

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

FACULTAD DE POSGRADOS

INFORME DE INVESTIGACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGIA

TEMA:

CIRCULACIÓN DE FLAVIVIRUS EN MURCIÉLAGOS Y ROEDORES
SINANTRÓPICOS EN LA PROVINCIA DEL GUAYAS

AUTORES:

CINDY TATIANA NACIPUCHA GONZÁLEZ
JOHANNA VANESSA PARRALES VALDIVIEZO

DIRECTOR:

ING. LUIS EDUARDO CAGUA MONTAÑO, MSC.

Milagro, 2024

Derechos de Autor

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, **Johanna Vanessa Parrales Valdiviezo** y **Cindy Tatiana Nacipucha González**, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de Magíster en Biotecnología, como aporte a la Línea de Investigación Salud Pública y Bienestar Humano Integral de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Proyecto de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 31 de octubre del 2024

Johanna Vanessa Parrales Valdiviezo

C.I.: 0925889768

Cindy Tatiana Nacipucha González

C.I.: 0924870595

Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación

Yo, **Luis Eduardo Cagua Montaña** en mi calidad de tutor del trabajo de titulación, elaborado por **Johanna Vanessa Parrales Valdiviezo** y **Cindy Tatiana Nacipucha González**, cuyo tema es **Circulación de Flavivirus en murciélagos y roedores sinantrópicos en la provincia del Guayas**, que aporta a la Línea de Investigación Salud Pública y Bienestar Humano Integral de conformidad, previo a la obtención del Grado **Magíster en Biotecnología**. Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 31 de octubre del 2024

Ing. Luis Eduardo Cagua Montaña, MSc.

C.I.: 0924773559

Aprobación del tribunal calificado



VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO FACULTAD DE POSGRADO CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **LIC. NACIPUCHA GONZALEZ CINDY TATIANA**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "CIRCULACIÓN DE FLAVIVIRUS EN MURCIÉLAGOS Y ROEDORES SINANTRÓPICOS EN LA PROVINCIA DEL GUAYAS ", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	59.77
SUSTENTACIÓN	39.67
PROMEDIO	99.43
EQUIVALENTE	Excelente



MARIA FERNANDA
GARCES MONCAYO

Msc GARCES MONCAYO MARÍA FERNANDA
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



ALEXANDRA GABRIELA
VALENZUELA COBOS

VALENZUELA COBOS ALEXANDRA GABRIELA
VOCAL



JUAN DIEGO
VALENZUELA COBOS

Ph.D. VALENZUELA COBOS JUAN DIEGO
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

Aprobación del tribunal calificador



VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO FACULTAD DE POSGRADO CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **LIC. PARRALES VALDIVIEZO JOHANNA VANESSA**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "CIRCULACIÓN DE FLAVIVIRUS EN MURCIÉLAGOS Y ROEDORES SINANTRÓPICOS EN LA PROVINCIA DEL GUAYAS ", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	59.77
SUSTENTACIÓN	39.67
PROMEDIO	99.43
EQUIVALENTE	Excelente



MARIA FERNANDA
GARCÉS MONCAYO

Msc GARCÉS MONCAYO MARÍA FERNANDA
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



ALEXANDRA GABRIELA
VALENZUELA COBOS

VALENZUELA COBOS ALEXANDRA GABRIELA
VOCAL



JUAN DIEGO
VALENZUELA COBOS

Ph.D. VALENZUELA COBOS JUAN DIEGO
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

Dedicatoria

Este trabajo de Titulación lo dedicamos a Dios, por ser nuestra guía y luz en cada paso de este camino académico. A nuestros padres, que, con su amor incondicional y el apoyo constante, nos brindaron la fortaleza y las herramientas necesarias para seguir adelante y culminar nuestros estudios satisfactoriamente. Finalmente, a nuestros amigos Richard y Tatiana quienes fueron nuestro refugio en los momentos de duda y nuestra alegría en los de éxito. Como muestra de gratitud por su confianza en nosotras y por cada lección impartida., les dedicamos este logro con todo nuestro cariño.

Cindy Nacipucha González

Johanna Parrales Valdiviezo

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento a Dios por darnos la fuerza y la constancia para culminar nuestras metas académicas. A nuestros colegas y compañeros del INSPI: Alberto, Silvia, Martha, Mary, Andrés, Paul, Diego y Kenneth, quienes nos brindaron los conocimientos y recursos necesarios a lo largo de este proceso. Su guía, dedicación y entusiasmo por la enseñanza han sido invaluableles en cada etapa de la realización de esta tesis. Agradecemos sinceramente a todas las personas que colaboraron indirectamente, facilitándonos su apoyo y guiándonos a lo largo de este camino. Sin su ayuda, este trabajo no habría sido posible. Este logro es el reflejo del esfuerzo colectivo y del compromiso de todos aquellos que han estado a nuestro lado.

Cindy Nacipucha González

Johanna Parrales Valdiviezo

Resumen

Los Flavivirus son virus de ARN transmitidos por mosquitos, causantes de enfermedades como la Fiebre Amarilla, Dengue y Zika. Esta investigación fue realizada en la provincia del Guayas, Ecuador; se centró en identificar la presencia de Flavivirus en muestras de tejido hepático de murciélagos y roedores sinantrópicos, así también la identificación de las especies que actúan como reservorios del virus. La metodología incluyó un diseño descriptivo y cuantitativo utilizando la técnica RT-PCR anidada con iniciadores y sondas específicas de la región NS5 del virus que amplifica un fragmento de 143 pares de bases (pb). Se realizó la extracción de ARN de un total de 150 muestras, de los cuales 128 eran murciélagos y 22 roedores. Los resultados indicaron que 15 muestras (10% de la población total) resultaron positivas, las cuales correspondientes a murciélagos capturados en Guayaquil y Manglar churute. La prevalencia de Flavivirus en murciélagos fue del 11,7%, siendo los 15 casos positivos de la especie *Molossus molossus*. El porcentaje de positivos encontrados confirman que los murciélagos podrían desempeñar un papel significativo como reservorios de estos virus en la región, mientras que los roedores parecen no estar involucrados en su transmisión ya que no se encontraron casos positivos.

Palabras claves: Flavivirus, reservorio, murciélagos, roedores sinantrópicos, transmisión zoonótica, RT-PCR anidada.

Abstract

Flaviviruses are RNA viruses transmitted by mosquitoes, responsible for diseases such as Yellow Fever, Dengue, and Zika. This research was conducted in the province of Guayas, Ecuador, and focused on identifying the presence of Flaviviruses in liver tissue samples from synanthropic bats and rodents, as well as identifying the species that act as virus reservoirs. The methodology included a descriptive and quantitative design using nested RT-PCR techniques with specific primers and probes targeting the NS5 region of the virus, amplifying a 143 base pair (bp) fragment. RNA extraction was performed on a total of 150 samples, of which 128 were from bats and 22 from rodents. Results indicated that 15 samples (10% of the total population) tested positive, all corresponding to bats captured in Guayaquil and Manglar Churute. The prevalence of Flaviviruses in bats was 11.7%, with all 15 positive cases identified in the species *Molossus molossus*. The percentage of positive cases confirms that bats may play a significant role as reservoirs of these viruses in the region, while rodents appear uninvolved in their transmission as no positive cases were found.

Keywords: Flavivirus, reservoir, bats, synanthropic rodents, zoonotic transmission, nested RT-PCR

Lista de Figuras

Figura 1	<i>Vías de transmisión de murciélagos o roedores a humanos.....</i>	20
Figura 2	<i>Distribución de la riqueza viral zoonótica en murciélagos y roedores</i>	22
Figura 3	<i>Estructura de los Flavivirus</i>	26
Figura 4	<i>Genoma del Flavivirus</i>	27
Figura 5	<i>Ciclo de transmisión de los Flavivirus</i>	31
Figura 6	<i>Distribución geográfica de la población.....</i>	45
Figura 7	<i>Presencia de Flavivirus por especie en murciélagos</i>	46
Figura 8	<i>Distribución de positivas a Flavivirus por sexo.....</i>	48

Lista de Tablas

Tabla 1	<i>Variable independiente</i>	9
Tabla 2	<i>Variable dependiente</i>	9
Tabla 3	<i>Virus que pertenecen a la Familia Flaviviridae</i>	23
Tabla 4	<i>Características ecológicas y biológicas</i>	36
Tabla 5	<i>Especies de roedores incluidas en el estudio</i>	42
Tabla 6	<i>Especies de murciélagos incluidas en el estudio</i>	43
Tabla 7	<i>Zona de captura positivos a Flavivirus en murciélagos</i>	47

Lista de Anexos

Anexo A. Termociclador Punto Final: Equipo Empleado para la RT-PCR anidada..	71
Anexo B. Preparación de Geles de Agarosa al 2%.....	72
Anexo C. Visualización del producto de amplificación de 143pb de Flavivirus	72
Anexo D. Controles positivos para Flavivirus: Resultados de la PCR Tiempo Real de los Serotipos de Dengue, Fiebre Amarilla, Zika, Virus de Encefalitis de San Luis. ...	73

Índice / Sumario

Derechos de Autor	ii
Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación	iii
Dedicatoria	vi
Agradecimientos	vii
Resumen.....	viii
Introducción.....	1
CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación	5
1.1 Planteamiento del problema.....	5
1.2 Delimitación del problema.....	7
1.3 Formulación del problema.....	7
1.4 Preguntas de investigación	7
1.5 Objetivos	8
1.5.1 Objetivo general	8
1.5.2 Objetivos específicos.....	8
1.6 Hipótesis	8
1.7 Justificación.....	8

1.8	Declaración de las variables	10
CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial		12
2.1	Antecedentes Referenciales	12
2.1.1	Virus asociados a Roedores y Murciélagos.....	15
2.2	Marco Conceptual	17
2.2.1	Reservorio	17
2.2.2	Vector	18
2.2.3	Huésped	18
2.2.4	Zoonosis.....	19
2.2.4.1	Riqueza viral zoonótica en murciélagos y roedores.....	23
2.2.5	Generalidades de los Flavivirus.....	24
2.2.5.1	Estructura de los Flavivirus	27
2.2.5.2	Ciclo de transmisión de los Flavivirus	31
2.2.5.3	Detección de Flavivirus por Técnicas Moleculares	35
CAPÍTULO III: Diseño Metodológico		38
3.1	Tipo y diseño de investigación	38
3.2	La población y la muestra	38

3.2.1	Característica de la población	39
3.2.2	Delimitación de la población	40
3.2.3	Tamaño de la muestra.....	40
3.2.4	Tipo de la muestra.....	40
3.2.5	Proceso de selección de la muestra.....	40
3.3	Los métodos y las técnicas	41
3.3.1	Procesamiento de la muestra.....	41
3.3.1.1	Extracción de ARN total.....	41
3.3.1.2	RT-PCR anidada genérica gen NS5 (fragmento de 143 pb).....	42
3.3.1.3	Migración electroforética.....	44
3.4	Procesamiento estadístico de la información.....	44
CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados.....		45
4.1	Especies incluidas en el estudio	45
4.2	Zonas de muestreo	47
4.3	Presencia de Flavivirus	48
4.3.1	Presencia de Flavivirus por especie	49
4.3.2	Presencia de Flavivirus por Zonas	50

4.3.3	Presencia de Flavivirus por sexo.....	51
CAPÍTULO V: Discusión, Conclusiones y Recomendaciones.....		52
5.1	Discusión	52
5.2	Conclusiones.....	55
5.3	Recomendaciones	56
Referencias		58
Anexos		75

Introducción

La información actual sobre la circulación de los Flavivirus en murciélagos y roedores y su potencial para actuar como reservorios en el Ecuador es limitada. Las enfermedades causadas por estos virus representan una preocupación mundial, ya que los flavivirus están implicados en brotes epidémicos y tienen la capacidad de adaptarse a nuevos hospedadores incluidos los humanos.

La familia Flaviviridae comprende aproximadamente 60 especies de virus diferentes, y se encuentra conformada por varios géneros, de los cuales, 53 especies corresponden al género Flavivirus, entre ellos, los de mayor importancia en la salud pública son los virus dengue (DENV), encefalitis de San Luis (SLEV), fiebre amarilla (YFV), Nilo Occidental (WNV) y Zika (ZIKV). (Cardozo et al., 2021). Los Flavivirus se dividen en dos grupos: los transmitidos por mosquitos y los transmitidos por garrapatas. Aquellos que no tienen un vector conocido se pueden dividir en dos categorías: los que están asociados con murciélagos y los que están relacionados con roedores. (Argaez-Sierra et al., 2024).

Wang et al. (2024) menciona que los murciélagos y roedores desempeñan un papel relevante como reservorios virales por sus características inmunológicas y la interacción con humanos, destaca la diversidad y el intercambio genético viral en estos animales facilita la adaptación a nuevos hospedadores incluyendo los humanos, lo que podría contribuir a la aparición de enfermedades zoonóticas.

Los murciélagos, forman parte del orden Chiroptera, son mamíferos voladores y sociables. A nivel mundial, hay más de 1400 especies (Federici et al.,

2022), de los cuales siete de estas especies son especialmente adaptables a los ambientes urbanos: *Desmodus rotundus*, *Anoura peruana*, *Sturnira bidens*, *S. erythromos*, *S. oporaphilum*, *Tadarida brasiliensis* y *Myotis oxyotus* (Tirira & Burneo, 2012). Viven en áreas influenciadas por los humanos y suelen encontrar una gran variedad de hábitats, tales como fisuras en las casas, túneles, alcantarillas, grietas en suelos o rocas, y cualquier refugio oscuro y protegido de las inclemencias del clima (Meierhofer et al., 2024); estos sitios facilitan la proliferación de enfermedades debido a sus condiciones de temperatura y humedad, convirtiendo a los murciélagos en reservorios de microorganismos como virus, bacterias, protozoos y hongos, lo que puede provocar enfermedades en otras especies.

Según Machain-Williams et al. (2013) el papel de los murciélagos en la transmisión y ecología del dengue, virus del Nilo occidental y encefalitis de san luis no se entiende completamente, sin embargo, otros estudios han demostrado que algunas especies de murciélagos pueden infectarse con estos virus y actuar como reservorios; así como lo describe Epstein et al. (2010) en un estudio realizado en Bangladesh en el cual se descubrió un nuevo flavivirus GBV-D en murciélagos frugívoros.

McFarlane et al. (2012) menciona que los roedores son reservorios naturales de enfermedades infecciosas. Participan en el ciclo infeccioso de numerosas enfermedades zoonóticas de importancia a nivel mundial y nacional, ya sea como reservorios, hospederos intermediarios u hospederos de los ectoparásitos vectores que transmiten a los agentes etiológicos (Torres-Castro., 2017). En estudios recientes como el de Sánchez-Soto et al. (2024), se identificó la presencia de

patógenos en roedores como *Rattus rattus* y *Mus musculus* recolectados en áreas rurales, que resultaron positivos para varios virus, entre ellos el dengue (DENV2, DENV4), el virus de la encefalitis de San Luis (SLEV), el virus de la fiebre amarilla (YFV) y el virus del Nilo Occidental (WNV).

La PCR de transcripción inversa (RT-PCR) es un método ampliamente utilizado para la detección e identificación de genomas de microorganismos, siendo especialmente efectiva para detectar flavivirus, lo que ha llevado a su aplicación en numerosos laboratorios. Estos virus poseen un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo, que varía entre 9,2 y 11 kbp, y codifica tres proteínas estructurales (C, prM y E) junto con siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). (Daidoji et al., 2021). La proteína más grande y conservada entre las proteínas de flavivirus transmitidos por vectores es la proteína NS5 (Blahove & Carter, 2021).

En un estudio realizado por He et al. (2021), se analizaron secuencias virales en muestras de tejido hepático de roedores y murciélagos, se identificaron secuencias de flavivirus y por primera vez se reportó la detección de secuencias asociadas con el virus Zika en roedores.

En base a la problemática de los flavivirus y su posible interacción con los roedores y murciélagos, este estudio se propone investigar la circulación de Flavivirus en muestras de estos animales recolectados en diferentes áreas de la provincia del Guayas, Ecuador. A través de la detección molecular se busca determinar el papel de estos mamíferos como posibles reservorios potenciales,

contribuyendo al entendimiento de la ecología de estos virus en la región y su posible impacto en la salud pública.

CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación

1.1 Planteamiento del problema

Zhao et al. (2021) considera al género de los flavivirus uno de los virus que han infectado a personas en la mayoría de las regiones del mundo. Existen más de 40 flavivirus que son patógenos para los seres humanos y otros vertebrados, provocando una variedad de enfermedades clínicas que van desde enfermedades febriles leves hasta encefalitis grave y/o fiebre hemorrágica. (Alkan et al., 2015)

Morales (2021), indica que el 50% de los flavivirus son transmitidos por mosquitos, el 28% por garrapatas y el 22% por artrópodos de vector desconocido o son transmitidos por roedores o murciélagos. El virus de la fiebre amarilla (YFV), los serotipos del virus del dengue 1-4 (DENV-1 a DENV-4), el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus del Nilo occidental (WNV) y el virus de la encefalitis transmitida por las garrapatas (TBEV) son flavivirus relacionados con infecciones humanas transmitidas por mosquitos y garrapatas causantes de morbilidad y mortalidad en el mundo. (Carrera & Navarro, 2022)

Un estudio realizado por Torres et al. (2017) en México, Yucatán mostraron una positividad para flavivirus del 33.3% en roedores del género *Rattus rattus*, y en la revisión realizada por Kading et al (2016) en la que describe la alta seroprevalencia de anticuerpos de zika en murciélagos de Uganda, nos muestran un antecedente del potencial que pueden desarrollar estas especies como posibles reservorios de estos virus.

Santos et al. (2023) manifiestan que, a nivel de América Latina, se reportan millones de casos de dengue cada año debido a la presencia constante de sus vectores. De acuerdo con Soni et al. (2023), el virus del zika ha sido especialmente preocupante debido a su impacto en las mujeres embarazadas, ya que puede causar microcefalia en los recién nacidos, un defecto congénito severo que se asocia con una mala formación del cerebro del feto. En menor medida, se ha registrado la presencia de fiebre amarilla, aunque es endémica en América del Sur y África, sigue siendo una preocupación significativa para la salud pública global, a pesar de contar con una vacuna efectiva. (de Oliveira et al.,2020). Por otro lado, flavivirus menos comunes en América Latina, como la encefalitis japonesa y la fiebre del Nilo Occidental, han mostrado una menor prevalencia, factores como la globalización y el cambio climático podrían facilitar la introducción y el establecimiento de estas infecciones en la región. (World Health Organization, 2023)

En Ecuador, las enfermedades transmitidas por flavivirus han tenido un impacto considerable en la salud pública. De acuerdo a la Gaceta Epidemiológica (2024), el país experimentó un aumento significativo en los casos de dengue, con 27,838 casos reportados en 2023, incrementándose a 44,103 hasta la semana epidemiológica de 2024. En cuanto a la fiebre amarilla, se registraron tres casos en 2017 y un caso en 2024, este último en un paciente proveniente de Colombia. Mientras que el último caso de Zika en el país se reportó en 2018, y no se han registrado nuevos casos desde entonces.

En la provincia del Guayas, el dengue ha sido una de las enfermedades más prevalentes y preocupantes. El Ministerio de Salud Pública (2024), en los últimos

cinco años ha registrado un gran número de casos: aproximadamente 3,200 en 2019, con un aumento a 4,500 en 2020; en 2021, los casos disminuyeron a 3,800, pero volvieron a subir a 4,200 en 2022 y a 5,100 en 2023. Hasta junio de 2024, se han reportado 4,965 casos, lo que indica una alta incidencia en esta provincia.

En este contexto se destaca la necesidad de contar información sobre la circulación de flavivirus en murciélagos y roedores en Ecuador y de cómo estos podrían desempeñar un papel como posible reservorio de estos virus.

1.2 Delimitación del problema

El estudio se enfocó en conocer la circulación de flavivirus en murciélagos y roedores sinantrópicos de la provincia del Guayas, tomando en cuenta el impacto que pueden tener estas especies como posibles reservorios, y su contribución en la propagación del virus.

1.3 Formulación del problema

En el contexto de las enfermedades causadas por los Flavivirus y ante la escasa información sobre la circulación de estos virus en murciélagos y roedores como posibles reservorios, surge la necesidad de investigar la exposición de estas especies a los Flavivirus, ya que su interacción con los vectores principales podría facilitar la propagación viral

1.4 Preguntas de investigación

¿Con que frecuencia se encuentra Flavivirus en murciélagos y roedores en zonas urbanas y rurales de la provincia del Guayas?

¿Cuáles son las principales especies de murciélagos y roedores que actúan como posibles reservorios de flavivirus, y cómo varía la prevalencia de estos virus entre las diferentes especies?

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Determinar la presencia de flavivirus en murciélagos y roedores sinantrópicos en la provincia del Guayas.

1.5.2 Objetivos específicos

- Efectuar la identificación de Flavivirus en murciélagos y roedores mediante la técnica RT-PCR anidada.
- Establecer la prevalencia de flavivirus en murciélagos y roedores.
- Clasificar las principales especies de murciélagos y roedores que actúan como posibles reservorios de flavivirus.

1.6 Hipótesis

Los murciélagos y roedores de la provincia del Guayas actúan como posibles reservorios de flavivirus debido a su diversidad y capacidad para alojar estos virus.

1.7 Justificación

Los flavivirus comprenden patógenos como el dengue, el zika y la fiebre amarilla, los cuales son responsables de enfermedades significativas en la región. Al

entender mejor los reservorios, se pueden desarrollar y aplicar mejores estrategias para controlar y prevenir brotes, estableciendo sistemas de vigilancia más robustos y dirigidos. Esto no solo permite una detección temprana de brotes potenciales, sino que también facilita una respuesta rápida y efectiva, minimizando el impacto en la población humana. Los flavivirus tienen a propagarse, emerger y establecerse en nuevas áreas geográficas y por lo tanto, cualquier zona puede tener el potencial de surgir inesperadamente, sobre todo si aparecen vectores y huéspedes vertebrados adecuados (Mackenzie & Williams, 2009)

La diversidad de virus zoonóticos asociados con roedores y murciélagos resalta la complejidad de las interacciones entre los seres humanos y la vida silvestre. La presente investigación permite identificar como posibles reservorios naturales de flavivirus a los murciélagos y roedores sinantrópicos en la provincia del Guayas proporcionando una mejor comprensión de la dinámica de transmisión del virus en entornos urbanos y periurbanos.

Los roedores, por su abundancia y adaptación a ambientes periurbanos, se encuentran frecuentemente en proximidad a las comunidades humanas, lo que aumenta las oportunidades de transmisión de enfermedades. Por otro lado, los murciélagos presentan una distribución geográfica extensa y comportamientos sociales que facilitan la propagación de virus, convirtiéndolos en actores clave en la dinámica de las zoonosis. Estos grupos de animales, debido a sus características biológicas y ecológicas, actúan como reservorios eficientes de una amplia gama de patógenos permitiendo que el virus permanezca en el ecosistema, incluso en ausencia de brotes en humanos. Esto significa que, aunque no haya casos

humanos reportados, el virus puede estar presente en la naturaleza, esperando la oportunidad para volver a infectar a las poblaciones humanas cuando las condiciones sean favorables. Esta interrelación entre humanos, roedores y murciélagos no solo pone de manifiesto la importancia de estudiar estos patógenos, sino que también subraya la necesidad de implementar estrategias de vigilancia y el control de los reservorios para prevenir la reemergencia de brotes de flavivirus (Gallegos-López, 2024)

1.8 Declaración de las variables

Tabla 1

Variable independiente

Variable	Operatividad	Medición	Indicador
Especies de murciélagos y roedores	Identificación de las especies capturadas	Registro taxonómico de especies capturadas mediante observación directa	Base de datos con número y tipo de especies identificadas

Tabla 2

Variable dependiente

Variable	Operatividad	Medición	Indicador
Presencia de Flavivirus	Aplicación de la técnica de RT-PCR anidada	Detección del producto de 143pb de la región NS5 de flavivirus.	Porcentaje de muestras positivas

			para
			flavivirus
Prevalencia	Determinación de		Tasa de
de Flavivirus	la proporción de	Cálculo del número de	prevalencia
en	individuos positivos	casos positivos de flavivirus	de flavivirus
murciélagos	para flavivirus en	para el total de murciélagos	en
y roedores	murciélagos y	y roedores	murciélagos
	roedores		y roedores

CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial

2.1 Antecedentes Referenciales

La transmisión por virus ha estado presente a lo largo de la historia humana, los cuales han sido influenciados por factores demográficos, tecnológicos y climáticos. Desde las primeras epidemias en la antigüedad hasta las pandemias modernas, el movimiento de personas, animales y bienes ha facilitado la propagación de enfermedades infecciosas con consecuencias devastadoras (Diomedi, 2003).

En tiempos premodernos, acontecimientos como la colonización, esclavitud y las diversas guerras han sido un hito determinante para la diseminación global de enfermedades infecciosas como la tuberculosis, la poliomielitis, la viruela y la difteria las cuales se propagaron ampliamente, causando una morbilidad y mortalidad significativas antes de la llegada de las vacunas. Las rutas comerciales y los ejércitos en movimiento también facilitaron la diseminación de enfermedades animales, como la peste bovina, que afectaron gravemente al ganado y a las poblaciones humanas dependientes (Álvarez & Murillo, 2021).

La viruela, provocada por el virus *Variola*, también tuvo un impacto significativo, con tasas de mortalidad del 20% al 30%. Fue erradicada en 1980 mediante una campaña de vacunación global liderada por la OMS (Apaza, 2021). El sarampión, causado por el *Morbillivirus*, originado posiblemente de un virus de ganado, sigue siendo una amenaza a pesar de los esfuerzos de vacunación, estableciendo la importancia de las interacciones zoonóticas en la propagación de

enfermedades (Lüthy & Kantor, 2020). De manera similar, los procesos de colonización en la conquista de América a partir del siglo XV tuvieron un impacto devastador en las poblaciones indígenas debido a la introducción de enfermedades zoonóticas y otras enfermedades infecciosas. Los colonizadores europeos trajeron consigo patógenos a los cuales las poblaciones indígenas no tenían inmunidad, lo que resultó en epidemias mortales.

Los arbovirus, término que hace referencia a los virus transmitidos por artrópodos, son patógenos que se propagan mediante vectores y tienen el potencial de provocar brotes graves, impactando a poblaciones enteras y representando un peligro considerable para la salud pública a nivel mundial. (Cabezas et al., 2024)

En las últimas décadas, varias enfermedades transmitidas por vectores han mostrado un incremento notable, entre ellas el paludismo (malaria), el dengue, la esquistosomiasis, la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño, la leishmaniasis, la fiebre amarilla, la encefalitis japonesa, el zika y el chikungunya. Un aspecto común entre estas enfermedades es que afectan considerablemente a los países subdesarrollados o en vías de desarrollo, donde sus tasas de morbilidad y mortalidad son considerablemente más altas. (Torres-Castro et al., 2020). Un estudio llevado a cabo por Intriago et al., (2023) reveló que, de 200 personas encuestadas, el 24% manifestó haber padecido alguna enfermedad transmitida por vectores, siendo el dengue el más prevalente, afectando al 66.66% de ese grupo. Además, entre el 26% de los familiares y conocidos de los encuestados que también

habían sufrido este tipo de enfermedades, el 77.35% correspondió a casos de dengue.

Baker et al., (2022) sostiene que existen diversos elementos que han generado la propagación de enfermedades zoonóticas. Entre los elementos más destacados se tiene al comercio de vida silvestre, el cual ha sido identificado como una fuente importante de patógenos zoonóticos; los viajes en avión, los cuales facilitan la rápida diseminación de estos patógenos a nivel global, permitiendo que brotes localizados se conviertan en pandemias en cuestión de días; el calentamiento global, lo que ha provocado una alteración en los ecosistemas y los rangos geográficos de muchas especies.

Sin embargo, una de las principales causas de propagación se puede contribuir al crecimiento desmesurado de la población, seguido de una mala planificación urbanística, en donde, no se ha realizado un adecuado control de fuentes hídricas ni cuidado con la vegetación. La urbanización ha destruido gran parte del hábitat natural de los murciélagos y, en respuesta, muchas especies utilizan cada vez más los edificios como refugios (Jackson et al., 2024). Además, factores como la deforestación y la destrucción de hábitats obligan a los animales a buscar refugio y alimento en áreas habitadas por humanos, generado una migración de diversas especies a las zonas urbanas, aumentando el contacto entre humanos y animales. A su vez, la densidad poblacional en las ciudades también facilita la rápida propagación de enfermedades, agravando la situación elevando aún más el riesgo de brotes zoonóticos (Geronimo & Capani, 2023)

2.1.1 Virus asociados a Roedores y Murciélagos

La mayoría de los patógenos virales zoonóticos emergentes y reemergentes son virus de ARN (Onyok et al., 2019). Los hantavirus son un grupo de virus ARN que se transmiten a los humanos principalmente a través del contacto con excreciones de roedores infectados, como la orina, las heces y la saliva. Estos virus pueden causar dos enfermedades graves en humanos: el síndrome pulmonar por hantavirus y la fiebre hemorrágica con síndrome renal. (Hantavirus, 2009).

Los arenavirus son otro grupo de virus ARN que se transmiten a los humanos a través del contacto con excreciones de roedores infectados. El virus de Lassa es un arenavirus del Viejo Mundo y es responsable de la fiebre de Lassa que es una enfermedad hemorrágica grave que causa brotes anuales en África occidental con una alta tasa de mortalidad entre los pacientes que presentan síntomas. De manera similar, el virus Junín perteneciente a los arenavirus del Nuevo Mundo es el causante de la fiebre hemorrágica argentina, una condición mortal con serias implicaciones para la salud pública (Saito et al., 2023). Los roedores actúan como reservorios naturales de estos virus, y la transmisión a humanos suele ocurrir cuando las personas entran en contacto con áreas contaminadas por excreciones de roedores (Lujan & Quiñones, 2023).

Los coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) son dos virus ARN que han causado brotes significativos de enfermedades respiratorias graves en humanos. El SARS-CoV, que emergió en China (Cui, Li, & Shi, 2019) y el MERS-CoV que apareció en Arabia Saudita (Zaki et al., 2012), se originaron en murciélagos y se

transmitieron a humanos a través de hospedadores intermediarios, como las civetas y los dromedarios, respectivamente. Estos virus causan enfermedades respiratorias graves con altas tasas de mortalidad y se propagan rápidamente a través del contacto humano cercano (Ramírez, 2023).

La rabia es una enfermedad viral que afecta el sistema nervioso central de los mamíferos, incluidos los humanos. El virus se encuentra principalmente en la saliva y el cerebro de animales infectados, su transmisión ocurre en la mayoría de los casos a través de la saliva de un animal enfermo especialmente de perros (Alfaro-Mora, 2023). Aunque los perros son los principales responsables de la transmisión de la rabia a humanos, en algunas regiones los murciélagos también son importantes vectores. Los murciélagos insectívoros y hematófagos pueden transmitir el virus de la rabia a través de mordeduras (de Thoisy et al., 2016). La rabia se puede prevenir mediante la vacunación postexposición, pero sigue siendo una amenaza significativa en muchas partes del mundo (Calderón & Cornejo, 2024).

Los filovirus, como el virus del Ébola y el virus de Marburg, son virus ARN altamente patogénicos que causan fiebre hemorrágica en humanos y otros primates. Se cree que los murciélagos frugívoros actúan como reservorios naturales de estos virus (Groseth & Hoenen, 2024). Los brotes de Ébola y Marburg han ocurrido principalmente en África subsahariana y se caracterizan por altas tasas de mortalidad y la capacidad de causar epidemias devastadoras. La transmisión a humanos puede ocurrir a través del contacto con fluidos corporales de animales infectados o mediante la manipulación de murciélagos o primates muertos (Gorgonho, 2024)

2.2 Marco Conceptual

2.2.1 Reservorio

Un reservorio natural se refiere al hospedador a largo plazo del patógeno de una enfermedad infecciosa. (LibreTexts, 2024). Es un organismo o entorno en el que un patógeno vive, se multiplica y persiste en el tiempo sin causar enfermedades significativas en dicho organismo, además actúan como fuentes persistentes de infección, permitiendo que el virus sobreviva en la naturaleza y sea transmitido a los vectores, que a su vez lo transmiten a los huéspedes susceptibles (Loaiza, Díaz, & Solis, 2020)

En relación con los flavivirus, diversos estudios han señalado a murciélagos, roedores y aves como los principales reservorios de estos virus. Estos animales pueden portar el virus sin mostrar síntomas clínicos, lo que facilita su transmisión a vectores como los mosquitos (Olival et al., 2020). La capacidad de los murciélagos para movilizarse grandes distancias y su vida social en colonias densas son factores que incrementan su importancia como reservorios de virus emergentes. Además, poseen un sistema inmunológico que les permite albergar virus sin sucumbir a las enfermedades que causan, lo que los convierte en reservorios eficientes. Además, su comportamiento social, como la formación de grandes colonias, facilita la transmisión de virus entre individuos y especies (Williams et al., 2021). Por su parte los roedores debido a su alta tasa reproductiva y proximidad a hábitats humanos, también son importantes reservorios. (Dahmana et al., 2020)

2.2.2 Vector

Los vectores son organismos vivos, usualmente artrópodos como mosquitos o garrapatas, que actúan como intermediarios en la transmisión de patógenos entre reservorios y huéspedes. El papel del vector es fundamental en la ecología de los flavivirus, ya que, sin un vector competente, la transmisión del virus entre los reservorios y los huéspedes no podría ocurrir. Los vectores, como los mosquitos, tienen una serie de características que los hacen altamente eficaces en la transmisión de estos virus (Ministerio de Sanidad, 2021).

En el caso de los flavivirus, los mosquitos, particularmente los del género *Aedes*, son los principales vectores responsables de la transmisión de virus como el Dengue y Zika (Loaiza, Díaz, & Solis, 2020). Estos mosquitos se infectan al alimentarse de un reservorio infectado, y posteriormente transmiten el virus al picar a un nuevo huésped susceptible. Según Gubler (2011), el control de los vectores, como la reducción de hábitats de mosquitos, es clave para prevenir enfermedades causadas por flavivirus. Estrategias como la reducción de hábitats donde los mosquitos se reproducen y la introducción de mosquitos modificados genéticamente han sido propuestas para controlar la propagación de virus (Centers for Disease Control and Prevention, 2024)

2.2.3 Huésped

El huésped es un organismo que puede ser infectado por un patógeno que pueden ser tanto animales como humanos; y dependiendo de su respuesta inmunitaria puede desarrollar la enfermedad. Entre los huéspedes vertebrados, los

flavivirus pueden infectar una variedad de especies, incluyendo aves y mamíferos. La capacidad del patógeno para saltar entre diferentes especies depende tanto de las características del virus como de las adaptaciones inmunológicas de los huéspedes.

En los ciclos zoonóticos de los flavivirus, los humanos pueden ser tanto huéspedes como reservorios, especialmente en ciclos de transmisión urbana, donde el virus se mantiene en la población humana a través de la picadura de mosquitos infectados (Echazarreta & Couto, 2024), por su parte Gouge et al. (2017) menciona que los humanos son infectados a través de la picadura de un mosquito que ha adquirido el virus de un reservorio infectado; sin embargo aunque los humanos son a menudo huéspedes incidentales o finales, aunque puedan desarrollar la enfermedad, no contribuyen a la transmisión del virus de vuelta a los vectores. La infección por flavivirus puede variar desde ser asintomática hasta causar enfermedades graves como fiebre hemorrágica, encefalitis y, en algunos casos, la muerte. La gravedad de la enfermedad depende de varios factores, incluidos la virulencia del virus, la respuesta inmune del huésped y la presencia de comorbilidades (Echazarreta & Couto, 2024).

2.2.4 Zoonosis

El término zoonosis proviene del griego "zoo" (animal) y "nosis" (enfermedad). Según la OMS (2020), se define como "Una enfermedad o infección que se transmite de forma natural de los animales vertebrados a los humanos". Estas enfermedades pueden ser causadas por una variedad de agentes patógenos, incluidos virus, bacterias, parásitos y hongos. Los virus zoonóticos, en particular,

han demostrado ser especialmente problemáticos debido a su capacidad para causar brotes masivos y pandemias por lo cual representan un importante desafío para la salud pública global ya que pueden ser transmitidas entre animales vertebrados y humanos. La probabilidad de transmisión zoonótica depende de la interacción de diversos factores, como la dinámica de la enfermedad en el reservorio huésped, la exposición al patógeno y los factores internos en los humanos que influyen en su vulnerabilidad a las infecciones (Plowright et al., 2017). Algunas zoonosis como la salmonelosis, el síndrome urémico hemolítico o la toxoplasmosis pueden ser transmitidas a través de alimentos o agua contaminada tal como indican Lampert y Porro (2021).

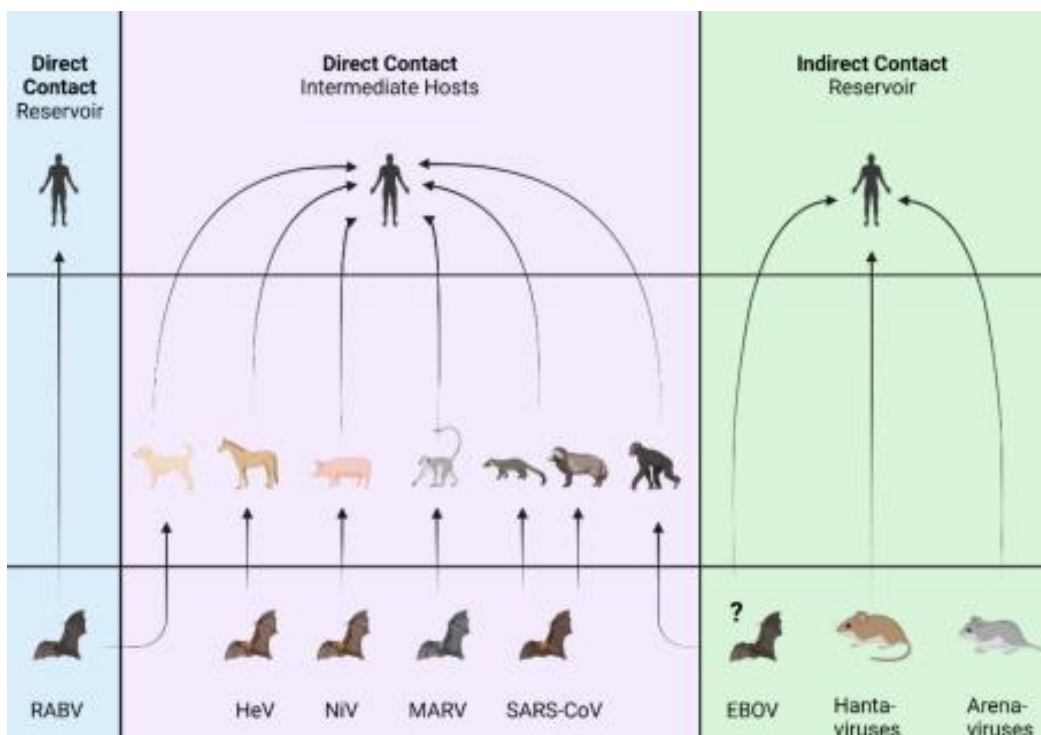
De esta manera, uno de los elementos clave en la propagación de los agentes zoonóticos son los virus ARN, un grupo de patógenos que utilizan el ácido ribonucleico (ARN) como material genético. (Woolhouse & Adair, 2013). Estos virus son especialmente relevantes en el estudio de las zoonosis debido a sus características únicas. En particular, los virus ARN presentan una alta tasa de mutación, lo que les permite adaptarse rápidamente a nuevos hospedadores y entornos. Esta capacidad de adaptación es una de las razones por las que muchos virus ARN pueden saltar entre especies, convirtiéndolos en agentes ideales para la transmisión zoonótica. Además, los virus ARN tienden a tener ciclos de replicación más rápidos que los virus ADN, lo que puede conducir a la rápida propagación de infecciones (Domingo, Sheldon, & Perales, 2012). Entre los virus ARN más conocidos que han causado zoonosis significativas se encuentran el virus del ébola, el virus de la gripe, y los flavivirus como el virus del dengue, fiebre amarilla, el virus

del zika y el virus del nilo occidental. Estos virus han causado brotes y pandemias que han tenido un impacto devastador en la salud pública (Antunez M. , 2020)

Por otra parte, autores como Williams, et al (2021), manifiestan que las enfermedades zoonóticas pueden transmitirse de los animales a los humanos a través de diversas vías ya sea mediante contacto directo con el reservorio, contacto directo con hospederos intermedios y contacto indirecto con el reservorio tal como se aprecia en la Figura 2.

Figura 1

Vías de transmisión de murciélagos o roedores a humanos



Reimpreso de Temas comunes en la propagación de enfermedades zoonóticas y la aparición de enfermedades: lecciones aprendidas de los virus ARN transmitidos por

murciélagos y roedores de Williams, E.P, et al, 2021, (<https://www.mdpi.com/1999-4915/13/8/1509>).

En el contacto directo con el reservorio, los humanos pueden adquirir virus al interactuar directamente con murciélagos o roedores infectados, ya sea por mordeduras, manipulación directa o inhalación de excrementos secos que contienen el virus (de Thoisy et al., 2016). Ejemplos de virus que se transmiten de esta manera incluyen el virus de la rabia, el *Hendra henipavirus*, el *Nipah henipavirus*, el *Marburg marburgvirus* y el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (Ministerio de Sanidad, 2021)

La segunda ruta es a través de contacto directo con hospederos intermedios. En esta ruta, los virus se transmiten primero a animales intermediarios, como caballos, cerdos o primates no humanos, antes de infectar a los humanos. Los humanos pueden contraer la enfermedad al tener contacto directo con estos animales intermediarios infectados (Chua, 2003). Virus como el *Hendra henipavirus*, el *Nipah henipavirus*, el *Marburg marburgvirus* y el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo pueden seguir esta vía de transmisión.

La tercera ruta es el contacto indirecto con el reservorio, que incluye la inhalación de partículas virales en el aire o el contacto con superficies contaminadas por excreciones de murciélagos o roedores. (Jackson et al., 2024). Los virus como el *ebolavirus*, los *hantavirus* y los *arenavirus* pueden transmitirse de esta manera, contaminando alimentos, agua u objetos en el entorno humano, facilitando la transmisión del virus sin necesidad de un contacto directo con el animal infectado. Esta diversidad de rutas de transmisión resalta la complejidad y el desafío que

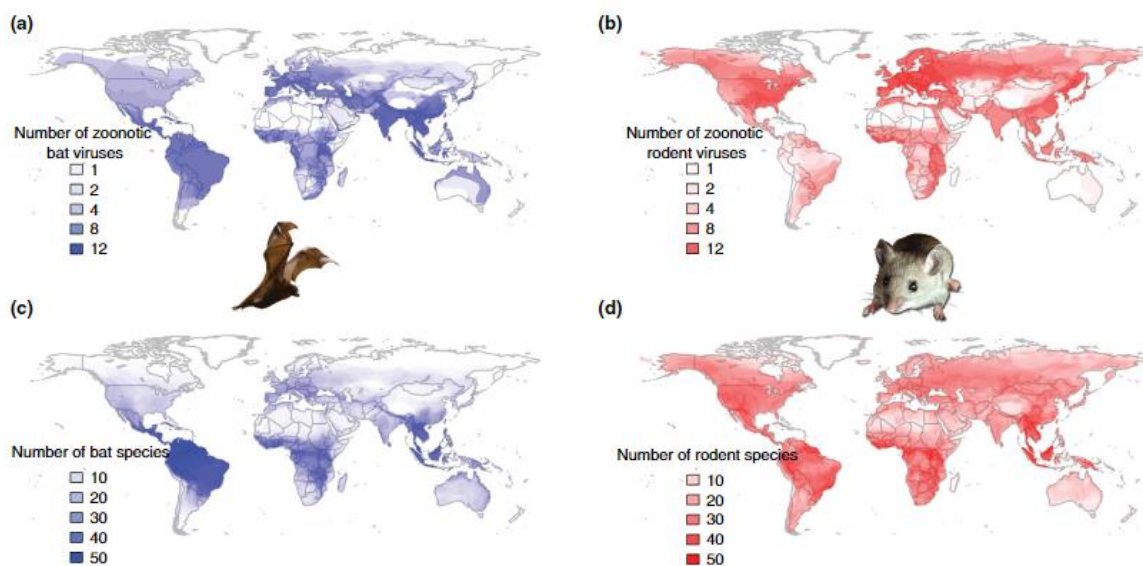
representa controlar y prevenir las enfermedades zoonóticas en la población humana (Antunez, 2020).

2.2.4.1 Riqueza viral zoonótica en murciélagos y roedores

En un estudio realizado por Luis, et al (2015), enfocado en la distribución mundial de la riqueza viral zoonótica y la diversidad de especies en murciélagos y roedores, se observó una alta concentración de virus zoonóticos en los murciélagos en varias regiones del mundo. A nivel internacional, las áreas con mayor incidencia de virus zoonóticos asociados a murciélagos incluyen África, América del Sur, el sudeste asiático y Europa.

Figura 2

Distribución de la riqueza viral zoonótica en murciélagos y roedores



Nota: Distribución de riqueza viral zoonótica (a) murciélagos, (b) roedores, (c) riqueza de especies de murciélagos y (d) roedores. Reimpreso de *Ecology Letters* de Luis et al. (2015, p. 1154).

Como podemos apreciar en la Figura 1, estos virus son diversos y numerosos debido a la alta diversidad de especies de murciélagos en estas regiones. Los murciélagos en América Central y del Sur, el sudeste asiático y algunas partes de África muestran una notable diversidad de especies, lo que contribuye a la alta riqueza viral. Esta diversidad y la capacidad de los murciélagos para desplazarse y migrar facilitan la transmisión de virus entre especies y potencialmente a humanos.

En el caso de los roedores, también se evidencia una alta concentración de virus zoonóticos en diversas partes del mundo. Las regiones con mayor incidencia incluyen África, América del Norte, América del Sur, el sudeste asiático y Europa. La alta diversidad de especies de roedores en estos países incrementa la probabilidad de transmisión de virus zoonóticos. Esta diversidad es particularmente prominente en América del Norte, América del Sur, África y el sudeste asiático, contribuyendo a la riqueza viral en estas áreas.

2.2.5 Generalidades de los Flavivirus

Los Flavivirus son un género de virus pertenecientes a la familia Flaviviridae que engloban 4 géneros y 89 especies y la mayoría de ellos son transmitidos a los humanos a través de artrópodos (Postler, et al., 2023). La mayoría de los flavivirus son virus zoonóticos, se mantienen en ciclos de transmisión enzoótica que involucran aves, roedores o primates no humanos como reservorios (Ver tabla 2), siendo generalmente los seres humanos los hospedadores finales.

Tabla 3*Virus que pertenecen a la Familia Flaviviridae*

Virus	Vector primario	Reservorio de vertebrados
Dengue 1,2,3,4	Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	humanos, monos
Encefalitis japonesa	Mosquito <i>culex</i>	aves
Encefalitis de San Luis	Mosquito <i>culex</i>	aves, cerdos
Virus del Nilo Occidental	Mosquito <i>culex</i>	aves
Fiebre amarilla	Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	humanos, monos
Fiebre hemorrágica de Omsk	Garrapata <i>dermacentor</i>	roedores
Encefalitis transmitida por garrapatas	Garrapata <i>Ixodes</i>	roedores, aves, animales domésticos
Enfermo de lupa	Garrapata <i>Ixodes</i>	ovejas, aves
Powassan	Garrapata <i>Ixodes</i>	pequeños mamíferos
Enfermedad del bosque de Kyansanur	Garrapata <i>Haemaphysalis</i>	roedores
Encefalitis del valle de Murray/ Kunjin Rocío	Mosquito <i>culex</i>	aves

Adaptado de Stanford University. *Flavivirus*. <https://virus.stanford.edu/flavi/table.html>

A nivel molecular, el género *Flavivirus* es un grupo monofilético que está dividido en tres clados: transmitidos por garrapatas, transmitidos por mosquitos y de

vector desconocido (Dutta & Langenburg, 2023). Razón por lo cual, los flavivirus representan un grupo significativo de patógenos que tienen un impacto considerable en la salud pública global y son responsables de diversas enfermedades en humanos, muchas de las cuales tienen una alta morbilidad y mortalidad. La epidemiología de los flavivirus muestra una distribución geográfica amplia, afectando tanto a regiones tropicales como subtropicales. En América Latina, enfermedades como el Dengue, el Zika y la Fiebre Amarilla han sido particularmente prevalentes, sobre todo en zonas de escasa pobreza, en donde existe presencia de depósitos de agua causando importantes brotes y afectando la vida de millones de personas (Oyarce & Nina, 2023).

A nivel global, los flavivirus tienen una distribución que abarca varios continentes, con una mayor incidencia en áreas donde las condiciones climáticas favorecen la presencia de vectores como los mosquitos. El Dengue es uno de los flavivirus más extendidos, reportado en 129 países y con más de 5 millones de casos y estimaciones de 5000 muertes. A nivel de América Latina, tiene una prevalencia de 4.1 millones lo que representa el 80% de casos a nivel mundial. Entre los países con mayor afectación se tiene Brasil, Ecuador, Perú, Colombia y México, y ha habido un incremento significativo en la incidencia de casos en las últimas décadas. Esto se debe principalmente a factores como el cambio climático o el fenómeno del niño (OMS, 2023).

El virus Zika, otro flavivirus de gran relevancia, se dio a conocer globalmente durante el brote de 2015-2016 que afectó principalmente a Brasil (Sharma et al., 2020). La OMS (2022) destaca que a pesar que los casos de Zika, disminuyeron

desde el 2017, se estima existen nuevos brotes a nivel mundial, con un reporte de 89 países en donde se ha desarrollado esta enfermedad La Fiebre Amarilla, aunque controlada en muchas áreas gracias a la vacunación, todavía representa una amenaza en regiones donde la cobertura vacunal es insuficiente y donde los vectores están presentes.

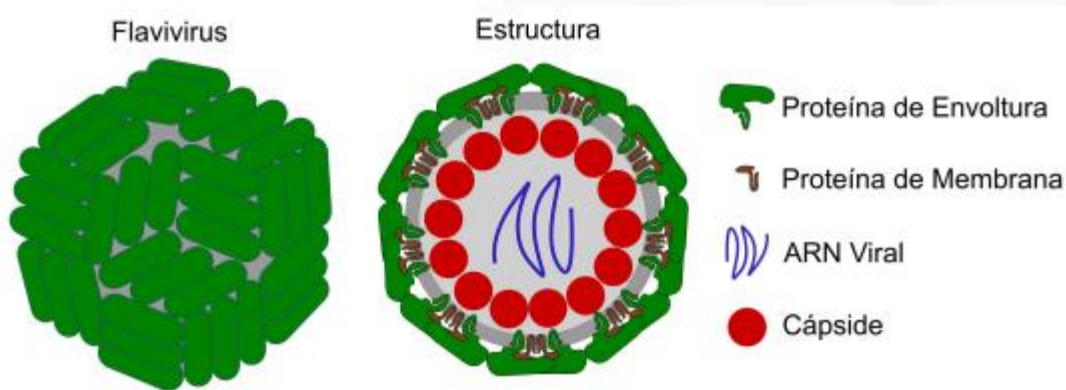
Autores como Gopar, et al (2018), manifiestan que los efectos de las infecciones por flavivirus en la salud humana son diversos y pueden variar desde enfermedades leves hasta condiciones severas que pueden ser fatales. Algunas de estas enfermedades pueden evolucionar en virtud de la condición de portador como es el caso del virus Zika en mujeres embarazadas provocando microcefalia en recién nacidos, así como otras anomalías neurológicas. Según la Organización Mundial de la Salud (2022) la Fiebre Amarilla una enfermedad de alto impacto y alta amenaza, con riesgo de propagación internacional, que representa una amenaza potencial para la seguridad sanitaria mundial.

2.2.5.1 Estructura de los Flavivirus

Son virus envueltos con genoma ARN. En la Figura 3 se observa que la envoltura está compuesta por una bicapa lipídica con dos tipos de proteínas virales, la proteína de envoltura, en forma de dímeros, y la proteína de membrana. La glicoproteína E es el principal determinante antigénico, media la unión y fusión del virus a la célula hospedadora. La proteína M se produce durante la maduración de las partículas virales en la vía secretoria de la célula hospedadora. Debajo de la envoltura está la cápside, constituida por la proteína de cápside y una única molécula de ARN genómico (Figuroa, 2023)

Figura 3

Estructura de los Flavivirus



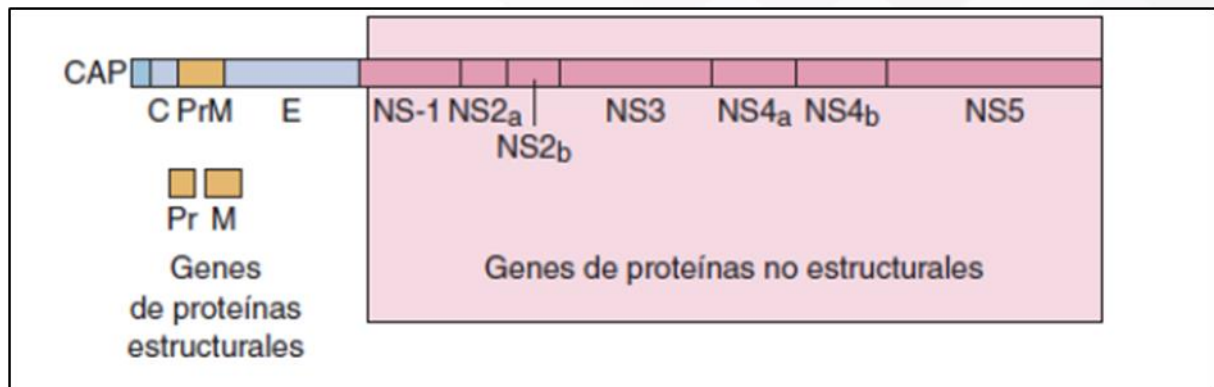
Reimpreso de Vías intracelulares de difusión de la proteína de cápside del virus del Dengue visualizadas por espectroscopías de correlación, por A. Luszczak, 2021, p. 7. Tesis de licenciatura, Universidad de Buenos Aires.(<https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/>)

El ARN genómico infeccioso es de cadena simple y polaridad positiva, con una longitud aproximada de 10,8 kb y un casquete tipo I (m7GpppAmpN2) en su extremo 5'. Este ARN codifica un único marco de lectura abierto (ORF), el cual está flanqueado por regiones no codificantes en sus extremos 3' y 5'. El ORF codifica una poliproteína que, a través del procesamiento proteolítico, se divide en proteínas estructurales y no estructurales.

La Figura 4 muestra como las proteínas estructurales (C-prM-E) se encuentran en el extremo N-terminal de la poliproteína, seguidas de las proteínas no estructurales (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-2K-NS4B-NS5).

Figura 4

Genoma del Flavivirus



Nota: Virus de Fiebre Amarilla. Reimpreso de Flavivirus y Alfavirus. *Hantavirus*. de Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina., 2023, p.04.

El procesamiento proteolítico de las regiones C/prM, prM/E, E/NS1 y 2K/NS4B es realizado por proteasas del hospedador, mientras que una serinproteasa viral se encarga del procesamiento de las proteínas NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/2K y NS4B/NS5. Sin embargo, la enzima que escinde la región NS1-2A aún no se ha identificado (Martínez & Urcuqui, 2017)

Las proteínas no estructurales tienen varias funciones importantes: NS1 está involucrada en la replicación del ARN, aunque su mecanismo exacto no está completamente claro. Esta proteína se encuentra en los sitios de replicación del ARN, y las mutaciones en los sitios de glicosilación del extremo N-terminal de NS1 causan defectos tanto en la replicación del ARN como en la producción de nuevas partículas virales. NS2A también se localiza en los sitios de replicación del ARN e interactúa con los componentes de la replicasa (NS3 y NS5), probablemente coordinando la transición entre el empaquetamiento y la replicación del ARN. Por su

parte, NS2B está asociada a la membrana y forma complejos con NS3, actuando como cofactor para la serinproteasa NS2B-NS3 (Shiryaev, et al., 2023)

El NS3 es una gran proteína multifuncional, contiene varias actividades necesarias para el procesamiento de la poliproteína y para la replicación del ARN. Su extremo N-terminal es el dominio catalítico de la serinproteasa NS2B-NS3, procesando las uniones entre las proteínas NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/NS5 y generando el extremo C-terminal de la proteína C madura y NS4A. Además, es responsable del procesamiento de sitios internos en NS2A y NS3. NS4A interactúa con NS1 formando complejos de replicación, mientras que NS4B co-localiza con NS3 y el ARN intermediario de doble hebra en los complejos de replicación. Finalmente, NS5 es la proteína de mayor tamaño del virus, está altamente conservada y tiene función metiltransferasa y ARN polimerasa ARN dependiente (Starvaggi & S, 2024)

La replicación viral según Parada (2020), comienza con la unión de la partícula viral a la célula a través de la proteína E. La entrada a la célula hospedadora es por endocitosis mediada por receptor. El bajo pH endosomal induce la fusión de la envoltura viral con las membranas de la vacuola endocítica. A continuación, se produce el desnudamiento de la nucleocápside y el ARN genómico es liberado al citoplasma. El ARN genómico cumple tres funciones en el ciclo viral: como ARN mensajero para la traducción de proteínas virales, como molde durante la replicación y como material genético a ser empaquetado en las nuevas partículas virales.

La traducción del ARN lleva a la síntesis de una única poliproteína de más de 3000 aminoácidos, la cual será procesada por proteasas virales y celulares. La replicación del genoma ocurre en complejos replicativos citoplasmáticos, asociados a membranas peri- nucleares y es a través de la síntesis de un ARN intermediario de polaridad negativa. La progenie de viriones se produce por brotamiento al retículo endoplásmico, allí continúan transitando por la vía secretoria de la célula hasta su liberación en la superficie celular (Arca, 2022)

2.2.5.2 Ciclo de transmisión de los Flavivirus

El ciclo de transmisión de los flavivirus es un proceso complejo que involucra la interacción entre múltiples factores, entre los cuales destacan los reservorios, vectores y huéspedes. Cada uno de estos elementos desempeña un papel importante en la persistencia y propagación de los flavivirus, que son un grupo de virus ARN transmitidos principalmente por vectores como mosquitos y garrapatas (Cardozo., et al 2021). El virus se replica en el cuerpo humano y puede ser transmitido a otros mosquitos si pican a la persona infectada, perpetuando así el ciclo de transmisión (Maringer, 2024)

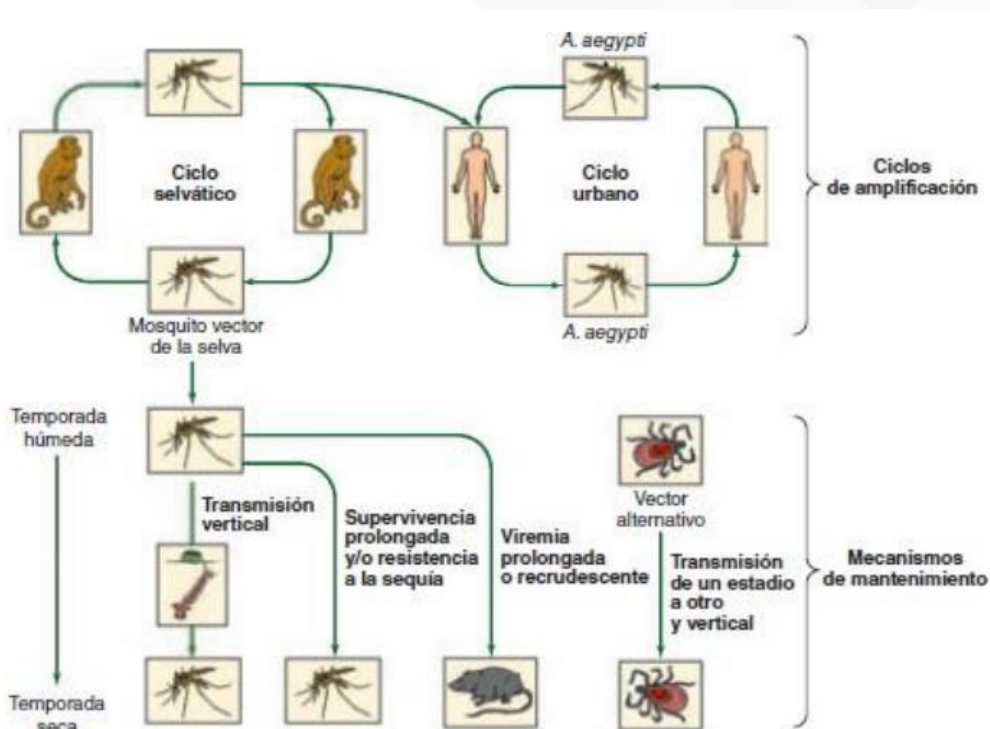
Además, Cardozo et al (2021) destaca que, la transmisión vectorial se realiza a partir de animales a humanos, como es el caso de la Fiebre Amarilla, la cual puede tener un ciclo de transmisión selvático, donde el virus circula entre primates no humanos y mosquitos en las selvas. Los humanos pueden ser infectados cuando ingresan a estas áreas y son picados por mosquitos infectados. A su vez, el virus Zika posee modos de transmisión no vectoriales, incluyendo la transmisión sexual y

de madre a hijo durante el embarazo, lo que añade otra capa de complejidad a su control y prevención.

El ciclo de transmisión de los flavivirus incluye tanto un ciclo selvático como un ciclo urbano, donde los mosquitos actúan como vectores en ambos casos. En el ciclo selvático, los primates no humanos son los principales huéspedes, mientras que, en el ciclo urbano, los humanos ocupan este papel. Durante la temporada seca, el virus se mantiene en la naturaleza mediante diversos mecanismos, como la transmisión vertical, la resistencia de los vectores y la viremia prolongada en roedores (ver Figura 5). Otros mecanismos incluyen la viremia prolongada o recrudesciente en ciertos animales, como los roedores o murciélagos, que pueden actuar como reservorios del virus, manteniéndolo activo durante largos períodos (Sanjuan, 2020).

Figura 5

Ciclo de transmisión de los Flavivirus



Nota: Representación del ciclo de transmisión tanto urbano como selvático.

Reimpreso de

Brooks(https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?legacysectionid=Brooks26_c38_tbl001)

La interacción entre reservorios, vectores y huéspedes en el ciclo de transmisión de los flavivirus crea un sistema altamente eficiente para la propagación del virus. Este ciclo puede ser difícil de interrumpir, especialmente en áreas donde las condiciones ecológicas y sociales favorecen la supervivencia y reproducción de los vectores, así como el contacto cercano entre humanos y reservorios animales. Por ejemplo, en muchas partes de América Latina y África, la urbanización no

planificada, la falta de acceso a agua potable y saneamiento adecuado, y las condiciones de pobreza extrema crean un ambiente ideal para la proliferación de mosquitos Aedes y la transmisión de flavivirus (Luis et al, 2015).

Interrumpir este ciclo requiere un enfoque integral que aborde cada componente del ciclo de transmisión. Esto incluye la vigilancia activa de los reservorios para detectar la presencia del virus en la naturaleza, el control de las poblaciones de vectores para reducir la transmisión, y la protección de los huéspedes a través de la vacunación y otras medidas preventivas. Además, es fundamental la educación comunitaria para aumentar la conciencia sobre los riesgos de los flavivirus y las medidas que se pueden tomar para reducir la exposición a los mosquitos (Gopar et al, 2018).

Del mismo modo, destaca Fila et al., (2021) que la vigilancia y control de los reservorios es esencial para prevenir la reemergencia de brotes de flavivirus. Esto puede incluir la vigilancia de las poblaciones de primates en áreas selváticas para detectar la circulación del virus y la implementación de medidas para reducir el contacto entre humanos y estos animales. En algunos casos, esto puede implicar la protección de los hábitats naturales de los animales para evitar que los humanos se acerquen a zonas donde los flavivirus son endémicos.

El control de los vectores también es una prioridad en la lucha contra los flavivirus. Esto incluye no solo la eliminación de criaderos de mosquitos y el uso de insecticidas, sino también la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías para el control de vectores, como los mosquitos genéticamente modificados que son incapaces de transmitir el virus. Además, la promoción del uso de mosquiteros,

repelentes de insectos y ropa protectora puede ayudar a reducir el riesgo de exposición a las picaduras de mosquitos infectados (Dutta & Langenburg, 2023).

2.2.5.3 Detección de Flavivirus por Técnicas Moleculares

Una de los principales beneficios de las técnicas moleculares es su elevada sensibilidad y precisión, lo que disminuye la probabilidad de reacciones cruzadas y facilita la detección temprana de patógenos virales. Además, estos métodos son muy flexibles, ya que pueden aplicarse a diferentes tipos de muestras biológicas. (Dias et al., 2023)

La PCR, desarrollada por Kary Mullis en 1983, es una técnica de biología molecular que permite amplificar secuencias específicas de ADN. Esta técnica es esencialmente un proceso de copia controlada del ADN, que, a través de ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento, permite la replicación exponencial de un fragmento específico del material genético. La PCR se basa en la acción de una enzima llamada ADN polimerasa, que sintetiza nuevas hebras de ADN a partir de un molde de ADN existente. Este proceso se realiza en presencia de pequeños fragmentos de ADN denominados cebadores o primers, que se unen a las secuencias diana y guían la síntesis de las nuevas hebras (Feijóo & Tacuri, 2021).

La RT-PCR permite la amplificación de ARN viral mediante la conversión de este en ADN complementario (ADNc) utilizando la enzima transcriptasa inversa (RT). Luego, el ADNc es amplificado por PCR convencional. Esta técnica se ha empleado para diagnosticar infecciones humanas por virus de ARN, mostrando una sensibilidad que varía entre el 73% y el 100%, y una especificidad entre el 99% y el 100%, lo que

la convierte en una herramienta altamente confiable en la detección de infecciones virales. (Blahove & Carter, 2021).

El principio clave de la PCR anidada es el uso de dos pares de cebadores que se dirigen a una sola región. El primer par amplifica la secuencia objetivo junto con una porción adicional, y el segundo par se une a sitios dentro de ese producto para amplificar una secuencia interna más corta. Después de la primera PCR, se realiza una segunda amplificación en los productos obtenidos, lo que mejora la especificidad. Los amplicones se detectan de manera similar a la PCR convencional, y solo los productos correctos permiten la amplificación en la segunda reacción. (AAT Bioquest, 2024)

En la década de 1990, se empezaron a desarrollar en la literatura científica varios ensayos de flavivirus basados en la técnica de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa). Estos ensayos mostraron una sensibilidad comparable al método de aislamiento viral en cultivos celulares, pero con tiempos de respuesta significativamente más rápidos. (Lanciotti, 2003).

En este contexto, Antúnez (2023) destaca la importancia de la RT-PCR anidada para detectar flavivirus, combinando la utilización de oligonucleótidos específicos dirigidos al gen NS5 de 1385 pb. El producto inicial de esta reacción es luego usado en una segunda PCR (anidada), que amplifica un fragmento más corto de 143 pb del mismo gen. Este protocolo, descrito por Sánchez-Seco, asegura una mayor sensibilidad y precisión en la detección de los flavivirus. Según Sánchez-Seco et al. (2005) el objetivo de su estudio fue desarrollar una RT-PCR anidada que permitiera detectar a todos los miembros del género de los flavivirus, y que esta

técnica sensible y confiable pueda usarse como una herramienta adecuada de diagnóstico y vigilancia epidemiológica.

CAPÍTULO III: Diseño Metodológico

3.1 Tipo y diseño de investigación

La investigación se enmarca en un enfoque cuantitativo con un diseño descriptivo-exploratorio y utiliza un diseño de cohorte transversal. Este enfoque es el más adecuado para abordar la problemática relacionada con la circulación de Flavivirus en murciélagos y roedores, ya que permite analizar la frecuencia y prevalencia del virus en estos reservorios.

El carácter descriptivo de la investigación permite detallar las características y condiciones de los murciélagos y roedores estudiados, así como documentar la presencia de Flavivirus en estas especies. Por otro lado, el componente exploratorio es necesario debido a la limitada información en la región que aborden específicamente la identificación de Flavivirus en estas especies.

El diseño de cohorte transversal se justifica debido a que permite identificar la presencia del virus en un tiempo determinado.

3.2 La población y la muestra

La población objeto de esta investigación corresponde a murciélagos y roedores provenientes del estudio realizado en el proyecto “Presencia del SARS-Cov-2 en animales de compañía de la ciudad de Guayaquil y circulación de coronavirus en roedores sinantrópicos y murciélagos en la provincia del Guayas durante el 2020-2021.”, del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública “Dr. Leopoldo Izquieta Pérez” INSPI- LIP

3.2.1 Característica de la población

En la tabla 4 se muestran las características ecológicas y biológicas de las familias de murciélagos y roedores incluidas en el estudio.

Tabla 4

Características ecológicas y biológicas

	Familia	Distribución geográfica	Hábitat	Tamaño de las colonias	Adaptaciones especiales
Murciélagos					
	Molossidae	Global (tropicales y subtropicales)	Áreas abiertas, cuevas, edificaciones	Colonias grandes (hasta miles o millones)	Resistencia a altas temperaturas
	Phyllostomidae	Principalmente América (regiones tropicales)	Selvas, cuevas, bosques, también áreas urbanas	Colonias pequeñas a medianas, algunas solitarias	Gran diversidad de adaptaciones, como la alimentación de sangre en vampiros
	Vespertilionidae	Global (excepto zonas polares y desérticas)	Bosques, praderas, áreas urbanas	Colonias pequeñas a grandes	Gran diversidad de especies adaptadas a climas templados
Roedores					
	Muridae	Distribución global en diversos hábitats	Hábitats variados: bosques, praderas, urbanos	Desde solitarios hasta colonias grandes	Gran diversidad de especies adaptadas a climas templados

3.2.2 Delimitación de la población

Se aplicó un tipo de muestreo no probabilístico por conveniencia, en donde las especies tanto de roedores como de murciélagos fueron seleccionados de varios cantones de la provincia del Guayas. Se escogió especies de todos los cantones considerados en el proyecto del INSPI, de tal manera que la población objeto de este estudio abarca 7 cantones: Guayaquil, Balzar, Bucay, Durán, Naranjal, Pedro Carbo y Milagro

3.2.3 Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra fue seleccionado de acuerdo con las condiciones y recursos disponibles al momento de la ejecución del presente estudio. Se escogió un universo de 150 muestras, distribuidos en 128 murciélagos y 22 roedores.

3.2.4 Tipo de la muestra

Tejido hepático de murciélagos y roedores.

3.2.5 Proceso de selección de la muestra

Se escogió el tejido hepático debido a que es un órgano clave en la replicación de muchos virus, como el virus del dengue y de la fiebre amarilla, flavivirus que muestran preferencia para replicarse en células hepáticas, según lo indicado por Pinheiro et al. (2023).

Las muestras de murciélagos y roedores fueron conservadas con PBS a -80°C, una vez descongeladas se procedió a pesar 25 mg de tejido (equivalente a un grano de lenteja) por cada especie hasta su procesamiento.

3.3 Los métodos y las técnicas

Para la identificación de Flavivirus en las muestras biológicas recolectadas de murciélagos y roedores, se utilizó el protocolo de la técnica RT-PCR anidada genérica de Sánchez-Seco et al. (2005) que es una técnica sensible y específica para la detección de Flavivirus.

3.3.1 Procesamiento de la muestra.

Mediante necropsia, se recolectó 128 tejidos hepáticos de murciélagos y 22 tejidos de roedores, con un peso que varió entre 0,02 g y 0,04 g. Estos fragmentos se almacenaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml, con 0,5 ml de tampón fosfato salino (PBS) al 10%, y se mantuvieron a -40°C hasta su posterior extracción de ARN.

3.3.1.1 Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN de los tejidos de hígado obtenidos de los murciélagos y roedores, se utilizó el kit de extracción comercial Zymo Research con columnas de sílica del catálogo D7021. Antes de iniciar la extracción de ácidos nucleicos, se diluyó el Tampón de ADN/ARN Viral con 125 µl de beta-mercaptoetanol al 0.5% por cada 25 ml de tampón, y se preparó el Viral Wash Buffer diluyéndolo con 96 ml de etanol al 100% tal como lo menciona el manual de

uso. Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente y las muestras se centrifugaron entre 10.000 y 16.000 x g.

Se colocó por cada muestra aproximadamente 25 mg de tejido (equivalente a un grano de lenteja) en 400 µl de DNA/RNA Shield 1X, se mezcló la solución con vortex por 5 minutos o hasta que se deshaga el tejido. Luego, se agregó 10 µl de proteinasa K y se incubó por 15 minutos. Después, se añadió 800 µl de tampón de ADN/ARN y se mezcló bien.

La mezcla se transfirió a una columna Zymo-Spin IIC-XLR en un tubo de recolección y se centrifugó a 10.000 g durante 2 minutos, luego se transfirió la columna a un nuevo tubo de recolección. Se añadieron 500 µl de tampón de lavado viral a la columna, se centrifugó por 30 segundos, se desechó el flujo, y se repitió este paso.

A continuación, se agregaron 500 µl de etanol (95-100%) a la columna y se centrifugó durante 1 minuto para asegurar la eliminación completa del tampón de lavado, después se transfirió la columna a un nuevo tubo eppendorf. Finalmente, se resuspendió en 50 µl de agua libre de DNasa/RNasa y se almacenó a -80°C.

3.3.1.2 RT-PCR anidada genérica gen NS5 (fragmento de 143 pb)

El protocolo de la RT-PCR anidada genérica para flavivirus que se empleó en esta investigación amplifica un fragmento de 143 pares de bases (pb) del gen NS5.

Se sintetizaron los siguientes iniciadores para la RT-PCR genérica: Flavi1+:

57871GAYYTIGGITGYGGIIGGGIRGITGG78973, Flavi1-:

59255TCCCAICCGCIRTRTCRTCIGC92333. Y para la PCR anidada genérica:

Flavi2+: 58987YGYRTIYAYAWCAYSATGGG90063,

Flavi2-: 59130CCARTGITCYKYRTTIAIRAAAICC91073

Para la transcripción reversa y primera amplificación se utilizó el kit SuperScript III One-Step RT-PCR con Platinum Taq (Invitrogen) , se adicionaron los siguientes reactivos para una reacción: 11 µl de agua, 24 µl de buffer 2X , 4 µl de cada uno de los iniciadores (Flavi+1 y Flavi-1) a 40 uM ,y 1 µl de SuperScript III One-Step RT-PCR con Platinum Taq más 5 µl de ARN que se colocó en el área de amplificación en el termociclador Applied Biosystem con el siguiente perfil térmico: ciclo inicial de 45°C por 30 min y 94°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 seg, 47°C por 1 min y 68°C por 1 min y 15 seg , y la extensión final a 68°C por 5 min.

La reacción de PCR anidada se la realizó con el kit de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) se adicionaron los siguientes reactivos para una reacción: Agua 33.2 µl, 10X Buffer 5 µl, MgCl₂ 50mM 1.5 µl, dNTP 10mM 1 µl, 4 µl de los iniciadores (Flavi 2+ y Flavi 2-) a 40 uM, 0.3 µl de Taq DNA polymerase y 1 µl del producto de la primera amplificación. Se llevó al termociclador a un ciclo inicial de 94°C durante 2 min, seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 seg, 47°C por 1 min y 72°C por 30 seg. La extensión final fue a 72°C por 5 min.

Se incluyeron controles negativos y controles positivos donados por el Laboratorio de Virología del INSPI para los virus de encefalitis de San Luis (SLEV), Fiebre Amarilla (YFV), Zika (ZIKV) y del Virus del Dengue (DENV) extraídos a partir de cultivo celular (células vero) y confirmadas por la técnica PCR tiempo real

3.3.1.3 Migración electroforética

Las muestras se analizaron por electroforesis, utilizando un gel de agarosa al 2% que se preparó disolviendo 3 g de agarosa en 150 ml de TAE 1X, se calentó la mezcla en el microondas durante 2 minutos, y se añadió 5 µl de Syber Safe antes de verterla en el molde, luego se dejó endurecer por 30 minutos. El gel se cubrió con TAE 1X y se migraron 10 µl del amplicón de la PCR anidada, mezclado con 2 µl de buffer de carga, junto con un marcador de peso molecular de 100 pb, programando la fuente de poder a 100 V por 1 hora. Para preparar el TAE 1X, se diluyeron 25 ml de TAE 40X en 975 ml de agua destilada.

3.4 Procesamiento estadístico de la información

Para asegurar la validez y confiabilidad de los hallazgos, se empleó la triangulación de datos, combinando las observaciones de campo, los registros visuales y los resultados de los análisis moleculares.

El procesamiento de la información se centró en la interpretación cuantitativa y descriptiva de los datos, donde se emplearon herramientas estadísticas descriptivas y pruebas inferenciales con el objetivo de evaluar la distribución y significancia de los resultados. Se utilizó el programa SPSS para realizar el análisis de los datos y determinar la frecuencia de detección de flavivirus en las muestras de murciélagos y roedores.

CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados

4.1 Especies incluidas en el estudio

El análisis de los resultados se presenta de manera cuantitativa y descriptiva. A partir de la captura y clasificación de las muestras, se obtuvieron un total de 150 muestras, distribuidos en 128 murciélagos, con una representación del 85% y 22 roedores con una representación del 15%. En la Tabla 5, al analizar la composición de los roedores por familias, se observa que todas las muestras pertenecen a la familia Muridae con 3 especies.

Tabla 5

Especies de roedores incluidas en el estudio

Familia/Especie	Cantidad	Porcentaje
Muridae		
<i>Rattus norvegicus</i>	12	54,5%
<i>Rattus rattus</i>	7	31,8%
<i>Mus musculos</i>	3	13,6%
Total	22	100,0%

Los datos presentados en la Tabla 6 revelan que la familia más predominante entre los murciélagos es Phyllostomidae, con un total de 67 muestras. Estas se distribuyen en 10 géneros y 14 especies. La especie con mayor frecuencia es *Carollia perspicillata*, que representa 26 de las muestras, seguida por *Carollia castanea*, con 7 muestras. En segundo lugar, la familia Molossidae se identifica con 55 muestras, todas pertenecientes a la especie *Molossus molossus*. Por último, la

familia Vespertilionidae incluye 5 muestras distribuidas en 3 especies diferentes, mientras que la familia Emballonuridae está representada por una única muestra de la especie *Saccopteryx bilineata*.

Tabla 6

Especies de murciélagos incluidas en el estudio

Familia/Especie	Cantidad	Porcentaje
Molossidae		
<i>Molossus molossus</i>	55	43,0%
Phyllostomidae		
<i>Carollia perspicillata</i>	26	20,3%
<i>Carollia castanea</i>	7	5,5%
<i>Artibeus fraterculus</i>	6	4,7%
<i>Glossophaga soricina</i>	6	4,7%
<i>Anoura peruana</i>	4	3,1%
<i>Desmodus rotundus</i>	4	3,1%
<i>Sturnira bakeri</i>	4	3,1%
<i>Carollia brevicauda</i>	3	2,3%
<i>Phylloderma stenops</i>	2	1,6%
<i>Artibeus concolor</i>	1	0,8%
<i>Artibeus lituratus</i>	1	0,8%
<i>Chiroderma trinitatum</i>	1	0,8%
<i>Micronycteris megalotis</i>	1	0,8%

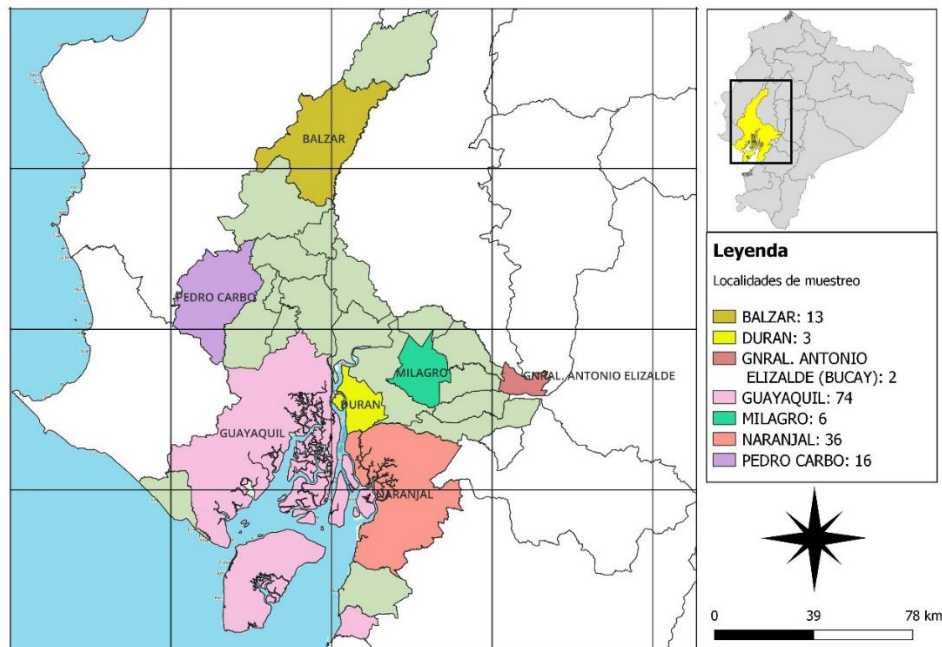
<i>Phyllostomus discolor</i>	1	0,8%
Vespertilionidae		
<i>Eptesicus innoxius</i>	2	1,6%
<i>Rhogeesa velilla</i>	2	1,6%
<i>Myotis nigricans</i>	1	0,8%
Emballonuridae		
<i>Saccopteryx bilineata</i>	1	0,8%
Total	128	100,0%

4.2 Zonas de muestreo

Al identificar las zonas de muestreo de la población total, se observa que 74 de las muestras (49.3 %) fueron recolectadas en Cantón Guayaquil, lo que representa el mayor porcentaje. Le sigue el Cantón Naranjal con 36 muestras (24%), y en tercer lugar se encuentra Pedro Carbo con 16 muestras (10.7%). En localidades como Balzar con 13 muestras (8.7%), Milagro con 6 muestras (4%), Durán con 3 muestras (2.00%) y Bucay con 2 muestras (1.3%).

Figura 6

Distribución geográfica de la población



4.3 Presencia de Flavivirus

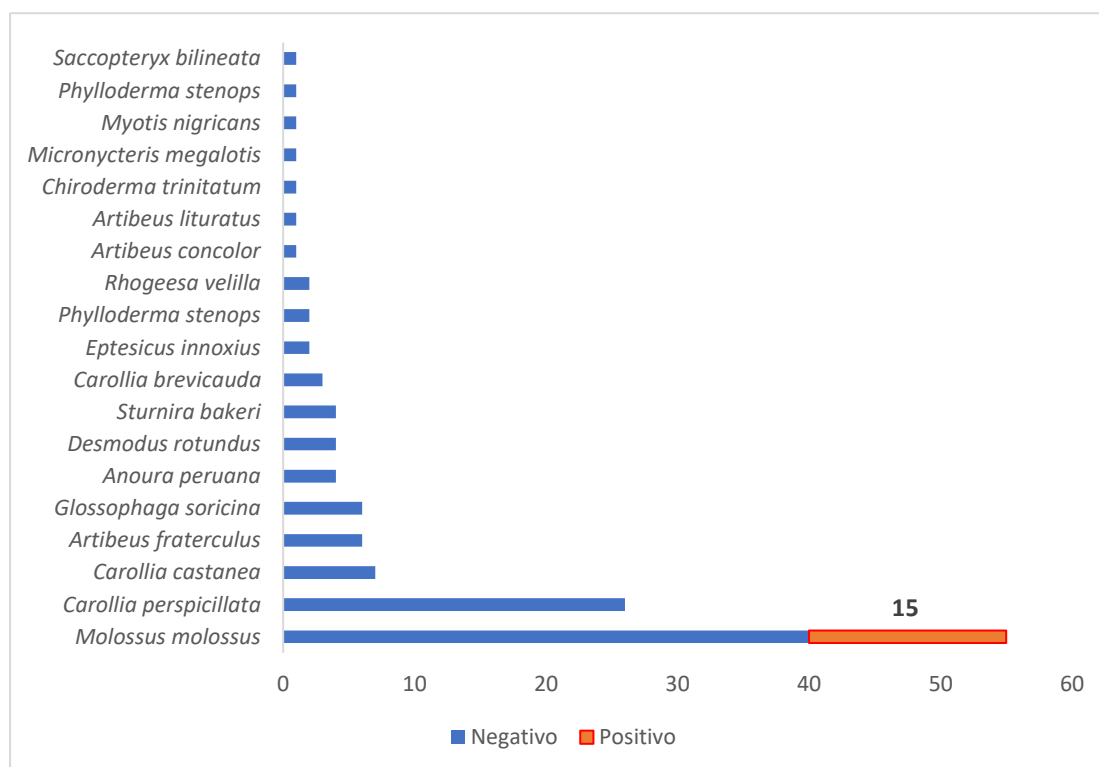
En un análisis total de 150 muestras mediante la técnica de RT-PCR anidada, los resultados revelaron 15 casos positivos, lo que representa aproximadamente el 10% de la población total analizada, todos correspondientes a murciélagos con una prevalencia de 11.7 % en este grupo, sugiriendo que los murciélagos están expuestos a flavivirus y podrían actuar como posibles reservorios en la región estudiada. En contraste, no se detectó la presencia de flavivirus en las muestras de roedores

4.3.1 Presencia de Flavivirus por especie

Al evaluar la distribución de los resultados por especie en los murciélagos, únicamente se identificó 15 positivos para flavivirus en la especie *Molossus molossus* (Figura 7), lo que corresponde a la prevalencia 27.27 % en esta especie.

Figura 7

Presencia de Flavivirus por especie en murciélagos



La dieta insectívora de *Molossus molossus* puede influir en la presencia de flavivirus en esta especie. Al alimentarse principalmente de insectos voladores, especialmente mosquitos (Freitas et al., 2020), es más probable que se exponga a estos vectores, que son conocidos portadores de flavivirus como el virus del Nilo Occidental y el dengue. Esta relación estrecha entre la dieta y la exposición a

vectores puede explicar por qué solo se encontraron casos positivos en esta especie.

4.3.2 Presencia de Flavivirus por Zonas

Los resultados positivos para Flavivirus en murciélagos se encuentran distribuidos en los cantones de Guayaquil y Naranjal, lo que revela que el mayor porcentaje se encuentra en las zonas urbanas como se visualiza en la tabla 7. La presencia del virus en estas áreas urbanas y rurales está relacionada con la proximidad entre murciélagos y seres humanos, lo que aumenta el riesgo de transmisión zoonótica siempre y cuando también esté presente el vector.

Tabla 7

Zona de captura positivos a Flavivirus en murciélagos

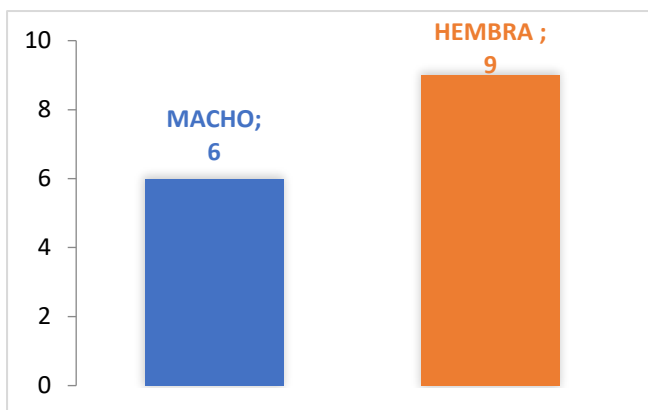
Cantón/Zona de captura	Cantidad	Porcentaje
Guayaquil		
Universidad agraria	4	26.67%
Parque samanes	2	13.33%
Casa	5	33.33%
Total	11	73.33%
Naranjal		
Manglar churute (aulladores)	3	20.00%
Manglar churute (Chorrillo)	1	6.67%
Total	4	26.67%

4.3.3 Presencia de Flavivirus por sexo

La distribución de las muestras positivas de flavivirus según el sexo muestra que, de las 15 muestras, 6 corresponden a machos y 9 a hembras. Existe una mayor prevalencia de flavivirus en las hembras en comparación con los machos, esta variación podría deberse a diversos factores, como diferencias biológicas en la susceptibilidad al virus entre los sexos o variaciones en el comportamiento que podrían influir en la exposición al virus.

Figura 8

Distribución de positivas a Flavivirus por sexo



CAPÍTULO V: Discusión, Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Discusión

La presente investigación se centra en determinar la presencia de Flavivirus en murciélagos y roedores sinantrópicos en la provincia del Guayas, empleando técnicas moleculares, como la RT-PCR anidada.

El análisis de los resultados obtenidos nos indica una prevalencia del 11.7% de flavivirus en la población de los murciélagos lo que nos confirma la hipótesis inicial, alineándose a estudios previos que destacan a los murciélagos como posibles reservorios de los Flavivirus. Un ejemplo de esto es el trabajo de Torres-Castro et al. (2021), donde se detectó una prevalencia del 31.8% del virus del Nilo Occidental (WNV) y del 9.1% del virus Zika (ZIKV) en murciélagos, ambos pertenecientes a la familia Flaviviridae. Estos resultados confirman la capacidad de los murciélagos para alojar naturalmente estos virus, proporcionando evidencia adicional sobre su posible papel como reservorios de flavivirus en la región y destacando su importancia en la ecología de estas enfermedades.

Se evidencia que el 27.27% de prevalencia en la especie *Molossus molossus*, juega un papel relevante en la exposición del virus en la región y es conocida por su adaptabilidad a entornos urbanos. Los flavivirus al ser virus ARN, con una alta capacidad de mutación y adaptación, facilita su persistencia en reservorios animales y su eventual aparición en poblaciones humanas cuando las condiciones son favorables (Dutta & Langenburg, 2023). Esta capacidad de adaptación y su amplia gama de hospedadores resaltan la importancia de especies como *Molossus*

molossus en la ecología de la transmisión de estos virus, lo que explica su prevalencia en áreas como Guayaquil y Manglar Churute. Este dato apoya la hipótesis que plantea que ciertas especies de murciélagos, especialmente aquellas adaptadas a entornos urbanos, tienen un papel significativo en la transmisión de virus zoonóticos.

Es importante mencionar que zonas urbanas, con alta densidad poblacional y mayor cercanía a especies sinantrópicas, presentan tasas elevadas de prevalencia viral, como se ha observado en Guayaquil y Manglar Churute. Estudios realizados como el de Luis (2015) en otros entornos urbanos evidenció como la proximidad entre humanos y reservorios animales facilita la propagación de enfermedades infecciosas.

La ausencia de Flavivirus en las muestras de roedores, sugiere que no desempeñan un papel relevante como reservorio de Flavivirus en la población estudiada esto podría deberse a que algunos flavivirus presentan afinidad a ciertos huéspedes y vectores; sin embargo otras investigaciones demuestran que estos animales si cumplen un papel como reservorios, como aquel realizado por Torres et al, (2022) en donde se ha reportado la presencia de Flavivirus en roedores. En su estudio se detectó que el 33% tenían presencia de flavivirus, lo que indica que la dinámica de transmisión puede variar significativamente entre regiones y especies. Por lo tanto, la posibilidad de que los roedores actúen como reservorios en otras áreas geográficas no puede descartarse completamente y podría ser un área de investigación futura.

Por otra parte, la revisión teórica realizada para esta investigación recalca la importancia de considerar la ecología y comportamiento de los reservorios animales en la propagación de Flavivirus. Los murciélagos, por ejemplo, no solo actúan como reservorios de Flavivirus, sino que también son portadores de otros virus ARN de alta relevancia para la salud pública, como el virus del Ébola y el coronavirus como sostiene Ramírez (2023). Estos virus, al igual que los Flavivirus, tienen la capacidad de transmitirse de animales a humanos, lo que refuerza la necesidad de estudios continuos sobre las interacciones entre humanos y murciélagos, especialmente en áreas de alta densidad poblacional.

Por ende, la investigación ha proporcionado evidencia clara de que los murciélagos de la especie *Molossus molossus* desempeña un papel como posible reservorio del virus en la provincia del Guayas. La prevalencia del virus en estas especies varía significativamente según la ubicación geográfica, lo que nos indica la importancia del contexto ecológico en la dinámica de transmisión del virus. La ausencia de Flavivirus en roedores, aunque relevante, no descarta la posibilidad de que estos animales puedan actuar como reservorios en otras regiones o bajo diferentes condiciones ecológicas. Estos hallazgos refuerzan la necesidad de una vigilancia continua y la implementación de estrategias de control específicas para mitigar el riesgo de transmisión zoonótica en áreas urbanas y periurbanas. La integración de estas estrategias con los conocimientos ecológicos sobre los reservorios animales y sus interacciones con los humanos es fundamental para prevenir futuros brotes de Flavivirus y otras enfermedades zoonóticas.

5.2 Conclusiones

La técnica de RT-PCR anidada permitió identificar de manera efectiva la región conservada NS5 de los flavivirus. Este procedimiento incluyó las siguientes etapas: extracción de ácidos nucleicos, la amplificación mediante la PCR y la visualización de los productos en gel de agarosa, así como también el uso de controles negativos y positivos que aseguraron la precisión del análisis. Esta metodología resultó fue efectiva para cumplir con el objetivo del estudio, que era la identificación de flavivirus en murciélagos y roedores sinantrópicos.

En el análisis de un total de 150 muestras mediante la técnica de RT-PCR anidada, se identificaron 15 casos positivos, lo que equivale al 10% de la población total evaluada. Todos los casos positivos corresponden a murciélagos, con una prevalencia del 11.7% dentro de este grupo, lo que sugiere que estos animales están expuestos a flavivirus y podrían actuar como posibles reservorios en la región estudiada, datos que responden al segundo objetivo. No obstante, en los roedores capturados no se detectó la presencia del virus.

El tercer objetivo del estudio, centrado en clasificar las principales especies que actúan como posibles reservorios de flavivirus, permitió identificar cómo ciertas especies de murciélagos están más asociadas a la exposición y potencial transmisión del virus. Los resultados confirman el papel de los murciélagos, especialmente de la especie *Molossus molossus*, como posibles reservorios de flavivirus ya que al tener una dieta que depende de la caza activa de insectos, esta especie podría estar en contacto más frecuente con ambientes donde los flavivirus están presentes. Esto a su vez aumenta la probabilidad de infección, ya que los

flavivirus son comúnmente transmitidos por vectores como los mosquitos, que son abundantes en ciertos ecosistemas. Otras especies de murciélagos, aunque presentes en el área, no mostraron presencia de Flavivirus, lo que sugiere que existen características específicas de *Molossus molossus* que favorecen su rol como posible reservorio.

En este sentido, esta investigación ha logrado cumplir con los objetivos propuestos, aportando evidencia valiosa sobre la circulación de Flavivirus en murciélagos en la provincia del Guayas. Los resultados obtenidos son coherentes con estudios globales, pero también se presentan hallazgos específicos que enriquecen el conocimiento local sobre los posibles reservorios de Flavivirus y su dinámica de transmisión en entornos urbanos.

5.3 Recomendaciones

Las recomendaciones de este estudio sugieren diversas líneas de investigación futura y posibles soluciones que podrían abordar los datos descubiertos durante la investigación.

Una de las principales interrogantes que surgen es la necesidad de explorar con mayor profundidad por qué *Molossus molossus* actúa como un posible reservorio de Flavivirus en comparación con otras especies de murciélagos; si sus características genéticas, ecológicas o de comportamiento hagan a esta especie particularmente susceptible al virus. Se sugiere llevar a cabo estudios adicionales para identificar otras especies de murciélagos en el área que puedan actuar como reservorios de Flavivirus, ya que no fueron identificadas en este estudio.

Aunque en este estudio no se identificó la presencia de Flavivirus, los roedores son bien conocidos por ser reservorios de diversos patógenos, por lo que investigaciones futuras con una población más amplia podrían ayudar a identificar qué virus zoonóticos podrían estar circulando en las poblaciones de roedores sinantrópicos de la provincia del Guayas.

Otro aspecto a considerar es la necesidad de estudios interdisciplinarios que integren la ecología, la biología molecular y la salud pública para desarrollar estrategias más efectivas de control y prevención de enfermedades zoonóticas. Se podrían explorar soluciones basadas en la ecología urbana, como el diseño de hábitats que reduzcan las interacciones entre humanos y reservorios de virus en zonas urbanas. Esta perspectiva ecológica, junto con políticas de salud pública, podría ofrecer una solución más sostenible ya largo plazo para mitigar los riesgos de transmisión zoonótica.

Referencias

AAT Bioquest. (2024). Advantages and limits of nested PCR vs. standard PCR.

https://www.aatbio.com/resources/application-notes/advantages-limits-of-nested-pcr-vs-standard-pcr#sec_2

Alfaro-Mora, Ramsés. (2023). Virología molecular de la rabia: un enfoque

clínico. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 75(1), . Epub 01 de diciembre de 2023. Recuperado en 24 de octubre de 2024, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602023000100006&lng=es&tlng=es.

Álvarez, C., & Murillo, D. (2021). Guerra y pestilencia: impacto de epidemias y

pandemias en la historia hasta el siglo XX. *Revista Científica General José María Córdova*, 19(35), 573-597 <https://doi.org/10.21830/19006586.840>.

Alkan, C., Zapata, S., Bichaud, L., Moureau, G., Lemey, P., Firth, A. E., Gritsun, T.

S., Gould, E. A., de Lamballerie, X., Depaquit, J., & Charrel, R. N. (2015).

Ecuador Paraiso Escondido Virus, a new flavivirus isolated from new world sand flies in Ecuador, Is the first representative of a novel clade in the genus *Flavivirus*. *Journal of Virology*, 89(23), 11773-11785.

<https://doi.org/10.1128/JVI.01543-15>

Antunez, M. P. (2020). La Ecología viral y su importancia en las enfermedades

virales emergentes y re-emergentes. . *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 8(1) 1-13.

- Antúnez, M. (2023). Detección de flavivirus en el murciélago casero (*Molossus milleri*) en un municipio de la Habana, Cuba. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 11(1).
- Apaza, Y. (2021). Respuesta inmunitaria frente al virus de la viruela. *artículos de revisión en respuesta inmunitaria frente a microorganismos*, , 54
https://www.researchgate.net/profile/Pedro-Coila-Anasco/publication/354234484_compendio_de_articulos_de_revision-inmunologia2/links/612d93de0360302a006c78d7/compendio-de-articulos-de-revision-inmunologia2.pdf#page=54.
- Arca, P. (18 de 12 de 2022). *ampligen*. Obtenido de El ARN y la información genética: <https://www.ampligen.es/adn-genetica/caracteristicas-arn/>
- Aréchiga, N., Rendón, E., Muñoz, C., Olave, I., & Aguilar, A. (2024). Flavivirus del Dengue y del Zika en murciélagos. *Notas Therya* , 5 , 112-118.
https://doi.org/10.12933/therya_notes-24-158.
- Argaez-Sierra, D. G., Baak-Baak, C. M., Garcia-Rejon, J. E., Cetina-Trejo, R. C., Tzuc-Dzul, J. C., Acosta-Viana, K. Y., Chan-Perez, J. I., & Cigarroa-Toledo, N. (2024). Entomo-virological surveillance of Flavivirus in mosquitoes in Yucatan State, Mexico. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 66, e56. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202466056>
- Baker, R., Mahmud, A., Miller, I. .:, Rice, B., & Metcalf, C. (2022). Enfermedades infecciosas en una era de cambio global. *Nature Reviews Microbiology* , 20 (4), 193-205.

- Blahove, M. R., & Carter, J. R. (2021). Flavivirus Persistence in Wildlife Populations. *Viruses*, 13(10), 2099. <https://doi.org/10.3390/v13102099>
- Cabezas, C., & Vasconcelos, P. F. C. (2024). Creciente amenaza de enfermedades emergentes y reemergentes: arbovirus y enfermedades transmitidas por vectores en las Américas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 41(1), 4-6. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2024.411.13805>
- Calderón, P., & Cornejo, C. (2024). Presencia del virus de la rabia en murciélagos no hematófagos en México. . *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, , 11(2) <https://doi.org/10.19136/era.a11n2.3768> .
- Cardozo, F., Rojas, A., Bernal, C., Ferreira, L., Díaz, A., Páez, M., & Mendoza, L. (2021). Implementación de un sistema de detección de flavivirus en mosquitos. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 19(2), 32-40 <https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2021.019.02.32>.
- Carrera & Navarro. (2022). *Dieño de una plataforma de diagnostico Filogenetico para Flavivirus*. <https://repositorio.uisek.edu.ec/handle/123456789/4749>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2024). Genetically modified mosquitoes. <https://www.cdc.gov/mosquitoes/mosquito-control/genetically-modified-mosquitoes.html>
- Chua K. B. (2003). Nipah virus outbreak in Malaysia. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 26(3), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(02\)00268-8](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(02)00268-8)

- Cui, J., Li, F., & Shi, Z.-L. (2019). *Origin and evolution of pathogenic coronaviruses*. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 181-192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- Dahmana, H., Granjon, L., Diagne, C., Davoust, B., Fenollar, F., & Mediannikov, O. (2020). Rodents as hosts of pathogens and related zoonotic disease risk. *Pathogens*, 9(3), 202. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030202>
- Daidoji, T., Morales Vargas, R. E., Hagiwara, K., Arai, Y., Watanabe, Y., Nishioka, K., Murakoshi, F., Garan, K., Sadakane, H., & Nakaya, T. (2021). Development of genus-specific universal primers for the detection of flaviviruses. *Virology journal*, 18(1), 187. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01646-5>
- de Oliveira Figueiredo, P., Stoffella-Dutra, A. G., Barbosa Costa, G., Silva de Oliveira, J., Dourado Amaral, C., Duarte Santos, J., Soares Rocha, K. L., Araújo Júnior, J. P., Lacerda Nogueira, M., Zazá Borges, M. A., Pereira Paglia, A., Desiree LaBeaud, A., Santos Abrahão, J., Geessien Kroon, E., Bretas de Oliveira, D., Paiva Drumond, B., & de Souza Trindade, G. (2020). Re-Emergence of Yellow Fever in Brazil during 2016-2019: Challenges, Lessons Learned, and Perspectives. *Viruses*, 12(11), 1233. <https://doi.org/10.3390/v12111233>
- De Thoisy B, Bourhy H, Delaval M, Pontier D, Dacheux L, Darcissac E, et al. (2016) *Bioecological Drivers of Rabies Virus Circulation in a Neotropical Bat*

Community. PLoS Negl Trop Dis 10(1): e0004378.

doi:10.1371/journal.pntd.0004378

Dias, B. P., Barbosa, C. C., Ferreira, C. S., Mayra Soares Alves Dos Santos, S., Arrieta, O. A. P., Malta, W. C., Gomes, M. L. M. D., Alves E Silva, M., Fonseca, J. M., Borges, L. P., & Silva, B. M. (2023). Challenges in Direct Detection of Flaviviruses: A Review. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 12(5), 643. <https://doi.org/10.3390/pathogens12050643>

Diomedi, P. (2003). La guerra biológica en la conquista del nuevo mundo: una revisión histórica y sistemática de la literatura. *Revista chilena de infectología*, 20(1), 19-25 <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182003000100003>.

Domingo, E., Sheldon, J., & Perales, C. (2012). Viral quasispecies evolution. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 76(2), 159–216. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05023-11>

Dutta, S., & Langenburg, T. (2023). Una perspectiva sobre el desarrollo actual de vacunas contra flavivirus: una breve revisión. . *Viruses* , , 15 (4), 860.

Echazarreta, S., & Couto, E. (2024). Dengue en Argentina: ¿ es tiempo de resignificar la endemia? *Actualizaciones en Sida e Infectología*, 32(114). <https://doi.org/10.52226/revista.v32i114.311>.

Epstein, J. H., Quan, P. L., Briese, T., Street, C., Jabado, O., Conlan, S., ... & Daszak, P. (2010). Identification of GBV-D, a novel GB-like flavivirus from old

world frugivorous bats (Pteropodidae) in Bangladesh. PLoS Pathogens, 6(7), e1000972. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000972>

Federici, G., O. Franchini, E. Falco, D. P. Mariani, M. P. D'Amico, y M. L. Albornoz. (2022). Bats: Diversity and Conservation. Bats: A Global Perspective on Their Conservation. 1-21.

Feijóo, D., & Tacuri, C. (2021). Sensibilidad y especificidad de pruebas moleculares en odontología. . *Revista ADM Órgano Oficial de la Asociación Dental Mexicana*, 78(2), 90-94.

Figueroa, E. (2023). Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes en los últimos 40 años. *Revista Médica Hondureña*, 91(Supl. 1), S16-S20.

Fila, A., Durán Morera, N., & Rosabal Ferrer, L. (2021). Actualización sobre Fiebre Amarilla en el contexto de la reemergencia de la enfermedad. *Revista Cubana de Salud Pública*, 47 (3).

Freitas, G. P., Carvalho, W. D., Costa, L. M., & Esbérard, C. E. L. (2020). Activity and foraging efficiency of the aerial insectivorous bat *Molossus molossus* (Molossidae) in Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Bat Research & Conservation*. DOI: 10.14709/BarbJ.13.1.2020.10

Gallegos-López, J. A.-S.-G.-A.-W. (2024). Avances en la Vacunación contra el Virus de la Peste Porcina Africana. *Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica*, 12 (67) 49- 59

https://riiit.com.mx/apps/site/files_v2450/peste_porcina_nl_3_riiit_mar-abr_2024.pdf.

Geronimo, R., & Capani, J. (2023). Rasgos antropogénicos de los ciclos zoonóticos en el Perú. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 63(2), 338-349.

Gopar, R., Chávez, L., González, M., Rentería, M., Estrada, L., & Loyo, L. (2018). Presentación clínica atípica de infección por flavivirus. *Reporte de caso. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 56(2), 198-202. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=457754717016>.

Gorgonho, P. (2024). Dispersão de vírus zoonóticos de alta patogenicidade para humanos por morcegos. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 11(24), e27-e27 <https://doi.org/10.21472/bjbs.v11n24-005>.

Gouge, D. H., Hagler, J. R., Nair, S., Walker, K., Li, S. (L.), Bibbs, C. S., Sumner, C., & Smith, K. A. (2017). *Human disease causing viruses vectored by mosquitoes*. <https://extension.arizona.edu/sites/extension.arizona.edu/files/pubs/az1744-2017.pdf>

Groseth, A., Hoenen, T. Nuevos filovirus: ¿indicio de una amenaza global o motivo para reevaluar nuestra percepción del riesgo? *npj Viruses* 2, 38 (2024). <https://doi.org/10.1038/s44298-024-00050-4>

Gubler, D. J. (2011). Emerging vector-borne flavivirus diseases: are vaccines the solution? *Expert Review of Vaccines*, 10(5), 563–565.

<https://doi.org/10.1586/erv.11.35>

Hantavirus. (2009). *Fiebre hemorrágica con síndrome renal y síndrome pulmonar por hantavirus*. Última actualización: Marzo del 2009.

He W, Gao Y, Wen Y, Ke X, Ou Z, Li Y, He H and Chen Q (2021) Detection of Virus-Related Sequences Associated With Potential Etiologies of Hepatitis in Liver Tissue Samples From Rats, Mice, Shrews, and Bats. *Front. Microbiol.*

12:653873. doi: 10.3389/fmicb.2021.653873

Intriago-Guillén, Merly Jaritza, Palacios-Lucas, Lina Gabriela, & Vallejo-Valdivieso, Patricio Alfredo. (2023). Comportamiento de enfermedades vectoriales en una población manabita, Ecuador. *Revista Arbitrada Interdisciplinaria de Ciencias de la Salud. Salud y Vida*, 7(14), 54-68. Epub 30 de agosto de 2023. <https://doi.org/10.35381/s.v.v7i14.2562>

Jackson RT, Lunn TJ, DeAnglis IK, Ogola JG, Webala PW, Forbes KM (2024) Interacciones frecuentes e intensas entre humanos y murciélagos ocurren en edificios de zonas rurales de Kenia. *PLoS Negl Trop Dis* 18(2): e0011988.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011988>

Kading, R. C., & Schountz, T. (2016). Flavivirus Infections of Bats: Potential Role in Zika Virus Ecology. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 95(5), 993–996. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0625>

Lampert, D., & Porro, S. (2021). Representaciones del estudiantado de la escuela secundaria sobre Enfermedades Transmitidas por Alimentos y zoonosis: diferencias entre el bachiller en ciencias naturales y la orientación agraria. Bio-grafía, ISSN 2619-3531 <https://revistas.upn.edu.co/index.php/bio-grafia/article/view/14774/9663>.

Lanciotti R. - S. (2003). Ensayos de amplificación molecular para la detección de flavivirus. Avances en la investigación de virus, 61, 67-99. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)61002-x](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)61002-x)

LibreTexts. (2024). Definición de reservorios en epidemiología. <https://espanol.libretexts.org>

Loaiza, E., Díaz, R., & Solis, J. (2020). Virus Zika en el embarazo. Revista Médica Sinergia., 5(7), e533. <https://doi.org/10.31434/rms.v5i7.533>.

Luis, A., O'Shea, T., Hayman, D., Wood, J., Cunningham, A., Gilbert, A., . . . Webb, C. (2015). El análisis de redes de comunidades de virus hospedadores en murciélagos y roedores revela determinantes de transmisión entre especies. . Ecol Lett, 18: 1153-1162. <https://doi.org/10.1111/ele.12491>.

Lujan, J., & Quiñones, A. (2023). Virus Arenaviridae y Fiebres Hemorrágicas: Una Revisión. Revista Científica de Enfermería UNITEPC, 5(1), 23-33 DOI: <https://doi.org/10.36716/unitepc.v5i1.017>.

Luszczak, A. (2021). Vías intracelulares de difusión de la proteína de cápside del virus del Dengue visualizadas por espectroscopías de correlación (Tesis de

licenciatura, Universidad de Buenos Aires. Repositorio Institucional de la Universidad de Buenos Aires.(<https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/>)

Lüthy, I., & Kantor, I. (2020). Sarampión. Medicina (Buenos Aires), 80(2), 162-168. ISSN 1669-9106.

MacKenzie, John and Williams, David. 2009. The zoonotic flaviviruses of southern, south-eastern and eastern Asia, and Australasia: the potential for emergent viruses. Zoonoses and Public Health. 56 (6-7): pp. 338-356. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01208.x>

Machain-Williams, C., López-Urbe, M., Talavera-Aguilar, L., Carrillo-Navarrete, J., Vera-Escalante, L., Puerto-Manzano, F., Ulloa, A., Farfán-Ale, J. A., Garcia-Rejon, J., Blitvich, B. J., & Loroño-Pino, M. A. (2013). Serologic evidence of Flavivirus infection in bats in the Yucatan Peninsula of Mexico. Journal of Wildlife Diseases, 49(3), 684-689. <https://doi.org/10.7589/2012-12-318>

Maringer, K. (2024). Pirbright. Obtenido de Flavivirus Transmission & Pathogenesis: <https://www.pirbright.ac.uk/our-science/flavivirus-transmission-pathogenesis>

Martínez, J., & Urcuqui, S. (2017). Papel de las células dendríticas en la infección por el virus Dengue: blancos de replicación y respuesta inmune. Revista chilena de infectología, 34(3), 249-256. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000300007>.

McFarlane, R., Sleigh, A., & McMichael, T. (2012). Synanthropy of wild mammals as a determinant of emerging infectious diseases in the Asian-Australasian region. *EcoHealth*, 9(1), 24–35. <https://doi.org/10.1007/s10393-012-0763-9>

Meierhofer, M. B., Tena, E., Lilley, T. M., Dechmann, D. K. N., Voigt, C. C., Troitsky, T. S., De Bruyn, L., Braun de Torrez, E., Eldegard, K., Elmeros, M., Gyselings, R., Hoyt, D., Janssen, R., Jonasson, K. A., López-Baucells, A., Matlova, M., Melber, M., Perea, S., Stidsholt, L., Valanne, V., Varghese, M. G., Zavattoni, G., & Weller, T. J. (2024). Re-weighting the 5% tagging recommendation: Assessing the potential impacts of tags on the behaviour and body condition of bats. *Mammal Review*.
<https://doi.org/10.1111/mam.12369>

Ministerio de Salud Pública. (1 de Julio de 2024). Subsecretaría de Vigilancia, Prevención y Control de la Salud Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica Enfermedades Transmitidas por Vectores . Obtenido de <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2024/07/gaceta-enf-vectoriales-se-28-2024.pdf>

Ministerio de Sanidad. (25 de 3 de 2021). Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Obtenido de Transmisión de SARS-CoV-2: https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Documento_transmision.pdf

Morales, M. (2021). Reemergencia del Dengue en Argentina: Identificación y análisis de determinantes virológicos y epidemiológicos con implicancia en la vigilia

laboratorial. Pergamino, Argentina: Universidad Nacional del Litoral
<https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/handle/11185/7109>.

MSP. (2024). Subsecretaría de vigilancia, prevención y control de la salud. Gaceta de enfermedades vectoriales, 1 (32) 1-6 <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2024/08/gaceta-enf-vectoriales-se-32-2024-1.pdf>.

Olival KJ, Cryan PM, Amman BR, Baric RS, Blehert DS, Brook CE, et al. (2020) Posibilidad de transmisión zoonótica inversa del SARS-CoV-2 a la fauna silvestre en libertad: un estudio de caso de murciélagos. PLoS Pathog 16(9): e1008758. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008758>

OMS. (29 de Julio de 2020). Zoonosis. Obtenido de <https://www.who.int/es/newsroom/fact-sheets/detail/zoonoses#:~:text=Una%20zoonosis%20es%20una%20enfermedad,y%20existentes%20en%20los%20humanos>.

OMS. (8 de dic de 2022). Virus de Zika. Obtenido de <https://www.who.int/es/newsroom/fact-sheets/detail/zika-virus>

OMS. (21 de dic de 2023). Noticias sobre brotes de enfermedades. Obtenido de <https://www.who.int/es/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON498>

Onyuk SO, Hu B, Li B, Fan Y, Kering K, Ochola GO, Zheng X-S, Obanda V, Ommeh S, Yang X-L, Agwanda B and Shi Z-L (2019) Molecular Detection and Genetic Characterization of Novel RNA Viruses in Wild and Synanthropic

Rodents and Shrews in Kenya. *Front. Microbiol.* 10:2696. doi:
10.3389/fmicb.2019.02696

Oyarce, A., & Nina, A. (2023). Riesgo de reurbanización de Fiebre Amarilla en el Perú. *Revista Médica Herediana*, 34(3), 184-185. <http://dx.doi.org/10.20453/rmh.v34i3.4932>

Parada, R. (30 de 1 de 2020). Lifer. Obtenido de Replicación viral: características, ciclo de replicación viral, ejemplo (VIH): <https://www.lifer.com/replicacion-viral/>

Pinheiro, B. S. S., Rodrigues, J. G., Dias, F. C. R., Gomes, A. de O., & Gomes, M. de L. M. (2023). Hepatic damage caused by flaviviruses: A systematic review. *Life Sciences*, 331, 122074. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122074>

Plowright, R., Parrish, C., McCallum, H. et al. Pathways to zoonotic spillover. *Nat Rev Microbiol* 15, 502–510 (2017). <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.45>

Postler, T., Beer, M., Blitvich, B., & Bukh, J. (2023). Renaming of the genus *Flavivirus* to *Orthoflavivirus* and extension of binomial species names within the family *Flaviviridae*. *Archives of virology*, 168(9), 224 <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05835-1>.

Ramírez, E. (2023). The Bat Lands, un proyecto que busca explorar áreas potenciales de brotes zoonóticos mediados por murciélagos. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 47(184), 722-726 doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1967>.

Saito, T., Reyna, R. A., Taniguchi, S., Littlefield, K., Paessler, S., & Maruyama, J. (2023). Vaccine candidates against Arenavirus infections. *Vaccines*, 11(3), 635. <https://doi.org/10.3390/vaccines11030635>

Sánchez-Seco, M. P., Rosario, D., Domingo, C., Hernández, L., Valdés, K., Guzmán, M. G., & Tenorio, A. (2005). Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *Journal of virological methods*, 126(1-2), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.01.025>

Sánchez-Soto MF, Gaona O, Viguera-Galván AL, Suzán G, Falcón LI, Vázquez-Domínguez E (2024) Prevalencia y transmisión de los patógenos zoonóticos y transmitidos por vectores más relevantes en la península de Yucatán: una revisión. *PLoS Negl Trop Dis* 18(7): e0012286. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012286>

Sanjuan, N. (2020). Flavivirus yalfavirus. Hantavirus. Virus junín. Obtenido de <https://www.fmed.uba.ar/sites/default/files/2020-07/Seminario%2017.pdf>

Santos, L., de Aquino, E., Fernandes, S., Ternes, Y., & Feres, V. (2023). Dengue, chikungunya, and Zika virus infections in Latin America and the Caribbean: a systematic review. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 47, e34. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.34>

Sharma, V., Sharma, M., Dhull, D., Sharma, Y., Kaushik, S., & Kaushik, S. (2020). Zika virus: An emerging challenge to public health worldwide. *Canadian Journal of Microbiology*, 66(2), 87–98. <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0331>

Shiryayev, S., Cieplak, P., Cheltsov, A., Liddington, R., & Terskikh, V. (2023). Dual function of Zika virus NS2B-NS3 protease. *PLoS Pathog* , 19(11): e1011795. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011795>.

Soni, S., Gill, V. J. S., Anusheel, Singh, J., Chhabra, J., Gill, G. J. S., & Bakshi, R. (2023). Dengue, Chikungunya, and Zika: The Causes and Threats of Emerging and Re-emerging Arboviral Diseases. *Cureus*, 15(7), e41717. <https://doi.org/10.7759/cureus.41717>

Stanford University. (s.f.). Flaviviruses. Stanford University. <https://virus.stanford.edu/flavi/table.html>

Starvaggi, J., & S, P. (2024). The Inhibition of NS2B/NS3 Protease: A New Therapeutic Opportunity to Treat Dengue and Zika Virus Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8):4376. <https://doi.org/10.3390/ijms25084376>.

Tirira, D. G., & Burneo, S. F. (Eds.). (2012). Investigación y conservación sobre murciélagos en el Ecuador. Quito: Editorial PUCE.

Torres, M., Poot, M., Moguel, C., Reyes, B., Panti, A., Noh, H., Hernandez, S., Medina, N., & Puerto, F. (2017). Detección molecular de Flavivirus en Suero Sanguíneo de Roedores Capturados en Yucatán, México. *Revista de investigaciones veterinarias del Perú*, 28(2), 431. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i2.12053>

Torres-Castro, M., Noh-Pech, H. R., Lugo-Caballero, C. I., Dzul-Rosado, K. R., & Puerto, F. (2020). Las enfermedades transmitidas por vector: importancia y aspectos epidemiológicos. *Bioagrociencias*, 13(1).

<https://doi.org/10.56369/bac.3446>

Torres-Castro, M., Noh-Pech, H., Hernández-Betancourt, S., Peláez-Sánchez, R., Lugo-Caballero, C., & Puerto, F. I. (2021). West Nile and Zika viruses in bats from a suburban area of Merida, Yucatan, Mexico. *Zoonoses and public health*, 68(7), 834–841. <https://doi.org/10.1111/zph.12834>

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina. (2023). Seminario N° 17: Flavivirus y Alfavirus. Hantavirus. Virus Junín. II Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología.

Van den Elsen, K., Quek, J. P., & Luo, D. (2021). Molecular insights into the flavivirus replication complex. *Viruses*, 13(6), 956.

<https://doi.org/10.3390/v13060956>

Wang, D., Yang, X., Ren, Z., Hu, B., Zhao, H., Yang, K., Shi, P., Zhang, Z., Feng, Q., Nawenja, C. V., Obanda, V., Robert, K., Nalikka, B., Waruhiuu, C. N., Ochola, G. O., Onyuok, S. O., Ochieng, H., Li, B., Zhu, Y., ... Shi, Z. (2024).

Diversidad viral sustancial en murciélagos y roedores de África Oriental: Insights en evolución, recombinación y cocirculación. *Microbiome*, 12(<https://doi/s40168-024-01782-4>)

Williams, E., Spruill-Harrell, B., Taylor, Lee, J., Nywening, A., Yang, Z., & Jonsson, C. B. (2021). Common themes in zoonotic spillover and disease emergence:

Lessons learned from bat-and rodent-borne RNA viruses. . *Viruses*, , 13(8), 1509.

World Health Organization. (2024). Dengue and severe Dengue. Obtenido de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Dengue-and-severe-Dengue>

World Health Organization. (2023). Mid-term evaluation of the Global Strategy to Eliminate Yellow Fever Epidemics (EYE) 2017 - 2026, Volume 1: Report. [https://www.who.int/publicaciones/m/ítems/mid-plazo-evaluación-de-el-global-strategia-a-eliminar-amarillo-fiebre-epidemics-Ojo\)-2017--2026-volumen-1--report---january-2023](https://www.who.int/publicaciones/m/ítems/mid-plazo-evaluación-de-el-global-strategia-a-eliminar-amarillo-fiebre-epidemics-Ojo)-2017--2026-volumen-1--report---january-2023)

World Health Organization. (2022). Yellow fever. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>

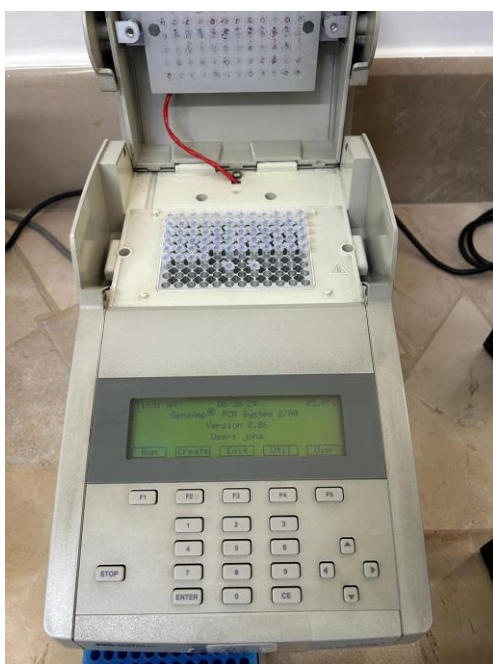
Woolhouse, M. E. J., & Adair, K. (2013). The diversity of human RNA viruses. *Future virology*, 8(2), 159–171. <https://doi.org/10.2217/fvl.12.129>

Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2012). Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*, 367(19), 1814-1820. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211721>

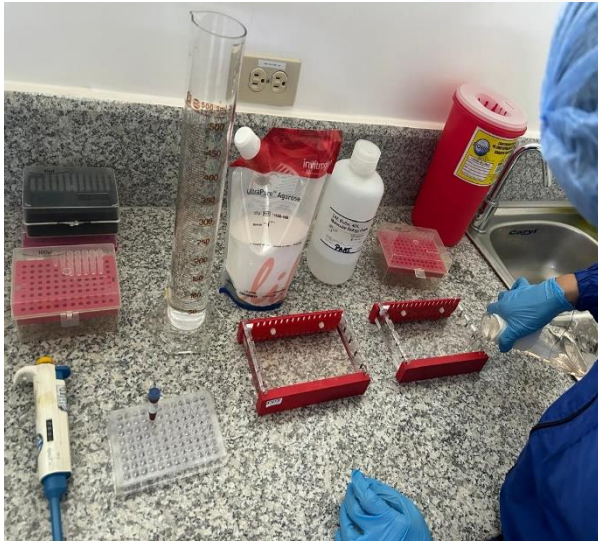
Zhao, R., Wang, M., Cao, J., Shen, J., Zhou, X., Wang D., & Cao J. Flavivirus: From Structure to Therapeutics Development. *Life*. 2021; 11(7):615. <https://doi.org/10.3390/life11070615>

Anexos

Anexo A. Termociclador Punto Final: Equipo Empleado para la RT-PCR anidada

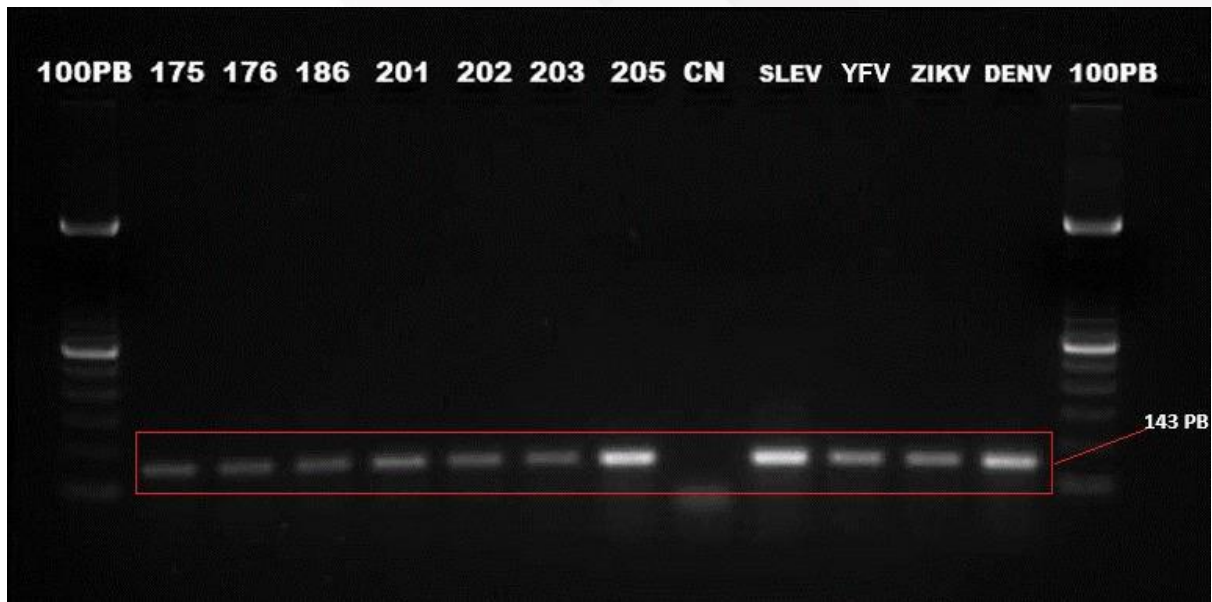


Anexo B. Preparación de Geles de Agarosa al 2%



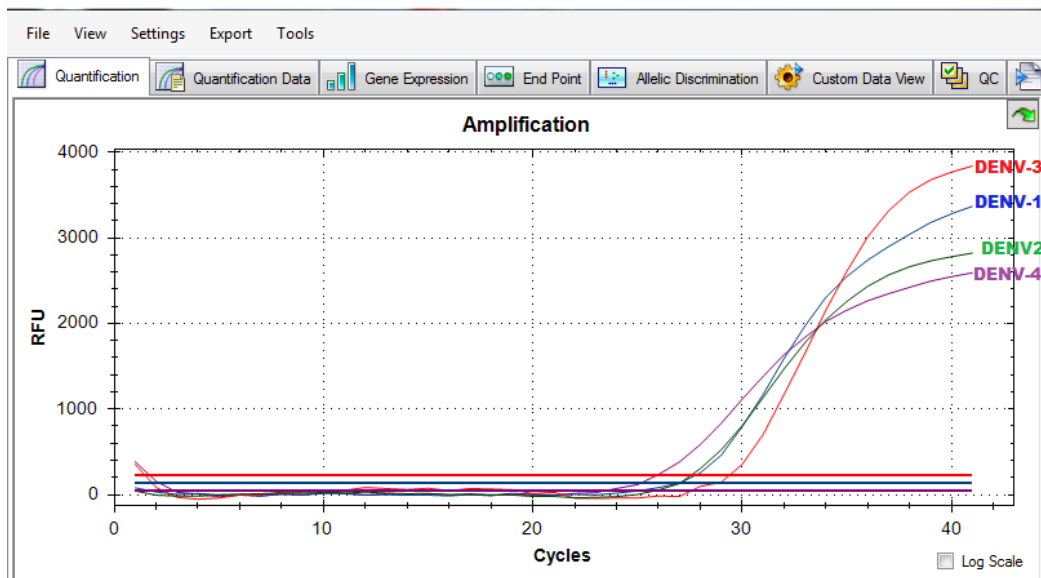
Anexo C. Visualización del producto de amplificación de 143pb de Flavivirus





Anexo D. Controles positivos para Flavivirus: Resultados de la PCR Tiempo Real de los Serotipos de Dengue, Fiebre Amarilla, Zika, Virus de Encefalitis de

San
Luis.



Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
H06	Cy5	DENV4	Pos Ctrl	CP DENV	23.48
H06	FAM	DENV1	Pos Ctrl	CP DENV	27.07
H06	HEX	DENV2	Pos Ctrl	CP DENV	25.96
H06	Texas Red	DENV3	Pos Ctrl	CP DENV	29.37

