



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE  
LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
*Ecología de Enfermedades*  
DIVERSIDAD DE CORONAVIRUS EN MURCIÉLAGOS DEL  
LÍMITE NEÁRTICO NEOTROPICAL EN MÉXICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

Paola Martínez Duque

TUTOR PRINCIPAL

Gerardo Suzán Azpiri

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

COMITÉ TUTOR

Rosa Elena Sarmiento Silva

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

Simon John Anthony

CENTER FOR INFECTION AND IMMUNITY, COLUMBIA UNIVERSITY

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Diciembre 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

---

Con toda mi gratitud y amor a toda mi familia, en especial a Raúl mi papá, a Mary mi mamá y Alejandro mi hermano.

## AGRADECIMIENTOS

---

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el desarrollo de esta investigación

Al Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A EcoHealth Alliance y al Center of Infection and Immunity, Columbia University por financiar este proyecto y por todas las oportunidades y el conocimiento otorgado a lo largo de este tiempo.

Al Laboratorio de Ecología de Enfermedades de la FMVZ, UNAM, por todo lo que me han brindado en este tiempo.

Al Dr. Gerardo Suzán Azpiri por la confianza y las oportunidades otorgadas a lo largo de estos años y durante este proyecto.

Al Dr. Simon J. Anthony por su confianza y apoyo durante el desarrollo de esta investigación.

A la Dr. Rosa Elena Sarmiento por enriquecer este trabajo con sus comentarios y conocimiento.

Al Dr. Rafael Ojeda por todo el apoyo y tiempo otorgado en diferentes etapas de este proyecto.

Al Dr. Heliot Zarza por sus valiosos comentarios y apoyo.

Al Dr. Alejandro Martínez por sus valiosos comentarios.

A todas las personas que me acompañaron, y me brindaron todo su apoyo y su tiempo durante todas y cada una de las diferentes etapas de este proyecto.

A toda mi familia por brindarme su cariño, apoyo y comprensión durante este proceso.

## CONTENIDO

---

RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
<b>CAPÍTULO I DIVERSIDAD DE COV EN MURCIÉLAGOS DEL LÍMITE NEÁRTICO NEOTROPICAL EN MÉXICO</b>	<b>10</b>
INTRODUCCIÓN	<b>11</b>
MATERIALES Y MÉTODOS	<b>16</b>
ÁREA DE ESTUDIO	16
DISEÑO DE ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS	19
ABUNDANCIA DE HOSPEDEROS	20
ANÁLISIS MOLECULAR DE CoVs	20
ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE CoVs	22
RIQUEZA Y DIVERSIDAD DE CoVs	23
RESULTADOS	<b>25</b>
COLECTA DE MUESTRAS	25
ABUNDANCIA HOSPEDEROS	25
ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE CoVs	27
RIQUEZA Y DIVERSIDAD DE CoVs	29
DISCUSIÓN	<b>45</b>
CONCLUSIÓN	<b>57</b>
<b>CAPÍTULO II MODELO DE DISTRIBUCIÓN POTENCIAL DE COV EN MURCIÉLAGOS DE AMÉRICA</b>	<b>59</b>
INTRODUCCIÓN	<b>60</b>
MATERIALES Y MÉTODOS	<b>64</b>
COLECTA DE INFORMACIÓN	64
RIQUEZA DE HOSPEDEROS	66
MODELO DE DISTRIBUCIÓN POTENCIAL DE CoV	67
RESULTADOS	<b>68</b>
COLECTA DE INFORMACIÓN	68
RIQUEZA DE HOSPEDEROS	69
DISCUSIÓN	<b>78</b>
DISCUSIÓN GENERAL	<b>92</b>
CONCLUSIÓN GENERAL	<b>98</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

---

CUADRO 1. Ubicación de las localidades de Colecta.....	18
CUADRO 2. Número de capturas y atributos de los individuos capturados por sitio de monitoreo.....	31
CUADRO 3. Clasificación de las especies de murciélagos capturados.....	33
CUADRO 4. Muestras de murciélagos positivas a Coronavirus.....	38
CUADRO 5. Estimación de la riqueza de CoV.....	42
CUADRO 6. Variables bioclimáticas empleadas por WorldClim.....	71
CUADRO 7. Puntos de presencia de CoVs en murciélagos de América.....	72
CUADRO 8. Especies de murciélagos hospederos de CoV en América y su clasificación.....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

FIGURA 1. Distribución de las regiones Neártica, Neotropical y zona de transición, en base a especies de mamíferos.....	9
FIGURA 2. Localidades de Colecta.....	17
FIGURA 3. Abundancia total de especies capturadas.....	32
FIGURA 4. Curvas de Rango_Abundancia de especies por localidad de colecta.....	34
FIGURA 5. Curvas de Rango_Abundancia de especies por localidad de colecta.....	35
FIGURA 6. Curvas de Rango_Abundancia de especies por localidad de colecta.....	36
FIGURA 7. Variabilidad en la secuencia de aminoácidos de CoVs en la región de la RdRp.....	37
FIGURA 8. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de CoV de murciélagos.....	39
FIGURA 9. Red de haplotipos de CoVs identificados en Murciélagos Mexicanos.....	40
FIGURA 10. Distribución geográfica de los genotipos de CoVs identificados.....	41
FIGURA 11. Curva de rarefacción y extrapolación basada en el total de la muestra.....	43
FIGURA 12. Curva de rarefacción y extrapolación de la localidad "2.Vegas".....	43
FIGURA 13. Curva de rarefacción y extrapolación de la localidad "14. Guano".....	44
FIGURA 14. Curva de rarefacción y extrapolación de la localidad "8. Agua".....	44
FIGURA 15. Registros de CoV en murciélagos de América.....	74
FIGURA 16. Modelo de distribución potencial de especies de murciélagos hospederos de CoV en América.....	75
FIGURA 17. Modelo de distribución potencial de CoV en América.....	76
FIGURA 18. Distribución potencial de CoV y especies de murciélagos reservorios en América.....	77

En años recientes el conocimiento sobre el papel que juegan los murciélagos en el mantenimiento y transmisión de enfermedades infecciosas emergentes se ha incrementado, mostrando que estos mamíferos son hospederos de virus que pueden cruzar la barrera entre especies e infectar al humano, animales domésticos y otras especies silvestres. Diferentes genotipos dentro de los Coronavirus (CoVs) han sido identificados en especies de murciélagos alrededor del mundo después de los brotes del Síndrome Respiratorio Agudo Severo en China (2002-03), y del Síndrome Respiratorio del Medio Oriente en Arabia Saudita (2012-13). Múltiples estudios han sugerido que los murciélagos actúan como hospedero natural de CoVs, por lo que el monitoreo de este grupo viral en quirópteros se ha incrementado.

Los objetivos de esta investigación (Capítulo 1), fueron monitorear la presencia de CoVs en murciélagos de la región de transición Neártico-Neotropical en México, caracterizar la diversidad filogenética y los patrones geográficos de los genotipos de CoVs identificados, así como describir su diversidad en la zona. Durante mayo-septiembre de 2014 y enero-marzo de 2015, se colectaron muestras de 633 murciélagos de 31 especies diferentes, en catorce localidades ubicados en la Ciudad de México, Puebla, Morelos e Hidalgo. Se colectaron 1,899 muestras (hisopados oral y rectal, y sangre), y se realizó la extracción de ácidos nucleicos totales de 1,596 muestras. La detección de CoVs se realizó mediante PCR anidado cuyo blanco es una región de la polimerasa (RdRp). Los productos de PCR del tamaño esperado fueron clonados y secuenciados, los resultados revelaron secuencias de CoVs en 39/559 (69%) individuos pertenecientes a catorce especies diferentes, en ocho de las catorce localidades. Los análisis indican la presencia de doce clados, nueve  $\alpha$ -CoVs y tres  $\beta$ -CoVs, ocho de los cuales se reportan por primera vez. Al realizar la extrapolación de estos datos, se estimó una riqueza máxima de diecinueve genotipos. Mientras que los resultados del esfuerzo de muestreo global representaron una cobertura total del 84%, en relación con la riqueza viral estimada.

El siguiente objetivo (Capítulo 2), fue desarrollar un modelo de distribución potencial de CoV en murciélagos de América, empleando la aproximación de Modelo de Nicho Ecológico a partir de modelos de distribución de especies de murciélagos hospederos de CoVs en América. El resultado de este modelo muestra que la distribución potencial del virus no se restringe a regiones tropicales con mayor concentración de hospederos, observando áreas de distribución potencial también en Norteamérica y áreas de Sudamérica con ecosistemas dominados por praderas y bosques templados, en donde la riqueza de hospederos es menor. Este trabajo expande nuestro conocimiento sobre la diversidad de CoVs en murciélagos de la región de transición Neártico-Neotropical ubicada al centro de México, y presenta un modelo de distribución potencial de CoVs en murciélagos, herramienta que puede ser empleada para dirigir esfuerzos y hacer más eficiente el uso de recursos en el monitoreo de CoVs en murciélagos del continente.

*Palabras clave: Coronavirus, murciélagos, diversidad viral, modelo de distribución potencial, neártico, neotrópico, México, América.*

## ABSTRACT

---

In recent years knowledge about role played by bats in the maintenance and transmission of emerging infectious diseases has been increasing, elucidating that bats are reservoir hosts for viruses which can cross species barriers to infect humans, domestic and wild animals. Viral species within Coronavirus (CoV) have been identified in bat species around the world, after the outbreaks of Severe Acute Respiratory Syndrome in China (2002-03), and Middle East Respiratory Syndrome in Saudi Arabia (2012-13). Due to multiple studies suggesting that bats are the natural reservoir-host of CoVs, monitoring this viral group on bats has increased, becoming a major focus for modeling and predicting outbreaks.

Chapter I aims were to survey the presence of CoVs in bats from Nearctic-Neotropical region in Mexico and to characterize phylogenetic diversity and geographic patterns within CoV genotypes identified. From May-September 2014 and from January-March 2015, a total of 633 individuals of thirty-one species were sampled, in fourteen different refuges located in Mexico City, Puebla, Morelos and Hidalgo states. A total of 1,899 samples (oral swabs, rectal swabs and blood) were collected; and total nucleic acid was extracted from 1,596 samples. CoV detection was performed using PCR primers targeting the RNA-dependent RNA-polymerase. PCR products were cloned and sequenced, the results revealed CoV sequences in 39/559 (6.9%) bats of fourteen species representing three families from eight collecting sites. Results indicated the presence of twelve clades, nine clustered within  $\alpha$ -CoVs, and three within  $\beta$ -CoVs, eight of them were reported for the first time. These data represent an estimated 84% of sampling coverage for CoV detection in the study region and expand the knowledge on CoV diversity in bats from the Nearctic-Neotropical transitional region.

In chapter two the principal aim was to develop a bat Coronavirus potential distribution model in America, through Ecological Niche Modeling perspective from host potential distribution model. Coronavirus potential distribution area indicates that this virus is not restricted at tropical regions with higher host richness, highlighting the importance to survey temperate areas at North America and South America dominated by meadows and temperate forest where host richness is lower. This study expands our knowledge about CoVs diversity in Nearctic-Neotropical bats in Mexico, and present the first bat-CoVs potential distribution model in America, this tool can be applied to conduct future surveys making efficient available resources in future bat-CoVs surveys in America.

*Key words: Coronavirus, bats, viral diversity, ecological niche modeling, nearctic, neotropics, Mexico, America.*

## INTRODUCCIÓN GENERAL

---

Las interacciones simbióticas en la naturaleza, desempeñan papeles fundamentales en la ecología y evolución de los organismos involucrados (Thrall et al., 2007). El resultado de estas interacciones que van del mutualismo al parasitismo, es diverso, cambiante y en algunas ocasiones poco claro, pues fluctúa en un gradiente influenciado por factores ambientales, temporales y por características relacionadas con la biología de los propios organismos (Leung & Poulin, 2008). Debido a la intervención de estos factores diversos, las interacciones son dinámicas y poseen gran plasticidad, lo que provoca que los efectos sobre los organismos involucrados sean variables en tiempo y en espacio (Lesser et al., 2013).

El parasitismo se ha definido como la relación simbiótica en la que el simbiote usa al hospedero como fuente de recursos, causándole algún daño (Poulin, 2007). Sin embargo, marcar los límites entre el parasitismo y el comensalismo no es sencillo cuando las patologías causadas por el parásito (macro y micro parásitos) en el hospedero son ligeras o poco perceptibles (Sachs & Simms, 2006). En general, se asume que las interacciones parásito-hospedero atraviesan un periodo de ajuste, durante el cual el simbiote tendrá efectos negativos en el hospedero por falta de adaptación, para finalmente llegar a un estado de coexistencia, en el que será benigno para el hospedero después de un proceso de adaptación evolutiva (Poulin, 2007).

El proceso de evolución parásito-hospedero sigue patrones de adaptación dirigidos por la variación en los factores involucrados. Estos factores pueden ser intrínsecos (organismos) y/o extrínsecos (ambiente) y generar resultados variables y en ocasiones contrastantes (Ebert & Herre, 1996; Lively, 1999; Day & Proulx, 2004; Boots et al., 2009). La interacción entre los organismos es el resultado de mecanismos que actúan a escala de tiempo evolutivo (miles de millones de años), produciendo gran diversidad de especies bien adaptadas al ambiente (Carroll et al., 2007). Por otro lado, la interacción entre organismos (parásito-hospedero) y el ambiente, ocurre a escala de tiempo ecológico, lo que provoca el enfrentamiento a cambios constantes e indeterminados en cortos periodos de tiempo, causando modificaciones a diferentes escalas en tiempo y en espacio, y con implicaciones en procesos ecológicos y evolutivos (Barrett et al., 2008).

Los procesos ecológicos y evolutivos moldean la virulencia o patogenicidad de un parásito, y generalmente varía en los diferentes escenarios ecológicos, de tal forma que una especie de parásito puede existir de forma patogénica o comensal en distintos contextos, y ocasionar niveles de daño variables en diferentes especies de hospederos y en sus poblaciones. Los macroparásitos (p.ej. helmintos y artrópodos) y los microparásitos (p.ej. virus, bacterias, protozoarios y hongos), pueden inducir cambios en las características de una población al modificar los índices en las tasas de natalidad y mortalidad sin ocasionar signos clínicos aparentes, así como también pueden modificar procesos ecosistémicos al desencadenar brotes epidémicos en poblaciones altamente susceptible y causar modificaciones en

dinámicas poblacionales tan graves que lleven a procesos de extinción (Duffy & Sivers\_Becker, 2007; Tompkins et al., 2012; McCallum, 2012).

En las poblaciones los brotes epidémicos responden en múltiples ocasiones a la emergencia o reemergencia de enfermedades infecciosas (EIE). Estas enfermedades se han definido como aquellas enfermedades que aparecen por primera vez en una población, o que existían previamente pero que incrementan rápidamente su incidencia o rango geográfico (Morse, 1995; Washer, 2010). Un evento fundamental para la emergencia de una enfermedad, es un cambio en la ecología del hospedero o del parásito como resultado de diversos factores como: actividades antropogénicas, cambios en el uso de suelo y la urbanización, variaciones en las condiciones climáticas y ambientales, variaciones en la demografía y en el comportamiento de la especie hospedera, aumento en la susceptibilidad a la infección, adaptación microbiana, zonas con bajo desarrollo económico y poca eficiencia en los sistemas de salud, aumento en la eficiencia de viajes y comercio internacional, e incremento en la tasa de contacto entre fauna silvestre, animales domésticos y humanos. Estos factores finalmente dejan disponibles nuevos nichos ecológicos que son favorables para ciertos agentes infecciosos (Morse, 1995; Daszak et al., 2000; Morens et al., 2004; Jones et al., 2008;).

Se ha estimado que la mayoría de las EIE que afectan a los seres humanos son zoonóticas (más del 60%), de etiología viral y con reservorios en especies de fauna silvestre. Los agentes causales de estas enfermedades se han transmitido de poblaciones silvestres al humano con éxito, por procesos de salto de hospedero o "spillover events"

(Cleaveland et al., 2001; Power & Mitchel, 2004; Wolfe et al., 2007; Johnson et al., 2015).

Se define como salto de hospedero al proceso en el que un parásito es transmitido de una especie reservorio a una nueva especie hospedera causando enfermedad (Power & Mitchell, 2004). Esto sucede como resultado de una serie de factores asociados al parásito entre los que destacan la alta incidencia del parásito en el reservorio natural, la expresión de nuevas características, alta capacidad evolutiva, amplio rango de hospederos, eventos de recombinación, estructura genética segmentada, receptores genéticamente conservados, entre otras características que son comunes en virus de ARN monocatenario. (Cleaveland et al., 2001; Parrish et al., 2008; Johnson et al., 2015). Además de características asociadas al hospedero como: la tasa de contacto entre el reservorio y el nuevo hospedero, la capacidad del hospedero para mantener al nuevo parásito y el éxito en la transmisión sostenida entre individuos de la nueva especie hospedera (Engering et al., 2013; Dixon et al., 2014).

Algunas zoonosis virales están bien estudiadas y se reconoce la identidad de las especies silvestres que actúan como reservorios naturales (p. ej. Influenza aviar y rabia). Sin embargo, el reconocimiento de los hospederos naturales de otras zoonosis virales de emergencia reciente como el Ebolavirus y los Coronavirus (CoVs) causantes del Síndrome Agudo Respiratorio Severo (SARS) y del Síndrome Respiratorio de Medio Oriente (MERS), hasta hace poco permanecían indeterminados (Simmonds, 2001; Woolhouse & Gaunt, 2007; Wang & Crameri, 2014).

Los reservorios naturales asociados a virus zoonóticos emergentes son principalmente especies de roedores, ungulados, primates, carnívoros, aves y murciélagos (Cleaveland et al., 2001; Woolhouse et al., 2012). En particular, se han identificado alrededor de 24 familias virales en especies de murciélagos, entre las que se encuentran las familias *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Filoviridae* y *Coronaviridae* (Calisher et al., 2006; Moratelli & Calisher, 2015; Calderon et al., 2016; Young & Olival, 2016). Estas familias engloban géneros virales de importancia en salud pública y animal, por ejemplo, los virus de la Rabia (Warrell & Warrell, 2004), Marburg (Towner et al., 2009), Ébola (Leroy et al., 2005), Nipah (Wacharapluesadee et al., 2005), Hendra (Halpin et al. 2000), y los CoVs causantes de SARS y MERS (Li et al., 2005; Drexler et al., 2014).

Los brotes epidémicos de SARS-Cov (China, 2002\_2003) (Drosten et al., 2003), y MERS-Cov (Arabia Saudita, 2012) (Zaki et al., 2012), en la población humana, aumentaron el interés en el estudio de este género viral a escala global. Durante el inicio del brote de SARS-CoV se desconocía al reservorio del virus, y durante las primeras investigaciones se identificó a la civeta de palma (*Paguma larvata*), al perro mapache (*Nyctereutes procyonoides*) y al tejón turón chino (*Melogale moschata*) como hospederos naturales (Xu et al., 2004; Song et al., 2005). Posteriormente, estudios de campo y análisis filogenéticos a mayor escala revelaron que el murciélago de herradura (*Rhinolophidae*) es el reservorio natural de SARS-CoV, y que los mamíferos antes mencionados actúan como hospederos intermediarios facilitando la amplificación del virus (Lau et al., 2005; Li et al., 2005).

Una vez identificado el papel de los murciélagos como reservorios de SARS-CoV, se incrementó el monitoreo de este virus en quirópteros del mundo (Drexler et al., 2014). Los diferentes estudios realizados revelaron altos índices de diversidad de CoVs en murciélagos, más que en otro orden de mamíferos. Este hallazgo, hizo evidente la necesidad de entender la relación ecológica y evolutiva entre murciélagos – CoVs alrededor del mundo (Poon et al., 2005; Price et al., 2014).

En general, se sabe que la distribución de los organismos sigue patrones que responden a su adaptación al medio y a su historia evolutiva, por lo tanto, conocer la distribución geográfica de los organismos involucrados en la dinámica de una enfermedad (parásitos, vectores y hospederos), así como su nicho ecológico, es fundamental para entender los patrones ecológicos y epidemiológicos que sigue una enfermedad. El reconocimiento de estas características, ha contribuido al desarrollo de modelos predictivos que evalúan diferentes aspectos de los sistemas de enfermedades como la identificación de patrones de distribución geográfica, gradientes de riqueza, patrones de coocurrencia, caracterización del nicho de un parásito en función de las características y el nicho de su hospedero, etcétera (Peterson et al., 2004; Peterson, 2007; Fenichel et al., 2010; Murray et al., 2015). Esta información en general es útil para entender la dinámica ecológica y evolutiva de los parásitos y las enfermedades, y en consecuencia resulta útil para el establecimiento de estrategias de control y prevención de enfermedades emergentes en las diferentes poblaciones susceptibles (Parkes et al., 2005).

En México, el monitoreo de CoVs en murciélagos ha revelado una relación de coevolución en donde la especie hospedera actúa como conductor en la selección y evolución del virus, de este modo, los patrones de distribución geográfica del hospedero podrían determinar la distribución y la epidemiología del virus (Anthony et al., 2013). Por ejemplo, en la Ciudad de México se identificó un grupo monofilético de CoVs diferente a las secuencias identificadas en el Sureste del país, este resultado sugiere que la diferencia en la composición filogenética del virus puede reflejar variaciones en la composición de las comunidades de hospederos distribuidas en las regiones del Neártico, del Neotrópico y de la región de transición localizadas en México (Ojeda, 2015).

Para identificar los límites entre las regiones biogeográficas del Neártico y del Neotrópico en México, se han empleado diversos grupos taxonómicos. El resultado señala que la mayor barrera de dispersión es el Cinturón Volcánico Transmexicano (CTV; Fig. 1), esta cordillera localizada al centro de la República Mexicana posee rasgos geomórficos, geológicos y bióticos muy particulares, que han contribuido a la diferenciación de la biota mexicana en un componente Neotropical y otro Neártico (Ferrusquía – Villafranca, 2007; Gámez et al., 2012; Ornelas et al., 2013; Morrone, 2017). Las características particulares de esta región originan que en un espacio relativamente restringido se distribuya una gran diversidad de especies residentes, migratorias, endémicas, y otras ampliamente distribuidos con afinidad tanto boreal como tropical, lo que vuelve a esta zona una de las áreas de mayor diversidad biológica en el mundo (Marshall & Liebherr, 2000; González\_Medrano, 2003).

La peculiaridad ecológica de la zona de transición, además de los resultados publicados previamente sobre la relación murciélagos – CoVs en México, vuelven interesante el identificar y entender las asociaciones parásito – hospedero desde un enfoque geográfico y evolutivo. Por lo anterior, el objetivo general de este proyecto, fue evaluar la presencia y diversidad de CoVs, en comunidades de murciélagos distribuidas en la región del CVT, así como caracterizar su distribución filogenética y geográfica.

Para cumplir con este objetivo, se plantearon objetivos específicos que se presentan en los siguientes capítulos. En el Capítulo I. se determinó la prevalencia de CoVs en comunidades de murciélagos ubicadas en la región del CVT, se describió la diversidad filogenética, y se caracterizó su distribución geográfica. En el Capítulo II. se construyó un modelo de distribución potencial de hospederos (quirópteros) de CoVs en América y un modelo de distribución potencial de CoVs asociados a murciélagos de América.

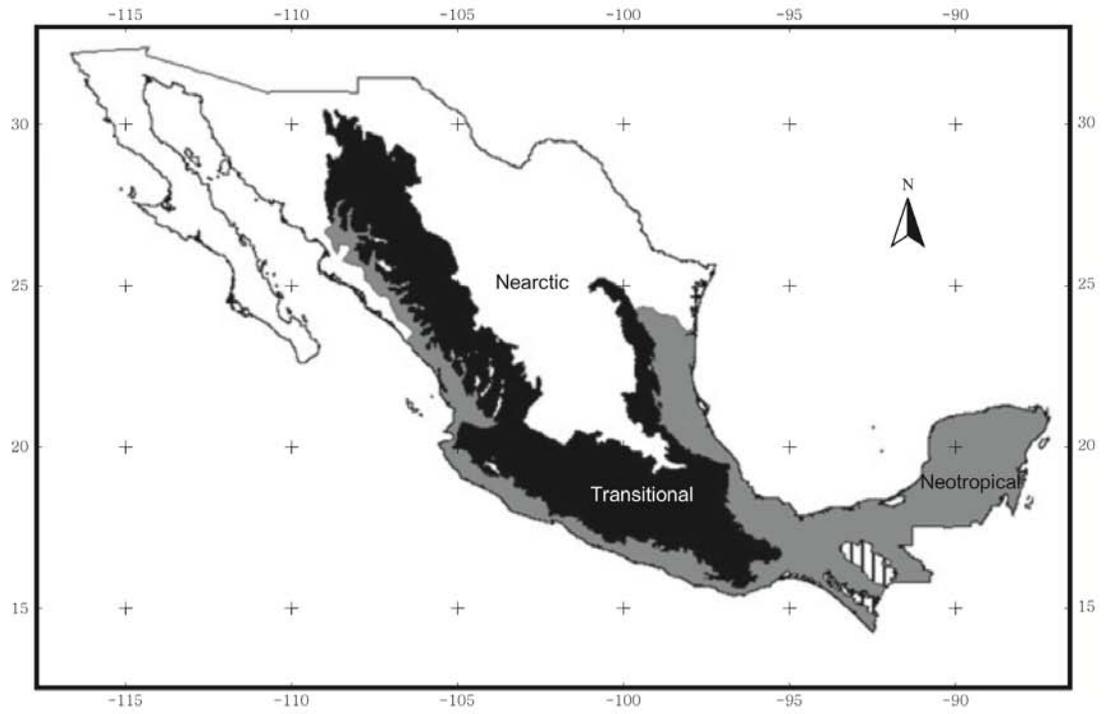


FIGURA 1. Distribución de las regiones Neártica, Neotropical y zona de transición, en base a especies de mamíferos. Tomado de Escalante et al., 2004.

Diversidad de Coronavirus en  
Murciélagos del Límite Neártico  
Neotropical en México

A lo largo de la historia de la humanidad se han presentado brotes epidémicos que han concluido en grandes pandemias en la población humana (p. ej. Influenza y peste). La investigación en temas de salud ha sido primordial para la toma de decisiones enfocadas en el control y la prevención de brotes epidémicos en los años más recientes, y el generar información desde una perspectiva transdisciplinarias es fundamental para enfrentar los retos generados asociados a la emergencia de enfermedades (Morens et al., 2004; Sirmali et al., 2017).

Un enfoque empleado para el estudio de enfermedades infecciosas a escala macroecológica, es mediante la identificación de patrones de distribución geográfica de organismos involucrados en la ecología de una enfermedad (hospederos, vectores y parásitos). (Murray et al., 2015). Otro enfoque es a escala microevolutiva, mediante la identificación y descripción de la historia evolutiva de los organismos, lo que permite identificar los orígenes y los patrones de dispersión y emergencia de enfermedades en diferentes poblaciones. Ambas aproximaciones han sido muy útiles para el estudio de enfermedades infecciosas de etiología viral, en donde se han logrado identificar procesos ecológicos y epidemiológicos que moldean la diversidad genética de los virus, y que actúan en una escala de tiempo y espacio similar a la generada por patrones mutacionales en las poblaciones virales (Moya et al., 2004).

Medir la diversidad genética de los virus es esencial para entender sus dinámicas evolutivas, sin embargo, reconstruir las características genéticas de una población, como la composición y las frecuencias relativas de los genomas virales, también referidos como cepas o haplotipos, representa retos a diferente escala, desde el diseño experimental hasta el análisis de la información (Iwasa et al., 2004). A pesar de que la inferencia de haplotipos puede presentar problemas asociados a la escala de análisis (p. ej. el largo de la región a analizar dentro del genoma), las inferencias globales de haplotipos o también llamadas ensamblaje de quasiespecies, pueden ayudar a entender patrones de transmisión, evolución, y selección, que se reflejan en la patogénesis y otros procesos derivados de la compleja interacción entre un virus y su hospedero (Eriksson et al., 2008; Beerenwinket et al., 2012). Así, la identificación de patrones ecológicos y evolutivos que siguen las enfermedades virales, permite identificar el origen genético de las infecciones, sus reservorios naturales y la ubicación geográfica de los elementos que favorecen su emergencia en poblaciones susceptibles (fauna silvestre, animales domésticos y humanos) (Holmes, 2004; Kilpatrick et al., 2006).

En 2002 se presentó una de las pandemias más importantes de las últimas décadas, en este año se registró el primer caso del Síndrome Agudo Respiratorio Severo (SARS-CoV) en China. Para 2003 esta pandemia había causado 8,096 casos, incluyendo 774 muertes en 27 ciudades del mundo (ICTV, 2017). Posterior a este brote, en 2012 la emergencia de un nuevo Coronavirus en humanos se presentó en Arabia Saudita. El virus causante del Síndrome Respiratorio de Oriente

Medio (MERS-CoV), ocasionó para 2016, 1,728 casos confirmados incluyendo 624 muertes en 27 ciudades del mundo (ICTV, 2016).

Los brotes de CoVs en humanos, amenazaron los sistemas de salud pública a nivel internacional, a tal grado, que hicieron evidente la necesidad de entender diferentes aspectos de este virus. Por ejemplo, factores asociados a su mecanismo de replicación, el origen de su patogénesis en humanos, y factores ecológicos y evolutivos asociados a su emergencia. Y a partir de este conocimiento se buscó identificar las causas de la emergencia, y dar pie a la creación y al establecimiento de mecanismos de control y prevención de brotes futuros (Peiris et al., 2003; Peiris & Guan, 2004; Wang et al., 2006; Raj et al., 2014).

A partir de la emergencia de CoVs en humanos el estudio de estos virus ha aumentado a nivel internacional, y a la fecha se han identificado nuevas especies en hospederos en los que previamente no habían sido descritos (especies de aves y murciélagos). Además, se ha determinado que la mayoría de los genotipos de CoVs infectan de manera natural a una sola especie hospedera, o a un número limitado de especies relacionadas entre sí, y que la gran diversidad de genotipos se debe principalmente a su elevada tasa mutacional ( $0.80 - 2.38 \times 10^{-3}$  por sitio por año) y a sus dinámicas evolutivas (Drexler et al., 2014; Durães\_Carvalho et al., 2015). Estas características podrían explicar la relación coevolutiva entre CoVs y diferentes especies de murciélagos específicamente (Cui et al., 2007; Anthony et al., 2013; Ojeda, 2015).

La familia Coronaviridae pertenece al orden Nidovirales y está representada por dos subfamilias (Torovirinae & Coronavirinae). Estos virus son de gran tamaño y poseen organización genómica y estrategias de replicación similares, sin embargo, difieren en su morfología y en la longitud del genoma (Zuckerman et al., 2004). La subfamilia Coronavirinae se divide en 4 géneros:  $\alpha$ -CoV,  $\beta$ -CoV,  $\delta$ -CoV y  $\gamma$ -CoV (ICTV, 2017). Las diferentes especies de estos géneros virales, se han identificado en especies de aves y mamíferos y se han reconocido como agentes causales de enfermedades que afectan tracto digestivo y respiratorio principalmente (Gallagher & Buchmeier, 2001; Durães\_Carvalho et al., 2015).

En las últimas décadas, los CoV se han reconocido como agentes causales de enfermedades emergentes y re emergentes, tanto en animales como en humanos. Además, se ha identificado a los murciélagos como reservorio natural de diferentes genotipos de CoVs, incluidos el SARS-CoV y el MERS-CoV (Lau et al., 2005; Wenhui et al., 2005; Li et al., 2005; Lau et al., 2010;). Por lo anterior, el monitoreo de este grupo viral en murciélagos se ha convertido en un eje fundamental para entender aspectos relacionados a la prevalencia del virus en poblaciones silvestres, y se ha sugerido que la ecología del hospedero, puede ser determinante para definir el grado de susceptibilidad y la prevalencia del virus, limitando o favoreciendo su transmisión dentro o entre diferentes especies (Garamszegi & Mølller, 2007; George et al., 2011; Luis et al., 2013).

En México, las comunidades de murciélagos son muy diversas y presentan niveles inusuales de riqueza y abundancia en comparación

con otros grupos de mamíferos. Estas características hacen de este grupo uno de los más interesantes para el desarrollo de investigaciones desde diferentes enfoques. Con la finalidad de entender aspectos de la ecología y evolución en la dinámica Murciélagos-CoVs en México, en 2013 se realizó una investigación en la que se reportaron ocho genotipos de  $\alpha$ -CoVs y cuatro de  $\beta$ -CoVs en murciélagos mexicanos. Esta investigación propuso que las especies de hospederos pueden actuar como conductores clave en la selección y evolución de los Coronavirus (Anthony et al., 2013).

Para aumentar nuestro conocimiento sobre la interacción entre CoVs y murciélagos mexicanos, se eligió como área de estudio la zona del Cinturón Volcánico Transmexicano (CVT), en la región de transición Neártico-Neotropical, en donde gracias a la heterogeneidad ambiental, se distribuye una gran riqueza de especies y se ha reconocido como un centro importante de diversificación y endemismos (Escalante et al., 2004).

Nuestros objetivos fueron, determinar la prevalencia de CoVs en comunidades de murciélagos de la zona de transición, describir la diversidad filogenética y taxonómica, y caracterizar la distribución geográfica de los CoVs identificados. Para cumplir con los objetivos se emplearon herramientas filogenéticas y filogeográficas para realizar la caracterización molecular de los genotipos de CoVs detectados. Por otra parte, se emplearon análisis ecológicos para determinar la diversidad de CoVs y la diversidad de hospederos quirópteros.

### *Área de Estudio*

El área de estudio se localizó al centro de la República Mexicana, dentro de la zona del CVT. Con base en revisión de la literatura y comunicación personal, se identificaron 35 refugios de murciélagos como sitios potenciales de monitoreo. Estos se ubican en los estados de Morelos, Hidalgo, Ciudad de México y Puebla.

Para seleccionar las localidades de colecta, se realizó una lista de especies de murciélagos por refugio (cuevas y edificios), y se identificaron aquellas especies que residían en dos o más localidades con la finalidad de coleccionar muestras de la misma especie en poblaciones independientes. Finalmente, bajo criterios de tipo logístico (accesibilidad, seguridad, obtención de permisos, etc.), y optimizando la diversidad de especies distribuidas en ambas ecozonas, se eligieron 14 sitios (Figura 2; Cuadro 1).

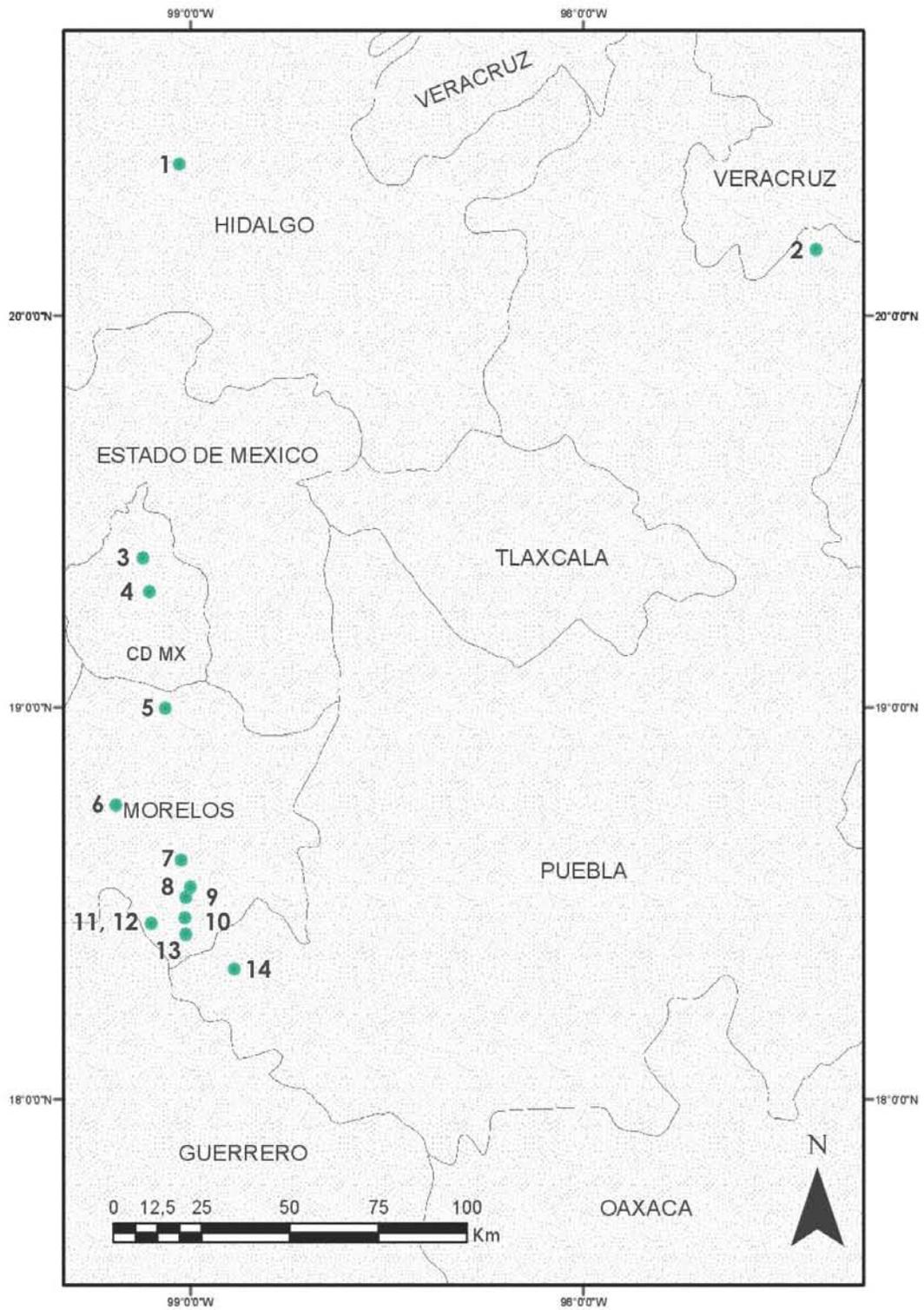


FIGURA 2. Localidades de Colecta.

CUADRO 1. Ubicación de las localidades de Colecta.

	NOMBRE Y TIPO DE REFUGIO	LONGITUD	LATITUD
HIDALGO	1. Xoxafi	_99.0276	20.3881
PUEBLA	2. Vegas	_97.4054	20.1703
	14. Guano	_98.8884	18.3326
CIUDAD DE MÉXICO	3. Viga	_99.1218	19.3824
	4. UAM	_99.0989	18.4486
MORELOS	5. Diablo	_99.0645	18.9981
	6. Salitre	_99.1897	18.7501
	7. Chapultepec	_99.0248	18.6098
	8. Agua	_98.999	18.5423
	9. Presa	_99.0130	18.5157
	10. Pinta	_99.0149	18.4629
	11. Toro	_99.0989	18.4486
	12. Encantada	_99.0989	18.4486
	13. Tereso	_99.0121	18.4213

### *Diseño de estudio y toma de muestras*

El trabajo de campo, se realizó de mayo a septiembre de 2014 y de enero a marzo de 2015. En cada localidad de colecta se identificó la salida del refugio o las zonas de paso de los murciélagos. Al atardecer se colocó una trampa de harpa o redes de niebla. El esfuerzo de muestreo fue variable y dependiendo de las características de cada refugio.

Para la colecta de muestras biológicas se capturó un máximo de 20 individuos por especie en cada localidad. Cada individuo capturado se colocó en sacos de tela hasta la colecta de datos y la toma de muestras. Los individuos se identificaron taxonómicamente con ayuda de guías de campo (Medellín, 1997). Se registró el género, especie, edad, sexo, medidas morfométricas y peso. Los individuos fueron liberados en el sitio de captura una vez que se colectaron las muestras y la información necesaria.

Se obtuvieron muestras de sangre por medio de punción de la vena cefálica, colectando una muestra no mayor a 10µl de sangre por 1g de peso, equivalente al 1% del peso corporal de cada individuo, la muestra se preservó como sangre completa. Para la colecta de hisopados orales e hisopados rectales se emplearon hisopos de poliéster. Todas las muestras fueron almacenadas en viales de plástico y preservadas con 200µL de medio de transporte viral (Chua et al., 2002). Las muestras se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta su traslado a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM en donde fueron almacenadas a -70°C.

Los procedimientos de captura y manejo de animales, siguieron los términos para el uso de mamíferos silvestres de la Sociedad Americana de Mastozoología (Sikes & Gannon, 2011), y fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales (CICUA), FMVZ, UNAM. La colecta se realizó con el permiso de colecta por línea de investigación emitido por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Permiso FAUT\_0250, Dr. Gerardo Suzán Azpiri).

#### *Abundancia de hospederos*

Para comparar de manera gráfica los patrones de abundancia relativa y riqueza de especies de murciélagos por comunidad se construyeron gráficas y curvas de rango abundancia (Whittaker, 1960), indicando la abundancia relativa de las especies registradas en cada sitio de monitoreo. Esto se realizó con las librerías Vegan (Oksanen et al., 2007), Biodiversity R (Kindt & Coe, 2005), y GGPlot 2 (Wickham, 2016) en la plataforma R.

#### *Análisis molecular de Coronavirus*

Las muestras fueron trasladadas al Centro de Infección e Inmunidad, de la Universidad de Columbia, en Nueva York, EUA para su procesamiento. Se realizó la extracción de ácidos nucleicos totales para los tres tipos de muestras colectadas (hisopado oral, hisopado rectal y sangre completa). Este procedimiento se llevó a cabo con la plataforma NucliSens® easyMAG®, de (bio Merieux); sistema de segunda generación para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de la extracción con sílice. Se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario (cDNA) por retrotranscripción (RT-PCR) con el kit

Superscript® III 1<sup>st</sup> Strand Synthesis (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante.

Se realizó la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa PCR, por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*) de tipo anidado, que usa como blanco el gen de la polimerasa RNA-Dependent RNA-Polymerase (*RdRp*) para la detección de fragmentos de material genético correspondientes a CoVs a partir de sangre, hisopado oral e hisopado rectal. Se siguió el protocolo descrito por Quan et al., 2010. Esta técnica se ha empleado para identificar un amplio rango de nuevos CoVs (Quan et al., 2010; Anthony et al., 2013). Se empleó el kit comercial QIAGEN Fast Cycling PCR Kit (Cat. No. 203745), y un control universal. Este protocolo, emplea los iniciadores consenso con las secuencias: 5'\_CGTTGGIACWAAAYBTVCCWYTICARBTRGG\_3' y 5'\_GGTCATKATAGCRTCAVMASWWGCNACATG\_3. Las condiciones térmicas empleadas fueron: un ciclo de 95°C por 5 min, 14 ciclos de 96°C por 5 s, 65°C (-1°C por ciclo) por 8 s, y 68°C por 18 s, 35 ciclos de 96°C por 5 s, 50°C por 8 s y 68°C por 18 s. Finalmente, 72°C por 3 min. Para el segundo ciclo se usó el alineamiento de un fragmento de ~328pb con las secuencias: 5'\_GGCWCCWCCHGGNGARCAATT\_3' y 5'\_GGWAWCCCCAYTG YTGWAYRTC\_3'. Las condiciones térmicas empleadas fueron: un ciclo de 95°C por 5 min, 14 ciclos de 96°C por 5 s, 65°C (-1°C por ciclo) por 8 s, y 68°C por 12 s, 35 ciclos de 96°C por 5 s, 50°C por 8 s y 68°C por 12 s. Finalmente, 72°C por 3 min. Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1% con luz UV. Las bandas del tamaño esperado, se cortaron para ser clonadas empleando un vector comercial de clonación (Strataclon Kit). Se

realizaron ocho clonas por cada banda obtenida y se realizó la secuenciación del DNA obtenido.

#### *Análisis filogenéticos de Coronavirus*

Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas en Geneious Pro (9.1.7). Se obtuvo la secuencia consenso de cada muestra positiva y sus respectivas clonas. Estas secuencias se transformaron de nucleótidos a aminoácidos y se compararon con las secuencias de CoVs previamente reportadas y publicadas en GenBank a través de la plataforma BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool, National Center for Biotechnology Information*), BLASTN (nucleótidos) y BLASTX (aminoácidos). Las secuencias consenso con porcentaje de similitud de aminoácidos igual o mayor al 90% con respecto a las secuencias previamente reportadas, fueron consideradas como el mismo genotipo (Murphy et al., 2012; Drexler et al., 2014), mientras que las secuencias con un porcentaje de similitud menor al 90%, se consideraron genotipos reportados por primera vez.

A partir de las secuencias de nucleótidos editadas, se realizó un alineamiento múltiple en MAFFT V7.222 (Kato & Standley, 2013), ejecutado en Geneious, empleando como grupo externo al CoV Respiratorio Bovino (BCoV), y se incluyeron las veinticinco secuencias con los porcentajes de coincidencia más altos obtenidos en BLASTN en relación con nuestros datos. La reconstrucción filogenética se realizó mediante el modelo de máxima verosimilitud ejecutado en la plataforma RAxML 3.1 (Stamatakis et al., 2005), y raxmlGUI (Silvestro & Michalak, 2012), construido bajo el modelo de sustitución general de tiempo reversible GTR+GAMMA, este modelo de sustitución de

nucleótidos fue sugerido como el modelo más adecuado de acuerdo con JModeltest 2.1.10, bajo una frecuencia de muestreo de 10,000 réplicas (Posada, 2008). El árbol filogenético obtenido fue editado en la plataforma FigTree v1.4.2 (Rambaut, 2017).

A partir de las secuencias obtenidas en este estudio, se construyó una red de haplotipos y un mapa de distribución de haplotipos, con la finalidad de describir la composición y las frecuencias de los haplotipos identificados, así como su distribución espacial (Bertolotti et al., 2007; Buzón et al., 2011). A partir del alineamiento múltiple previo, se construyó la red de haplotipos mediante la plataforma PopART (Leigh & Bryant 2015), con el método de parsimonia estadística descrito por Templeton et al., 1992, empleando el algoritmo de TCS (Clement et al., 2000), y los diferentes haplotipos identificados se proyectaron en un mapa.

#### *Riqueza y diversidad de Coronavirus*

Para describir la riqueza de los CoVs identificados se construyeron curvas de rarefacción y extrapolación a partir del total de las muestras procesadas y a partir de las localidades de colecta con más de una variedad de CoV. De este modo, se evaluó el esfuerzo de muestreo y se estimó el número de muestras que es necesario analizar, para estimar la riqueza viral con un intervalo de confianza del 95% (Anthony et al., 2013; Anthony et al., 2015; Chao et al., 2015). Esta estimación se realizó con base en el tamaño de muestra original, al doble y al triple, empleando la librería iNEXT (Hsieh et al., 2016) en la plataforma R.

Para describir la diversidad taxonómica de los CoVs identificados se calculó el índice de Shannon-Wiener ( $H'$ ), que considera el número de individuos registrados y el número de grupos taxonómicos identificados (Breitbart et al., 2004). Se realizó una prueba de t de Hutcheson para comparar los índices de diversidad entre sitios (Hutcheson, 1970). Finalmente se describió la diversidad genética de las secuencias identificadas mediante el índice de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) descrita por (Nei, 1987; Cui et al., 2007).

### Colecta de muestras

Se capturó un total de 633 individuos en las 14 localidades de colecta. Los individuos capturados representaron 31 especies de 6 familias diferentes. Se registró un total de 272 hembras, 371 machos y 10 no identificados, de los cuales 475 fueron adultos y 158 juveniles. Se registraron 98 individuos activos reproductivamente, 362 inactivos y 173 no identificados (Cuadro 2).

Se obtuvo un total de 1,899 muestras, de las cuales se procesaron 1,596; 529 muestras de sangre, 532 hisopados orales y 535 hisopados rectales. Por cuestiones logísticas se excluyeron del análisis diagnóstico las muestras pertenecientes a las especies *Leptonycteris nivalis* y *Leptonycteris yerbabuena*.

### Abundancia hospederos

De acuerdo con los datos de captura la familia con el mayor número de especies capturadas fue Phyllostomidae (18 especies), seguida de la familia Vespertilionidae (5 especies), Mormoopidae (4 especies), Molossidae (2 especies) y finalmente las familias Natalidae y Emballonuridae con una especie, respectivamente.

Las especies capturadas representan cinco gremios tróficos diferentes: Insectívoros (n=15), Nectarívoros (n=7), Frugívoros (n=6), Hematófagos (n=2) y Omnívoros (n=1). La distribución biogeográfica de estas especies se clasificó en cuatro categorías: especies con afinidad

neártica (n=2), afinidad neotropical (n=11), especies endémicas (n=2) y especies compartidas entre el neártico y el neotrópico (n=16). Estas especies representaron tres estados de conservación establecidos por la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza): amenazado (n=1), preocupación menor (n=28), y casi amenazada (n=2) (Cuadro 3).

De acuerdo con los registros obtenidos, la información se organizó en función de la abundancia relativa y las frecuencias registradas por especie y por localidad. En la Figura 4, se distingue que la estructura de las comunidades de murciélagos monitoreadas es variable y se puede observar que todos los sitios de colecta tienen una composición de especies diferente.

Las especies presentes en mayor número de refugios, fueron *Leptonycteris yerbabuenae* y *Pteronotus parnellii* (5 refugios), seguidas de *Artibeus hirsutus*, *Glossophaga morenoi* y *Macrotus waterhousii* (4 refugios); *Myotis velifer*, *Desmodus rotundus* y *Mormoops megalophylla* (3 refugios). El resto de las especies se encontraron en dos localidades como máximo.

La localidad de colecta con mayor riqueza de especies fue la cueva "2. Vegas", en donde se registraron 18 especies de murciélagos, seguida de la cueva "14. Guano" con siete especies, la cueva "5. Diablo" con seis especies, y las cuevas "10. Pinta" y "12. Encantada" con cinco especies respectivamente. El resto de los sitios de colecta tuvieron una representación menor a tres especies (Figura 5).

### Análisis molecular de Coronavirus

Se analizaron 1,596 muestras de 559 individuos diferentes. De estas muestras, se identificaron 39 positivas (2.44%), pertenecientes a 38 individuos diferentes, lo que representa una prevalencia total del 6.9%. Las muestras positivas fueron principalmente hisopados rectales (87%, n=34), seguidas de hisopados orales (7.6%, n=3), y finalmente sangre (5%, n=2).

El mayor porcentaje de muestras positivas se encontró en murciélagos de la especie *Pteronotus parnellii* (38.4%), seguido de *Myotis velifer* (12.8%) y *Glossophaga morenoi* (10.2%). El resto de las especies (n=11), tuvieron una representación menor al 10% de las muestras positivas.

Respecto al total de muestras positivas, el 51% fue de la cueva "2.Vegas", mientras que en las cuevas "8.Agua" y "14.Guano" representaron un porcentaje de 12.8% respectivamente. El resto de los puntos de monitoreo tuvieron menos del 10% del total de las muestras positivas respectivamente ("11.Toro", "6.Salitre", "12.Encantada", "5.Diablo", y "13.Tereso").

### Análisis filogenéticos de Coronavirus

Al comparar las treinta y nueve secuencias en BLASTX (aminoácidos), treinta y dos tuvieron un porcentaje de similitud mayor al 90% en referencia a las secuencias disponibles en Genbank. Por otro lado, al realizar la comparación en BLASTN (nucleótidos), el número de secuencias con porcentaje de similitud mayor al 90% fue de veintitrés (Cuadro 7).

Al realizar la reconstrucción filogenética a partir de secuencias de nucleótidos, estas se agruparon en doce clados diferentes, de los cuales nueve corresponden a  $\alpha$ -CoVs y tres a  $\beta$ -CoVs. Dentro de estos agrupamientos, seis clados de  $\alpha$ -CoVs (Mex\_ $\alpha$ \_CoV\_14, Mex\_ $\alpha$ \_CoV\_17, Mex\_ $\alpha$ \_CoV\_13, Mex\_ $\alpha$ \_CoV\_12, Mex\_ $\alpha$ \_CoV\_16, Mex\_ $\alpha$ \_CoV\_15) y dos clados de  $\beta$ -CoVs (Mex\_ $\beta$ \_CoV\_18 y Mex\_ $\beta$ \_CoV\_19), tuvieron porcentajes de similitud menores al 90% con respecto a los datos disponibles en GenBank, considerándose secuencias no reportadas anteriormente.

El árbol filogenético (Figura 6) muestra agrupamiento de los clados en función de la especie de hospedero. Los  $\alpha$ -CoVs, fueron identificados en murciélagos de las familias Phyllostomidae, Mormoopidae y Vespertilionidae. Los  $\beta$ -CoVs, se identificaron en especies de las familias Phyllostomidae y Mormoopidae. La organización de las secuencias previamente reportadas, en función de la familia de hospedero, coincide en todos los casos. Mex\_ $\alpha$ \_CoV\_1 y Mex\_ $\alpha$ \_CoV\_4, fueron identificados en especies de la familia Phyllostomidae, Mex\_ $\alpha$ \_CoV\_7 en la familia Vespertilionidae, y Mex\_ $\beta$ \_CoV\_10 en la familia Mormoopidae y Phyllostomidae.

Las secuencias reportadas por primera vez en este estudio, también se agruparon en función de la familia de hospedero. Por ejemplo, Mex\_ $\alpha$ \_CoV\_17 y Mex\_ $\alpha$ \_CoV\_16 se identificaron en 2 especies de la familia Phyllostomidae respectivamente. Mientras que  $\alpha$ \_CoV\_15 se identificó en una especie de la familia Phyllostomidae. Por otro lado, Mex\_ $\beta$ \_CoV\_18 y Mex\_ $\beta$ \_CoV\_19 se identificaron en especies de la familia Mormoopidae.

La red de haplotipos (Figura 7) muestra una composición de doce grupos filogenéticos, los mismos que se observan en el cladograma (Figura 6). El tamaño de los nodos representa la frecuencia de cada haplotipo dentro de la muestra obtenida. Las líneas transversales entre cada nodo, representan los pasos mutacionales necesarios para conectar los diferentes haplogrupos y los nodos de color negro representan a los haplotipos hipotéticos necesarios para la configuración de la red. En esta red también observamos dos bucles o reticulaciones no resueltas, la primera se observa dentro del grupo de los  $\alpha$ -CoV entre los clados Mex\_ $\alpha$ \_CoV\_1, Mex\_ $\alpha$ \_CoV\_15 y Mex\_ $\alpha$ \_CoV\_16, y la segunda entre géneros  $\alpha$ -CoV y  $\beta$ -CoV. Finalmente, se observa que los haplotipos se agrupan principalmente en función de la familia de sus hospederos, y no se observa diferenciación geográfica clara entre grupos.

#### Riqueza y diversidad de Coronavirus

El esfuerzo total de muestreo fue de 1,596 ensayos de PCR. A partir de los resultados de estos ensayos, se obtuvo una riqueza (S) total de doce genotipos diferentes a partir de los cuales se calculó el índice de diversidad de Shannon que tuvo un valor de 7.2. Al realizar la extrapolación de estos datos, se estimó una riqueza máxima de diecinueve genotipos de CoVs según el modelo estadístico de Chao2 y un índice de diversidad máximo de 9. El esfuerzo de muestreo global representó una cobertura total del 84%, en relación con la riqueza viral estimada (Cuadro 4). Los resultados de rarefacción demuestran una cobertura total estimada de 95% en un tamaño de muestra estimado de 4,788 (extrapolación al triple) (Figura 8).

Para los refugios con mayor riqueza de genotipos de CoVs, se realizaron los mismos análisis. Los resultados se describen a continuación:

En el refugio "2.Vegas", con un esfuerzo de muestreo de 420 PCR's se identificó una riqueza de cinco genotipos de CoVs y un índice de diversidad de 3.3, lo que representa una cobertura del 89% de la riqueza total. Los resultados de extrapolación, con una muestra triplicada (n=1,260) representarían una riqueza estimada de siete genotipos y una diversidad de 3.9, con una cobertura del 99%. En el refugio "14.Guano ", con un esfuerzo de muestreo de 420 PCR's se identificó una riqueza de cuatro genotipos y una diversidad de 3.8. Esto representa una cobertura del 66% de la riqueza total. Los resultados de extrapolación, con una muestra triplicada (n=777), representarían una riqueza estimada de cinco genotipos y una diversidad estimada de 5.7, con una cobertura del 99%. Finalmente, en el refugio "8. Agua", con un esfuerzo de muestreo de 97 PCR's se identificó una riqueza de dos genotipos, lo que representa una cobertura del 100%.

La diversidad genética identificada en la muestra total (n=39 secuencias), fue de doce genotipos. El genotipo más común fue el Mex\_β\_CoV\_10, identificado en quince individuos diferentes. Estos genotipos fueron definidos por 199 sitios polimórficos o segregantes, 185 sitios parsimoniosamente informativos; resultando una diversidad nucleotídica de  $\pi = 4.45$ , en las 39 secuencias analizadas.

CUADRO 2. Número de capturas y atributos de los individuos capturados por sitio de monitoreo.

Sitio de muestreo	Especie	TOTAL	Sexo		Edad		E. Reproductivo	
			H	M	A	J	AR	I
5. DIABLO	<i>Pteronotus parnellii</i>	9	1	8	9	0	1	8
	<i>Eptesicus fuscus</i>	1	0	1	1	0	1	0
	<i>Myotis occultus</i>	1	0	1	1	0	0	1
	<i>Desmodus rotundus</i>	22	9	13	20	2	10	12
	<i>Leptonycteris nivalis</i>	3	0	3	3	0	2	1
	<i>Choeronycteris mexicanus</i>	1	0	1	1	0	0	1
	6. SALITRE	<i>Leptonycteris verbabuenae</i>	21	14	17	19	2	0
<i>Artibeus hirsutus</i>		20	12	8	18	2	5	15
<i>Pteronotus parnellii</i>		4	0	4	4	0	0	4
<i>Myotis velifer</i>		20	11	9	7	13	1	19
8. AGUA	<i>Myotis velifer</i>	20	12	8	15	5	0	20
	<i>Myotis californicus</i>	11	5	6	8	3	1	10
11. TORO	<i>Artibeus hirsutus</i>	20	8	12	19	1	13	7
	<i>Macrotus waterhousii</i>	1	0	1	1	0	1	0
	<i>Glossophaga morenoi</i>	21	6	15	17	4	11	10
12. ENCANTADA	<i>Artibeus hirsutus</i>	5	2	3	5	0	3	2
	<i>Choeronycteris godmani</i>	10	2	8	9	1	7	3
	<i>Choeronycteris mexicanus</i>	2	2	0	2	0	2	0
	<i>Desmodus rotundus</i>	5	0	5	5	0	4	1
13. TERESO	<i>Micronycteris microtis</i>	1	1	0	1	0	0	1
	<i>Balantiopteryx plicata</i>	20	13	7	13	7	1	19
10. PINTA	<i>Micronycteris microtis</i>	5	2	3	4	1	1	4
	<i>Macrotus waterhousii</i>	2	0	2	2	0	2	0
	<i>Pteronotus davyi</i>	1	0	1	1	0	1	0
	<i>Pteronotus parnellii</i>	5	3	2	4	1	1	4
9. PRESA	<i>Leptonycteris verbabuenae</i>	5	1	4	5	0	4	1
	<i>Mormoops megalophylla</i>	5	3	2	5	0	0	5
	<i>Macrotus waterhousii</i>	14	4	10	14	0	9	5
	<i>Balantiopteryx plicata</i>	20	14	6	16	4	0	20
7. CHAPULTEPEC	<i>Artibeus hirsutus</i>	2	1	1	2	0	1	1
	<i>Glossophaga leachii</i>	13	2	11	12	1	9	4
	<i>Glossophaga morenoi</i>	5	0	5	5	0	4	1
14. GUANO	<i>Artibeus jamaicensis</i>	1	1	0	1	0	0	1
	<i>Pteronotus personatus</i>	2	2	0	2	0	0	2
2. VEGAS	<i>Artibeus phaeotis</i>	1	1	0	1	0	0	1
	<i>Artibeus hirsutus</i>	20	8	12	19	1	13	7
	<i>Macrotus waterhousii</i>	1	0	1	1	0	1	0
	<i>Glossophaga morenoi</i>	21	6	15	17	4	11	10
	<i>Sturnira lillium</i>	2	1	1	2	0	1	0
	<i>Pteronotus personatus</i>	2	2	0	2	0	0	2
	<i>Artibeus phaeotis</i>	1	1	0	1	0	0	1
	<i>Pteronotus personatus</i>	12	8	4	7	5	0	12
	<i>Leptonycteris verbabuenae</i>	20	5	15	8	12	3	17
	<i>Mormoops megalophylla</i>	17	4	13	12	5	0	17
	<i>Macrotus waterhousii</i>	20	5	15	6	14	0	20
	<i>Glossophaga morenoi</i>	1	0	1	1	0	0	1
	<i>Pteronotus parnellii</i>	20	20	0	14	6	0	20
	<i>Pteronotus davyi</i>	17	10	7	17	0	1	16
4. UAM	<i>Tadarida brasiliensis</i>	20	0	20	12	8	1	19
	<i>Myotis velifer</i>	21	8	13	15	6	9	1
3. VIGA	<i>Nyctinomops macrotis</i>	20	4	16	8	12	0	20
	<i>Nyctinomops macrotis</i>	1	0	1	1	0	0	1
1.XOXAFI	<i>Leptonycteris verbabuenae</i>	20	1	19	16	4	10	10
		TOTAL 633						

Se describe la proporción de capturas por sexo, edad y estado reproductivo. H = hembra, M = macho, A = adulto, J = juvenil, A = activo reproductivamente, I = inactivo reproductivamente.

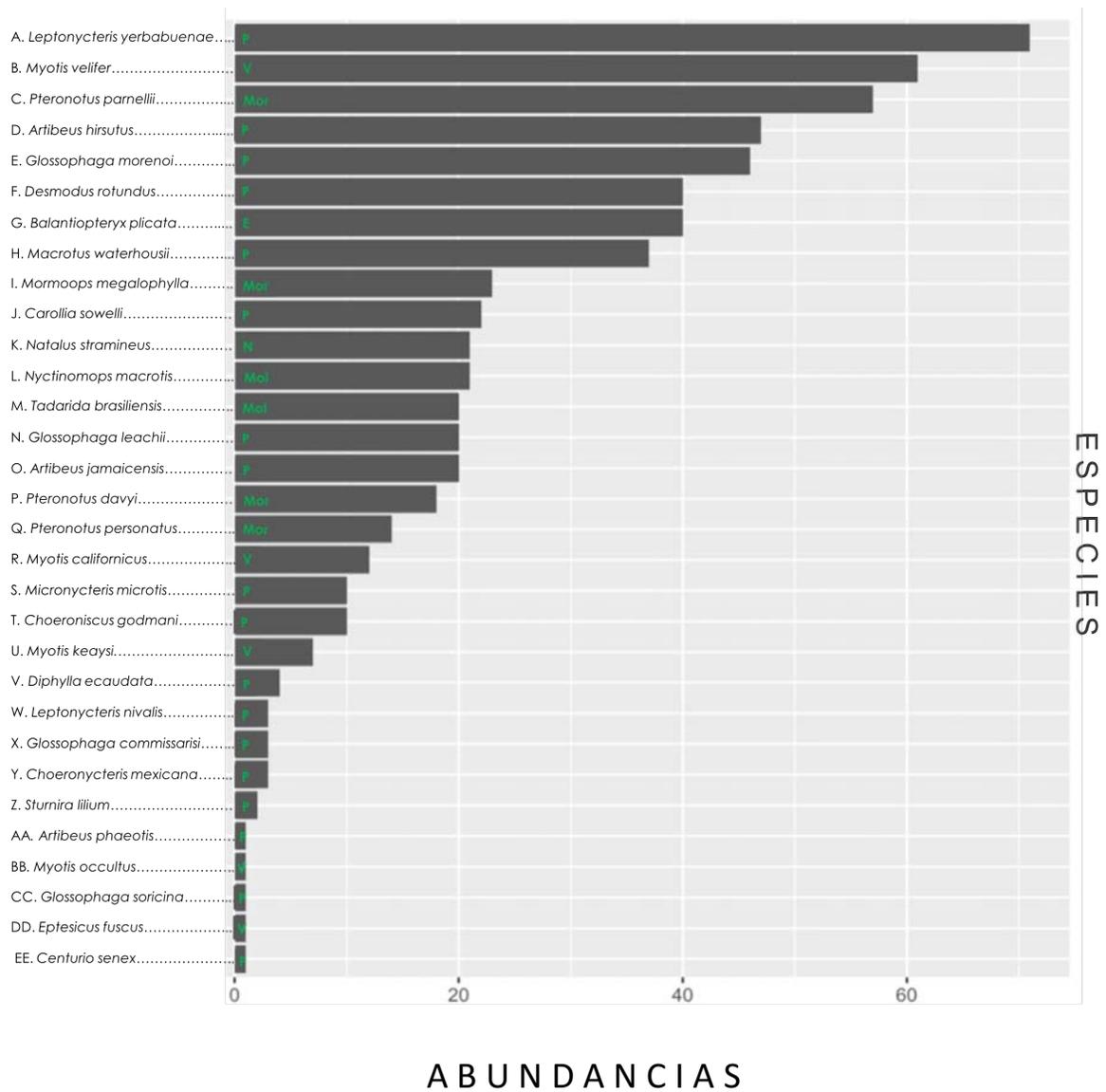


FIGURA 3. Abundancia total de especies capturadas. Se especifica la familia a la que pertenece cada especie: P = Phyllostomidae, V = Vespertilionidae, Mor = Mormoopidae, Mol = Molossidae, N = Natalidae y E = Emballonuridae.

CUADRO 3. Clasificación de las especies de murciélagos capturados.

Abundancia (><)	Género y Especie	Clave	Familia	Gremio Trófico	Afinidad Biogeográfica	Estado de Conservación
1	<i>Leptonycteris yerbabuenae</i>	A	Phyllostomidae	Nectarívoro	Compartida	NT
2	<i>Myotis velifer</i>	B	Vespertilionidae	Insectívoro	Compartida	LC
3	<i>Pteronotus parnellii</i>	C	Mormoopidae	Insectívoro	Compartida	LC
4	<i>Artibeus hirsutus</i>	D	Phyllostomidae	Frugívoro	Endémico	LC
5	<i>Glossophaga morenoi</i>	E	Phyllostomidae	Nectarívoro	Endémico	LC
6	<i>Desmodus rotundus</i>	F	Phyllostomidae	Hematófago	Compartida	LC
7	<i>Balantiopteryx plicata</i>	G	Emballonuridae	Insectívoro	Neotrópico	LC
8	<i>Macrotus waterhousii</i>	H	Phyllostomidae	Omnívoro	Compartida	LC
9	<i>Mormoops megalophylla</i>	I	Mormoopidae	Insectívoro	Compartida	LC
10	<i>Carollia sowelli</i>	J	Phyllostomidae	Frugívoro	Neotrópico	LC
11	<i>Natalus stramineus</i>	K	Natalidae	Insectívoro	Neotrópico	LC
12	<i>Nyctinomops macrotis</i>	L	Molossidae	Insectívoro	Compartida	LC
13	<i>Tadarida brasiliensis</i>	M	Molossidae	Insectívoro	Compartida	LC
14	<i>Glossophaga leachii</i>	N	Phyllostomidae	Nectarívoro	Neotrópico	LC
15	<i>Artibeus jamaicensis</i>	O	Phyllostomidae	Frugívoro	Neotrópico	LC
16	<i>Pteronotus davyi</i>	P	Mormoopidae	Insectívoro	Compartida	LC
17	<i>Pteronotus personatus</i>	Q	Mormoopidae	Insectívoro	Compartida	LC
18	<i>Myotis californicus</i>	R	Vespertilionidae	Insectívoro	Neártico	LC
19	<i>Micronycteris microtis</i>	S	Phyllostomidae	Insectívoro	Neotrópico	LC
20	<i>Choeroniscus godmani</i>	T	Phyllostomidae	Insectívoro	Neotrópico	LC
21	<i>Myotis keaysi</i>	U	Vespertilionidae	Insectívoro	Compartida	LC
22	<i>Diphylla ecaudata</i>	V	Phyllostomidae	Hematófago	Compartida	LC
23	<i>Leptonycteris nivalis</i>	W	Phyllostomidae	Nectarívoro	Compartida	EN
24	<i>Glossophaga commissarisi</i>	X	Phyllostomidae	Nectarívoro	Neotrópico	LC
25	<i>Choeronycteris mexicana</i>	Y	Phyllostomidae	Nectarívoro	Compartida	NT
26	<i>Sturnira lilium</i>	Z	Phyllostomidae	Frugívoro	Compartida	LC
27	<i>Artibeus phaeotis</i>	AA	Phyllostomidae	Frugívoro	Neotrópico	LC
28	<i>Myotis occultus</i>	BB	Vespertilionidae	Insectívoro	Neártico	LC
29	<i>Glossophaga soricina</i>	CC	Phyllostomidae	Nectarívoro	Neotrópico	LC
30	<i>Eptesicus fuscus</i>	DD	Vespertilionidae	Insectívoro	Compartida	LC
31	<i>Centurio senex</i>	EE	Phyllostomidae	Frugívoro	Neotrópico	LC

Se describe la familia, el gremio trófico, la afinidad biogeográfica y el estado de conservación de las especies capturadas. NT=Casi amenazada, LC=Preocupación menor, EN= Amenazada.

## FRECUENCIA

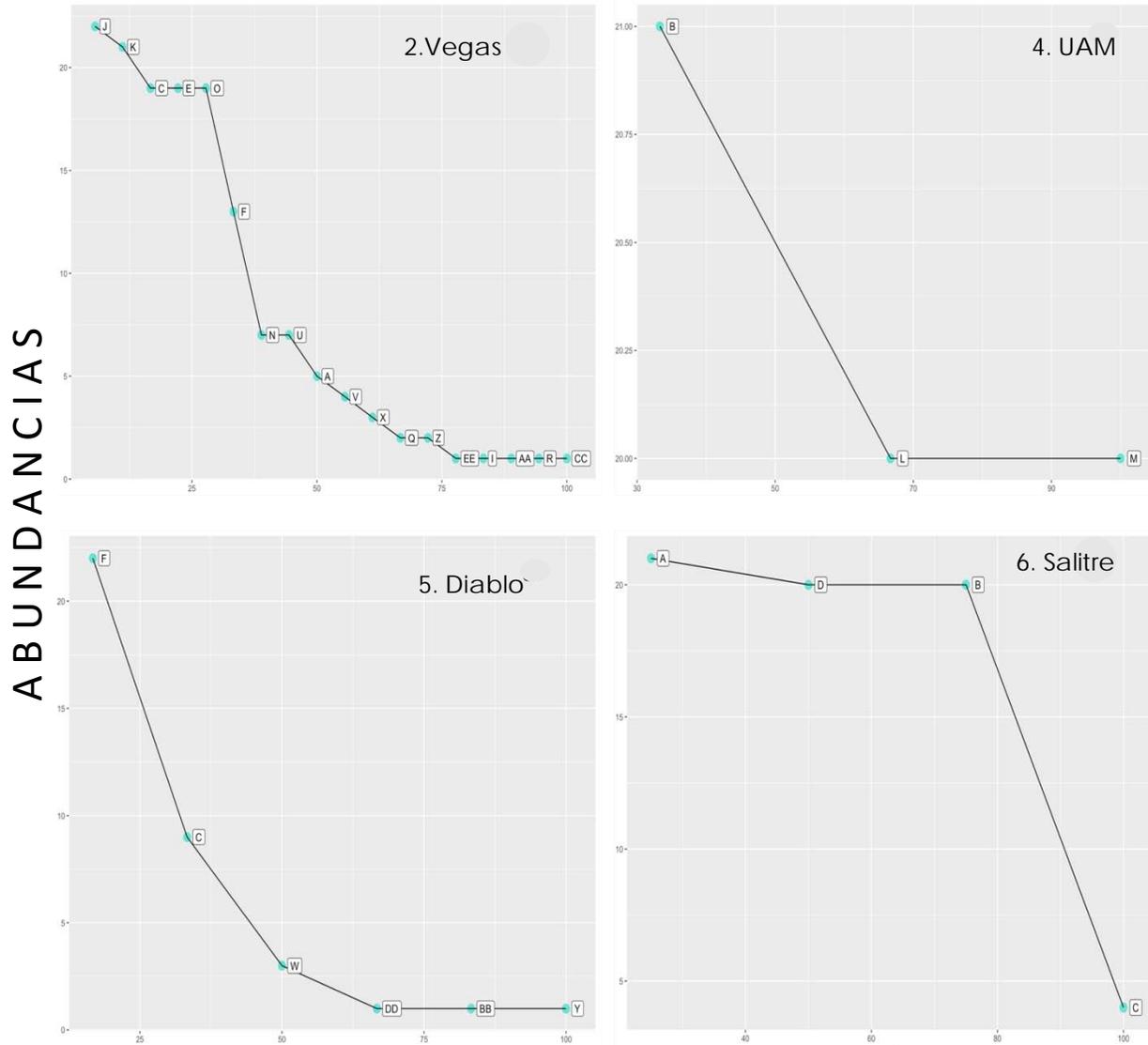


FIGURA 4. Curvas de Rango-Abundancia de especies por localidad de colecta (Localidades 2, 4, 5 y 6).

# FRECUENCIA

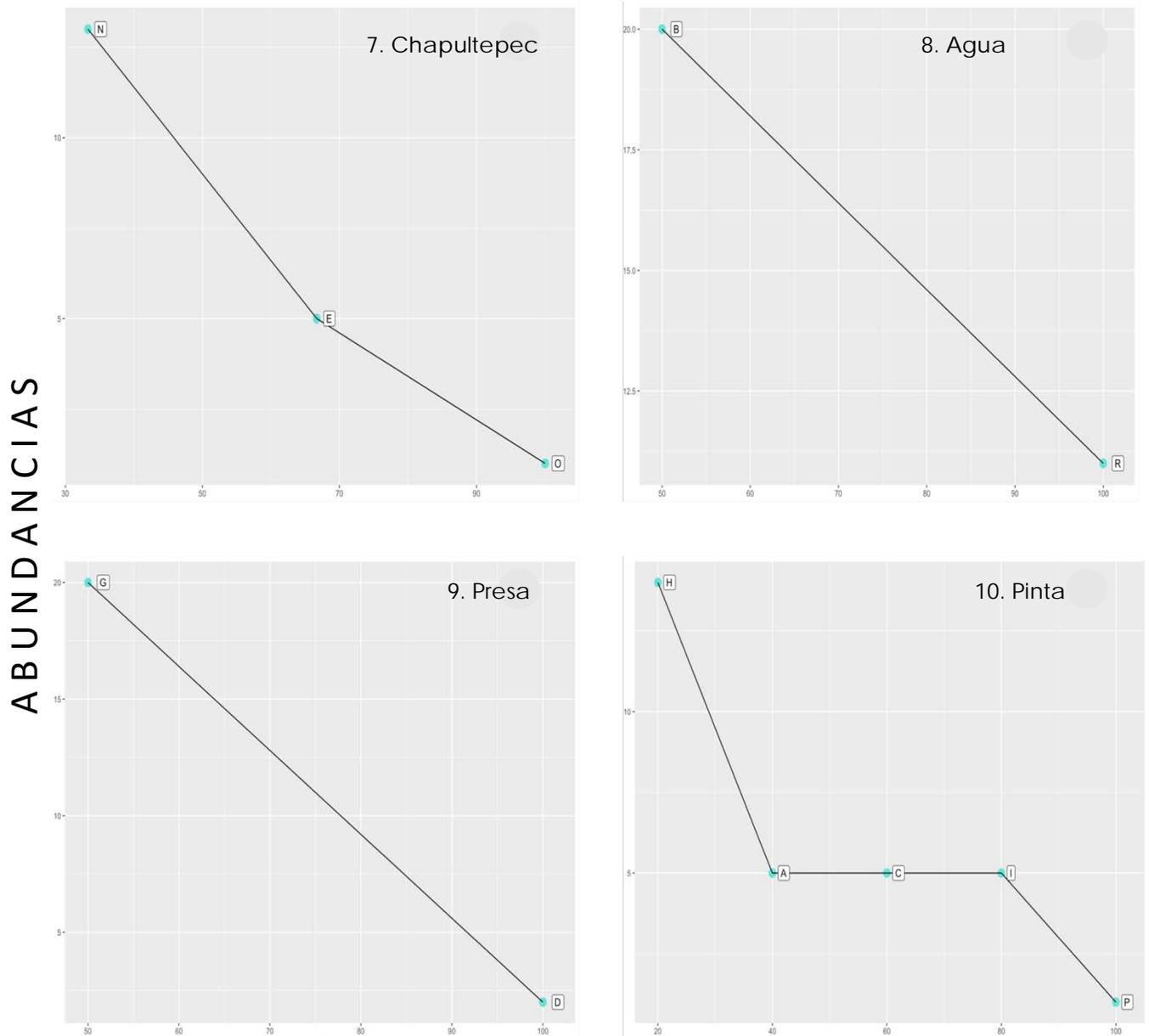


FIGURA 5. Curvas de Rango-Abundancia de especies por localidad de colecta (Localidades 7 a 10).

## FRECUENCIA

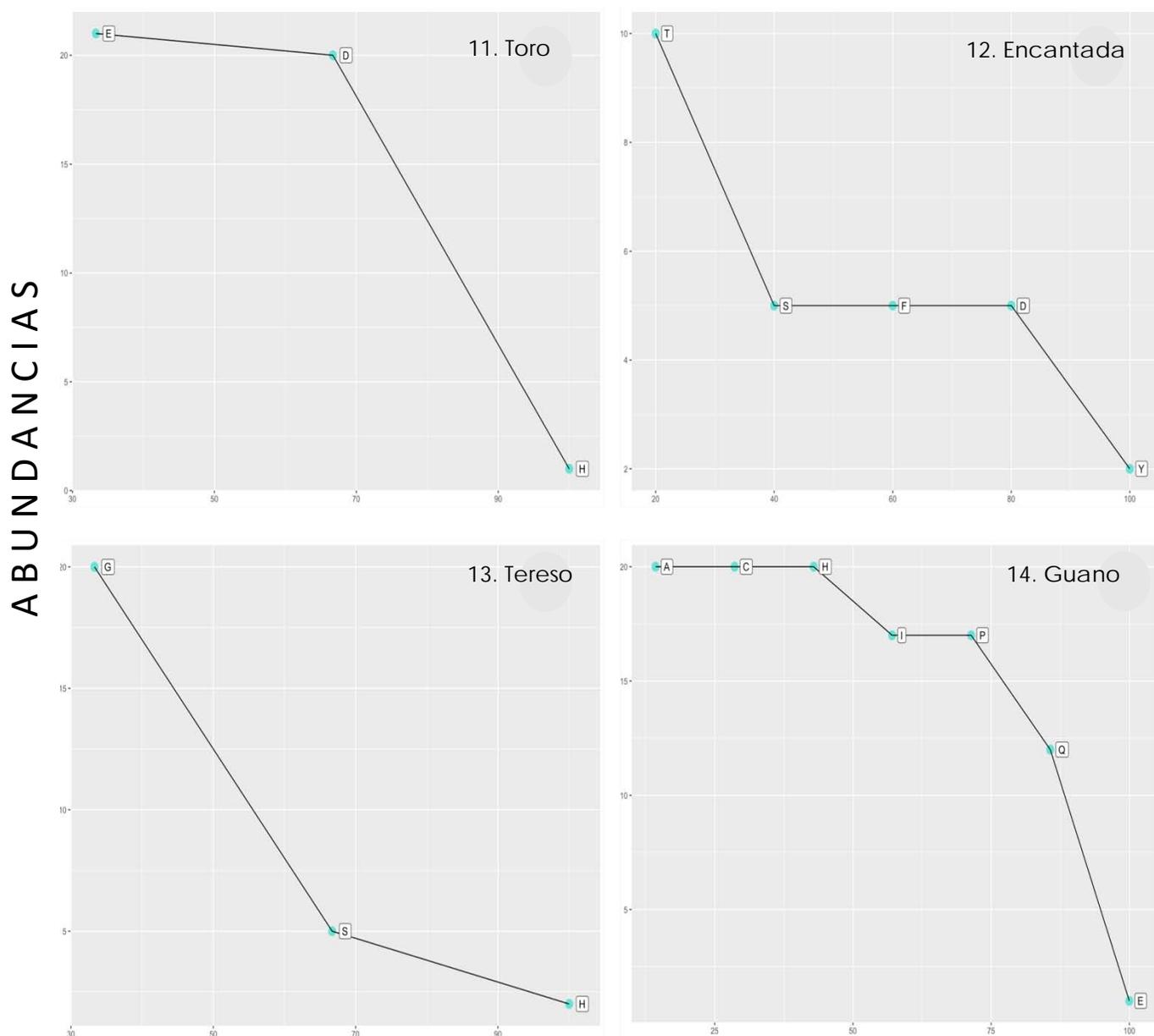


FIGURA 6. Curvas de Rango-Abundancia de especies por localidad de colecta. (Localidades 11 a 14). Se señala la especie con el identificador asignado en la Figura y Cuadro 3. El eje "X" representa las abundancias (de menor a mayor) de cada especie para cada sitio. El eje "Y" representa el valor relativo de la proporción de muestras.

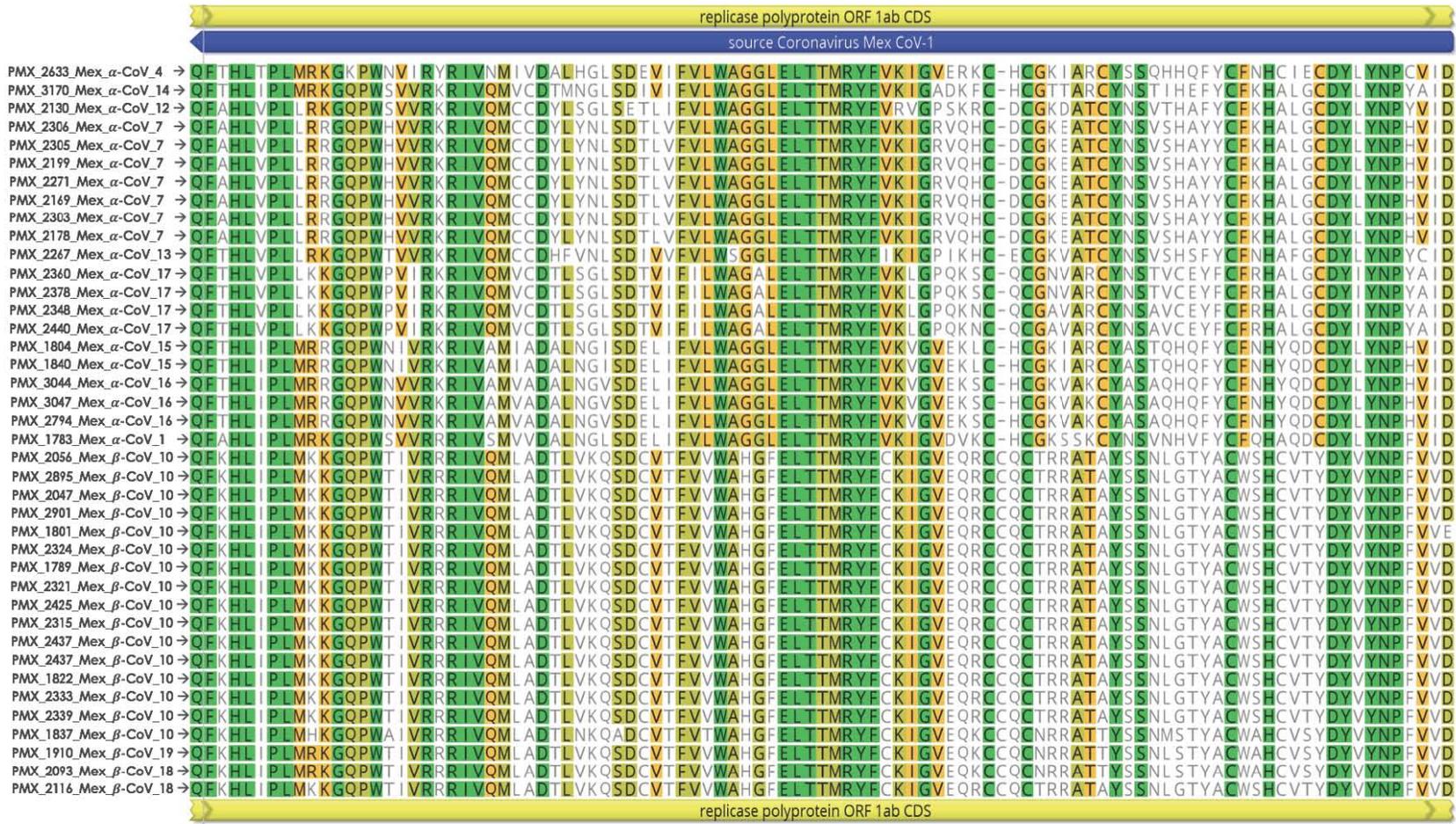


FIGURA 7. Variabilidad en la secuencia de aminoácidos de CoVs en la región de la RdRp. Se muestran los porcentajes de similitud de acuerdo con los siguientes colores. \*\* 100%, \* 80 a 100%, \*\* 60 a 80%, \*\* menos del 60%.

CUADRO 4. Muestras de murciélagos positivas a Coronavirus

No. de muestra	BLASTN con mayor % de coincidencia a nivel de nucleótidos	Valor de E	% identidad	Largo (pb)	BLASTX con mayor % de coincidencia a nivel de proteínas	Valor de E	% identidad	Largo (aa)
PMX_2633	Mex CoV_4 PMX_1245_KC117194	1.27e_77	86.2%	254	Mex_CoV_4_AGE31648	2.37e_54	94.1%	85
PMX_3170	AcCoV_JC34_KX964649	7.53e_30	75.2%	175	BlNv_AlphaCoV/SC2013_YP_009201729	4.53e_49	80.6%	98
PMX_2440	Neixiang Md bat Co_31 KF294381	5.42e_19	73.3%	176	NL63_related bat CoV_YP_009328933	1.23e_46	77.6%	98
PMX_2348	Neixiang Md bat CoV_31_KF294381	5.42e_19	73.3%	176	NL63_related bat CoV_YP_009328933	1.23e_46	77.6%	98
PMX_2378	Ferret CoV: ferret063	1.05e_21	72.0%	225	NL63_related bat CoV_YP_009328933	1.05e_46	77.6	98
PMX_2360	Bat CoV HKU8 AFCD77_EU420139	3.20e_28	72.1%	262	NL63_related bat CoV_YP_009328933	1.05e_46	77.6%	98
PMX_2267	Bat CoV Neixiang_32	9.16e_67	79.9%	294	Bat CoV CDPHE15/USA/2006_YP_008439224	5.86E_61	92.9%	98
PMX_2178	Mex_CoV_7 PMX_1448_KC117213	3.41e_129	100%	261	Mex_CoV_7_AGE31667	8.76e59	100%	87
PMX_2271	Mex_CoV_7 PMX_1448_KC117213	3.41e_129	100%	261	Mex_CoV_7_AGE31667	8.76E_59	100%	87
PMX_2169	Mex_CoV_7 PMX_1448_KC117213	3.41e_129	100%	261	Mex_CoV_7_AGE31667	8.76e_59	100%	87
PMX_2303	Mex_CoV_7 PMX_1448_KC117213	3.41e_129	100%	261	Mex_CoV_7_AGE31667	8.76E_59	100%	87
PMX_2306	Mex_CoV_7 PMX_1424_KC117209	2.15e_144	99.3%	294	Mex_CoV_7_AGE31667	8.76e_59	100%	87
PMX_2199	Mex_CoV_7 PMX_1424_KC117209	2.15e_144	99.3%	294	Mex_CoV_7_AGE31667	8.76e_59	100%	87
PMX_2305	Mex_CoV_7_KC117209	2.15e_144	99.7%	294	Mex_CoV_7_AGE31667	8.76e_59	100%	87
PMX_2130	Chaerephon bat CoV/Kenya/KY22/2006_HQ728486	5.07e_51	77.2%	272	Chaerephon bat CoV/Kenya/KY22/2006_ADX59501	1.19e_54	88.8%	98
PMX_1783	Mex_CoV_1 PMX_1239	4.44e_96	93%	243	Mex_CoV_2_AGE31651	6.86e_67	96.9%	98
PMX_3044	Bat CoV Trinidad/1CO7BA/2007_EU769558	1.11e_84	84.4%	294	Bat CoV Trinidad/1CO7BA/2007_ACJ49566	4.66e_59	92.9%	98
PMX_2794	Bat CoV Trinidad/1CO7BA/2007_EU769558	1.65e_82	84%	293	Bat CoV Trinidad/1CO7BA/2007_ACJ49566	4.66e_59	92.9%	98
PMX_3047	Bat CoV Trinidad/1CO7BA/2007_EU769558	4.74e_83	84%	294	Bat CoV Trinidad/1CO7BA/2007_ACJ49566	4.66e_59	99.9%	98
PMX_1840	Bat CoV Trinidad/1CO7BA/2007_EU769558	2.01e_100	88.4%	293	Bat CoV Trinidad/1CO7BA/2007_ACJ49566	4.87e_61	96.9	98
PMX_1804	Bat CoV Trinidad/1CO7BA/2007_EU769558	5.77e_101	88.4%	294	Bat CoV Trinidad/1CO7BA/2007_ACJ49566	4.87e_61	96.9%	98
PMX_1910	Mex_CoV_10 PMX_1302_KC117198	1.06e_59	78%	296	Mex_CoV_10_AGE31652	5.63e_62	87.9%	99
PMX_2093	Mex_CoV_10 PMX_1302_KC117198	3.69e_59	77.8%	297	Mex_CoV_10_AGE31652	3.64e_65	92.9%	99
PMX_2116	Mex_CoV_10 PMX_1302 ORF_KC117198	8.13e_55	76.8%	297	Mex_CoV_10_AGE31652	3.64e_65	92.9%	99
PMX_2056	Mex_CoV_10 PMX_1302 ORF_KC117198	1.13e_141	98.3%	297	Mex_CoV_10_AGE31652	5.45e_69	100%	99
PMX_2895	Mex_CoV_10 PMX_1302_KC117198	1.37e_144	98%	297	Mex_CoV_10_AGE31652	5.45e_69	100%	99
PMX_2047	Mex_CoV_10 PMX_1302_KC117198	2.17e_144	99%	297	Mex_CoV_10_AGE31652	5.45e_69	100%	99
PMX_1837	Mex_CoV_10 PMX_1302_KC117198	2.65e_143	98.7%	297	Mex_CoV_10_AGE31652	5.45e_69	100%	99
PMX_2901	Mex_CoV_10 PMX_1302_KC117198	5.11e_146	99.3%	297	Mex_CoV_10_AGE31652	5.45e_69	100%	99
PMX_2324	Mex_CoV_10 PMX_1302_KC117198	2.17e_144	99%	297	Mex_CoV_10_AGE31652	5.45e_69	100%	99
PMX_2321	Mex_CoV_10 PMX_1302_KC117198	2.17e_144	99%	297	Mex_CoV_10_AGE31652	5.45e_69	100%	99
PMX_2425	Mex_CoV_10 PMX_1302_KC117198	2.17e_144	99%	297	Mex_CoV_10_AGE31652	5.45e_69	100%	99
PMX_1789	Mex_CoV_10 PMX_1302_KC117198	2.17e_144	99%	297	Mex_CoV_10_AGE31652	5.45e_69	100%	99
PMX_2437	Mex_CoV_10 PMX_1302_KC117198	2.65e_143	98.7%	297	Mex_CoV_10_AGE31652	5.45e_69	100%	99
PMX_2315	Mex_CoV_10 PMX_1302_KC117198	2.65e_143	98.7%	297	Mex_CoV_10_AGE31652	5.45e_69	100%	99
PMX_2339	Mex_CoV_10 PMX_1302_KC117198	9.23e_143	98.6%	296	Mex_CoV_10_AGE31652	5.45e_69	100%	99
PMX_2333	Mex_CoV_10 PMX_1302_KC117198	9.23e_143	98.6%	296	Mex_CoV_10_AGE31652	5.45e_69	100%	99
PMX_1801	Mex_CoV_10 PMX_1302_KC117198	7.58e_144	99%	296	Mex_CoV_10_AGE31652	1.84e_68	99%	99
PMX_1822	Mex_CoV_10 PMX_1302_KC117198	7.58e_144	99%	296	Mex_CoV_10_AGE31652	5.45e_69	100%	99

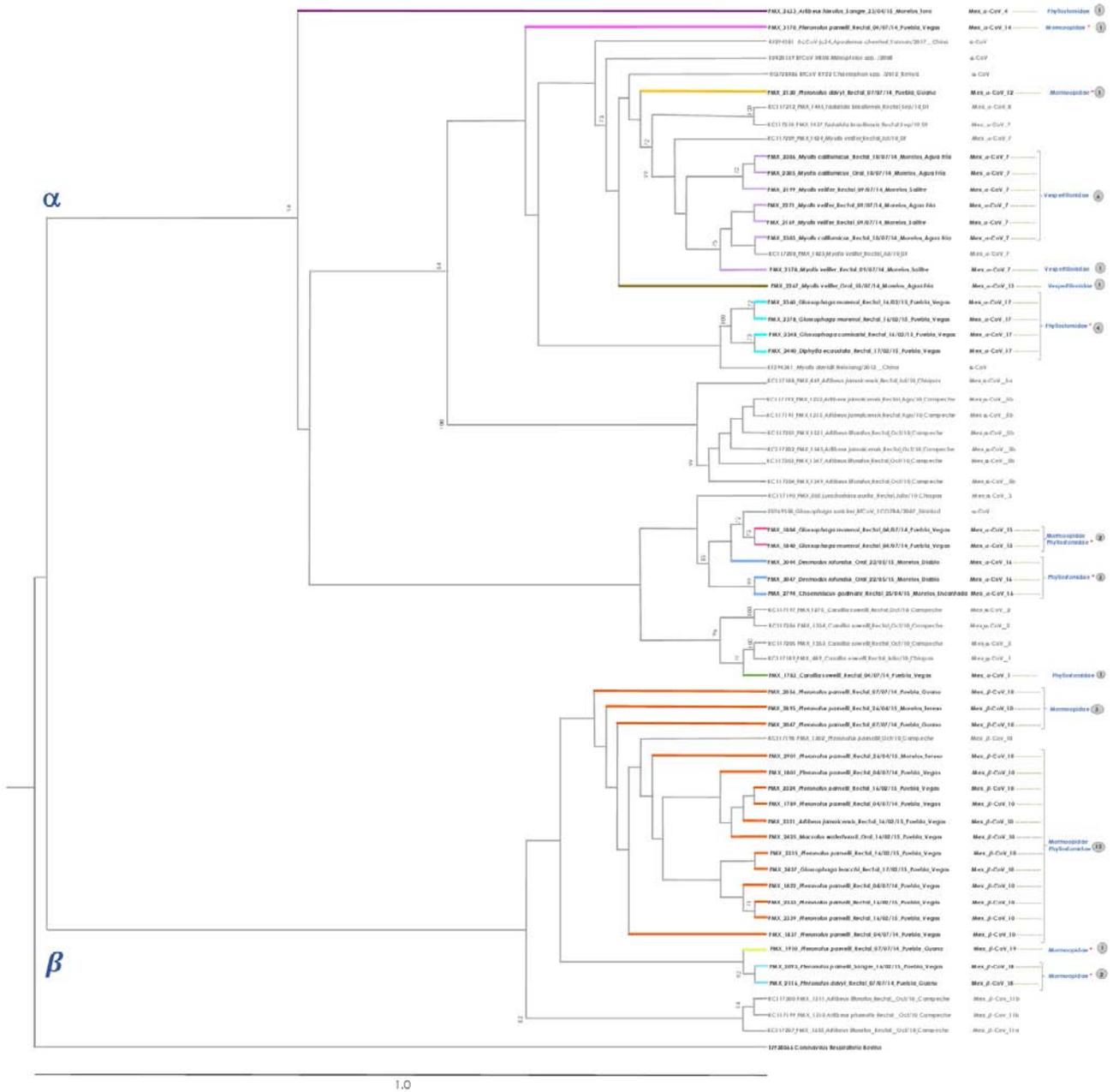


FIGURA 8. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de un fragmento de 329pb de la RdRp de CoV de murciélagos. Se presentan las 39 muestras positivas con identificador PMX. Se incluye la especie de hospedero, el tipo de muestra, la fecha y localidad de colecta. Se señala la familia a la que pertenece cada hospedero y dentro del círculo gris, el número de muestras positivas por clado. Se señalan únicamente los valores de bootstrap mayores de 70. Los colores dentro del cladograma señalan un genotipo diferente y son congruentes con los gráficos subsiguientes. Con asterisco en color rojo se señalan los genotipos que se reportan por primera vez.

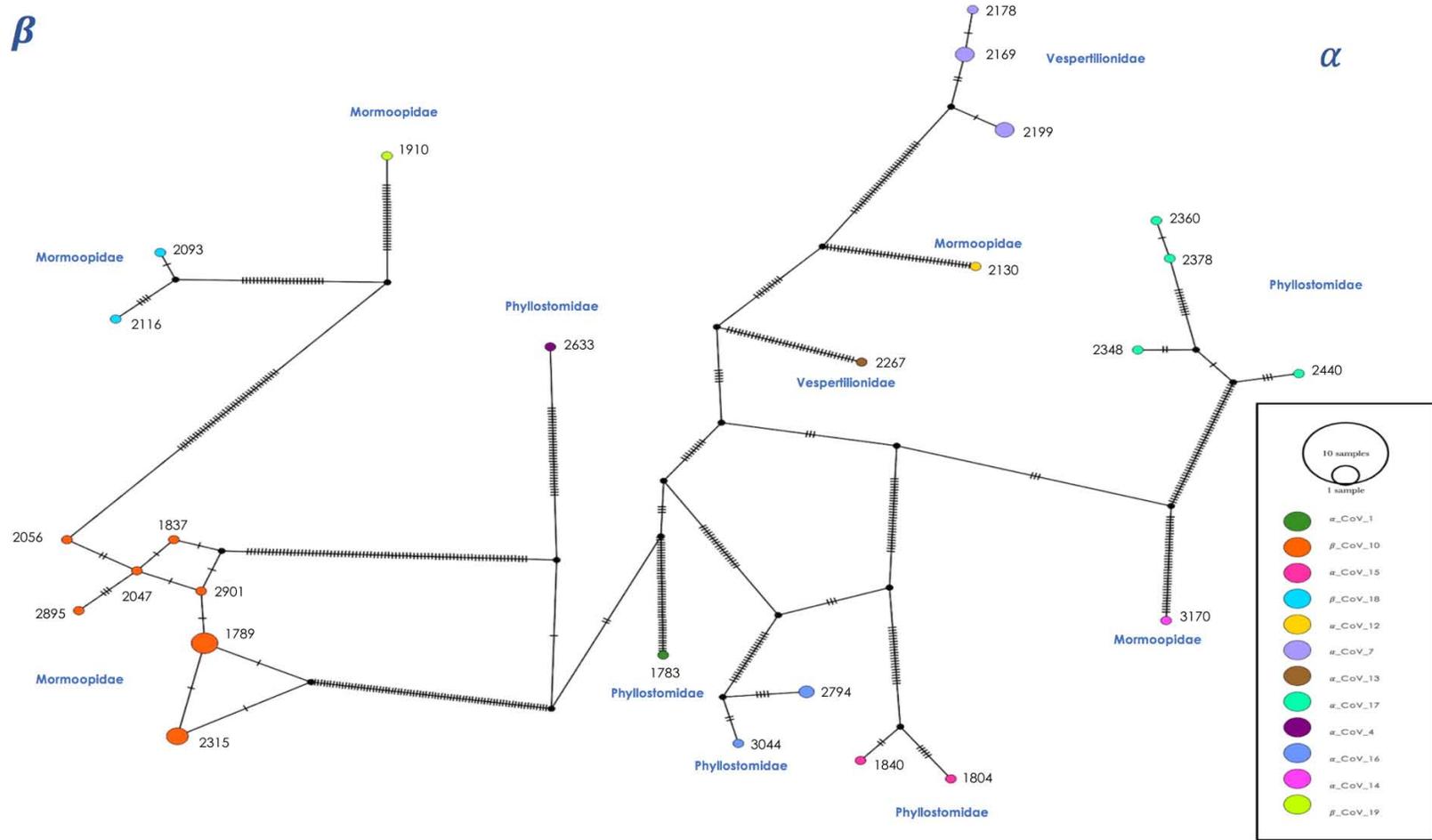


FIGURA 9. Red de haplotipos de CoVs identificados en Murciélagos Mexicanos. Los nodos representan cada haplotipo identificado. I = Paso mutacional entre haplotipos. • Haplotipos hipotéticos. El tamaño de los nodos es proporcional a la abundancia del haplotipo en el total de la muestra. Los números señalan el identificador de la muestra correspondiente a cada haplotipo.

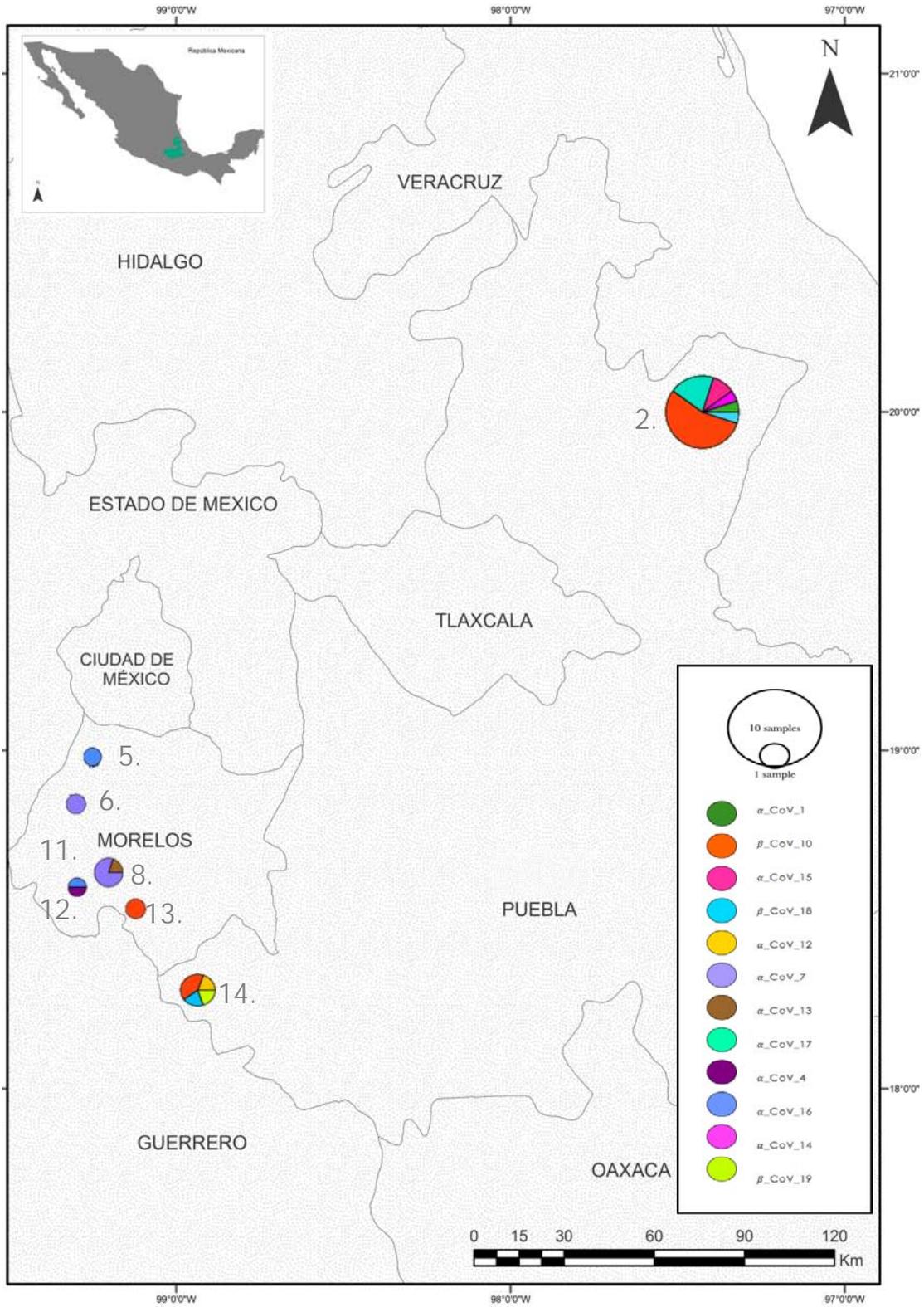


FIGURA 10 Distribución geográfica de los genotipos de Coronavirus identificados.

CUADRO 5. Estimación de la riqueza de CoV.				
	Tamaño de muestra	Riqueza de CoVs	Índice de Shannon	Cobertura de muestreo
Muestreo Total				
Observado	1596	12	7.2	84 %
Extrapolación Doble	3192	16	8.4	92 %
Extrapolación Triple	4788	19	9.0	95 %
2. Vegas				
Observado	420	5	3.3	89 %
Extrapolación Doble	840	6	3.7	97 %
Extrapolación Triple	1260	7	3.9	99 %
14. Guano				
Observado	259	4	3.8	66 %
Extrapolación Doble	518	5	5.1	95 %
Extrapolación Triple	777	5	5.7	99 %
8. Agua				
Observado	97	2	1.6	100 %
Extrapolación Doble	194	2	1.9	100 %
Extrapolación Triple	291	2	2.1	100 %

Se describe la riqueza de CoVs identificados, el índice de Shannon para diversidad, el porcentaje cubierto en el muestreo realizado, y extrapolando los datos de colecta con un tamaño de muestra doble y triple, con respecto al real. Estos datos se describen para el muestreo general, y para los sitios con mayor riqueza de CoVs ("2.Vegas", "14.Guano" y "8. Agua").



FIGURA 11 . Curva de rarefacción y extrapolación basada en el total de la muestra.

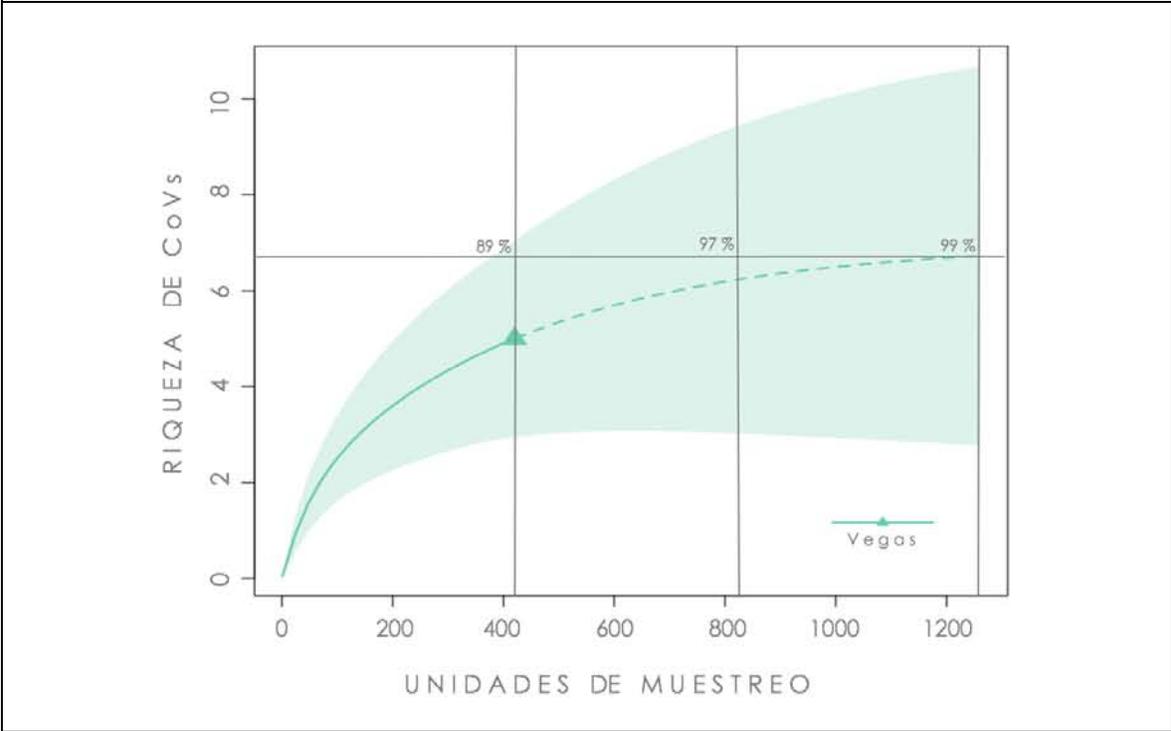


FIGURA 12 . Curva de rarefacción y extrapolación de la localidad "2.Vegas".

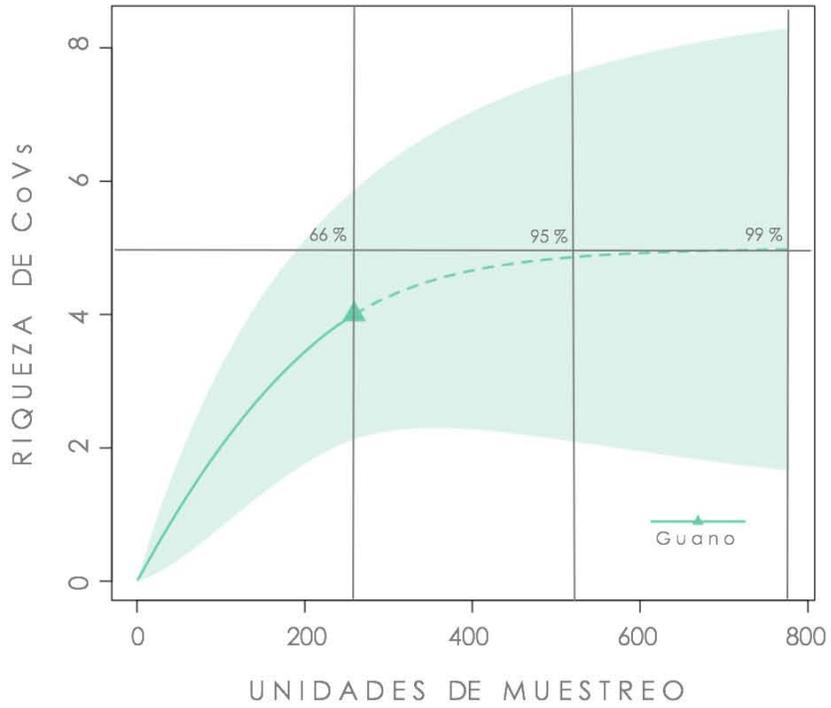


FIGURA 13 . Curva de rarefacción y extrapolación de la localidad "14. Guano".

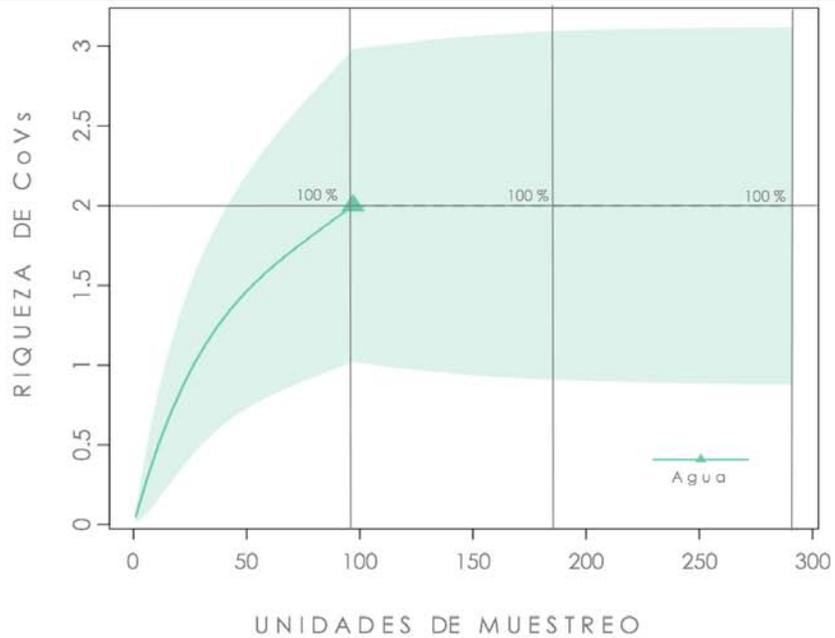


FIGURA 14 . Curva de rarefacción y extrapolación de la localidad "8. Agua".

El objetivo principal de este estudio fue incrementar nuestro conocimiento sobre la prevalencia y diversidad de Coronavirus en murciélagos que habitan la región de transición entre el Neártico y el Neotrópico en México.

La región del Cinturón Volcánico Transmexicano posee una historia geológica compleja, por lo cual se ha empleado como área de estudio para entender los procesos que moldean la distribución y la estructura biótica del país, que se compone de una alta tasa de grupos taxonómicos, resultado de una gran disponibilidad de hábitats asociados a las dos zonas biogeográficas.

Nuestros sitios de monitoreo se ubicaron dentro de la región del CVT, en los estados de Hidalgo, Ciudad de México, Puebla y Morelos, en donde, en una región parcialmente restringida dentro del país, se observa un marcado gradiente altitudinal, con gran variedad de zonas climáticas que, en combinación con diferentes características topográficas, así como la complejidad de los procesos ocurridos a diferentes escalas de tiempo y espacio han dado origen a una alta heterogeneidad ambiental y una gran variedad de microhábitats en donde se distribuye una alta diversidad biológica y endemismos (Dávila et al., 2002).

Diferentes investigaciones han determinado que el arreglo de las comunidades de mamíferos en México, se compone de elementos con afinidad Neártica y Neotropical (en proporciones equitativas), y de organismos endémicos (Ruggiero & Ezcurra, 2003; Escalante et al., 2004). Esta característica concuerda con la composición de la

comunidad de murciélagos que fue capturada para este estudio, en donde se obtuvieron organismos con afinidad Neártica, Neotropical, compartida, así como especies endémicas (Medellín, 1997; Ortega & Arita, 1998). En nuestra muestra se obtuvo un mayor número de especies de afinidad neotropical, el resto fueron especies con distribución geográfica compartida entre ambas ecorregiones, además de dos especies endémicas. La heterogeneidad en la muestra obtenida refleja los patrones descritos en las comunidades distribuidas en ambas regiones biogeográficas, pues se ha descrito que en la zona del neotrópico hay mayor riqueza (228 especies) con bajas abundancias por especie (Chivers, 1998), mientras que en la región neártica se observa menor riqueza (73 especies) con abundancias por especie mayores (Hutson & Mickleburgh, 2001).

En nuestros resultados las abundancias por especie fueron variables, sin embargo, el mayor número de especies capturadas pertenecen a la familia Phyllostomidae (18 especies), la cual, con alrededor de 123 especies descritas, es considerada la familia más diversa de toda la región Neotropical (Fenton et al., 1992), representada por especies con una gran variedad de nichos ecológicos, morfológicos y funcionales (Feldhamer et al., 2003; Ceballos & Oliva, 2005). Por ejemplo, la diversidad de esta familia se ve reflejada en sus hábitos alimenticios que son el resultado de la disponibilidad de recursos alimenticios en su área de distribución, así podemos encontrar especies hematófagas, polinívoras, nectarívoras, frugívoras y carnívoras (Fenton et al., 1992), en nuestra muestra en particular fueron capturadas especies de hábitos frugívoros, nectarívoros y hematófagos.

En referencia al estado de conservación de las especies de la familia Phyllostomidae, la mayoría de las especies de esta familia se encuentran en categoría de preocupación baja. Sin embargo, dentro de la muestra se colectaron tres especies en categoría de preocupación alta. *Leptonycteris nivalis*, especie clasificada como "amenazada", *Leptonycteris yerbabuenae* y *Choeronycteris mexicana* clasificadas como especies "casi amenazadas". Estas tres especies de filostómidos a pesar de su estado de conservación tienen un rango de distribución amplio en comparación con otras especies ubicadas en la misma categoría, lo que justifica que *Leptonycteris yerbabuenae* fuera la especie más abundante dentro de la muestra total, además de estar presente en un mayor número de sitios de colecta (5) (Arita, 1993).

En México se tienen registradas trece especies de murciélagos endémicos, de los cuales seis se distribuyen también en Centroamérica. En este estudio se capturaron dos especies endémicas pertenecientes a la familia Phyllostomidae, *Artibeus hirsutus* y *Glossophaga morenoi*. Ambas especies se encuentran en estado de preocupación menor, sin embargo, debido a su rango de distribución restringido se ha sugerido que se cataloguen en estado de preocupación mayor (Ceballos & Brown, 1995).

El resto de las especies capturadas, pertenecientes a las familias Vespertilionidae, Mormoopidae, Molossidae y Natalidae fueron especies abundantes en general, con afinidades biogeográficas compartidas entre el Neártico y el Neotrópico, y en categoría de preocupación menor (Hutson & Mickleburgh, 2001). Algunas de estas especies forman grandes colonias, de incluso más de 10,000

individuos. Por ejemplo, *Tadarida brasiliensis*, *Pteronotus parnelli*, *Pteronotus davyi*, *Mormoops megalophylla*, *Myotis velifer* y *Natalus stramineus* (Arita, 1993).

La prevalencia de CoVs identificada en este estudio (6.9%), es congruente con los reportes previos (2-55%) (Osborne et al., 2011). En donde, se ha identificado mayor prevalencia en muestras correspondientes al tracto gastrointestinal (Osborne et al., 2011; Anthony et al., 2013; Drexler et al., 2014), y no se reportan individuos con signos de enfermedad clínica aparente (Calisher et al., 2006; Wong et al., 2007). Estos hallazgos sugieren que, aunque existe circulación de CoVs en las comunidades de murciélagos, los individuos pueden experimentar infecciones ligeras y sin signología clínica aparente (Osborne et al., 2011). Esto ya ha sido comprobado en laboratorio, en donde se infectaron murciélagos de manera experimental y no se encontraron rasgos de enfermedad (Watanabe et al., 2010).

En este estudio, las especies con prevalencias más altas, fueron en general especies abundantes en la muestra: *Pteronotus parnellii* (38.4%; n=57), *Myotis velifer* (12.8%; n=61) y *Glossophaga morenoi* (10.2%; n=46). Por lo que la alta prevalencia en estas especies podría explicarse por un efecto del muestreo. Sin embargo, también podría sugerir que especies con hábitos gregarios y con mayores tasas de contacto entre individuos, podrían favorecer aumento en la prevalencia del virus al interior de sus poblaciones, ya que como se mencionó anteriormente, estas especies tienden a formar colonias con un elevado número de individuos (Arita, 1993; Schountz, 2014; Plowright et al., 2015).

Por el contrario, entre las especies menos abundantes en nuestra muestra también se identificaron individuos positivos. En algunos casos es la primera vez que se monitorea y se reporta CoVs, como en el caso de *Macrotus waterhousii* y *Artibeus hirsutus*. En ambas especies se identificaron CoVs previamente descritos para México, en *Artibeus hirsutus* se identificó Mex\_α\_CoV\_4 que anteriormente se reportó en *Artibeus jamaicensis*, en el estado de Campeche, y en *Macrotus waterhousii* (Phyllostomidae) se identificó Mex\_β\_CoV\_10 que ha sido descrito previamente en *Pteronotus parnellii* (Mormoopidae) en el estado de Campeche (Anthony et al., 2013).

Aunque estos organismos en general se encuentran en abundancias menores dentro de sus refugios, la presencia del virus en las poblaciones sugiere que no es indispensable la alta densidad poblacional del hospedero para que el virus circule constantemente dentro de la población. Este patrón propone que el virus se encuentra bien adaptado a la población hospedera y posee tasas de reproducción constantes y frecuentes, lo que puede indicar un proceso de coevolución parásito-hospedero (Papkou et al., 2016). Por otro lado, ambas especies de murciélago *Macrotus waterhousii* y *Artibeus hirsutus* tienen distribución geográfica restringida, sin embargo, los genotipos identificados en estos organismos también se han identificado en organismos de las mismas familias o familias filogenéticamente relacionadas pero de localidades geográficas alejadas, lo que sugiere que la distancia y dispersión a escala geográfica no influye más de lo que podría influir la presión de selección del hospedero en la diversificación de los genotipos virales.

La relación, entre genotipos de CoVs y especies de murciélagos cercanamente relacionadas en América, ha apoyado la hipótesis de coevolución (Ojeda, 2015). Esta hipótesis puede estar favorecida por el hecho de que existen refugios con mayor riqueza de especies hospederas en donde los genotipos de CoVs se agrupan en función de la especie hospedera (Pfefferle et al., 2009). Este grado de asociación se ha observado al comparar genotipos de CoVs presentes en poblaciones provenientes de áreas geográficas alejadas (Tang et al., 2006; Gloza-Rausch et al., 2008). Por el contrario, también se ha observado que, en el mismo refugio dos especies hospedero de familias distintas, presentan el mismo genotipo de CoV, siendo contrario a la teoría de especificidad de hospedero (Osborne et al., 2011), y a la evidencia observada en otros virus, en donde la especie hospedera, puede actuar como barrera en la transmisión (Streicker et al., 2010).

En referencia a las localidades de colecta, el mayor número de individuos positivos a CoVs corresponden a los dos refugios con mayor riqueza y abundancia de especies ("2.Vegas" y "14.Guano"). En estudios realizados en cuevas de diferentes zonas de México, se registró que la cueva "2. Vegas" es una de las cuevas con mayor riqueza y abundancia de murciélagos en México (Arita, 1993). Por otro lado, la cueva "8.Agua", en donde únicamente se identificaron dos especies de murciélagos vespertilionidos en abundancias altas, también tuvo un alto porcentaje de individuos positivos con respecto al total de la muestra. Este resultado, concuerda con la hipótesis de que refugios con altas abundancias y estrecho contacto entre individuos, puede ser un factor predisponente para el mantenimiento y circulación de parásitos entre la población (Plowright et al., 2015). Aunque este hallazgo es contrario a lo previamente descrito, hace

falta realizar estudios a largo plazo en poblaciones y comunidades de configuración variable, con la finalidad de identificar que patrón tiene mayor influencia en la prevalencia del virus. En general, las prevalencias determinadas por sitio de monitoreo indican que los individuos pueden ser susceptibles o estar infectados, y que dispersan el virus a tasas muy bajas (Dominguez et al., 2007; Brandão et al., 2008). Sin embargo, debido a las características de movilización y ecología de los murciélagos, resulta imprescindible entender patrones asociados al origen, evolución y dispersión de los diferentes genotipos del virus en comunidades variables (Carrington et al., 2008).

Actualmente, las herramientas moleculares y de análisis filogenéticos, nos permiten desarrollar y comprobar hipótesis relacionadas con la dinámica de los parásitos y sus hospederos a escalas macro y micro ecológicas (Hunt et al., 2008; Deneff et al., 2010). En este estudio, la información obtenida a partir de los análisis filogenéticos, nos confirma la circulación de diferentes genotipos de  $\alpha$ \_CoVs y  $\beta$ \_CoVs en murciélagos mexicanos de la región de transición entre el Neártico y el Neotrópico. La identificación de genotipos previamente reportados en México, pero en una región geográfica diferente, permiten corroborar la relación entre algunos genotipos de CoVs y las especies hospederas, así como reafirmar los patrones de mayor riqueza viral dentro del género  $\alpha$ \_CoVs en comparación con el género  $\beta$ \_CoVs, de acuerdo con los datos reportados hasta este momento en murciélagos.

Por ejemplo, la identificación de Mex\_ $\alpha$ \_CoV\_1 en *Carollia sowelli* es congruente con lo previamente reportado en los estados de Campeche y Chiapas, al igual que Mex\_ $\alpha$ \_CoV\_4, que previamente fue identificado en *Artibeus jamaicensis* en Campeche y que en este

estudio fue reportado en una especie cercanamente relacionada, *Artibeus hirsutus* en el estado de Morelos. De igual forma, observamos congruencia con Mex\_α\_CoV\_7, que anteriormente se identificó en individuos del género *Myotis*, capturados en refugios de la Ciudad de México, y que en esta ocasión se reportan en siete individuos pertenecientes a dos especies del género *Myotis*, capturados en dos refugios del estado de Morelos. Finalmente, Mex\_β\_CoV\_10 anteriormente se describió en *Pteronotus parnellii*, y se agrupó en un clado junto a Mex\_β\_CoV\_11a y Mex\_β\_CoV\_10b, secuencias asociadas a murciélagos de las familias Mormoopidae y Phyllostomidae (Anthony et al., 2013b). En este caso, Mex\_β\_CoV\_10, se identificó en doce individuos de *Pteronotus parnellii* (Mormoopidae), y por primera vez en tres especies de filostómidos (familia cercanamente relacionada a la Mormoopidae) *Artibeus jamaicensis*, *Macrotus waterhousii* y *Glossophaga leachii* (Teeling et al., 2005).

Además, los ocho genotipos de CoVs identificados en este estudio, también se agrupan por familia de hospederos. Por ejemplo, Mex\_α\_CoV\_17 se identificó en tres especies de la familia Phyllostomidae, un individuo de *Diphylla ecaudata*, un individuo de *Glossophaga commissarisi* y dos individuos de *Glossophaga morenoi*, todos en el refugio "2. Vegas" localizado en el estado de Puebla. Mex\_α\_CoV\_15, se identificó en dos individuos de *Glossophaga morenoi* del refugio "2. Vegas". Y Mex\_α\_CoV\_16 fue identificado en dos individuos de *Desmodus rotundus* y un individuo de *Choeroniscus godmani*, en dos refugios del estado de Morelos, en este caso en particular es importante mencionar que este genotipo tiene un porcentaje de similitud mayor al 90% a nivel de aminoácidos con

referencia al CoV identificado por Carrington et al., 2008, en murciélagos de la familia Phyllostomidae en la isla de Trinidad localizada en Sudamérica.

En cuanto a las secuencias de  $\beta$ \_CoV reportadas en este estudio, también se observa agrupación por familias; Mex\_ $\beta$ \_CoV\_18 y Mex\_ $\beta$ \_CoV\_19, se identificaron en especies de la familia Mormoopidae, el primero en un individuo de *Pteronotus parnellii* y otro en *Pteronotus davyi*, mientras que el segundo únicamente se identificó en un individuo de *Pteronotus parnellii*, ambos CoVs en refugios del estado de Puebla, con aproximadamente 250Km de distancia entre ellos.

En general, todos los ejemplos mencionados anteriormente apoyan la hipótesis que sugiere que la presión de selección de la especie hospedera tiene mayor influencia que la distancia geográfica, sobre la diversificación de los genotipos de CoVs en murciélagos, al igual que los resultados obtenidos en estudios previos. Esta hipótesis que puede ser comprobada analizando patrones de coespeciación (murciélagos-CoVs) (Anthony et al., 2015; 2017).

La red de haplotipos construida muestra la relación entre los genotipos identificados y el origen geográfico de la muestra. La topología de esta red no nos permite identificar un origen genético para las variantes descritas, pues no se logra definir un centro ancestral de irradiación. Tampoco se logra identificar una estructura poblacional o estructura geográfica. Por el contrario, los centros a partir de los cuales se despliegan los diferentes haplotipos, están representados por reticulaciones o bucles no resueltos y conformados por haplotipos

hipotéticos a partir de los cuales se deriva una serie de pasos mutacionales que dan origen a los haplotipos identificados.

En otras investigaciones, se ha logrado establecer una relación entre la filogenia viral y la distribución geográfica de los diferentes genotipos. Esta información puede ser útil para identificar localidades en donde se originó alguna epidemia o para identificar factores predisponentes para la emergencia de alguna enfermedad (Holmes, 2004; Takano et al., 2009). Sin embargo, los resultados obtenidos en este caso, sugieren que la especificidad de hospedero es más relevante que los patrones geográficos, lo que es congruente con estudios previos (Anthony et al., 2013; Drexler et al., 2014; Fischer et al., 2016).

Se sabe que los CoVs presentan altas tasas de recombinación, característica que juega un papel importante en su ecología, virulencia y evolución. Además, se ha demostrado una alta divergencia de los CoVs en espacios geográficos relativamente pequeños, lo que puede reflejar la capacidad de adaptación de este grupo viral hacia diferentes especies de hospederos (Carrington et al., 2008). Esta característica podría favorecer el cambio de hospedero y, en consecuencia, la emergencia de enfermedades relacionadas con estos virus. Por ejemplo, en el caso del CoV causante de la Diarrea Epidémica Porcina en Europa, se desconocía la especie que actuaba como reservorio natural del virus (Pensaert & de Bouck, 1978). O el caso del CoV humano OC43, que se cree deriva del CoV bovino (Vijgen et al., 2005).

Es fundamental entender la dinámica asociada con los hospederos intermediarios en relación a la ecología de los CoVs (p.ej. camellos y

alpaca, en el caso de MERS-CoV), que actúan como reservorios, capaces de favorecer la recombinación viral, y por ende la capacidad de infectar a otras especies como el humano (Mohd et al., 2016; Rabaan et al., 2017). Esto, debido a que actualmente se reconoce que varios procesos involucrados en la transmisión de enfermedades a humanos a partir de especies silvestres, dependen de actividades antrópicas tales como: consumo de fauna silvestre como alimento, deforestación, fragmentación de hábitat, producción agrícola y la urbanización (Calisher et al., 2006; Epstein & Field, 2015; Voigt et al., 2016).

Por otro lado, se ha demostrado que los CoVs de murciélagos, tienen gran divergencia genética y que son los CoVs más antiguos entre especies animales. Además, se ha registrado que los CoVs presentan tamaños poblacionales estables en poblaciones de murciélagos, mientras que en otras especies de hospederos presentan crecimiento poblacional epidémico (Vijaykrishna et al., 2007; Gloza-Rausch et al., 2008; Pfefferle et al., 2009).

Ante las evidencias sobre la estrecha relación Murciélagos–CoVs, resulta interesante determinar la influencia de la gran diversidad y riqueza de especies de murciélagos y su amplio rango de distribución, sobre la riqueza y diversidad de CoVs. En este estudio, se identificó una riqueza total de doce genotipos de CoVs en la muestra total, mientras que los sitios con mayor riqueza de hospederos (“2. Vegas” y “14. Guano”), tuvieron la riqueza más alta de genotipos de CoVs de entre los sitios monitoreados. En particular el refugio “2. Vegas” es considerado uno de los refugios con mayor diversidad de especies de murciélagos en México, por lo que la hipótesis que asocia la riqueza

de CoVs con la riqueza de hospederos es congruente en este ejemplo. Por otro lado, el refugio "8. Agua", con dos especies de hospederos, tuvo una riqueza real de dos genotipos de CoVs y una riqueza extrapolada también de dos genotipos, misma en la que se determinó que la cobertura del muestreo fue del 100%. Esta información soporta la hipótesis de que entre mayor es la riqueza de hospederos, mayor será la riqueza de CoVs. Sin embargo, estos datos no pueden correlacionarse ya que el esfuerzo de muestreo entre sitios no fue constante.

En este estudio se observa que los patrones de organización de las comunidades de murciélagos de la región de transición evaluadas, presentan características que han sido descritas en las comunidades de murciélagos de ambas regiones biogeográficas de manera independiente. Por otro lado, la diversidad de murciélagos identificada en la zona de monitoreo representa el intercambio de especies de ambas zonas biogeográficas en un espacio geográfico restringido en relación con el territorio que abarca México.

Los resultados obtenidos en esta investigación corroboran la circulación de CoVs en comunidades de murciélagos de la región de transición Neártico-Neotropical, además, los datos generados permitieron identificar la presencia de diferentes genotipos virales en las poblaciones de murciélagos monitoreados. Es importante mencionar que algunos de estos genotipos son reportados por primera vez.

La prevalencia de CoVs en las diferentes poblaciones de hospederos, no está determinada aparentemente por la abundancia del hospedero, ya que aun en sitios con abundancias bajas, se identificaron organismos positivos. Observándose también, presencia de CoVs en colonias con baja riqueza de hospederos, pero con abundancias altas. Los resultados también muestran que la riqueza de hospederos por localidad de colecta es determinante en los patrones de riqueza de CoVs identificados.

Por otro lado, los patrones de distribución geográfica de CoVs parecen estar influenciados por los patrones de distribución del hospedero, de tal forma que la distribución geográfica del genotipo viral podría estar restringida a una determinada zona geográfica, asociada principalmente al área de distribución de la especie hospedera en que se ha identificado. Estas características, promueven el desarrollo de estudios de coevolución entre CoVs-murciélagos que permitan corroborar esta asociación a mayor detalle, y de esta forma identificar otras variables que pueden influir en los patrones de distribución de los diferentes genotipos de CoVs a escalas variables.

La información obtenida reveló la presencia de genotipos que no habían sido identificados anteriormente, lo que sugiere que aún hay genotipos que permanecen sin ser identificados, por lo cual es fundamental continuar realizando estudios que evalúen la presencia de este virus en comunidades de murciélagos. Estos datos corroboran lo señalado en otros trabajos, que sugieren que la riqueza de CoVs en murciélagos es alta, permitiendo el planteamiento de hipótesis que busquen identificar los patrones y procesos que determinen esta asociación a diferentes escalas de tiempo y espacio.

## CAPÍTULO II

---

# Modelo de Distribución Potencial de Coronavirus en Murciélagos de América

En respuesta al brote de SARS-CoV, el primer reporte de CoV en murciélagos se realizó en China en 2005 como parte de un programa de monitoreo de fauna silvestre. Este programa fue establecido para determinar la circulación de virus en animales de vida libre (Poon et al., 2005).

El brote de SARS-CoV fue la primera pandemia global del siglo XXI (Zhong et al., 2003), en consecuencia, muchos recursos fueron asignados para atender el origen de este brote. Diez años después se reportó el primer caso de MERS-CoV en Arabia Saudita. El origen de este brote en la población humana también se asoció con variedades de CoVs identificadas en especies de murciélagos (Annan et al., 2013). A partir de estos brotes, se ha descrito una gran variedad de CoVs en diferentes especies de murciélagos en distintos países del mundo. De las quince especies de  $\alpha$ -CoV y  $\beta$ -CoV actualmente descritas, la mayoría, es decir, ocho han sido identificadas en especies de murciélagos (Ge et al., 2015).

La asociación entre CoVs y murciélagos a nivel global se ha hecho evidente gracias a múltiples estudios. Se ha determinado que los CoVs identificados en especies de murciélagos son más diversos que aquellos identificados en otras especies de mamíferos silvestres, lo que sugiere que los murciélagos son uno de los reservorios más importantes de este género viral (Drexler et al., 2014; Anthony et al., 2017).

Para generar información que ayude a comprender e interpretar los factores involucrados en la emergencia de este virus en la población humana, se han empleado diferentes aproximaciones (Graham et al.,

2013). Sin embargo, comprender la dinámica entre un parásito y sus hospederos es una tarea compleja, debido a la diversidad de variables involucradas en esta interacción. Por ejemplo, la emergencia de enfermedades zoonóticas inicia cuando el patógeno pasa de su hospedero natural a un nuevo hospedero, y la transmisión entre especies, depende de una oportunidad física, que se puede presentar al ocupar el mismo ambiente y al aumentar la frecuencia de contacto directo o indirecto (Pedersen & Davies, 2009; Hayman et al., 2013).

Debido a la variación en los procesos y dinámicas ecológicas, los conductores de la emergencia de una enfermedad también presentan variación espacial, por lo que el ambiente y las características biogeográficas de una región representan un determinante significativo (Peterson et al., 2004; Scheiner, 2009; Reperant, 2010). Por ejemplo, los sistemas involucrados en la transmisión de parásitos funcionan como un conjunto de especies que interactúan alojando, o moviendo en forma de vectores, al parásito a través de diferentes escenarios biológicos. Cada una de estas especies tiene sus propias características y áreas de distribución biogeográfica, ligadas a su propio nicho ecológico (condiciones apropiadas para su sobrevivencia y reproducción), su interacción con otras especies y el área en la que están accesibles a otras especies en ciertos periodos de tiempo. Estas complejas interacciones, pueden actuar como factores predisponentes para la emergencia de enfermedades a diferentes escalas temporales y espaciales.

En el área de Ecología de Enfermedades, se emplean aproximaciones y herramientas derivadas de diferentes disciplinas como: Biología

Molecular, Ecología, Epidemiología, Genética Molecular, Medicina Humana, Medicina Veterinaria, Salud Pública, Geografía, entre otras, que permiten entender la dinámica parásito-hospedero a diferentes niveles. Un ejemplo son los Sistemas de Información Geográfica (SIG), herramienta que, entre otras cosas, ayuda a identificar áreas de distribución potencial de diferentes especies. Esto es posible a partir de modelos de nicho ecológico (MNE) en función de las condiciones ambientales ideales para su establecimiento (Peterson et al., 2011).

Los MNE emplean diferentes algoritmos que estiman la relación entre puntos de distribución reales o también llamados datos de ocurrencias (observaciones en campo o registros de colecciones o museos), con información espacial que pudiera restringir la distribución de las especies. Este es un método correlativo que emplea el nicho realizado (registros de ocurrencias) para caracterizar el nicho ecológico o fundamental de las especies (Elith et al., 2006).

Originalmente los ENM se empleaban para hacer predicciones ecológicas de la distribución geográfica de especies de flora y fauna silvestre a partir de datos de ocurrencias. Sin embargo, recientemente esta aproximación se ha empleado para modelar la distribución potencial de enfermedades infecciosas a partir de modelos de organismos que participan en la dinámica de una enfermedad (reservorios, vectores y macro y micro parásitos). Identificar la distribución geográfica de los organismos involucrados en la dinámica de una enfermedad es crucial para entender las dimensiones geográficas del riesgo de transmisión de una enfermedad (Peterson, 2007; Baptista-Rosas et al., 2007; Pigott et al., 2014).

Entender los patrones y procesos que determinan la ecología y distribución de los CoVs en sus reservorios naturales, y cómo se transmiten a especies domésticas y al humano, resulta fundamental para identificar zonas de riesgo potencial, así como para el establecimiento de programas de control y prevención de brotes. Por lo anterior, el objetivo de este Capítulo fue desarrollar un modelo de distribución potencial de CoV en murciélagos de América, empleando la aproximación de MNE a partir de modelos de distribución de especies de murciélagos en donde se ha identificado el virus. Así como de reportes de CoVs en murciélagos de América.

### Colecta de información

Se realizó una revisión bibliográfica en el catálogo “Web of Science” para obtener registros de ocurrencia de CoVs en murciélagos de América. El criterio de búsqueda fue “CoV AND Bats AND America”. Por cada registro positivo se obtuvo la siguiente información: País, localidad de colecta (latitud y longitud), especie de hospedero y técnica diagnóstica. En caso de que las coordenadas de la localidad de colecta, no estuvieran disponibles en la referencia bibliográfica, estos datos fueron ubicados y georreferenciados con apoyo del software de acceso libre Google Earth. En este capítulo, también se usaron los registros de individuos positivos descritos en el Capítulo I.

### Ocurrencia de hospederos

A partir de las especies de murciélagos reportadas como positivas a algún CoV, se construyó una base de datos de especies que pueden actuar como reservorios. Posteriormente se descargaron las localidades con ocurrencia de estas especies registradas en la base de acceso libre gbif.org (*Global Biodiversity Information Facility*). Finalmente, se corroboró que los datos publicados en gbif.org coincidieran con el área de distribución geográfica de cada especie, previamente descrita por la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza). En caso de identificar localidades que no coincidieran con los rangos geográficos descritos, estos fueron eliminados para el análisis.

## Modelado de Distribución Potencial de Hospederos Quirópteros

Se construyó un modelo de nicho ecológico empleando el software MaxEnt (Modelo de Máxima Entropía) para cada especie de murciélago con registros positivos a CoVs (Phillips et al., 2006). MaxEnt realiza predicciones modelando el nicho de las especies con base en un algoritmo que estima la distribución más cercana a la uniforme (máxima entropía). Los modelos se construyen en función de la relación que existe entre los puntos de presencia identificados y las variables ambientales que se incluyen en el modelo (Phillips et al., 2006). Como resultado se presenta el área geográfica que reúne las condiciones óptimas para que la especie esté presente, en función de las probabilidades acumuladas de distribución del nicho ecológico de la especie y las variables ambientales empleadas. Esto generará mapas que presentan la probabilidad de distribución de la especie. Los resultados se muestran a través de un gradiente que representa valores del 0 al 100% (Felicísimo et al., 2002).

En un primer ensayo se emplearon diecinueve variables bioclimáticas (Cuadro 6) de *WorldClim* (<http://www.worldclim.org>) a 1km de resolución. Cada modelo se desarrolló empleando el 30% de los datos de cada especie para validación y el 70% para calibración (Araújo & Guisan, 2006). Se seleccionaron las características predeterminadas del programa y se eligió el formato de salida logístico, esto con la finalidad de interpretar la distribución en términos de probabilidad (Phillips & Dudík, 2008).

Dado que el desempeño de los modelos se puede ver afectado por la correlación existente entre las diecinueve variables previamente descritas, y generar información redundante, se realizó una selección

de variables para la construcción de los modelos finales por especie. Los criterios de selección resultantes fueron: el porcentaje de contribución de las variables climáticas por modelo y el grado de correlación entre variables según los criterios de selección (Loiselle et al., 2008).

Los modelos obtenidos previamente se transformaron a mapas binarios, para definir el área de distribución potencial de cada especie. En estos, se determinó como presencias, aquellas áreas en las que se ubicó el 90% de los puntos de colecta, y como ausencias las zonas restantes.

Para evaluar el desempeño de cada modelo se empleó la curva ROC (Receiver Operating Characteristic). Esta curva muestra el rendimiento del modelo en los umbrales posibles, en función del AUC (Area Under the Curve). El AUC indica que los sitios de presencia fueron clasificados al azar como puntos de ausencia, de acuerdo con un modelo de probabilidad. El AUC generará dos valores, uno de entrenamiento y otro para datos de calibración, en donde una clasificación al azar tendrá un valor de AUC de 0.5 y una clasificación ideal tendrá un AUC de 1.0. Se consideraron modelos con buen ajuste, aquellos con valores de AUC arriba de 0.75 (Elith et al., 2002).

#### Riqueza de hospederos

A partir de los modelos generados y transformados a mapas binarios, para cada especie de murciélago detectada como positiva, se realizó un mapa consenso que representa la distribución potencial de hospederos quirópteros de CoV en América. La riqueza de hospederos fue clasificada en gradientes de especies acumuladas (3,

6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 y 33) de acuerdo a su distribución potencial y a sus áreas de convergencia.

#### Modelo de distribución potencial de CoV

Para construir un modelo de distribución potencial de CoVs en América se emplearon los puntos geográficos con registros positivos previamente identificados. Se consideró cada punto con al menos un individuo positivo de cualquier especie de murciélago mediante PCR.

Para el desarrollo y validación de este modelo, se emplearon los parámetros previamente descritos. Para definir el área de distribución potencial, el modelo se transformó en mapa binario, siendo las presencias aquellas áreas en las que se ubicó el 90% de los puntos de colecta y como ausencias las zonas restantes.

Finalmente, se realizó un mapa consenso del modelo de riqueza de hospederos y del modelo de distribución potencial de CoV con la intención de evaluar la zona de convergencia de ambos modelos.

### Colecta de información

Se seleccionaron 15 artículos publicados en el periodo 2007\_2016 que se ajustaron a los criterios de búsqueda en "Web of Science" (n= 49). Los datos obtenidos de estas publicaciones, junto con los registros originales obtenidos en este estudio, sumaron un total de 47 localidades diferentes con diagnóstico molecular positivo a CoVs en diferentes especies de murciélagos. Se identificaron veinticinco para México, once para Estados Unidos, tres para Costa Rica, trece para Brasil, dos para Canadá y dos para Trinidad y Tobago (Cuadro 7, Figura 15).

### Ocurrencia de hospederos

En total, se identificaron 43 especies de murciélagos diagnosticadas como positivas a CoVs en América. Se identificaron veintiún especies de la familia Phyllostomidae, once de la familia Vespertilionidae, nueve de la familia Molossidae, y tres de la familia Mormoopidae (Cuadro 8).

### Modelado de Distribución Potencial de Hospederos Quirópteros

De las 43 especies registradas, se contó con un número mayor a 40 registros por especie en gbif.org, lo que permitió generar los 43 modelos de nicho en MAXENT. Para el primer grupo de modelos, se eliminaron aquellas variables altamente correlacionadas ( $\geq 80\%$ ). Por lo tanto, las variables empleadas fueron: BIO1 (temperatura promedio anual), BIO2 (rango diurno promedio), BIO3 (isotermalidad), BIO4 (temperatura estacional), BIO12 (precipitación anual), BIO15 (precipitación estacional), BIO17 (Precipitación del trimestre más

seco) y BIO18 (precipitación del trimestre más cálido) (Cuadro 6). Los modelos obtenidos, presentaron un buen ajuste de acuerdo con los valores de AUC que, en todos los casos, fueron mayores a 0.75. Posteriormente, se realizó una segunda selección de variables por modelo, eliminando las variables con menor porcentaje de aporte. En general, las variables que aportaron más y al mayor número de modelos fueron: BIO1, BIO2, BIO4, BIO12 y BIO15 (Cuadro 6).

#### Riqueza de hospederos

Se realizó un mapa consenso de la distribución potencial de las 43 especies de murciélagos en América (Cuadro 8; Figura 15). La riqueza de hospederos se describe en gradientes que aumentan en grupos de tres especies. Las regiones con mayor riqueza de hospederos se localizan en la región biogeográfica Neotropical, principalmente en los estados de las costas del Pacífico y del Golfo de México, en EUA, en la península de la Florida, Cuba, Puerto Rico, Centroamérica, y países sudamericanos como Ecuador, Colombia, Venezuela, Guyana, Surinam, Brasil, Perú y Bolivia. En el resto de América se identifican zonas con las condiciones ideales para que se distribuyan diferentes especies de hospederos potenciales, sin embargo, las zonas de convergencia de estos presentan menor riqueza de especies. Esto se observa en la región Neártica en Estados Unidos, Canadá, México, y algunas regiones del Neotrópico, en Brasil, Argentina, y Chile.

#### Modelo de distribución potencial de CoV en América

Para el modelo de CoV, se emplearon las cincuenta y dos localidades con registros positivos de CoVs en murciélagos. Se desarrolló un primer modelo con las diecinueve variables de Worldclim. Posteriormente, se desarrolló un segundo modelo, eliminando las variables altamente correlacionadas y que aportaban menos al modelo. En este segundo

modelo se tomaron en cuenta las siguientes variables: BIO1(temperatura promedio anual), BIO2 (rango diurno promedio), BIO3 (isotermalidad), BIO4 (temperatura estacional), BIO12 (precipitación anual), BIO15 (precipitación estacional), BIO17 (Precipitación del trimestre más seco) y BIO18 (precipitación del trimestre más cálido) (Cuadro 6). La tasa de omisión resultante se encontró debajo de la tasa de omisión prevista y presentó un buen ajuste de acuerdo con los valores de AUC, que fue mayor a 0.75.

Posteriormente, se realizó una segunda selección de variables, eliminando aquellas variables que aportaron menos al modelo. Finalmente, las variables que tuvieron un mayor aporte al modelo fueron: BIO1, BIO4, BIO17 y BIO18 (Cuadro 6). El modelo final tuvo un buen ajuste en la curva de omisión y el valor de AUC fue mayor a 0.75.

El mapa binario final, muestra que las zonas de distribución potencial de CoVs en América se localizan principalmente en la región fronteriza noreste de EUA y Canadá, al sur de EUA, y en la región de la Península de la Florida. También se distribuyen en las islas de Cuba y Puerto Rico, en gran parte del territorio mexicano, Centroamérica, algunas zonas de Colombia, Venezuela, Guyana, Surinam, Brasil, Uruguay, Paraguay, Bolivia, Perú Ecuador, y una pequeña región al sur de Argentina y Chile (Figura 17).

---

CUADRO 6. Variables bioclimáticas empleadas por WorldClim.

---

BIO1*	Temperatura media anual
BIO2*	Rango diario promedio (Promedio mensual (max temp _ min temp))
BIO3*	Isotermalidad (BIO2/BIO7* 100)
BIO4*	Temperatura estacional (Desviación estándar *100)
BIO5	Temperatura mínima del mes más cálido
BIO6	Temperatura mínima del mes más frío
BIO7	Rango de la temperatura anual (BIO5_BIO6)
BIO8	Temperatura promedio del trimestre más húmedo
BIO9	Temperatura promedio del trimestre más seco
BIO10	Temperatura promedio del trimestre más cálido
BIO11	Temperatura promedio del trimestre más frío
BIO12*	Precipitación anual
BIO13	Precipitación del mes más húmedo
BIO14	Precipitación del mes más seco
BIO15*	Precipitación estacional (Coeficiente of Variación)
BIO16	Precipitación del trimestre más húmedo
BIO17*	Precipitación del trimestre más seco
BIO18*	Precipitación del trimestre más cálido
BIO19	Precipitación trimestre más frío

---

CUADRO 7. Puntos de presencia de CoVs en murciélagos de América.

Referencia	País	Localidad	Lat	Long
(Dominguez et al., 2007)	EUA	Mancos, Montezuma County, Colorado_Sitio_1	37.34224	-108.28923
	EUA	Fort Collins, Larimer County, Colorado, Sitio 2	40.42943	-105.07842
(Brandão et al., 2008)	Brasil	Sao Paulo	-23.5	-46.63
(Carrington et al., 2008)	Trinidad	Fyzabad	10.15525	-61.54625
	Trinidad	Couva	10.432	-61.43515
(Misra et al., 2009)	Canadá	St. Georges Cave_Manitoba	50.365225	-96.23990
	Canadá	Dale's_Manitoba	49.87514	-95.90684
(Donaldson et al., 2010)	EUA	Little Orleans, Allegany County	39.62592	-78.38640
(Li et al., 2010)	EUA	San Saba, Texas	31.19572	-98.71809
	EUA	Sitio_4	40.92578	-105.85911
(Osborne et al., 2011)	EUA	Sitio_5	37.31993	-104.39024
	EUA	Sitio_17	40.86726	-105.14871
	EUA	Sitio_18	40.93664	-105.17604
	EUA	Sitio_19	40.82220	-105.18499
(Huynh et al., 2012)	EUA	Saratoga National Historical Park, NY	43.01230	-73.64888
	EUA	Chesapeake & Ohio Canal National Historical Park, Maryland	39.60073	-77.8269
(Anthony et al., 2013)	México	Campeche Undisturbed / KM_15	18.40933	-89.89911
	México	Campeche Undisturbed/Silvituk	18.64291	-90.29458
	México	Campeche Undisturbed/KM_49	18.18547	-89.74688
	México	ChiapasUndisturbed/Playon	16.13486	-90.90363
	México	Chiapas/Undisturbed/Ruinas	16.10527	-91.01491
	México	San Gabriel/Oaxaca	16.03333	-97.06666
	México	Chiapas Undisturbed/Siete	16.10616	-90.98522
	México	Chiapas Disturbed/Mariposario	16.15497	-90.89378
	México	Campeche Disturbed/Hormiguero	18.40027	-89.48211
	México	Chiapas Undisturbed/Plataforma	16.10586	-90.93780
	México	Campeche Disturbed/Carrizal	18.52308	-89.59913
	México	Chiapas Undisturbed/Estación	16.11491	-90.94088
	México	Campeche Undisturbed/Volcan	18.52281	-89.82363
	México	Distrito Federal/UAM	19.29615	-99.10352
(Lima et al., 2013)	Brasil	Chiapas Disturbed/Teapa_LaFinca	17.63497	-92.99702
(Góes et al., 2013)	Brasil	Porto Alegre, Brasil	-30.03305	-51.23
	Brasil		-23.5	-46.63
(Simas et al., 2015)	México	Jequitibás Wood Campinas, Sao Paulo	19.47878	-104.64308
(Moreira_Soto et al., 2015)	Costa Rica	Sitio C Tirimbina Biological Station	-22.90870	-47.04944
	Costa Rica	Sitio J, Parrita	10.41705	-84.12372
(Asano et al., 2016)	Costa Rica	Sitio D, San José	9.54055	-84.40069
	Costa Rica		9.93869	-84.04522
(Góes et al., 2016)	Brasil	Sao Paulo	-23.5	-46.63
	Brasil	State Park Villa Rica do Espírito Santo, Fénix_PR	-23.91666	-51.95
	Brasil	Iguacu National Park PR	-25.46050	-53.81778
	Brasil	Private Reserve of Natural Heritage Fazenda Barbacena, Sao Pedro do Ivaí_PR	-23.86068	-51.87340
(Martínez-Duque, 2017)	Brasil	Aracatuba_SP	-21.20784	-50.44100
	Brasil	Andradina, SP	-20.89751	-51.37848
	Brasil	Penápolis_SP	-21.41509	-50.07747
	Brasil	Andradina	-20.89751	-51.37848
	Brasil	Sud Mennucci_SP	-20.6441	-50.88716
	México	"12"	18.44869	-99.09897
Capítulo I.	México	"14"	18.33269	-98.88841
(Martínez-Duque, 2017)	México	"8"	18.54238	-98.999
	México	"6"	18.75011	-99.18972
	México	"13"	18.42130	-99.01211

CUADRO 8. Especies de murciélagos hospederos de CoV en América y su clasificación.

Familia	Género y especie	Gremio Trófico	Afinidad Biogeográfica	Estado de Conservación
Phyllostomidae	<i>Anoura geoffroyi</i>	Omnívoro	Neotrópico	LC
	<i>Artibeus hirsutus</i>	Frugívoro	Endémico	LC
	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Frugívoro	Neotrópico	LC
	<i>Artibeus lituratus</i>	Frugívoro	Neotrópico	LC
	<i>Artibeus phaeotis</i>	Frugívoro	Neotrópico	LC
	<i>Carollia brevicauda</i>	Frugívoro	Neotrópico	LC
	<i>Carollia castanea</i>	Frugívoro	Neotrópico	LC
	<i>Carollia perspicillata</i>	Frugívoro	Neotrópico	LC
	<i>Carollia sowelli</i>	Frugívoro	Neotrópico	LC
	<i>Choeroniscus godmani</i>	Insectívoro	Neotrópico	LC
	<i>Desmodus rotundus</i>	Hematófago	Neotrópico	LC
	<i>Diphylla ecaudata</i>	Hematófago	Compartida	LC
	<i>Glossophaga commissarisi</i>	Nectarívoro	Neotrópico	LC
	<i>Glossophaga leachii</i>	Nectarívoro	Neotrópico	LC
	<i>Glossophaga morenoi</i>	Nectarívoro	Endémico	LC
	<i>Phyllostomus discolor</i>	Omnívoro	Neotrópico	LC
	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Omnívoro	Neotrópico	LC
	<i>Sturnira lilium</i>	Frugívoro	Compartida	LC
<i>Macrotus waterhousii</i>	Omnívoro	Compartida	LC	
<i>Glossophaga soricina</i>	Nectarívoro	Neotrópico	LC	
<i>Lonchorhina aurita</i>	Insectívoro	Neotrópico	LC	
Vespertilionidae	<i>Eptesicus fuscus</i>	Insectívoro	Compartida	LC
	<i>Myotis californicus</i>	Insectívoro	Neártico	LC
	<i>Myotis evotis</i>	Insectívoro	Neártico	LC
	<i>Myotis lucifugus</i>	Insectívoro	Neártico	LC
	<i>Myotis nigricans</i>	Insectívoro	Neotrópico	LC
	<i>Myotis occultus</i>	Insectívoro	Neártico	LC
	<i>Myotis riparius</i>	Insectívoro	Neotrópico	LC
	<i>Myotis velifer</i>	Insectívoro	Compartida	LC
	<i>Myotis volans</i>	Insectívoro	Neártico	LC
	<i>Nycticeius humeralis</i>	Insectívoro	Neártico	LC
<i>Pipistrellus subflavus</i>	Insectívoro	Compartida	LC	
Molossidae	<i>Cynomops abrasus</i>	Insectívoros	Neotrópico	DI
	<i>Cynomops planirostris</i>	Insectívoros	Neotrópico	LC
	<i>Molossus currentium</i>	Insectívoros	Neotrópico	LC
	<i>Molossus molossus</i>	Insectívoros	Neotrópico	LC
	<i>Molossus rufus</i>	Insectívoros	Neotrópico	LC
	<i>Nyctinomus laticaudatus</i>	Insectívoros	Neotrópico	LC
	<i>Eumops glaucinus</i>	Insectívoros	Neotrópico	LC
	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Insectívoros	Compartida	LC
Mormoopidae	<i>Pteronotus parnellii</i>	Insectívoro	Compartida	LC
	<i>Pteronotus personatus</i>	Insectívoro	Compartida	LC
	<i>Pteronotus davyi</i>	Insectívoro	Compartida	LC

Se describe la familia, el gremio trófico, la afinidad biogeográfica y el estado de conservación de las especies capturadas. LC=Preocupación menor, DI= Datos Insuficientes.

□

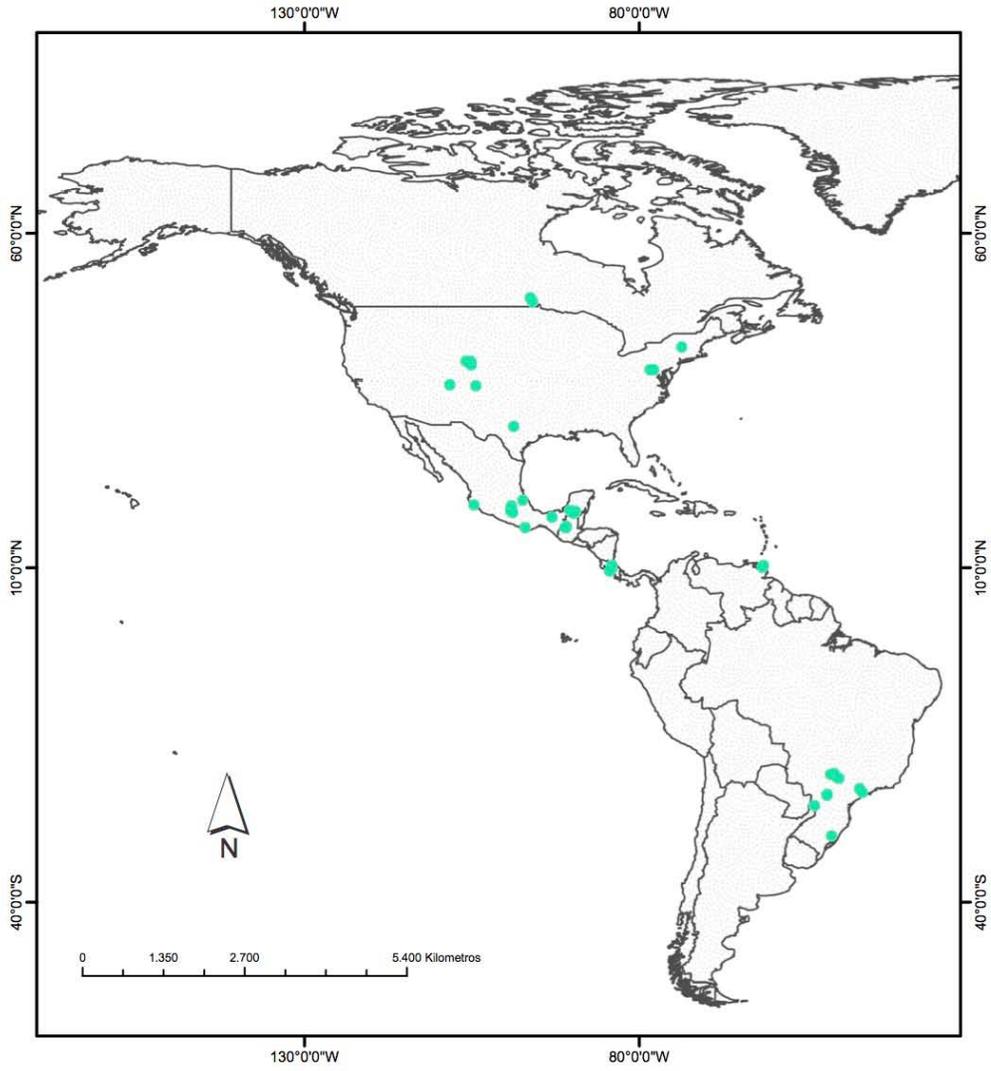


FIGURA 15. Registros de CoV en murciélagos de América.

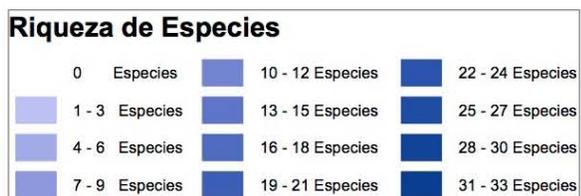
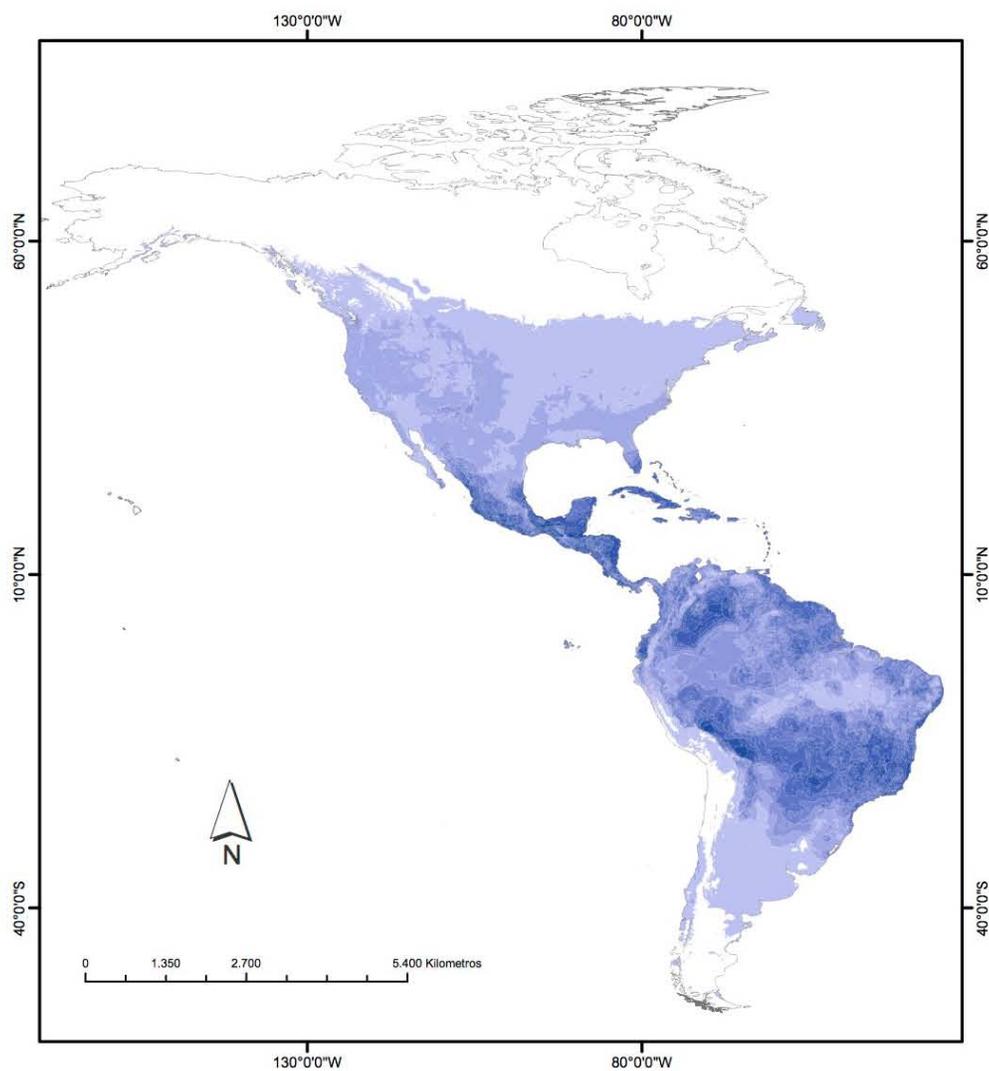


FIGURA 16. Modelo de distribución potencial de especies de murciélagos hospederos de CoV en América.

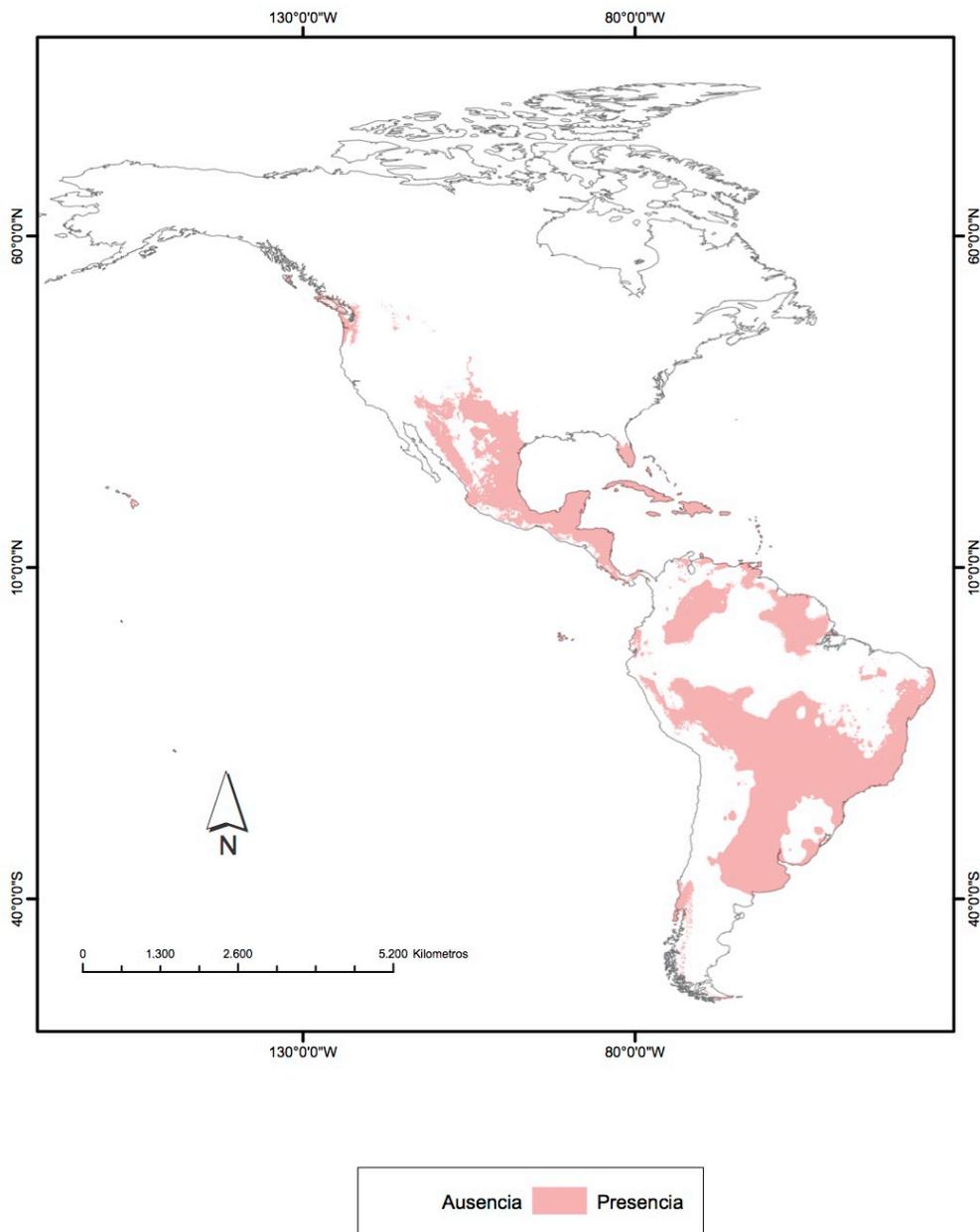


FIGURA 17. Modelo de distribución potencial de CoV en América.

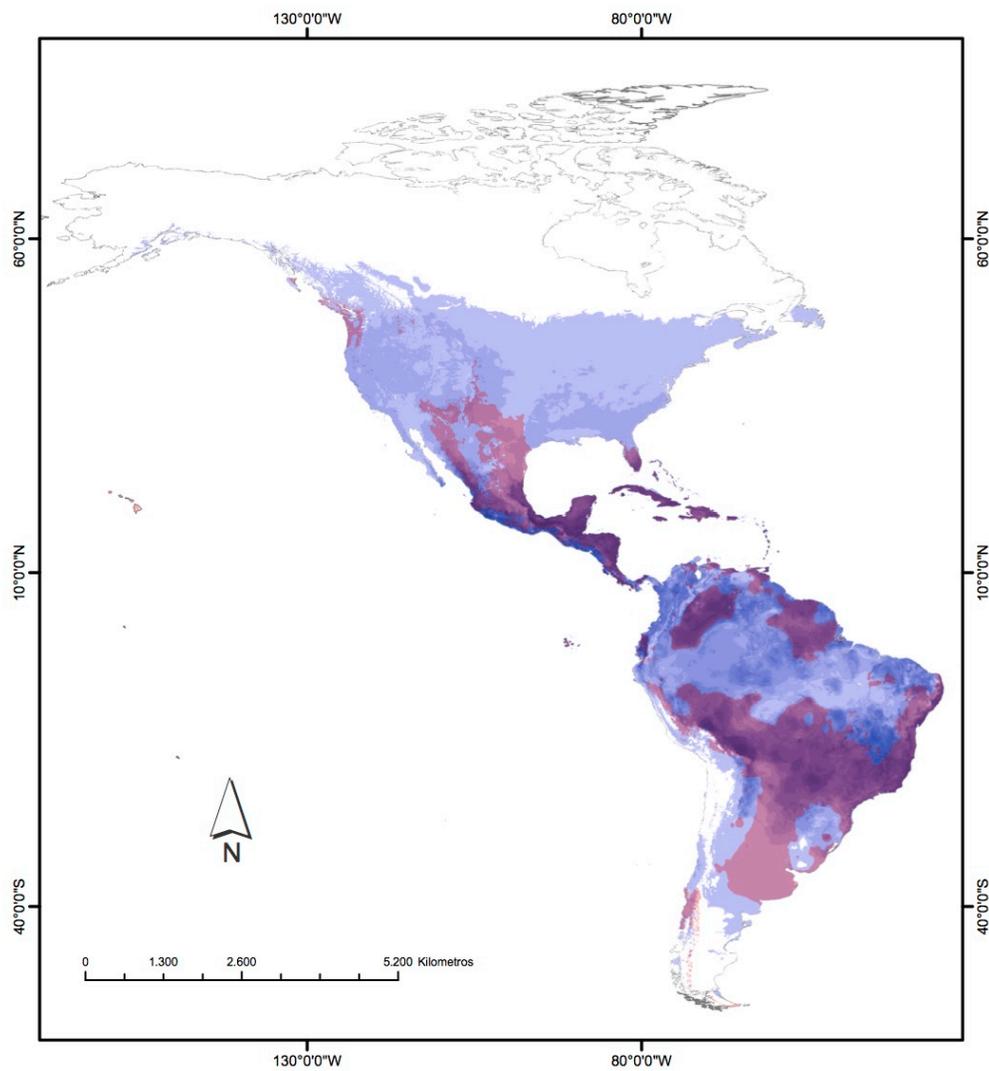


FIGURA 18. Distribución potencial de CoV y especies de murciélagos reservorios en América.

La identificación de CoVs emergentes con potencial zoonótico y pandémico, ha incrementado el monitoreo de este grupo viral en diferentes especies de mamíferos silvestres. Estos monitoreos permitieron demostrar la presencia de CoVs genéticamente relacionados con el brote de SARS-CoV en 2002-2003, en murciélagos de herradura o rinolófidos, además, estos datos han fomentado el desarrollo de investigación asociada a la relación murciélagos-CoVs (Guan et al., 2003; Song et al., 2005).

En 2014, Drexler y colaboradores describieron algunas de las características de las investigaciones relacionada a CoVs de murciélagos a nivel internacional posterior al brote de SARS-CoV. Para este año, se contabilizaron sesenta y tres estudios que presentaron nuevas secuencias de CoVs identificadas en murciélagos de los cinco continentes y se observa que el continente con mayor número de estudios y secuencias registradas en GenBank es Asia (25), seguido de América (15), Europa (13), África (9) y finalmente Australia (1). Estos datos, hicieron evidente la poca información disponible obtenida de regiones con altos índices de biodiversidad, por ejemplo, la región del Congo en África, el Sureste de Asia y la región Neotropical en América (Drexler et al., 2014).

Actualmente, realizar estudios en zonas con altos índices de biodiversidad, aporta información que aumenta nuestro conocimiento sobre la diversidad de hospederos (murciélagos) y en consecuencia la diversidad genética de los parásitos (CoVs) asociados (Murray et al., 2015). Por ejemplo, los patrones biogeográficos se han empleado como conductores para el

desarrollo de estrategias de monitoreo de la biodiversidad, por lo que conocer que patrones de distribución siguen diferentes grupos taxonómicos, incluidos los asociados a enfermedades (macro y micro parásitos), resulta de gran utilidad para entender por qué ciertas enfermedades se presentan en algunas regiones geográficas y en otras no, o porque la presencia de una enfermedad está relacionada con la presencia de alguna especie en particular (Myers et al., 2000).

A la fecha y de acuerdo con los datos obtenidos para esta revisión, las secuencias de CoVs de murciélagos reportadas para América, provienen de regiones localizadas en seis países de todo el continente de entre los cuales tres son considerados países megadiversos. Estos datos son restringidos, si consideramos que en América existen treinta y cinco países, de los cuales siete están clasificados como países megadiversos (Wilson & Mittermeier, 2004). Estos datos resaltan la importancia de incrementar la investigación y continuar identificando patrones de diversidad genética de CoVs en áreas con alta diversidad taxonómica de hospederos en América.

En esta revisión, además de apreciar la escasa información disponible asociada a este virus en murciélagos de América, también nos enfrentamos a la falta de consistencia de la información disponible. Por ejemplo, aunque existe un mayor número de publicaciones, que las empleadas en esta revisión, algunas fueron excluidas del análisis por no contar con información concreta relacionada con: clasificación taxonómica del hospedero, falta de diagnóstico molecular del virus, falta de referencias geográficas de los sitios de colecta, etc. La inconsistencia en los datos disponibles, es una

limitante para comparar y correlacionar los datos, por lo que nos enfrentamos a un número de datos restringidos para nuestro análisis.

A partir de los datos obtenidos de estudios realizados en diferentes regiones de América, se ha logrado identificar la presencia de CoVs en cuarenta y tres especies de murciélagos de diferentes regiones del continente. Estas especies representan cuatro de las seis familias de quirópteros que se distribuyen en América y dentro de la muestra el mayor porcentaje de especies (49%) pertenece a la familia Phyllostoidae. Esta familia únicamente se distribuye en América y es la familia de murciélagos con afinidad Neotropical más diversificada a nivel de género (Fenton, 1992). La familia Vespertilionidae tuvo un 25% de especies de la muestra, esta familia es la más dominante en la región Boreal y se distribuye en todo el planeta a excepción de los polos, además, los vespertiliónidos son los murciélagos más diversos a nivel de especie, y esta diversidad se concentra principalmente en el Sureste Asiático (Hutson & Mickleburgh, 2001).

Las familias Molossidae (19%) y Mormoopidae (7%) tuvieron menor representatividad dentro de la muestra. Por un lado, los molósidos al igual que los vespertiliónidos, se distribuyen en el nuevo y en el viejo mundo y aunque se distribuyen en zonas templadas y en zonas tropicales, hay mayor diversidad en los trópicos (Freeman, 1981). La familia Mormoopidae es de afinidad Neotropical y únicamente se distribuye en América, incluye únicamente dos géneros y diez especies (Simmons & Conway, 2001), de las cuales, tres especies del género *Pteronotus* han sido positivas al virus.

Estos resultados describen de manera general la composición de especies de murciélagos en América, con mayor diversidad de

especies de afinidad neotropical (60%), alta diversidad de especies de distribución compartida (21%) y en menor proporción especies de afinidad neártica (14%) y así como especies endémicas (5%). Es importante considerar que el mayor número de localidades de colecta se localizan en la región neotropical, en Centroamérica, al sur de Brasil y al centro y sur de México, mientras que en el neártico se obtuvieron datos del sur de Canadá, y del centro y Noroeste de EUA.

El gremio trófico de las especies positivas fue principalmente insectívoro (56%), esto se puede explicar debido a que las familias Molossidae, Mormoopidae y Vespertilionidae se alimentan únicamente de insectos. Por otro lado, la familia Phyllostomidae está compuesta por especies con alta diversidad de gremios tróficos, así en la muestra se observan especies frugívoras (21%), especies nectarívoras (9%), omnívoras (9%) y hematófagas (5%). Estos datos son congruentes con la distribución de gremios tróficos de los quirópteros, pues se sabe que, de las 1300 especies descritas en el mundo, el porcentaje más alto (75%) se alimenta de insectos y otros invertebrados (Denzinger & Schnitzler, 2013).

De acuerdo con la clasificación establecida por la UICN, el mayor número de especies positivas están categorizadas como preocupación menor (LC), únicamente una especie presentó información insuficiente para su clasificación (*Cynomops abrasus*). De acuerdo con la información disponible, la mayoría de las especies de quirópteros del mundo se encuentran en la categoría de preocupación menor (LC) de la UICN (UICN, 2017).

Desde un enfoque geográfico y haciendo referencia a las dos regiones biogeográficas de América, la mayor riqueza de murciélagos se concentra en el Neotrópico, región en la que se han identificado alrededor de doscientas ochenta y ocho especies de murciélagos, mientras que en la región Neártica se han descrito aproximadamente setenta y tres especies, sin embargo al sur de esta región, al centro de México, se aprecia una fuerte influencia neotropical, por lo que esta zona es identificada como zona de convergencia (Escalante et al., 2004). Identificar que determina los patrones de distribución de la biodiversidad en el planeta, es una de las preguntas científicas más estudiadas (Pennisi, 2005). Una de hipótesis planteada al respecto, se centra en los patrones de heterogeneidad del hábitat, esta teoría se basa en la premisa de que la variación en las condiciones ambientales ha dado origen a ecosistemas con diferentes características y de distribución geográfica variable, lo que genera mayor diversidad de nichos y facilita la coexistencia, dando como resultando mayor riqueza de especies (Hortal et al., 2008).

El mapa consenso de hospederos potenciales, muestra los parámetros de mayor riqueza de especies en la zona de transición en México. Se ha reconocido que, aunque México abarca únicamente el 1% del área terrestre del planeta contiene alrededor del 10% de todos los vertebrados terrestres. En el caso particular de los murciélagos se han descrito ciento treinta y siete especies en todo el territorio, de las cuales cincuenta y siete son de afinidad neártica y el resto de afinidad tropical. Dentro del territorio nacional, los estados que muestran mayor riqueza, se localizan en la costa del Pacífico que incluye a los estados de Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, y algunos estados del centro como Puebla y del Sureste

localizados en la Península de Yucatán, Oaxaca y Chiapas (Ceballos & Oliva, 2005). Se ha demostrado que la composición de especies de murciélagos en México, tiene una fuerte asociación con los atributos de la vegetación y con la variación espacial de los factores ambientales (López-González et al., 2012).

Los resultados del modelo, muestran alta riqueza de hospederos potenciales en las islas del Caribe, principalmente en Cuba y República Dominicana. Se ha sugerido que Cuba tiene la mayor riqueza de murciélagos de entre las Antillas, con aproximadamente el 45% de las especies de la región. Este nivel de diversidad, se ha asociado con la alta complejidad del hábitat en la región y con la abundancia de ambientes ricos en refugios (Mancina et al., 2007).

En Centroamérica el modelo muestra patrones de mayor riqueza de hospederos, principalmente en la costa del Caribe en Belice y Guatemala, la región costera localizada entre la frontera de Honduras y Nicaragua, así como la región del istmo de Panamá. Diferentes estudios han señalado que es en el área de América entre México y Panamá, en donde habita la mayor riqueza de murciélagos del mundo, en términos de número de especies y géneros. En esta zona se han descrito aproximadamente 166 especies de murciélagos, de sesenta y siete géneros pertenecientes a nueve familias, además de reportar un alto grado de endemismos. Dentro de esta región, se ha señalado a la costa del Pacífico de Guatemala, El Salvador, Honduras y Nicaragua, como áreas prioritarias para la conservación de murciélagos, por presentar un mosaico de vegetación, que va de manglares hasta bosques de niebla y bosques tropicales (Hutson & Mickleburgh, 2001). También se ha señalado que los países del Sur

(Costa Rica y Panamá) tienen mayor diversidad que los países del Norte (Guatemala y Belice), y de manera general se ha señalado que esta región es un marcado centro de diversificación de la biota en América (Ortega y Arita, 1998, Hernández Dávila, 2012).

En Sudamérica, la zona con mayor probabilidad de convergencia entre especies de hospederos se localiza en regiones de Ecuador, Colombia, Venezuela, Guyana, Surinam, Brasil, Perú y Bolivia. En de la mayoría de estos países se localiza la Amazonía, región de gran importancia para la diversidad de murciélagos. El bosque tropical amazónico es uno de los centros de biodiversidad más importante del mundo y es el bioma con mayor riqueza de murciélagos (50%) del Neotrópico, sin embargo, el mayor porcentaje (60%) del territorio de esta selva se localiza en Brasil (Sampaio et al., 2003). Por otro lado, la Amazonía Peruana y su frontera con Brasil y Bolivia también presenta las características ideales para alojar una alta riqueza de hospederos.

Colombia es otro país sudamericano con alta riqueza de murciélagos, a pesar de ello, se considera que no existen registros de un gran porcentaje del área geográfica de la Amazonía Colombiana y Venezolana (Noguera Urbano & Escalante, 2014). Además de la selva amazónica, el mapa también señala el bosque tropical de la costa del Atlántico y la zona de pastizal y matorral tropical al sur de Brasil, como áreas de importancia para la riqueza de hospederos potenciales.

Los resultados muestran que las zonas con características adecuadas para la distribución de la mayor riqueza de hospederos, se localizan en los bosques tropicales y subtropicales. Sin embargo, en la región

neártica las zonas con características ambientales favorables para alojar una alta riqueza de hospederos, se localizan en la costa de la Florida en EUA, en donde el ecosistema principal es bosque de coníferas (Boenigk, 2015).

Como se observó en los resultados los mayores porcentajes de biodiversidad se concentran en la región tropical, y estos patrones son el resultado de variables asociadas al clima y a la historia geológica de la Tierra. Algunas de las variables ambientales con mayor influencia en los patrones de biodiversidad son la temperatura y la precipitación. En los modelos de hospederos, se emplearon estas variables pues se sabe que están fuertemente asociadas a la ecología de las especies y de sus dinámicas poblacionales (Austin et al., 2009).

La precipitación es fundamental para el crecimiento de vegetación que provee de recursos alimenticios y refugios para los organismos, así, los bosques se localizan en zonas con precipitación que va de normal a alta en zonas climáticas tropicales y templadas. Por otro lado, la temperatura, además de influir en la disponibilidad de recursos en el ambiente, también modifica el comportamiento y las características ecológicas de los murciélagos, como las tasas de reproducción (Adams & Hayes, 2008).

Se ha identificado, que los patrones de diversidad y endemismos también responden a gradientes latitudinales y de elevación, sin embargo, por estar altamente correlacionadas con variables ambientales como la precipitación y la temperatura, no se emplearon para el desarrollo de los modelos (López-González et al., 2012).

Actualmente el conocimiento sobre la diversidad de quirópteros en América sigue en aumento, así como la diversidad de macro y micro parásitos asociados a este grupo de mamíferos. Por lo cual, identificar los centros con alta riqueza de murciélagos, ayudará a conocer características que determinan los patrones de distribución de sus parásitos asociados. Por ejemplo, los estudios sobre CoVs en murciélagos mexicanos, muestran que el porcentaje de especies de quirópteros que han sido positivas a este virus, representan alrededor del 34% de las especies descritas para el país. Este resultado apoya la hipótesis sobre la relación entre diversidad viral y diversidad de hospederos (Anthony et al., 2015; 2017).

El modelo de distribución potencial de virus, construido en este trabajo, coincide únicamente con algunas regiones de mayor riqueza de hospederos potenciales, principalmente en la región de la Amazonía localizada en la frontera entre Venezuela y Colombia. Por otro lado, algunas regiones con características ideales para la presencia de una alta riqueza de hospederos potenciales localizadas en Perú, Colombia y Ecuador, no se han realizado estudios sobre CoVs en murciélagos. Además, se muestra que la región de Centroamérica es una zona con las características adecuadas para la distribución del virus, por lo que realizar investigaciones en esta región es importante por ser uno de los centros de diversidad más importantes de América.

A la fecha, existen pocos estudios que describan la influencia de las condiciones ambientales en la prevalencia de CoVs en murciélagos. En este trabajo se construyó el modelo de distribución potencial de CoVs, a partir de la selección primaria de variables que mostraron un alto nivel de aporte, estas variables estuvieron relacionadas

principalmente a la temperatura y precipitación. Algunos estudios han demostrado que la estacionalidad y la precipitación, en conjunto con la temperatura, pueden afectar la tasa de reproducción, el desarrollo, el comportamiento, la distribución geográfica y las dinámicas poblacionales de hospederos y vectores (Goetz et al., 2000).

La influencia de variables climáticas en la prevalencia de virus en poblaciones silvestres, se ha relacionado con patrones reproductivos y de crianza. Se ha sugerido que bajos niveles de precipitación representan un factor de estrés por favorecer la disminución de recursos alimenticios y de refugio, esta condición tiene un impacto directo en la salud de los individuos, causando modificaciones en sus parámetros inmunológicos (Seltmann et al., 2017).

Se ha demostrado que la estacionalidad juega un papel clave en brotes epidémicos de algunos patógenos, por ejemplo, algunos brotes de Filovirus en murciélagos se han relacionado con la época de nacimientos, y se ha observado que, en regiones geográficas con menor variación de la temperatura mensual, son más propensas a presentar brotes de Marbug (Nyakarahuka et al., 2017).

Estudios epidemiológicos de CoVs en murciélagos del viejo mundo (familia Rhinolophidae), demostraron en un periodo de cuatro años un aumento de la prevalencia únicamente en la primavera de algunos años (Su et al., 2016), lo que coincide con otros estudios longitudinales en donde se observa variación en las prevalencias reportadas año con año (Osborne et al., 2011). Por otro lado, estudios realizados en sitios de maternidad han demostrado que año con año la prevalencia

de CoVs es persistente durante la temporada en la que los murciélagos no se encuentran en hibernación, presentando un pico al final de la primavera y al inicio del verano, este hallazgo es interesante y plantea la posibilidad de realizar estudios en diferentes poblaciones durante esta época con la finalidad de identificar procesos que influyan en la prevalencia del virus (Dominguez et al., 2007).

La información disponible sobre la distribución geográfica de diferentes especies de quirópteros obtenida a partir de investigaciones sistemáticas es limitada, pues generalmente proviene de regiones geográficas específicas y muy restringidas, por lo que los datos de ocurrencia generalmente son pocos o no abarcan comunidades completas. Por lo anterior, el uso de modelos de distribución potencial en especies de murciélagos ha resultado una herramienta útil, además de aportar información sobre los efectos de la modificación del hábitat y los requerimientos para la conservación de distintas especies de quirópteros, principalmente aquellas con características ecológicas y de comportamiento que vuelven compleja su identificación y detectabilidad (Russo & Voigt, 2016).

Por otro lado, el uso de modelos de distribución potencial como herramienta para identificar zonas de riesgo para la emergencia de enfermedades continúa en aumento. Se han descrito las ventajas y desventajas sobre el uso de estos modelos, y se sabe que la agudeza de estos modelos depende en gran medida de los datos de presencia disponibles, lo que puede representar un sesgo en el desempeño de los modelos propuestos (Peterson et al., 2011). Además, es indispensable considerar los sesgos espaciales a partir de los datos

disponibles, por ejemplo, en este trabajo se empleó la base de datos en línea *gbif.com*, que cuenta con datos a escala global y en donde se pueden apreciar sesgos en la información disponible por país, asociados principalmente a la variación en los esfuerzos de muestreo por localidad y por país, así como a la presencia de errores en la identificación taxonómica de especies crípticas (Anderson, 2012; Beck et al., 2013).

Actualmente el uso de esta herramienta en América es limitado en comparación con el que se ha dado en Europa y África (Razgour et al., 2016), sin embargo, se espera que su uso se incremente a favor de estudios con aproximaciones integrales y multidisciplinarias como la ecología de enfermedades y la ecología espacial.

## Conclusión

---

Los resultados obtenidos en la revisión bibliográfica, muestran que la información disponible sobre prevalencia de CoVs en murciélagos de América, proviene de zonas geográficas restringidas. A partir de la revisión de la literatura y los datos generados en el monitoreo realizado para el Capítulo 1 de esta investigación, podemos observar que México es uno de los países en donde se ha generado más información sobre la diversidad de CoVs asociados a murciélagos en América.

Las especies de murciélagos del nuevo mundo en las que se ha identificado este género viral son pocas en comparación con el total de especies descritas para el continente, representando aproximadamente menos del 15% de ellas, siendo en su gran mayoría especies con afinidad tropical.

Los modelos construidos para este estudio fueron desarrollados a partir de variables que se sabe están fuertemente relacionadas con la distribución de la biodiversidad (temperatura y precipitación). Por ser un modelo que abarca una amplia región geográfica, la agudeza de los resultados puede ser limitada, además de emplear los datos sobre los diferentes genotipos de manera general sin hacer diferencias entre los requerimientos ambientales de cada uno (en caso de existir diferencias), sin embargo, estos resultados nos proporcionan información sobre áreas geográficas a gran escala que reúnen características adecuadas ambientalmente para la presencia de hospederos y virus.

El mapa consenso generado a partir de los modelos de hospederos y de distribución potencial del virus, muestra que la distribución potencial del virus no se restringe a las regiones con mayor concentración de hospederos potenciales, que generalmente son áreas con bosques tropicales. Por el contrario, también observamos áreas de distribución potencial del virus en Norteamérica y áreas de Sudamérica con ecosistemas templados dominados por praderas y bosques templados, en donde la riqueza de hospederos potenciales es menor.

El modelo propuesto funciona como herramienta para determinar áreas prioritarias para la investigación sobre CoVs en murciélagos, con la finalidad de hacer más eficiente los recursos disponibles, y dirigir esfuerzos hacia regiones en donde existe poca o nula información disponible. Por ejemplo, áreas localizadas al sur de EUA, el noreste de México, la frontera entre Colombia y Venezuela, los bosques tropicales ubicados al este de Brasil y algunas regiones de Argentina, Bolivia, Paraguay y Perú.

Este es el primer modelo de distribución potencial de CoVs en murciélagos de América que se ha desarrollado, y como cualquier aproximación de modelación ecológica, requiere de consideraciones cuidadosas respecto a sus contribuciones y a las suposiciones del modelo.

En la última década el estudio de enfermedades infecciosas emergentes en especies silvestres ha sido un eje central de estudio, que ha tenido como objetivo en general identificar los patrones y procesos que dirigen el brote de enfermedades en diferentes organismos entre ellos el humano (Daszak et al., 2000; Jones et al., 2008; Morse et al., 2012). Entre los mamíferos más estudiados en este tema, se encuentran los quirópteros, que, gracias a su gran diversidad de especies, amplia distribución en el mundo, y características únicas como la habilidad de volar, han sido tomados como objeto de estudio (Wibbelt et al., 2010; Hayman et al., 2013; Moratelli & Calisher, 2015). Investigaciones centradas en identificar el papel de los murciélagos en la ecología de enfermedades de etiología viral, han revelado su papel como hospederos de una gran diversidad de familias virales, entre ellas la familia Coronaviridae (Li et al., 2005; Poon et al., 2005; Ge et al., 2015).

Las investigaciones actuales han resaltado la importancia de realizar estudios con un enfoque de ecología de enfermedades en regiones con altos índices de biodiversidad, con la finalidad de aumentar el conocimiento disponible en referencia la diversidad de hospederos y en consecuencia la diversidad genética de los parásitos asociados (Murray et al., 2015). Para este tipo de investigaciones las regiones biogeográficas han funcionado como variables para delimitar áreas prioritarias para el monitoreo de la diversidad biológica. El identificar los patrones de distribución que siguen diferentes grupos taxonómicos, incluidos los asociados a enfermedades (macro y micro parásitos), es de gran utilidad para entender que variables favorecen la presencia

de enfermedades en algunas regiones geográficas y en otras no (Myers et al., 2000).

Estudios realizados en murciélagos de Asia, África y América han demostrado que los murciélagos actúan como hospederos de este grupo de virus y que los genotipos causantes de los brotes de SARS-CoVs y MERS-CoVs están altamente relacionados con estos mamíferos (Drexler et al., 2014; de Wit et al., 2016; Anthony et al., 2017). Los resultados de investigaciones realizadas en diferentes partes del mundo, han propuesto que conocer la diversidad de CoVs en las poblaciones de murciélagos, así como su distribución geográfica pueden ayudar a identificar e incluso predecir zonas de riesgo para la emergencia de brotes en humanos (Huynh et al., 2012; Azhar et al., 2014; Corman et al., 2014).

El propósito del presente estudio fue evaluar la presencia y diversidad de CoVs en murciélagos distribuidos en la región del CVT, así como caracterizar su distribución filogenética y geográfica (Capítulo 1). Paralelamente se emplearon herramientas de modelación que permitieron desarrollar un modelo de distribución potencial de hospederos quirópteros y de CoVs en América (Capítulo 2).

Los resultados de este proyecto mostraron una prevalencia general de 6.9%, porcentaje congruente con los datos reportados en murciélagos de otras regiones (Osborne et al., 2011). En este estudio reportamos la presencia de doce genotipos de CoVs, nueve que corresponden a  $\alpha$ -CoVs y tres a  $\beta$ -CoVs. De entre los cuales seis  $\alpha$ -CoVs y dos  $\beta$ -CoVs corresponden a secuencias que no han sido reportados previamente. Estos resultados contribuyen al conocimiento sobre la diversidad de

CoVs en murciélagos de México en particular y del nuevo mundo en general.

A partir de herramientas moleculares y filogenéticas logramos describir el agrupamiento de los diferentes genotipos de CoVs identificados, en función de los hospederos en donde fueron diagnosticados. Este resultado fue congruente con el reporte previo de CoVs en murciélagos mexicanos, en donde los genotipos identificados se agruparon por familia de hospedero. En esta investigación se reportan genotipos previamente publicados en el país y de nuevo se observa un patrón de agrupamiento con la familia de hospedero, correspondiente a los resultados del estudio previo (Anthony et al., 2013, Ojeda, 2015).

Entre las secuencias identificadas en este trabajo, se presentan nueve secuencias con porcentajes de similitud menores al 90% con respecto a las secuencias publicadas en GenBank a nivel de aminoácidos, esto las clasifica como reportes nuevos. Estas secuencias también muestran un patrón de agrupamiento por género o por familia de hospedero, lo que sugiere un proceso de coevolución murciélago-CoVs, sin embargo, esta hipótesis debe ser corroborada con análisis de coevolución parásito-hospedero como los reportados en estudios previos (Ojeda, 2015).

El siguiente objetivo de esta investigación fue identificar los patrones geográficos de distribución de los genotipos de CoVs de la zona de transición Neártico Neotropical en México. Los resultados no mostraron un patrón de agrupamiento espacial. La red de haplotipos propuesta muestra patrones de distribución aleatorios, en donde el

mayor número de haplotipos se conecta por haplotipos hipotéticos, lo que no permite distinguir algún centro de irradiación entre haplotipos, y no revela algún patrón en la estructura genética de los CoVs identificados. Este resultado sugiere que existe mayor variedad de genotipos de CoVs que no fueron incluidos en este análisis. Al proyectar estos resultados en la geografía podemos observar que no existe un patrón en la distribución de los genotipos de CoVs reportados como se ha observado en otros estudios que incluyen otras familias virales (Holmes, 2004, 2008; Durães-Carvalho et al., 2015).

Los resultados asociados a la diversidad de CoVs en murciélagos de la región, mostraron que, la localidad de colecta con mayor diversidad de especies de quirópteros (2. Vegas) presentó una mayor diversidad de CoVs, en comparación con la localidad con menor diversidad de hospederos que tuvo prevalencia al virus (8. Agua). Estos resultados son congruentes con lo propuesto respecto a la correlación positiva entre diversidad de hospederos y diversidad de CoVs (Anthony et al., 2017).

El segundo capítulo de este trabajo se centró en construir un modelo de distribución potencial de hospederos y de CoVs asociados a estas especies en América. Los resultados mostraron que la mayor riqueza de hospederos potenciales de acuerdo con las características ambientales se concentra en las regiones tropicales a partir del centro de México hasta Sudamérica, concentrándose principalmente en el sur de México, Centroamérica, islas del Caribe, y los límites entre Brasil, Bolivia, Perú y Paraguay. Por otro lado, la riqueza de hospederos potenciales en el resto de las regiones de América es menor, sin embargo, la distribución potencial de hospederos quirópteros

prácticamente cubre toda la superficie del continente con excepción de los polos, dato congruente con los patrones de distribución de murciélagos en América, en donde se describen patrones de mayor riqueza en la región tropical que en la región boreal (Fenton et al., 1992; Ceballos & Brown, 1995; Ortega & Arita, 1998; Hutson & Mickleburgh, 2001).

El mapa de distribución potencial de CoVs, mostró que las zonas de distribución potencial de CoVs en América se localizan al Sur de Canadá en la frontera con EUA, y en parte de la región de la costa este de EUA y la frontera con México, así como algunas zonas del Oeste del país. Por otro lado, en México se observó una amplia distribución a lo largo del país tanto en la región del Neártico como del Neotrópico. Centroamérica y las islas del Caribe muestran una amplia área de distribución potencial del virus, mientras que en Sudamérica se observan puntos de distribución más restringidos que abarcan localidades en la frontera entre Colombia y Venezuela, parte de la costa del Atlántico a la altura de Brasil y hacia el Oeste en algunas regiones de Perú, Paraguay y Bolivia. Finalmente, hacia el Sur del continente observamos zonas de distribución potencial al sur de Brasil y al norte de Argentina, áreas con distribución potencial de hospederos, pero con riqueza baja.

El uso de modelos de distribución potencial de organismos que actúan como hospederos, vectores o parásitos, involucrados en la emergencia de enfermedades, es una herramienta que en la actualidad resulta útil para dirigir esfuerzos y recursos con la finalidad de entender las dinámicas de las enfermedades y desarrollar medidas

de acción previas a la emergencia. Por lo tanto, este modelo es una herramienta para identificar áreas con características ambientales adecuadas para la presencia del virus, en donde no se han realizado estudios. Este modelo ayuda a identificar zonas en donde se sugiere realizar investigaciones que nos permitan ampliar nuestro conocimiento sobre la prevalencia y la ecología de CoVs en comunidades de murciélagos con diferentes características. Es importante considerar que este modelo fue desarrollado a escala de continente por lo cual no está detallado a escala de cada país.

## CONCLUSIÓN GENERAL

---

A pesar de que el estudio de CoVs en murciélagos del mundo ha aumentado considerablemente en los últimos años, la información disponible para algunas regiones de América es escasa o nula en comparación con otras regiones del mundo. En México se han realizado investigaciones previas a este estudio principalmente en murciélagos con afinidad tropical, distribuidos en la costa del Pacífico, la costa del sureste y la Ciudad de México. Este trabajo se concentró en el centro del país dentro de la zona determinada como la región de transición entre el neártico y el neotrópico incluyendo localidades para las que no existía información sobre la prevalencia de CoVs en las comunidades de murciélagos, contribuyendo de forma importante al conocimiento de la distribución de CoVs en México.

Esta investigación permitió confirmar mediante estudios moleculares y aproximaciones filogenéticas la presencia de diferentes genotipos de CoVs en murciélagos de la región Neártico Neotropical en México. Aportando información sobre la riqueza de este grupo de virus y sobre los patrones de distribución en diferentes comunidades de hospederos y de distribución geográfica.

Las técnicas de modelación de nicho ecológico han sido empleadas para predecir las áreas de distribución potencial de especies sobre las que se tiene poca información y en años recientes han sido empleadas para predecir áreas en donde se podría presentar el brote de enfermedades infecciosas emergentes, específicamente para identificar áreas con las condiciones ambientales necesarias para la presencia de parásitos, hospederos y vectores, representando una herramienta valiosa para los estudios de ecología de enfermedades.

En este estudio, el modelo de nicho propuesto funciona como herramienta para determinar áreas prioritarias para el monitoreo de CoVs en murciélagos de América, y puede funcionar como guía para dirigir esfuerzos hacia regiones en donde existe poca o nula información, haciendo más eficiente el uso de los recursos disponibles.

Los resultados de este trabajo confirman lo propuesto en estudios anteriores que sugieren que la diversidad de CoVs depende de la diversidad de sus hospederos quirópteros. Esta tendencia se observó en una región geográfica relativamente restringida en donde convergen dos regiones biogeográficas en donde las comunidades de hospederos quirópteros tienen las características de las comunidades de ambas ecozonas.

Continuar generando información que nos permita conocer mayor y mejor información sobre la diversidad de los CoVs, como características moleculares, mecanismos de transmisión, rangos de distribución, entre otros aspectos de su ecología, resulta fundamental para el establecimiento de programas de prevención y control de enfermedades emergentes a escala local y global.

## REFERENCIAS

---

- Adams, R.A., Hayes M.A. Water availability and successful lactation by bats as related to climate change in arid regions of western North America. *Journal of Animal Ecology*. 2008; 77: 1115-1121.
- Anderson, R.P. Harnessing the world's biodiversity data: promise and peril in ecological niche modeling of species distributions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012; 1260: 66-80.
- Annan, A., Baldwin, H. J., Cornman, V. M., Klose, S. M., Owusu, M., Nkrumah, E. E., et al. Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related Viruses in Bats, Ghana and Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 2013; 19(3): 456-459.
- Anthony, S. J., Epstein, J. H., Murray, K. A., Navarrete-Macias, I., Zambrana-Torrel, C. M., Solovyov, A., et al. A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. *mBio*. 2015; 4(5): e00598-13.
- Anthony, S. J., Islam, A., Johnson, C., Navarrete-Macias, I., Liang, E., Jain, K., et al. Non-random patterns in viral diversity. *Nature Communications*. 2015; 6: 8147.
- Anthony, S. J., Johnson, C.K., Greig, D. J., Kramer, S., Che, X., Wells, H., et al. Global patterns in coronavirus diversity. *Virus Evolution*. 2017; 3(1): vex012.
- Anthony, S. J., Ojeda-Flores, R., Rico-Chávez, O., Navarrete-Macias, I., Zambrana-Torrel, C. M., Rostal, M. K., et al. Coronaviruses in bats from Mexico. *Journal of General Virology*. 2013; 94: 1028-1038.
- Araújo, M. B., Guisan, A. Five (or so) challenges for species distribution modelling. *Journal of Biogeography*. 2006; 33(10): 1677-1688.
- Arita, H.T., Figueroa F., Frisch, A., Rodríguez, P., Santos del Prado, K. Geographical range size and the conservation of Mexican mammals. *Conservation Biology*. 1997; 11: 92-100.
- Asano, K.M., Hora, A. S., Scheffer, K.C., Fahl, W.O., Yamamoto, K., Mori, E., et al. Alphacoronavirus in urban Molossidae and Phyllostomidae bats, Brazil. *Virology Journal*. 2016; 13: 110.
- Austin, M.P., Smith, T.M., Van Niel, K.P., Wellington, A.B. Physiological responses and statistical models of the environmental niche: a comparative study of two co-occurring *Eucalyptus* species. *Journal of Ecology*. 2009; 97:496-507.
- Azhar, E.I., El-Kafrawy, S.A., Farraj, S.A., Hassan, A.M., Al-Saeed, M.S., Hashem, A.M., et al. Evidence for camel to human transmission of MERS coronavirus. *New England Journal of Medicine*. 2014; 370:2499-2505.
- Baptista-Rosas, R. C., Hinojosa, A., Riquelme, M. Ecological niche modelling of *Coccidioides* spp. in Western North American deserts. En: Clemons, K. V., Laniado, L. R., Stevens, D. A., editors. *Coccidioidomycosis Sixth Int. Symp*. 2007; 1111: 35-46.
- Barrett, L. G., Thrall, P. H., Burdon, J. J., Linde, C. C. Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host-parasite interactions. *Trends in Ecology & Evolution*. 2008; 23: 678-685.

- Beck, J., Böller, M., Erhardt, A., Schwanghart, W. Spatial bias in the GBIF database and its effect on modeling species geographic distributions. *Ecological Informatics*. 2013; 19: 10-15.
- Beerenwinkel, N., Günthard, H.F., Roth, V., Metzner, K.J. Challenges and opportunities in estimating viral genetic diversity from next-generation sequencing data. *Frontiers in Microbiology*. 2012; 3: 329.
- Bertolotti, L., Kitron, U. Goldberg, T. L. Diversity and evolution of West Nile virus in Illinois and the United States, 2002-2005. *Virology*. 2007; 1(30): 143-149.
- Boots, M., Best, A., Miller, M.R., White, A. The role of ecological feedbacks in the evolution of host defence: what does theory tell us?. *Philosophical transactions of the Royal Society B*. 2009; 364: 27-36.
- Brandão, P.E. Scheffer K., Villarreal, L.Y., Achkar, S., Oliveira, R. de N., Fahl, de O., et al. A Coronavirus detected in the vampire bat *Desmodus rotundus*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2008; 12(6):466-468.
- Breitbart, M., Felts, B., Kelley, S., Mahaffy, J.M., Nulton, J., Salamon, P., et al. Diversity and population structure of a near-shore marine-sediment viral community. *Philosophical transactions of the Royal Society B*. 2004; 271: 565-574.
- Buzón, M.J., Codoér, F.M., Frost, S.D.W., Pou, C., Puertas, M.C., Massanella, M., et al. Deep molecular characterization of HIV-1 dynamics under suppressive HAART. *PLOS Pathogens*. 2011; 7(10): e1002314.
- Calderon A., Guzman C., Salazar-Bravo, J., Luiz, T. F., Salim, M., German, A. Viral zoonoses that fly with bats: A review. 2016; 6:1-13.
- Calisher, C.H., Childs, J.E., Field, H.E., Holmes, K.V., Schounts, T. Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006; 19: 531-545.
- Carrington, C.V.F., Foster, J.E., Zhu, H.C., Zhang, J.X., Smith, G.J.D., Thompson, N., et al. Detection and phylogenetic analysis of group 1 coronaviruses in South American bats. *Emerging Infectious Diseases*. 2008; 14(12):1890-1893.
- Carroll, S.P., Hendry, A.P., Rexnick, D.N., Fox, C.W. Evolution on ecological time-scales. *Functional Ecology*. 2007; 21(3): 387-393.
- Ceballos, G., Brown, J.H., Global patterns of mammalian diversity, endemism and endangerment. *Conservation Biology*. 1995; 9: 559-568.
- Ceballos, G., Oliva G. Los mamíferos silvestres de México. CONABIO-UNAM-Fondo de Cultura Económica, México D.F. 2005.
- Chao, A., Chiu C-H., Hsieh, T.C., Davis, T., Nipperess, D. A., Faith, D.P. Rarefaction and extrapolation of phylogenetic diversity. *Methods in Ecology and Evolution*. 2015; 6: 380-388.
- Chivers, D.E. Neotropical rainforest mammals, a field guide. University of Chicago Press, Chicago, USA. 1998.
- Chua, K.B., Koh, C.L., Hooi, P.S., Wee, K.F., Khong, J.H., Chua, B.H., et al. Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes. *Microbes and Infection*. 2002; 4: 145-151.
- Cleaveland, S., Laurenson, M.K., Taylor, L.H. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philosophical transactions of the Royal Society B*. 2001; 356: 991-999.

- Clement M., Posada, D., Crandall, K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. 2000; 9:1657-1659.
- Cornman, V.M., Ithete, N.L., Richards, L.R., Schoeman, M.C., Preiser, W., Drosten, C., et al. Rooting the phylogenetic tree of middle East respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat. *Journal of Virology*. 2014;88:11297-303.
- Cui, J., Han, N., Streicker, D., Li, G., Tang, X., Shi, Z., et al. Evolutionary relationships between bat coronaviruses and their hosts. *Emerging Infectious Diseases*. 2007; 13: 1526-1532.
- Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D. Emerging infectious diseases of wildlife -- threats to biodiversity and human health. *Science*. 2000; 287(5452): 443-449.
- Dávila, P., Arizmendi, M.C., Valiente-Banuet, A., Villaseñor, J.L., Casas, A., Lira, R. Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Biodiversity Conservation*. 2002; 11: 421-442.
- Day, T., Proulx, S.R. A general theory for the evolutionary dynamics of virulence. *The American Naturalist*. 2004; 163(4): E40-E63.
- Denef, V.J., Mueller, R.S., Banfield, J.F., AMD biofilms: using model communities to study microbial evolution and ecological complexity in nature. *The ISME Journal*. 2010;4:599-610.
- Denzinger, A., Schitzler H-U. Bat guilds, a concept to classify the highly diverse foraging and echolocation behaviors of microchiropteran bats. *Front Physiol*. 2013;4.
- Dixon, M.A., Dar, O.A., Heymann, D.L., Emerging infectious diseases: opportunities at the human-animal-environment interface. *Veterinary Record*. 2014; 174: 546-551.
- Domínguez, S.R., O'Shea, T.J., Oko, L.M., Holmes, K.V. Detection of group 1 coronaviruses in bats in North America. *Emerging Infectious Diseases*. 2007; 13(9): 1295-1300.
- Donaldson, E.F., Haskew, A.N., Gates, J.E., Huynh, J., Moore, C.J., Frieman, M.B. Metagenomic analysis of the viromes of three North American bat species: viral diversity among different bat species that share a common habitat. *Journal of Virology*. 2010; 84(24):13004-13018.
- Drexler, J.F., Cornman, V.M., Drosten, C. Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. *Antiviral Research*. 2014; 101:45-56.
- Drosten, C., Günther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.R., Becker, S., et al. Identification of a novel Coronavirus in patients with severe acute respiratory Syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 2003;348:1967-1976.
- Duffy, M.A., Sivars-Becker, L. Rapid evolution and ecological host-parasite dynamics. *Ecology Letters*. 2007; 10: 44-53.
- Durães-Carvalho, R., Caserta, L.C., Barnabé, A.C., Martini, M.C., Simas, P.V., Santos, M.M., Salemi, M., Arns, C.W. *Virus Research*. 2015; 201:101-112.
- Ebert, D., Herre, E.A. The evolution of parasitic diseases. *Parasitology Today*. 1996; 12:96-101.

- Elith, J., Burgman, M.A., Regan, H.M. Mapping epistemic uncertainties and vague concepts in predictions of species distribution. *Ecology Model.* 2002; 157:313-329.
- Elith, J., Graham, H. C., Anderson, P.R., Dudik, M., Ferriers, S., Guisan, A., et al. Novel methods improve prediction of species distributions from occurrence data. *Ecography.* 2006; 29:129-151.
- Engering, A., Hogerwerf, L., Slingenbergh, J. Pathogen host environment interplay and disease emergence. *Emerging Microbes and Infections.* 2013; 2: e5.
- Epstein, J.H., Field, H.E. Anthropogenic epidemics. In: Wang L-F, Cowled C, editors. *Bats viruses*, 2015. p249-279.
- Eriksson, N., Pachter, L., Mitsuya, Y., Rhee, S-Y., Wang, C., Garizadeh, B., et al. Viral populations estimation using pyrosequencing. *PLOS Computational Biology.* 2008; 4(5): e1000074.
- Escalante, T., Rodríguez, G., Morrone, J.J. The diversification of Nearctic mammals in the Mexican transition zone. *Biological Journal of the Linnean Society.* 2004; 83:327-339.
- Feldhamer, G.A., Thompson, B.C., Chapman, J.A. *Wild Mammals of North America: Biology, Management, and Conservation.*
- Felicísimo, A.M., Frances, E., Fernández, J.M., González-Diez, A., Varas, J. Modeling the potential distribution of forest with a GIS. *Photogrammetric Engineering & Remote Sensing.* 2002; 68: 455-461.
- Fenichel, E.P., Horan, R.D., Hickling, G.J. Management of infectious wildlife diseases: bridging conventional and bioeconomic approaches. *Ecological applications.* 2010; 20(4): 903-914.
- Fenton, M.B., Acharya, L., Audet, D., Hickey, M.B.C., Merriam, O., Ovrst, M.K., et al. Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the Neotropics. *Biotropica.* 1992; 24:440-446.
- Fernando, S., Malavige, G., Karunaratne, P., Palihawadana, P., Vitarana, T. Emerging Infectious Diseases. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka.* 2008;36:127-133.
- Ferrusquía-Villafranca. Ensayo sobre la caracterización y significación biológica. En: *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana*, I. Luna, J.J. Morrone y D. Espinosa (eds.). Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. P. 7-24.
- Fischer, K., Zeus, V., Kwasnitschka, L., Kerth, G., Haase, M., Groschup, M.H., et al. Insectivorous bats carry host specific astroviruses and coronaviruses across different regions in Germany. *Infection, Genetics and Evolution.* 2016; 37: 108-116.
- Freeman, P. A multivariate study of the family Molossidae (Mammalia, Chiroptera): Morphology, ecology, evolution. *Mammal Pap Univ Neb State*, 1981.
- Gallagher, T.M., Buchmeier, M.J. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology.* 2001; 279:371-374.
- Gómez, N., Escalante, T., Rodríguez, G., Linaje, M., Morrone, J.J. Caracterización biogeográfica de la Faja Volcánica Transmexicana y análisis de los patrones de distribución de su mastofauna. *Revista Mexicana de Biodiversidad.* 2012; 83: 258-272

- Garamszegi, L.Z., Moller, A.P. Prevalence of avian influenza and host ecology. *Proceedings of the Royal Society B*. 2007; 274: 2003-2012.
- Ge, X-Y., Hu, B., Shi, Z-L. Bat Coronaviruses. In: Wang L-F., Cowled, C., editors. *Bats Viruses* John Wiley & Sons, Inc; 2015, p. 127-155.
- George, D.B., Webb, C.T., Farnsworth, M.L., O'Shea, T.J., Bowen, R.A., Smith, D.L., et al. Host and viral ecology determine bat rabies seasonality and maintenance. *Proceedings of the National Academy of Science*. 2011; 108:10208-10213.
- Gloza-Rausch, F., Ipsen, A., Seebens, A., Götsche, M., Panning, M., Drexler, J.F., et al. Detection and prevalence patterns of group I Coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerging Infectious Diseases*. 2008; 14(4): 626-631.
- Góes, L.G.B., Campos, A. A., Carvalho, C., Ambar G., Queiroz, L.H., Cruz-Neto, A.P., et al. Genetic diversity of bats coronaviruses in the Atlantic Forest hotspot biome, Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*. 2016; 44:510-513.
- Góes, L.G.B., Ruvalcaba S.G., Campos, A.A., Queiroz, L.H., Carvalho, C., Jerez, J.A., et al. Novel bat coronaviruses, Brazil and Mexico. *Emerging Infectious Diseases*. 2013; 19(10):1711-1713.
- Goetz, S.J., Prince, S.D., Small, J. *Advances in satellite remote sensing of environmental variables for epidemiological applications*. Adv. Parasitol. Academic Press; 2000.
- González-Medrano. *Las comunidades vegetales de México. Propuesta para la unificación de la clasificación y nomenclatura de la vegetación de México*. México, D.F.: ine, semarnat.; 2003.
- Graham, R.L., Donaldson, E.F., Baric, R.S. A decade after SARS: Strategies to control emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*. 2013; 11: 836-848.
- Guan, Y., Zheng, B.J., He, Y.Q., Liu, X.L., Zhuang, Z.X., Cheung, C.L., et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. 2003; 302: 276-278.
- Halpin, K., Young, P.L., Field, H.E., Mackenzie, J.S. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: A natural reservoir of Hendra virus. *Journal of General Virology*. 2000; 81: 1927-1932.
- Hayes, M.A., Adams, R.A. Simulated bat populations erode when exposed to climate change projections for western North America. *Plos One*. 2017; 12.
- Hayman, D.T.S., Bowen, R.A., Cryan, P.M., McCracken, G.F., O'Shea, T.J., Peel, A.J., et al. Ecology of Zoonotic Infectious Diseases in Bats: Current knowledge and future directions. *Zoonoses Public Health*. 2013; 60: 2-21.
- Hernández-Dávila, A., Vargas, J.A., Martínez-Méndez, N., Lim, B.K., Engstrom, M.D., Ortega, J. DNA barcoding and genetic diversity of Phyllostomid bats from the Yucatan Peninsula with comparisons to Central America. *Mol Ecol Resour*. 2012; 12:590-597.
- Holmes, E.C. Evolutionary history and phylogeography of human viruses. *Annu Rv Microbiol*. 2008;62:307-328.
- Holmes, E.C. The phylogeography of human viruses. *Molecular Ecology*. 2004; 13:745-756.

- Hortal, J., Rodríguez, J., Nieto-Díaz, M., Lobo, J.M. Regional and environmental effects on the species richness of mammal assemblages. *J Biogeogr.* 2008;35:1202-1214.
- Hsieh, T.C., Ma, K.H., Chao, A. iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methodos in Ecology and Evolution.* 2016; 7:1451-1456.
- Hunt, D.E., David, L.A., Gevers, D., Preheim, S.P., Alm, E.J., Polz, M.F. Resource partitioning and sympatric differentiation among closely related bacterioplankton. *Science.* 2008; 320:1081-1085.
- Hutcheson K. A test for comparing diversities based on the Shannon formula. *Journal of Theoretical Biology.* 1970; 29:151-154.
- Hutson, A.M., Mickleburgh, S.P. Microchiropteran Bats: Global status survey and conservation action plan. IUCN; 2001.
- Huynh, J., Li, S., Yount, B., Smith, A., Sturges, L., Olsen, J.C., et al. Evidence supporting a zoonotic origin of human Coronavirus strain NK63. *Journal of Virology.* 2012; 86: 12816-12825.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Nd. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (accessed May 26, 2017)
- Iwasa, Y., Michor, F., Nowak, M.A. Evolutionary dynamics of invasion and escape. *Journal of Theoretical Biology.* 2004; 226:205-214.
- Johnson, C.K., Hitchens, P.L., Evans, T.S., Goldstein, T., Thomas, K., Clements, A., et al. Spillover and pandemic properties of zoonotic viruses with high host plasticity. *Scientific Reports Nature.* 2015; 5:14830.
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature Letters.* 2008; 451:990-994.
- Judson, S.D., Fischer, R., Judson A., Munster, V.J. Ecological contexts of index cases and spillover events of different ebolaviruses. *PLOS Pathogens.* 2016;12.
- Katoh, K., Standley, D.M. MAFFT Multiple sequence alignment software Version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution.* 2013; 30:772-780.
- Kilpatrick, A.M. Daszak, P., Goodman, S.J., Rogg, H., Kramer, L.D., Cedeño, V., et al. Predicting pathogen introduction: West Nile virus spread to Galápagos. *Conservation Biology.* 2006; 20:1224-1231.
- Kindt, R., Coe, R. Tree diversity analysis: A manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies. World Agroforestry Centre. 2005.
- Lau, S.K.P., Li, K.S.M., Huang, Y., Shek, C.T., Tse, H., Wang, M., et al. Ecoepidemiology and complete genome comparison of different strains of severe acute respiratory syndrome related *Rhinolophus* bat Coronavirus in China reveal bats as a reservoir for acute, self-limiting infection that allows recombination events. *Journal of Virology.* 2010; 84(6): 2808-2819.
- Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Li, K.S.M., Huang, Tsoi, H-W, Wong, B.H.L., et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;102(39):14040-14045.

- Leigh, J.W., Bryant, D. Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*. 2015; 6:1110-1116.
- Leroy, E.M., Kumulungui, B., Purrut, X., Rouquet, P., Hassanin, A., Yaba, P., et al. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*. 2005; 438:575-576.
- Lesser, M.P., Stat, M., Gates, R.D. The endosymbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium* sp.) of corals are parasites and mutualists. *Coral Reefs*. 2013; 32:603-611.
- Leung, T.L.F., Poulin R. Parasitism, Commensalism, and Mutualism: Exploring the many shades of symbioses. *Vie et Milieu Life and Environment*. 2008; 58:107-115.
- Li, L., Victoria, J.G., Wang, C., Jones, M., Fellers, G.M., Kunz, T.H., et al. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *Journal of virology*. 2010; 84(14):6955-6965.
- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J.H., et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*. 2005; 310:676-679.
- Li, W, Zhang, C., Sui, J., Kuhn, J.H., Moore, M.J., Luo, S., et al. Receptor and viral determinants of SARS-Coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO Journal*. 2005; 24:1634-1643.
- Lima, F.E., Campos, F.S., Kunert Filho, H.C., Batista, H.B., Carnielli, P. Jr., Cibulski, S.P., Spilki, F.R., Roehe, P.M., Franco, A.C. 2013; 47(1):164-167.
- Lively, C.M., Migration, virulence, and the geographic mosaic of adaptation by parasites. *The American Naturalist*. 1999; 153:S34-47.
- Loiselle, B.A., Jorgensen, P.M., Consiglio, T., Jiménez, I., Blake, J.G., Lohmann, L.G., et al. Predicting species distributions from Herbarium collections: Does climate bias in collection sampling influence model outcomes?. *Journal of Biogeography*. 2008; 35:105-116.
- López-González, C., Presley, S.J., Lozano, A., Stevens, R.D., Higgins, C.L. Metacommunity analysis of Mexican bats: environmentally mediated structure in an area of high geographic and environmental complexity. *J biogeogr*. 2012;39:177-192.
- Luis, A.D., Hayman, D.T.S., O'Shea, T.J., Cryan, P.M., Gilbert, A.T., Pulliam, J.R.C., et al. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special?. *Proceedings of the Royal Society B*. 2013; 280:20122753.
- Mancina, C., Echenique-Diaz, L., Tejedor, A., García, L., Daniel-Álvarez, A., Ortega-Huerta, M. Endemic under threat: an assessment of the conservation status of Cuban bats. *Hystrix Ital J Mammal*. 2007;18.
- Marshall, C.J., Liebherr, J.K. Cladistic biogeography of the Mexican transition zone. *Journal of Biogeography*. 2000; 27:203-216.
- Mayer, F., von Helversen, O. Cryptic diversity in European bats. *Proceedings of the Royal Society B*. 2001; 268:1825-1832.
- McCallum, H. Disease and the dynamics of extinction. *Proceedings of the Royal Society B*. 2012; 367: 2828-2839.
- Medellín, R.A. Identificación de los murciélagos de México: Clave de campo. México. Asociación Mexicana de Mastozoología; 1997.
- Milne Prince, S., Miazgowicz, K.L., Munster, V.J. The emergence of the Middle East Respiratory Syndrome coronavirus. *Pathogens and disease*. 2014; 71: 121-136.

- Misra, V., Dumonceaux, T., Dubois, J., Willis, C., Nadin-Davis, S., Severini, A., et al. Detection of polyoma and coronaviruses in bats of Canada. *Journal of General Virology*. 2009; 90:2015-2022.
- Mohd, H.A., Al-Tawfiq, A.J., Memish, Z.A. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) origin and animal reservoir. *Virology Journal*. 2016; 13.
- Moratelli, R., Calisher, C.H. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015; 110:1-22.
- Moreira-Soto, A., Taylor-Castillo, L., Vargas-Vargas, N., Rodríguez-Herrera, B., Jiménez, C., Corrales-Aguilar, E. Neotropical bats from Costa Rica harbour diverse Coronaviruses. *Zoonoses Public Health*. 2015; 62:501-505.
- Morens, D.M., Folkers, G.K., Fauci, A.S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*. 2004; 430:242-249.
- Morrone, J.J. *Neotropical Biogeography: Regionalization and Evolution*. CRC Press; 217.
- Morse, S.S. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*. 1995; 1:7-15.
- Moya, A., Holmes, E.C., González-Candelas, F. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology*. 2004; 2:279-288.
- Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A., Martelli, G.P., et al. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Springer Science & Business Media; 2012.
- Murray, K.A., Preston, N., Allen, T., Zambrana-Torrel, C., Hosseini, P.R., Daszak, P. Global biogeography of human infectious diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015; 112: 12746-12751.
- Myers, N., Mittermeier, R., A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 2000; 403:853-858.
- Nei, M. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press; 1987.
- Noguera-Urbano, E.A., Escalante, T. Geographic data for Neotropical bats (Chiroptera). *Rev Biol Trip*. 2014;62:2001-215.
- Nyakarahuka, L., Ayabare, S., Mosomtai, G., Kankya, C., Lutwama, J., Mwiine, F.N., et al. Ecological Niche modeling for filoviruses: A risk map for Ebola and Marburg Virus Disease outbreaks in Uganda. *PLoS Curr*. 2017;9.
- Ojeda, R. Coronavirus en murciélagos neotropicales en México; Prevalencia, filogenia y coevolución. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM*. 2015.
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Stevens, M.H.H., Oksanen, M.J., et al. The vegan package. *Community Ecology Package*. 2007; 10:631-637.
- Ornelas, J.F., Sosa, V., Soltis, D.E., Daza, J.M., González, C., Soltis, P.S., et al. Comparative Phylogeographic analyses illustrate the complex evolutionary history of threatened cloud forests of Northern Mesoamerica. *Plos ONE*. 2013; 8.

- Ortega, J., Arita, H.T. Neotropical-Nearctic limits in Middle America as determined by distributions of bats. *Journal of mammalogy*. 1998; 79:772-783.
- Osborne, C., Cryan, P.M., O'Shea, J.T., Oko, M.L., Ndaluka, C., Calisher, H.C., Berglund, A.D., et al. Alphacoronaviruses in new world bats: Prevalence, persistence, phylogeny, and potential for interaction with humans. *PLOS One*. 2011; 6(5):e19156.
- Papkou, A., Gokhale, C.S., Traulsen, A., Schulenberg, H. Host-parasite coevolution: Why changing population size matters. *Zoology*. 2016; 119:330-338.
- Parkes, M.W., Bienen, L., Breilh, J., Hsu, L-N., McDonald, M., Patz, J.A. et al. All hands on deck: Transdisciplinary approaches to emerging infectious disease. *EcoHealth*. 2005; 2:258-272.
- Parish, C.R., Holmes, E.C., Morens, D.M., Park, E-C, Burke, D.S., Calisher, C.H., et al. Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2008; 72:457-470.
- Pedersen, A.B., Davies, T.j. Cross-species pathogen transmission and disease emergence in primates. *EcoHealth*. 2009; 6:496-508.
- Peiris, J.S.M., Guan, Y. Confronting SARS: A view from Hong Kong. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2004; 359:1074-1079.
- Peiris, J.S.M., Lai, S.T., Poon, L.L.M., Guan, Y., Yam, L.Y.C., Lim, W., et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet Lond England*. 2003; 361; 1319-1325.
- Pennisi, E. What Determines species diversity? *Science*. 2005; 309:90.
- Pensaert M.B., de Bouck, P. A new Coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Archives of Virology*. 1978; 58:243-247.
- Peterson, A.T. Ecological niche modelling and understanding the geography of disease transmission. *Veterinaria Italiana*. 2007; 43:393-400.
- Peterson, A.T., Bauer, J.T., Mills, J.N. Ecologic and geographic distribution of filovirus disease. *Emerging Infectious Diseases*. 2004; 10:40-47.
- Peterson, A.T., Soberón, J., Pearson, R.G., Anderson, R.P., Martínez-Meyer, E., Nakamura, M., et al. *Ecological niches and Geographic distributions (MPB-49)*. Princeton University Press; 2011.
- Pfefferle, S., Oppong, S., Drexler, J.F., Gloza-Rausch, F., Ipsen, A., Seebens, A., et al. Distant relatives of severe acute respiratory syndrome coronavirus and close relatives of human coronavirus 229E in bats, Ghana. *Emerging Infectious Diseases*. 2009.
- Phillips, S.J., Anderson, R.P., Schapire, R.E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*. 2006; 190:231-259.
- Phillips, S.J., Dudík, M. Modeling of species distributions with Maxent; new extensions and a comprehensive evolution. *Ecography*. 2008; 31:161-175.
- Pigott, D.M., Golding, N., Mylne A., Huang, Z., Henry, A.J., Weiss, D.J., et al. Mapping the zoonotic niche of Ebola virus disease in Africa. *Elife*. 2014; 3:e04395.

- Polowright, R.K., Eby, P., Hudson, P.J., Smith, I.L., Westcott, D., Bryden, W.L., et al. Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proceedings of the Royal Society B*. 2015; 282:20142124.
- Poon, L.L.M., Chu, D.K.W., Chan, K.H., Wong, O.K., Ellis, T.M., Leung, Y.H.C., et al. Identification of a novel coronavirus in bats. *Journal of Virology*. 2005; 79(4):2001-2009.
- Posada, D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 2008; 25:1253-1256.
- Poulin, R. *Evolutionary ecology of parasites*. 2nd ed. Princeton: Princeton University Press; 2007.
- Power, A.G., Mitchell, C.E. Pathogen spillover in disease epidemics. *American Naturalist*. 2004; 164:s79-89.
- Quan, P.-L., Firth C., Street, C., Henriquez, J.A., Petrosov, A., Tashmukhamedova, A., et al. Identification of a severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in a leaf-nosed bat in Nigeria. *mBIO*. 2010;1(4): e00208-10.
- Rabaan, A.A., Al-Ahmed, S.H., Bazzi, A.M., Al-Tawfiq, J.A. Dynamics of scientific publications on the MERS-CoV outbreaks in Saudi Arabia. *Journal of Infection and Public Health*. 2017; 10(6): 702-710.
- Raj, V.S., Osterhaus, A.D.M, Fouchier, R.A.M., Haagmans, B.L. MERS: emergence of a novel human coronavirus. *Current Opinion in Virology*. 2014; 5: 58-62.
- Rambaut, A. FigTree: Tree figure drawing tool, Version 1.4.2.2017.
- Razgour, O., Rebelo H., Febbraro, M.D., Russo, D. Painting maps with bats: species distribution modelling in bat research and conservation. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*. 2016;27(1).
- Reperant, L.A. Applying the theory of island biogeography to emerging pathogens: toward predicting the sources of future emerging zoonotic and vector-borne diseases. *Vector Borne Zoonotic Diseases*. 2010; 10:105-110.
- Ruggiero, A., Ezcurra C. Regiones y transiciones biogeográficas: Complementariedad de los análisis en biogeografía histórica y ecológica. Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía. 2003; 141-154.
- Russo D., Voigt, C.C. The use of automated identification of bat echolocation calls in acoustic monitoring: A cautionary note for a sound analysis. *Ecological Indicators*. 2016;66:598-602.
- Sachs, J.L., Simms, E.L. Pathways to mutualism breakdown. *Trends in Ecology and Evolution*. 2006; 21:585-592.
- Sampaio, E.m., Kalko., E.K.V., Bernard, E., Rodríguez-Herrera, B., Handley, C.O. A biodiversity assessment of bats (Chiroptera) in a tropical lowland rainforest of Central Amazonia, Including methodological and Conservation considerations. *Stud Neotropical Fauna Environ*. 2003;38:17-31.
- Scheiner, S.M. The intersection of the sciences of biogeography and infectious disease ecology. *EcoHealth*. 2009; 6:483-488.
- Schountz, T. Immunology of bats and their viruses; Challenges and opportunities. *Viruses*. 2014; 6:4880-4901.

- Seltmann, A., Corman, V.M., Rasche, A., Drosten, C., Cziráj, G.A., Bernard, H., et al. Seasonal fluctuations of Astrovirus, but not Coronavirus shedding in bats inhabiting human-modified tropical forests. *EcoHealth*. 2017; 14:272-284.
- Sikes, R.S., Gannon, W.L. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogist*. 2011; 92:235-253.
- Silvestro, D., Michalak, I. RaxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity and Evolution*. 2012; 12:335-337.
- Simas, P.V.M., Bernabé A.C. De S, Duraes-Carvalho R., Neto, D.F.L., Caserta, L.C., Artacho, L., et al. Bat Coronavirus in Brazil related to Appalachian Ridge and Porcine Epidemic Diarrhea Viruses. *Emerging Infectious Diseases*. 2015; 21:729-731.
- Simmonds, P. Reconstructing the origins of human hepatitis viruses. *Philosophical transactions of the Royal Society B*. 2001;356:1013-1026.
- Smith, I., Wang L-F. Bats and their virome: an important source of emerging viruses capable of infecting humans. *Current Opinion in Virology*. 2013; 3:84-91.
- Song, H-D., Tu, C-C., Zhang, G-W., Wang, S-Y, Zheng, K., Lei, I-C., et al. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102:2430-2435.
- Stamatakis, A., Ludwig, T., Meier, H. RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 2005; 21:456-463.
- Streicker, D.G., Turmelle, A.S., Vonhof, M.J., Kuzmin, I.V., McCracken G.F., Rupprecht, C.E. Host phylogeny constrains cross-species emergence and establishment of rabies virus in bats. *Science*. 2010;329:676-679.
- Su, s., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A.C.K., Zhou, J., et al. Epidemiology, Genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol* 2016;24:490-502.
- Takano, R., Nidom, C.A., Kiso, M., Muramoto, Y., Yamada, S., Sakai-Tagawa, Y., et al. Phylogenetic characterization of H5N1 avian influenza viruses isolated in Indonesia from 2003-2007. *Virology*. 2009;390:13-21.
- Tang, X.C., Zhang, J.X., Zhang, S.Y., Wang, P., Fan, X.H., Li, L.F., et al. Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China. *Journal of Virology*. 2006; 80(15):7481-7490.
- Teeling, E.C., Springer, M.S., Madsen, O., Bates, P., O'Brien, S.J., Murphy, W.J. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science*. 2005; 307:580-584.
- Templeton, A.R., Crandall, K.A., Sing, C.F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*. 1992; 132:619-633.
- Thrall, P.H., Hochberg, M.E., Burdon, J.J., Bever, J.D. Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context. *Trends in Ecology and Evolution*. 2007;22:120-126.

- Towner, J.S., Amman, B.R., Sealy, T.K., Reeder-Carroll, S.A., Comer, J.A., Kemp, A., et al. Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats. *PLoS Pathogens*. 2009; 5(7): e1000536.
- Vijaykrishna, D., Smith, G.J.D., Zhang, J.X., Peiris, J.S.M., Chen, H., Guan, Y. Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses. *Journal of Virology*. 2007;81:4012-4020.
- Vijgen, L., Keyaerts, E., Moës, E., Thoelen, I., Wollants, E., Lemey, P., et al. Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: Molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. *Journal of Virology*. 2005; 79:1595-1604.
- Voigt, C.C., Phelps, K.L., Aguirre, L.F., Schoeman, M.C., Vanitharani, J., Zubaid, A. Bats and buildings: The conservation of synanthropic bats. En: Voigt, C.C., Kingston, T. Editors.
- Wacharapluesadee, S., Lumlertdacha, B., Boongird, K., Wanghongsa, S., Chanhom, L., Rollin, P., et al. Bat Nipah virus, Thailand. *Emerging Infectious Diseases*. 2005;11:1949-1951.
- Wang, L-F., Cramer, G. Emerging zoonotic viral diseases. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*. 2014;33:569-581.
- Wang, L-F., Shi, Z., Zhang, S., Field, H., Daszak, P., Eaton, B.T. Review of bats and SARS. *Emerging Infectious Diseases*. 2006;12:1834-1840.
- Warrell, M.J., Warrell, D.A. Rabies and other lyssavirus diseases. *Lancet*. 2004; 363:959-969.
- Washer, P. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases Society*. Palgrave Macmillan UK; 2010, p. 1-19.
- Watanabe, S., Masangkay, J.S., Nagata, N., Morikawa, S., Mizutani, T., Fujushi, S., et al. Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines. *Emerging Infectious Diseases*. 2010; 16(8); 1217-1223.
- Whittaker, R.H. Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs*. 1960;30:279-338.
- WHO. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. WHO. [http://www.who.int/csr/sars/country/table2004\\_04\\_21/en/](http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/) (accessed May 26, 2017).
- WHO, 2016. WHO. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)- Saudi Arabia. WHO <http://www.who.int/csr/don/26-april-2016-mers-saudi-arabia/en/> (accessed May 26, 2017)
- Wibbelt, G., Moore, M.S., Schounts, T., Voigt, C.C. Emerging diseases in Chiroptera: why bats?. *Biol Lett*, 2010.
- Wickham, H. *Ggplot2: Elegants graphics for data analysis*. Springer; 2016.
- Wilson, E.O., Mittermeier, R.A. *Megadiversity: Earth's biologically wealthiest nations*. México, D.F.: Graphic Arts Center Publishing Company; 2004.
- de Wit, E., van Doremalen, N., Falzarano, D., Munster, V.J. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14:523-534.
- Wolfe, N.D., Dunavan, C.P., Diamond, J. Origins of major human infectious diseases. *Nature*. 2007; 447:279-283.

- Wong, S., Lau, S., Woo, P., Yuen, K-Y. Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Reviews in medical virology*. 2007; 17:67-91.
- Woolhouse M, Gaunt, E. Ecological origins of novel human pathogens. *Critical Reviews in microbiology*. 2007; 33:231-242.
- Woolhouse, M., Scott, F., Hudson, Z., Howey, R., Chase-Topping, M. Topping M. Human viruses: discovery and emergence. *Philosophical transactions of the Royal Society B*. 2012;367:2864-2871.
- Xu, R.H., He, J.F., Evans, M.R., Peng, G.W., Field, H.E., Yu, D.W., et al. *cdDiseases*. 2004;10:1030-1037.
- Young, C.C.W., Olival, K.J. Optimizing viral discovery in bats. *PLoS ONE*. 2016;11.
- Zaki, A.M., van Boheemen, S., Bestebroer, T.M., Osterhaus, A., Fouchier, R. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *The new England Journal of Medicine*. 2012;367:1814-1820.
- Zhong, N., Zheng, B., Li, Y., Poon, L., Xie, Z., Chan, K., et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, IN february, 2003. *The Lancet*. 2003; 362:1353-1358.
- Zuckerman, A.J., Banatvala, J.E., Pattison, J.R., Griffiths, P., Schoub, editors. *Principles and practice of clinical virology*. 5o. Edition. Chichestr: Wiley; 2004.