

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS ASOCIADOS A LA PRESENCIA
DE ARBOVIRUS (CHIKUNGUNYA, ZIKA, DENGUE, VIRUS DEL
NILO OCCIDENTAL) EN MURCIÉLAGOS Y AVES SILVESTRES EN
AMBIENTES RURALES DOMICILIARES Y PERIDOMICILIARES

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de
Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica
e Inmunología para optar al grado y título de Maestría Académica en
Microbiología

DANIEL FELIPE BARRANTES MURILLO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2020

Dedicatoria

A todos los pacientes que sufren por la infección de los arbovirus alrededor del mundo. Muchos de estos mueren sin una causa específica o un diagnóstico. Es por ellos, que este trabajo tiene como objetivo entender la dinámica de estas enfermedades y su posible diseminación y ubicación en el continente americano.

A los habitantes de la comunidad de Ostional en Santa Cruz y Hone Creek, Sixaola y Cahuita en Talamanca, por abrir las puertas de sus casas y permitir que se realizara este proyecto tan ambicioso.

Agradecimientos

A mis padres, Mario y Lucía; a mis hermanos, Mario, César, Andrés, Steven y a mi cuñada Stephanie, por su apoyo incondicional durante la realización de este proyecto.

A Valeria Vargas Jiménez, por siempre darme un apoyo emocional durante las giras y durante los cursos de Maestría.

Al Sistema de Estudios de Posgrado y al Posgrado de Microbiología, por ayudarme a realizar este trabajo.

A los técnicos de Laboratorio, Francisco Vega, Carlos Vargas y Giovanni Vargas, por el apoyo para la realización de la tesis y su buena disposición para ayudarme y enseñarme.

A Claudio Soto Garita, por ser el compañero ideal en las giras, por siempre estar dispuesto a escuchar y dar su apoyo en los momentos más difíciles de este proyecto.

A las Doctoras Julia Lankton, Saskia Keller y Valerie Schaern-Boschler, por su apoyo, asesoramiento y ayuda con la interpretación de lesiones en murciélagos y aves.

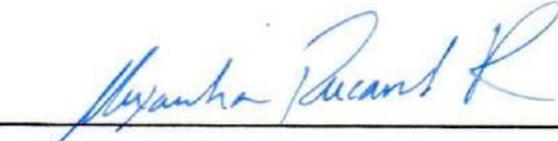
Al Dr. Andrés Moreira, por su buena disposición de enseñar, su paciencia y excelente forma de ser, que me ayudó a mejorar mi trabajo en el Laboratorio.

A la Dra. Eugenia Corrales Aguilar, por haberme abierto las puertas para trabajar con ella, sin conocerme, me adoptó como su estudiante y me permitió trabajar en este proyecto FEES. Siempre le estaré profundamente agradecido por darme una oportunidad y creer en mí. Quiero tratar a mis estudiantes en el futuro como ella me trató a mí y no negarles la oportunidad de ser mejores. Siempre me apoyó en las aulas y en las giras, y sin su apoyo nunca hubiera podido llevar a cabo este proyecto.

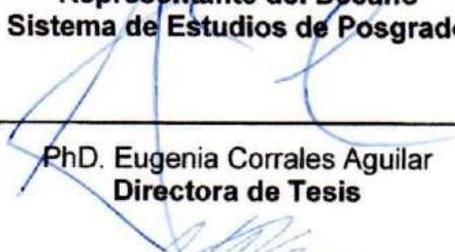
Al Dr. Juan Alberto Morales Acuña, por inculcarme el amor y la pasión por la Patología Veterinaria. Mi mentor y maestro me enseñó, desde hace varios años en un aula, cuál era mi verdadera vocación y cuál era el motivo por el que estoy en este mundo. Siempre lo llevaré con orgullo en mis recuerdos y siempre será mi primer mentor en esta área. Gracias por permitirme encontrar mi vocación y mi pasión, en un momento tan crucial en mi vida, siempre voy a admirar el trabajo y la trayectoria de su carrera en nuestro país.

¡Gracias a todos por ayudarme a ser un mejor profesional y persona!

"Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología."



PhD. Alexandra Rucavado Romero
**Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado**



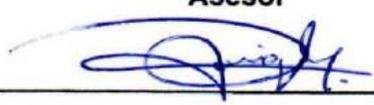
PhD. Eugenia Corrales Aguilar
Directora de Tesis



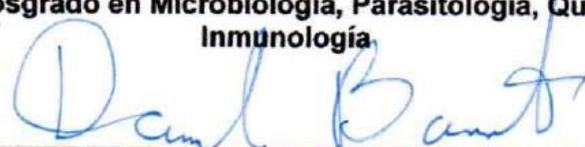
PhD. Andrés Moreira Soto
Asesor



PhD. Alejandro Alfaro Alarcón
Asesor



PhD. Gilbert David Loria Masis
**Representante del Director
Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e
Inmunología**



Daniel Felipe Barrantes Murillo
Candidato

Tabla de Contenidos

Portada	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Hoja de Aprobación.....	iv
Resumen	viii
Abstract	ix
Lista de cuadros	x
Lista de tablas	xi
Lista de figuras	xiv
Índice de abreviaturas	xvii
1. Introducción	1
1.1. Virus del Chikungunya (CHIKV)	2
1.2 Virus del Zika (ZIKV)	5
1.3 Virus del Dengue (DENV)	9
1.4 Virus del Nilo Occidental (WNV)	13
1.5 Virus de la Encefalitis de San Luis (SLEV)	14
1.6 Virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEEV)	17
1.7 Virus de la Encefalitis Equina del Este (EEEV)	19
1.8 Virus de la Fiebre Amarilla (YFV)	20
2. Justificación	22
3. Pregunta de Investigación	24
4. Hipótesis	24
5. Objetivo general	24
5.1 Objetivos específicos	24
6. Estrategia metodológica	25
7. Materiales y métodos	26
7.1 Recolección de las muestras	26
7.2 Extracción del ARN viral	27
7.3 Obtención del ADN complementario (ADNc) a partir del ARN	28

7.4 Protocolo del RT-PCR para la detección de los virus del género <i>Flavivirus</i> y <i>Alfavirus</i>	28
7.5 Análisis semicuantitativo para la determinación de la presencia de anticuerpos neutralizantes contra <i>Flavivirus</i> y <i>Alfavirus</i> mediante PRNT	32
7.6 Evaluación histológica de las lesiones en los tejidos animales	34
7.7 Análisis estadístico de las muestras obtenidas en la colecta realizada en las dos localidades Pacífico Norte (Santa Cruz) y Caribe Sur (Talamanca)	35
8. Resultados	37
8.1 Dieciséis puntos de muestreo fueron seleccionados, a saber: 8 casas de la zona del Pacífico Norte y 8 casas de la Zona del Caribe Sur que cumplieron los criterios de inclusión para realizar el muestreo durante la época seca y la época lluviosa	37
8.2 Se capturaron en total 144 murciélagos y 140 aves de los puntos de muestreo en Santa Cruz y Talamanca.....	38
8.3 No hay evidencia de ARN de <i>Flavivirus</i> o <i>Alfavirus</i> en los órganos o sangre de los animales colectados.	40
8.4 Hay evidencia serológica de <i>Flavivirus</i> y <i>Alfavirus</i> en los murciélagos y aves silvestres colectados en la región del Pacífico Norte y del Caribe Sur.	47
8.5 El estudio histopatológico realizado revela lesiones presentes en 9 sistemas orgánicos en los murciélagos (hepatobiliar, gastrointestinal, hematopoyético, respiratorio, cardiovascular, urinario, reproductor, tegumentario y nervioso) y 5 en aves (hepatobiliar, gastrointestinal, hematopoyético, cardiovascular y urinario). ...	58
8.6 El análisis estadístico sólo muestra relación estadísticamente significativa entre la seropositividad de los murciélagos y la estación en la que fueron colectados.....	87
9. Discusión	99
10. Conclusiones	120
11. Referencias	122
12. Anexos	141
Anexo 1. Permiso del Comité Institucional para el Cuido y Uso de Animales (CICUA), Vicerrectoría de Investigación, UCR.	141

Anexo 2. Permiso del Sistema Nacional de Áreas de Conservación, Área de Conservación del Tempisque, MINAE.	142
Anexo 3. Permiso de la Comisión Institucional de Biodiversidad, Vicerrectoría de Investigación, UCR.	143
Anexo 4. Permiso del Sistema Nacional de Áreas de Conservación, Área de Conservación La Amistad Caribe Sur, MINAE.	147
Anexo 5. Permiso de colecta científica (Pasaporte científico) otorgado por el Sistema Nacional de Áreas de Conservación, Área de Conservación La Amistad Caribe Sur, MINAE.	165
Anexo 6. Lista de murciélagos capturados en los puntos de muestreo en Ostional, Santa Cruz y Hone Creek, Cahuita y Sixaola en el cantón de Talamanca	169
Anexo 7. Lista de aves capturadas en los puntos de muestreo en Ostional, Santa Cruz y Hone Creek, Cahuita y Sixaola en el cantón de Talamanca.	176
Anexo 8. Murciélagos positivos mediante PRNT dilución 1:10 contra <i>Flavivirus</i> (DENV-1,2,3,4, ZIKV, YFV, WNV, SLEV) y <i>Alfavirus</i> (EEEV, VEEV).	183
Anexo 9. Principales hallazgos histopatológicos y diagnósticos morfológicos presentes en murciélagos positivos por medio de PRNT y RT-PCR, capturados en el cantón de Santa Cruz y Talamanca.	187
Anexo 10. Principales hallazgos histopatológicos y diagnósticos morfológicos presentes en aves positivas por PRNT capturados en el cantón de Santa Cruz y Talamanca.	200

Resumen

Los arbovirus son virus transmitidos por vectores artrópodos. En Costa Rica, circulan algunos como el Dengue, Zika, Chikungunya y Nilo occidental. Los arbovirus poseen dos ciclos ecológicos diferentes para lograr mantenerse en el ambiente, a saber: selvático y urbano. El ciclo selvático del Dengue, Zika y Chikungunya sólo se ha descrito entre primates no humanos y artrópodos en África y Asia, sin embargo, no se ha descrito aún en América. El ciclo selvático del Virus del Nilo Occidental involucra las aves silvestres. La presencia de estos arbovirus se ha descrito en vertebrados; no obstante, no se ha logrado demostrar la presencia de lesiones patológicas en los animales silvestres infectados por estos arbovirus.

Mediante el uso de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) y técnicas para la detección de anticuerpos, como el PRNT (*plaque reduction neutralization test*, por sus siglas en inglés) se determinó la posible presencia de estos virus en aves y murciélagos silvestres en dos zonas endémicas a arbovirosis del país (Santa Cruz y Talamanca). Además, se realizó un estudio histopatológico complementario extensivo con el objetivo de describir los hallazgos histopatológicos asociados con la presencia de los arbovirus en los animales silvestres. Se colectaron en total 140 aves y 144 murciélagos de las zonas. Se determinó la presencia de anticuerpos neutralizantes en murciélagos contra DENV-1 en el 34.95% (43/123), DENV-2 en el 16.26% (20/123), DENV-3 en el 5.69% (7/123), DENV-4 en el 4.87% (6/123), YFV en un 0.81% (1/123), WNV en 2.43% (3/123), SLEV en un 4.87% (6/123), EEEV en 7.31% (9/123) y VEEV en 0.81% (1/123). No se identificaron anticuerpos neutralizantes contra ZIKV. En el caso de las aves, se determinaron anticuerpos neutralizantes contra WNV en 0.80% (1/124), SLEV en 2.41% (3/124), EEEV en 8.4% (6/71) y VEEV en el 5.63% (4/71). No se encontraron lesiones histopatológicas específicas asociadas a la seropositividad por flavivirus. Además, los resultados de los RT-PCR fueron negativos. Con base en esto hay evidencia de exposición a *Flavivirus* y *Alfavirus* en murciélagos y aves silvestres en Costa Rica, sin embargo, no fue posible evidenciar la presencia de lesiones histopatológicas asociadas.

Abstract

Arbovirus are arthropod borne viruses. In Costa Rica, Dengue, Zika, Chikungunya Virus and West Nile Virus have been reported. Arbovirus have two ecologic transmission cycles, sylvatic and urban. Dengue, Zika and Chikungunya sylvatic cycle has been described only between nonhuman primates and mosquitoes from Africa and Asia. It has not been yet described in America. The sylvatic cycle of West Nile Virus involves free-ranging birds. The presence of these viruses has been described in vertebrates; however histological lesions associated with their infection have not been yet described in wild animals. Using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and plaque reduction neutralizing tests (PRNT), evidence of these viruses in wild bats and birds from two arbovirus endemic locations in Costa Rica (Santa Cruz and Talamanca) was determined. Also, a complementary full tissue histological analysis was performed to establish histological lesions associated with them. A total of 140 birds and 144 bats were collected. Neutralizing antibodies were detected against Dengue (DENV 1-4), Zika Virus (ZIKV), Yellow Fever Virus (YFV), West Nile Virus (WNV), Saint Louis Encephalitis Virus (SLEV), Eastern Equine Encephalitis Virus (EEEV) and Venezuelan Encephalitis Virus (VEEV). In bats, 34.95% (43/123) for DENV-1, 16.26% (20/123) for DENV-2, 5.69% (7/123) for DENV-3, 4.87% (6/123) for DENV-4, 2.43% (3/123) for WNV, 4.87% (6/123) for SLEV, 0,81% (1/123) for YFV, 7.31% (9/123) for EEEV and 0.81% (1/123) for VEEV were found. Antibodies to ZIKV were not found. In birds, PRNT resulted positive against WNV in 0.80% (1/124), SLEV in 5.64% (7/124), EEEV in 8.4% (6/71) and VEEV in 5.63% (4/71). No significant specific histological findings were observed. Results for RT-PCR were also negative. These results demonstrate that free-ranging bats and birds are exposed to *Flavivirus* and *Alphavirus*, however there is no presence of associated histological lesions.

Lista de cuadros

Cuadro 1: Resumen de Resultados 1.	40
Cuadro 2: Resumen de Resultados 2.	47
Cuadro 3: Resumen de Resultados 3.	57
Cuadro 4: Resumen de Resultados 4.	86
Cuadro 5. Resumen de Resultados 5.	98

Lista de tablas

Tabla 1: Lesiones histopatológicas reportadas en modelos animales infectados con el Virus del Chikungunya.....	4
Tabla 2: Lesiones histopatológicas reportadas en modelos animales con inoculación experimental del virus del Zika.	7
Tabla 3: Lesiones histopatológicas reportadas en modelos animales inoculados con el Virus del Dengue.....	11
Tabla 4: Lesiones histopatológicas reportadas con la infección experimental de 2 cepas de SLEV en Ratón Rockefeller Suizo Albino, mediante inoculación subcutánea.	16
Tabla 5: Secuencias y localizaciones de los cebadores para la detección de <i>Flavivirus</i>	29
Tabla 6: Secuencias y localizaciones de los cebadores para la detección de los serotipos de DENV.	32
Tabla 7: Secuencias y localizaciones de los cebadores para la detección de ZIKV.....	32
Tabla 8: Resultados preliminares de la secuenciación de mezclas de órganos de murciélagos.	40
Tabla 9: Murciélagos positivos mediante PRNT dilución 1:10 contra <i>Flavivirus</i> (DENV-1,2,3,4, ZIKV, YFV, WNV, SLEV) y <i>Alfavirus</i> (EEEV, VEEV).....	48
Tabla 10: Reacciones cruzadas observadas mediante la prueba PRNT dilución 1:10 contra arbovirus (DENV-1,2,3,4, YFV, WNV, SLEV, EEEV y VEEV) en murciélagos capturados en Santa Cruz y Talamanca. Los sueros fueron analizados contra ZIKV pero no se encontró evidencia.	50
Tabla 11: Aves con presencia de anticuerpos neutralizantes mediante PRNT dilución 1:10 contra <i>Flavivirus</i> (WNV, SLEV) y <i>Alfavirus</i> (EEEV, VEEV).....	54
Tabla 12: Principales hallazgos histopatológicos en el sistema hepatobiliar presentes en murciélagos positivos por medio de PRNT y RT-PCR, capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.	60
Tabla 13: Principales hallazgos histopatológicos en el sistema gastrointestinal presentes en murciélagos positivos por medio de PRNT y RT-PCR, capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.	62

Tabla 14: Principales hallazgos histopatológicos en el sistema hematopoyético presentes en murciélagos positivos por medio de PRNT y RT-PCR, capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.	63
Tabla 15: Principales hallazgos histopatológicos en el sistema respiratorio presentes en murciélagos positivos por medio de PRNT y RT-PCR, capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.	64
Tabla 16: Principales hallazgos histopatológicos en el sistema cardiovascular presentes en murciélagos positivos por medio de PRNT y RT-PCR, capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.	64
Tabla 17: Principales hallazgos histopatológicos en el sistema reproductivo presentes en murciélagos positivos por medio de PRNT y RT-PCR, capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.	65
Tabla 18: Principales hallazgos histopatológicos en el sistema urinario presentes en murciélagos positivos por medio de PRNT y RT-PCR, capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.	66
Tabla 19: Cantidad de murciélagos capturados en Santa Cruz y Talamanca con presencia de parásitos (metazoarios y protozoarios) en cada órgano.	67
Tabla 20: Diagnósticos morfológicos presentes en aves positivas por PRNT capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.	78
Tabla 21. Tabla de contingencia Resultado * Género de murciélagos capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.	87
Tabla 22 Pruebas de chi-cuadrado ^c para Resultados de Serología y Género.....	88
Tabla 23 Tabla de contingencia Resultado * Edad en Murciélagos capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.	88
Tabla 24. Pruebas de chi-cuadrado ^c para resultados de serología y edad de los murciélagos.	89
Tabla 25. Tabla de contingencia Resultado * Estado Reproductivo en murciélagos capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.	89
Tabla 26. Pruebas de chi-cuadrado ^c para resultados de serología versus estatus reproductivo.	90

Tabla 27. Tabla de contingencia Resultado * Localidad en murciélagos capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.	91
Tabla 28. Pruebas de chi-cuadrado ^c para resultados de serología versus localidad de muestreo.	91
Tabla 29. Tabla de contingencia Resultado * Estación en los murciélagos capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.	92
Tabla 30. Pruebas de chi-cuadrado ^c para resultados de serología versus estación (seca o lluviosa) durante la colecta de murciélagos.	92
Tabla 31. Tabla de contingencia Resultado * Ubicación de la Red de Niebla en los murciélagos colectados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.	93
Tabla 32. Pruebas de chi-cuadrado ^c para resultados de serología versus la ubicación de las redes de niebla para la captura de los murciélagos.	93
Tabla 33. Tabla de contingencia Resultado * Género en las aves colectadas en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.	94
Tabla 34. Pruebas de chi-cuadrado ^c para resultados de serología versus género de las aves colectadas.	95
Tabla 35. Tabla de contingencia Resultado * Localidad en las aves colectadas en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.	95
Tabla 36. Pruebas de chi-cuadrado ^c para resultados de serología versus localidad (Santa Cruz o Talamanca) en las aves colectadas.	96
Tabla 37. Tabla de contingencia Resultado * Estación en las aves colectadas en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.	96
Tabla 38. Pruebas de chi-cuadrado ^c realizadas con las variables de resultados de serología y estación de colecta en las aves capturadas.	97
Tabla 39. Tabla de contingencia Resultado * Ubicación de la red de niebla en las aves capturadas en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.	97
Tabla 40. Pruebas de chi-cuadrado ^c realizadas con las variables de resultados ante serología y ubicación de las redes de niebla en las aves colectadas.	98

Lista de figuras

Figura 1: Puntos de muestreo en el Cantón de Santa Cruz, Guanacaste.	37
Figura 2: Puntos de muestreo en el Cantón de Talamanca, Limón.	38
Figura 3: Experimento “Murcis 16”. Resultados preliminares del RT-PCR contra <i>Flavivirus</i> . Evidencia de bandas tenues con un peso molecular cercano a 220pb (individuos MTAB7, MTAB10 y MTAB11) (Flechas). Presencia de control negativo (IN NEG).....	41
Figura 4: Experimento “Murcis 16” (continuación de la figura 3). Resultados preliminares del RT-PCR contra <i>Flavivirus</i> en murciélagos (MTAD1, MTAD2, MTAD3, MTAJ1, MTAJ2, MTAJ3 negativos). Evidencia de control positivo (IN POS).	42
Figura 5: Experimento “Coágulos 6” Resultados negativos del RT-PCR para <i>Flavivirus</i> en coágulos de aves (ATAM1, ATAN1, ATAN2, ATAN3, ATAN4, ATAO1, ATAO2, ATAO3, ATAO4, ATAO5). Presencia de control negativo (IN NEG) y control positivo (IN POS).....	44
Figura 6: Experimento “Coágulos 6”. Resultados negativos en RT-PCR de <i>Alfavirus</i> , en coágulos de las aves (ATAB2, ATAB3, ATAC1, ATAC2, ATAC3, ATAC4, ATAC5), con presencia de control negativo (IN NEG) y positivo (IN POS).	46
Figura 7: Evidencia de reacción cruzada en anticuerpos neutralizantes contra arbovirus en murciélagos en Talamanca y Santa Cruz.	52
Figura 8: Aves capturadas en Santa Cruz y Talamanca, con presencia de anticuerpos neutralizantes contra <i>Flavivirus</i> (WNV y SLEV) mediante PRNT dilución 1:10.	55
Figura 9: Aves capturadas en Santa Cruz y Talamanca, con presencia de anticuerpos neutralizantes contra <i>Alfavirus</i> (EEEV, VEEV o ambos) mediante PRNT dilución 1:10. ..	56
Figura 10: Pulmón, <i>Phyllostomus discolor</i> (MSCC4). Marcada hipertrofia de la túnica íntima y media de la arteria pulmonar (<i>asterisco</i>) con un moderado infiltrado inflamatorio compuesto por eosinófilos y linfocitos. Arteritis eosinofílica e hipertrofia miointimal. Tinción H&E. 200X.....	68
Figura 11: Hígado, <i>Artibeus jamaicensis</i> (MSCG14). Presencia de un infiltrado inflamatorio focal, piogranulomatoso, con necrosis del parénquima hepático y presencia intralesional de nemátodos (<i>flechas</i>). Hepatitis piogranulomatosa y necrotizante multifocal crónico activa severa. Tinción H&E. 200X.	69

Figura 12: Hígado, <i>Artibeus jamaicensis</i> (MSCH1), focos de mineralización (asteriscos) asociado a las necrosis de la grasa (Lipogranulomas hepáticos). Tinción H&E. 400X.	70
Figura 13: Intestino delgado (yeyuno), <i>Phyllostomus discolor</i> (MSCM4). Presencia de un cestodo en el lumen intestinal (<i>flecha</i>). Tinción H&E. 100X.....	71
Figura 14: Vesícula biliar, <i>Phyllostomus discolor</i> (MSCM6). Presencia de un infiltrado inflamatorio severo compuesto por linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos en lamina propia de la mucosa (<i>asterisco</i>). Colecistitis linfo-plasmocítica eosinofílica crónico activa severa. Tinción H&E. 200X.	72
Figura 15: Esófago, <i>Noctilio albiventris</i> (MSCN3). Presencia de múltiples nemátodos embebidos en el epitelio plano estratificado queratinizado (<i>flechas</i>), con hiperplasia del estrato espinoso. Tinción H&E. 100X.	73
Figura 16: Hígado, <i>Artibeus watsoni</i> (MTAB2). Infiltrado inflamatorio periportal compuesto por linfocitos, histiocitos, células plasmáticas y eosinófilos (<i>asterisco</i>). Hepatitis periportal linfo-histio-plasmocítica con eosinófilos, crónico activa moderada. Tinción H&E. 400X. .	74
Figura 17: Vesícula biliar, <i>Lonchophylla robusta</i> (MTAD3). Presencia de tremátodos en el lumen de la vesícula biliar (<i>flechas con punta</i>) sin inflamación asociada. Tinción H&E. 40X.	75
Figura 18: Intestino delgado (yeyuno), <i>Lonchophylla robusta</i> (MTAD3). Múltiples céstodos anclados en las vellosidades intestinales (<i>flechas con punta</i>). Tinción H&E. 200X.....	76
Figura 19: Yeyuno, <i>Artibeus jamaicensis</i> (MTAK9). En lamina propia hay un infiltrado compuesto por linfocitos, células plasmáticas y abundantes eosinófilos (15-20 células por campo de alto poder (400X)) (<i>asteriscos</i>). Enteritis linfo-plasmocitaria con eosinófilos crónico activa moderada. Tinción H&E. 400X.	77
Figura 20: Cloaca, <i>Turdus grayi</i> (ASCD1). Presencia de <i>Sarcocystis</i> spp. en el músculo esquelético de la cloaca (<i>asterisco</i>). Tinción H&E. 100X.....	79
Figura 21: Pulmón, <i>Pitangus sulphuratus</i> (ASCI6). Presencia de múltiples microfilarias en el lumen del vaso sanguíneo pulmonar (<i>flechas</i>). Tinción H&E. 400X.....	80
Figura 22: Hígado, <i>Quiscalus mexicanus</i> (ASCK2). Presencia de múltiples focos de mineralización asociados a la necrosis de la grasa (<i>flechas con punta</i>). Tinción H&E. 400X.	81

Figura 23: Tráquea, *Icterus pustulatus* (ASCM6). Presencia de artrópodos en el lumen traqueal, con la cutícula café y refringente y bandas estriadas de músculos en la cavidad corporal morfológicamente compatible con *Sternostoma tracheacolum* (flecha). Presencia de fibrina, detrito celular en el lumen de la tráquea (asterisco). Tinción H&E. 100X.....82

Figura 24: Corazón, *Icterus pustulatus* (ASCM6). Infiltrado inflamatorio linfo-histiocítico focal (asterisco), con necrosis de las fibras musculares cardíacas y presencia intralesional de una estructura parasitaria, protozooario (flecha). Tinción H&E. 400X.....83

Figura 25: Intestino delgado, *Icterus pustulatus* (ASCM6). Presencia de protozoarios embebidos en la mucosa intestinal (flechas con punta). Tinción H&E. 600X.....84

Figura 26: Hígado, *Crotophaga sulcirostris* (ATAA8). Focos de necrosis de los hepatocitos, infiltrado inflamatorio mononuclear (linfo-histiocítico) con células gigantes tipo Langhans (asteriscos) y presencia intralesional de filarias (flechas). Tinción H&E. 400X.85

Figura 27: Duodeno, *Myiozetetes similis* (ATAH5). Presencia de tremátodos en el lumen intestinal (corte transversal) (asteriscos). Tinción H&E. 100X.86

Índice de abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ARN: Ácido Ribonucleico.

CICUA: Comité Institucional para el Cuido y Uso de Animales.

CMC: Carboximetil celulosa.

CHIKV: Chikungunya Virus.

DENV: Dengue Virus.

DHF: Dengue Hemorrhagic Syndrome.

DSS: Dengue Shock Syndrome.

EEEV: Eastern Equine Encephalitis Virus.

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.

IHQ: Inmunohistoquímica.

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

INF: Interferón.

MEM: Medio Esencial Mínimo.

MINAE: Ministerio de Ambiente y Energía.

PNH: Primates no Humanos.

PRNT: Plaque reduction neutralization test.

RT-PCR: Reverse transcriptase polymerase chain reaction.

SLEV: Saint Louis Encephalitis Virus.

SNC: Sistema Nervioso Central.

TGI: Tracto gastrointestinal.

UCR: Universidad de Costa Rica.

UFP: Unidades Formadoras de Placa.

VEEV: Venezuelan Equine Encephalitis Virus.

WNV: West Nile Virus.

YFV: Yellow Fever Virus.

ZIKV: Zika Virus.



Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Daniel Felipe Barrantes Murillo, con cédula de identidad 2-0700-0565, en mi condición de autor del TFG titulado Hallazgos histopatológicos asociados a la presencia de arbovirus (Chikungunya, Zika, Dengue, Virus del Nilo Occidental) en murciélagos y aves silvestres en ambientes rurales domiciliarios y peridomiciliarios

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Daniel Felipe Barrantes Murillo

Número de Carné: B79383 Número de cédula: 2-0700-0565

Correo Electrónico: danielfelipebarrantesmurillo@gmail.com

Fecha: 25/7/2020 Número de teléfono: 83293760

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Dra. Eugenia Corrales Aguilar, PhD

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

1. Introducción

Los arbovirus son virus zoonóticos transmitidos a los humanos por medio de insectos hematófagos como los mosquitos, flebótomos, ceratopogónidos y garrapatas (1). Generalmente, poseen dos ciclos de transmisión, el ciclo selvático que involucra un reservorio vertebrado y un vector artrópodo y el ciclo urbano, el cual involucra a los seres humanos y los vectores artrópodos (1, 2).

Convencionalmente, el concepto de reservorio hace referencia a una especie animal (vertebrado), que presenta la infección crónica o persistente sin desarrollar la patología o pérdida de función (incluyendo su potencial reproductivo) y que puede diseminar suficientes cantidades del agente infeccioso (ya sea por la sangre, orina, heces y/o fluidos corporales) para convertirse en una fuente de infección para otros hospederos de la misma especie o de especies diferentes (incluyendo los humanos y los artrópodos) (2). El invertebrado puede transmitir el agente hasta llegar a un final ciego, en donde el vertebrado no es capaz de transmitir la enfermedad. Estos organismos son conocidos como hospederos terminales (2). Los arbovirus requieren reservorios que puedan mantener estados prolongados de viremia, sin embargo, esto puede ser limitado por el sistema inmune del vertebrado y/o por una alta mortalidad (1, 2).

La respuesta humoral en los reservorios debe ser débil, el virus no debe ser completamente neutralizado, con el fin que los reservorios puedan mantener niveles de viremia altos para poder infectar los vectores artrópodos (2). Los términos hospedero amplificador y reservorio han sido utilizados como sinónimos; sin embargo, se involucra a los reservorios con ciclos de transmisión enzoóticos en ambientes selváticos y/o rurales (2). Los hospederos amplificadores se relacionan con ciclos de transmisión epidémicos o epizooticos en ambientes urbanos y suburbanos (2). De esta manera, los hospederos vertebrados son diferenciados en base a su función en el ciclo de transmisión (2).

Los arbovirus no son un grupo taxonómico de agentes y actualmente, se conocen más de 135 arbovirus que causan enfermedad en los seres humanos (1). Los síntomas varían entre los distintos virus, pero generalmente se categorizan como una enfermedad febril sistémica, fiebre hemorrágica o enfermedad con sintomatología neurológica (1). La mayoría de los

arbovirus son virus ARN y pertenecen a los géneros *Alphavirus*, *Flavivirus*, *Orthobunyavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus*, *Orbivirus*, *Vesiculovirus* y *Thogovirus* (1).

En Costa Rica, los principales arbovirus que se han descrito hasta el momento y que afectan a los seres humanos son: el Dengue, Zika y Chikungunya (3, 4, 5). En el caso del Virus del Nilo Occidental, se ha logrado documentar infecciones en seres humanos y animales, con prevalencia de infecciones demostradas por seropositividad en muestras representativas en bancos de sueros de las especies equina, ovina y caprina, lo cual evidencia una extensa diseminación en el territorio nacional (6), no obstante, el diagnóstico del Virus del Nilo Occidental no es habitual en el país a nivel de los sistemas de salud.

En este trabajo, se procede a describir algunos arbovirus del género *Alfavirus* (CHIKV, EEEV, VEEV) y del género *Flavivirus* (ZIKV, DENV, WNV, SLEV, YFV). Los *Alfavirus* mencionados pertenecen a la familia *Togaviridae*, su genoma mide aproximadamente 11.8 kb y consiste en una cadena simple de ARN positiva que codifica para 4 proteínas no estructurales (nsP1-4) y 5 proteínas estructurales (C, E3, E2, 6K y E1) (7-15). Los *Flavivirus* como el ZIKV, DENV, WNV, SLEV y YFV comparten un genoma de cadena simple de ARN positiva de 10.7 kb aproximadamente, que codifica para 3 proteínas estructurales (E, C y PrM) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5) (16-19).

A continuación, se hará una breve descripción de cada uno de estos arbovirus, incluyendo aspectos generales sobre su etiología, distribución, síntomas que provocan, ciclos de transmisión y lesiones descritas en animales domésticos o silvestres.

1.1. Virus del Chikungunya (CHIKV)

El virus del CHIKV se descubrió en 1952-1953 en Tanzania y desde entonces se han descrito 4 genotipos: África Este-Centro-Sur (ECSA), África Oeste, Asia y Linaje del Océano Índico (IOL) (1, 7-12).

La infección en seres humanos tiene un período de incubación de 3-12 días y provoca una enfermedad febril autolimitante, cuyos síntomas clínicos incluyen cefalea, dolor abdominal, estreñimiento y artralgia (7, 9, 10, 11, 13).

Los ciclos de transmisión del CHIKV incluyen el ciclo urbano entre los humanos y el mosquito *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (dependiendo de la cepa) y el ciclo selvático,

que involucra los primates no humanos y los mosquitos selváticos africanos como *Aedes furcifer*, *Aedes taylori*, *Aedes africanus*, *Aedes luteocephalus* y *Aedes neoaffricanus* (1, 7, 11, 12). Se han identificado anticuerpos contra CHIKV en monos, roedores, aves y vertebrados domésticos en Asia y África; sin embargo, los títulos de anticuerpos son bajos y se han realizado pocas infecciones experimentales (7). Estos resultados han permitido sugerir que los primates no humanos sirven como hospederos amplificadores, sin embargo, esto no excluye que otros vertebrados tengan un rol importante en el mantenimiento enzoótico de la enfermedad (8).

El ciclo selvático del virus aún no ha sido reportado en Asia ni en América (7, 8). Se cree que el CHIKV podría establecer un ciclo enzoótico si lograra utilizar a los primates no humanos del nuevo mundo como reservorio y las especies de vectores mosquitos selváticos (7,8). La mayoría del CHIKV se mantiene a través del ciclo urbano (7).

Los modelos animales en murinos con inmunodeficiencia o inmaduros y macacos han ayudado a entender los mecanismos de la patogénesis de la enfermedad (13). A continuación, en la Tabla 1, se presentan los principales hallazgos histopatológicos en modelos animales.

Tabla 1: Lesiones histopatológicas reportadas en modelos animales infectados con el Virus del Chikungunya

Modelo animal	Vía de inoculación	Días de infección al momento del análisis	Lesiones histopatológicas
Ratones deficientes de <i>Rag1</i> carentes de células B y células T.	Subcutánea, superficie dorsal del pie.	2-4 semanas.	Sinovitis, artritis, tendinitis, necrosis focal del cartílago articular, necrosis del periostio y necrosis multifocal isquémica de la médula ósea (9, 10, 10).
Ratones IRF3/7 ^{-/-} .	Subcutánea, superficie dorsal del pie.	21 días.	
Ratones C57BL/6J.	Superficie dorsal del pie.	5 días.	
Ratones neonatos carentes del receptor IFN - α/β .	Inoculación subcutánea.	16 semanas.	Enfermedad articular (13).
Ratones neonatos.	Inoculación intracerebral.	10 días.	Necrosis e infiltrado mononuclear en las leptomeninges (13, 14).
<i>Macaca fascicularis</i> .	Inoculación intravenosa.	6-7 días.	Infiltrado histiocítico en tejidos linfoides e hígado. Hiperplasia folicular en tejidos linfoides. Miositis necrotizante y artritis fibrinosa (13, 15).
<i>Macaca mulatta</i> 121-132 días de gestación.	Inoculación intramuscular.	21 días.	Madres: Hepatitis necrotizante linfocitaria con neutrófilos. Meningitis y ganglioneuritis linfo-histio-plasmocítica. Miositis necrotizante. Hiperplasia folicular e histiocitosis subcapsular de ganglios linfáticos. Feto: Sin lesiones histopatológicas (11, 13, 14).

1.2 Virus del Zika (ZIKV)

El ZIKV fue aislado, por primera vez, en 1947, de la sangre de un macaco febril, en el bosque Zika en Uganda (17-20). Mediante secuenciación del genoma, se han identificado tres linajes; el linaje del Este de África, el linaje del Oeste de África y el linaje Asia (18). La infección causada por el ZIKV (asintomática en el 80% de los casos) causa síntomas clínicos variados los cuales incluyen fiebre, cefalea, prurito, mialgia, artritis, conjuntivitis, vómito y desórdenes gastrointestinales (1, 17, 18). La infección viral se asocia a microcefalia y el Síndrome de Guillain-Barré (21-23). La presentación clínica de los casos sintomáticos tiene un período de incubación de 3 a 12 días (18, 19).

El ZIKV presenta dos ciclos de transmisión, al igual que el CHIKV, el ciclo urbano y el ciclo selvático descritos anteriormente (17, 19, 24). En el ciclo selvático los humanos representan un hospedero accidental, sin embargo, en áreas que carecen de primates no humanos pueden actuar como hospederos primarios de amplificación del virus y reservorios (19). El virus se ha aislado en primates no humanos (monos, simios y orangutanes) y además se han detectado anticuerpos en roedores, aves, ovejas, cabras, bovinos, elefantes y reptiles, lo cual sugiere una posible participación en el ciclo de transmisión (18, 19, 25).

En 1971, en Kenia, un estudio buscó demostrar el potencial papel de los rumiantes (ovejas, cabras, vacas) y vertebrados salvajes (mamíferos pequeños, aves y reptiles) en la transmisión de los arbovirus. Los ensayos de inhibición de la hemaglutinación fueron positivos contra este agente viral, en sueros de animales domésticos, aves, mamíferos pequeños y reptiles (25), sin embargo, la presencia anticuerpos contra el virus en animales no implica que exista viremia y que sean capaces de transmitir el virus al mosquito (25). Mediante el uso de RT-PCR por tiempo real, se logró determinar, en Brasil, que especies de primates del nuevo mundo como *Callithrix jacchus* y *Sapajus libidinosus* pueden estar infectados (25). También se determinó mediante secuenciación del genoma, que el virus detectado en los monos era 100% similar al que circula en humanos en Sudamérica, lo cual sugiere la participación de los primates no humanos del nuevo mundo como posibles hospederos, como se ha observado con el virus de la fiebre amarilla en Brasil (25). A pesar de que los primates no humanos han sido considerados como los mayores reservorios del ciclo selvático del ZIKV y otros virus relacionados como la fiebre amarilla y el virus del

Dengue, se ha planteado en estudios de campo, la posibilidad de otras especies de animales pueda participar en el ciclo de transmisión de esta enfermedad (21).

Pocas investigaciones se han orientado en el estudio de los animales silvestres como hospederos de este virus (25). Algunos autores fundamentan que no hay evidencia para determinar que los animales silvestres son reservorios (25), sin embargo, actualmente, hay investigaciones que se enfocan en determinar el establecimiento del ciclo selvático del Zika en las Américas mediante el estudio y vigilancia de las poblaciones de animales susceptibles a la infección (18).

Se han desarrollado modelos animales experimentales utilizando ratas, conejillos de indias, conejos, hámsteres, monos, embriones de gallina y murciélagos (25, 26). Los modelos murinos con animales, que están o no inmunocomprometidos, han demostrado la transmisión vertical transplacentaria del ZIKV, seguido por la infección del cerebro fetal y desarrollo de microcefalia (23). Otro estudio realizado, en 1955, demostró que los murciélagos son susceptibles a la exposición intraperitoneal, intradérmica, intracerebral e intrarrectal, pero no a la exposición intranasal del ZIKV (25). En la Tabla 2 se muestran las principales lesiones histopatológicas encontradas en modelos animales.

Tabla 2: Lesiones histopatológicas reportadas en modelos animales con inoculación experimental del virus del Zika.

Modelo animal	Vía de inoculación	Días de infección al momento del análisis	Lesiones histopatológicas
Ratón KM.	Inyección subcutánea múltiple.	8-10 días.	Sistema nervioso central: Necrosis eosinofílica, necrosis de coagulación, nódulos de células gliales, células fantasmas, infiltración de neutrófilos e infiltración linfocitaria en el cerebro y cerebelo, infiltrado de neutrófilos en la aracnoides. Bazo: Hiperplasia linfoide reactiva en la pulpa blanca, congestión esplénica con presencia de numerosas células multinucleadas. Ganglios linfáticos: Histiocitosis en el seno medular de los ganglios linfáticos y focos hemorrágicos. Riñón: Edema de células epiteliales del túbulo renal, edema en la cápsula renal e hiperemia mesenquimal. Hígado: degeneración hidrópica, hiperplasia y apoptosis (22).
Ratón BALB/c.	Inyección subcutánea múltiple.	13-14 días.	Bazo: Hiperplasia linfoide reactiva en la pulpa blanca, congestión esplénica con presencia de numerosas células multinucleadas. Riñón: Edema de células epiteliales del túbulo renal, edema en la cápsula renal e hiperemia mesenquimal. Hígado: degeneración hidrópica, hiperplasia y apoptosis (22).
Ratón C57BL/6.	Inyección subcutánea múltiple.	8-11 días.	Sistema nervioso central: Necrosis eosinofílica neuronal en cerebro y cerebelo. Bazo: En el bazo se evidenció la presencia de congestión marcada, islas eritroblásticas, hiperplasia reactiva linfoide y macrófagos. Hígado: degeneración hidrópica, hiperplasia y apoptosis (22).

Modelo animal	Vía de inoculación	Días de infección al momento del análisis	Lesiones histopatológicas
Ratones carentes de la cadena α del receptor de Interferón tipo I (Infar1 ^{-/-}).	Intramuscular.	7-14 días.	Testículos: destrucción de los túbulos seminíferos, necrosis e infiltrado inflamatorio compuesto por neutrófilos. En el tejido conectivo alrededor de los túbulos seminíferos hay un infiltrado inflamatorio mixto (neutrófilos, macrófagos y linfocitos), degeneración del epitelio de los túbulos del epidídimo, con acúmulo de células epiteliales necróticas y espermatozoides degenerados en el lumen (24).
Ratones hembras preñadas Infar1 ^{-/-} .	Inoculación intravenosa <i>in útero</i> .	Hembras: 3 semanas. Fetos: 8 días.	Hembras: conjuntivitis, pan uveítis, infección de la córnea, iris y el nervio óptico. Fetos: placentitis y microcefalia. (26, 27).
Hámster STAT KO2.	Intramuscular.	30 días.	Sin lesiones histopatológicas en cerebro, médula espinal, bazo, riñón o testículo (28).
Hembras preñadas <i>Macaca mulatta</i> .	Intravenoso.	10 días.	Fetos: desarrollan hipoplasia de la sustancia blanca, gliosis en la sustancia blanca periventricular y daño en el área axonal y ependimaria (26, 29).
Embriones de gallina.	Inoculación <i>in ovo</i> .	Día embrionario 15.	Mortalidad embrionaria y malformación en el sistema nervioso central similares a microcefalia (26).

1.3 Virus del Dengue (DENV)

El DENV pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus* y existen 4 serotipos (DENV-1, -2, -3 y -4) (30, 31). El DENV es responsable de un espectro de enfermedades que abarcan desde una enfermedad febril autolimitante (dengue) hasta el dengue grave y síndrome del shock por dengue (DHF/DSS) (32).

El DENV posee un ciclo de transmisión selvático y urbano (1, 33). El ciclo selvático sólo ha sido detectado en África y Asia (34). El ciclo urbano es el más importante debido a su impacto en salud pública (1).

En el nuevo mundo se creía que la infección estaba ausente en la fauna tropical, sin embargo, un estudio realizado en Sudamérica demostró la presencia de ARN viral del DENV-1, -2, -3 y -4 en hígados y sueros de mamíferos (marsupiales, roedores y murciélagos) en zonas endémicas periurbanas y bosques utilizando RT-PCR (35). Estos hallazgos sugieren un posible salto de seres humanos a mamíferos, o hipotéticamente, un posible ciclo enzoótico, que involucra mamíferos salvajes. Además, un estudio realizado en Costa Rica, en el cual se muestrearon 318 murciélagos de tres regiones geográficas del país, con alta y baja incidencia del virus, concluyó que los murciélagos no tienen un rol como reservorios de la enfermedad, sino más bien son hospederos accidentales (36). A razón de esta evidencia, aunque limitada, actualmente se sugiere que la fauna silvestre podría actuar como hospederos terminales o participar en el mantenimiento del virus como amplificadores del virus durante períodos inter epidémicos (36, 37).

Las lesiones histopatológicas descritas en casos fatales de DENV en seres humanos incluyen necrosis de los hepatocitos, micro y macro esteatosis, formación de membranas hialinas en el pulmón, y necrosis de los túbulos renales (38). También se han descrito en seres humanos, destrucción de los centros germinales y focos de miocarditis (38).

Los modelos animales utilizados en estudios de la patogénesis del DENV involucran el uso de primates no humanos y modelos murinos (39). En el caso de los primates no humanos se ha demostrado la replicación del virus sin el desarrollo de sintomatología clínica (39). Entre los modelos de primates no humanos utilizados se incluyen los macacos y los chimpancés (40). Al inocular el virus se ha detectado viremia con linfadenopatía y esplenomegalia en el caso de los macacos y sin sintomatología clínica en el caso de los chimpancés (40). El estudio en modelos murinos susceptibles a la infección del DENV, se

ha desarrollado en animales genéticamente modificados (40). En la Tabla 3 se incluyen los modelos murinos inmunocomprometidos más comunes para el estudio del DENV, incluyen animales carentes del receptor de Interferón α/β y γ . Los modelos murinos inmunocompetentes incluyen los BALB/c, A/J, y AG129 (40).

Adicionalmente, dos estudios realizados con murciélagos evaluaron la susceptibilidad de estos animales ante la infección del DENV. El primer estudio se realizó con *Artibeus intermedius* inoculados intraperitonealmente con DENV-2, en el segundo estudio se evaluó los efectos de la inoculación experimental de DENV-1 y DENV-4 en *Artibeus jamaicensis* utilizando diferentes rutas (subcutáneo, intraperitoneal y por la picadura de *A. aegypti* infectados), sin embargo, los autores concluyen que los virus no se replican exitosamente en estos animales (51, 52).

Tabla 3: Lesiones histopatológicas reportadas en modelos animales inoculados con el Virus del Dengue

Modelo animal	Vía de inoculación	Días de infección al momento del análisis	Lesiones histopatológicas
<i>Macaca mulatta</i>	Subcutáneo e intradermal.	3 días	Linfoadenopatía, esplenomegalia y hepatomegalia (40).
Ratones BALB/c	Inoculación intraperitoneal e intravenosa con DENV-2 no neuro adaptado.	2-7 días.	Hígado: Congestión centrolobulillar y venular y muerte celular sinusoidal. Infiltrado de células mononucleares, hemorragias hepáticas y esteatosis macro vesicular. Edema intracelular y degeneración vacuolar. Pulmones: Neumonía intersticial mononuclear, edema interseptal, hiperplasia e hipertrofia del epitelio bronquiolar (39, 41, 42, 43, 44).
Ratones BALB/c	Inoculación intracerebral con DENV-2 neuro adaptado	7 días.	SNC: Gliosis reactiva, hemorragias, microglía con hiperplasia e hipertrofia, proliferación de astrocitos, retracción de células de Purkinje e infiltrado inflamatorio perivascular en piamadre y neuro pilo (45).
Ratones IFNAR ^{-/-} C57BL/6	Inoculación intravenosa con DENV-2.	1-6 días.	Infiltrado inflamatorio mononuclear en corazón, hígado, bazo, pulmón, riñón, intestino grueso e intestino delgado (46).
Ratones AG129 carentes de receptor IFN- α/β y IFN- γ R	Inoculación intraperitoneal con DENV-4 (TVP-376)	5 días.	Hígado: Trombosis de la vena porta, necrosis, decrecimiento de la reserva del glicógeno, pleomorfismo nuclear y binucleación de hepatocitos. Bazo: Incremento de la pulpa blanca y centros germinales, disminución de las células hematopoyéticas y la pulpa roja, esplenomegalia (47).

Modelo animal	Vía de inoculación	Días de infección al momento del análisis	Lesiones histopatológicas
Ratones AG129 carentes de receptor IFN- α/β y IFN- γ R	Inoculación intraperitoneal con DENV-4 cepa 703-4	1-4 días.	Bazo: Disminución de la pulpa roja. Hígado: Pleomorfismo nuclear y focos de necrosis. Depleción de glicógeno en hepatocitos (48)
Ratones AG129 carentes de receptor IFN- α/β y IFN- γ R	Inoculación intraperitoneal DENV-1 cepa Pacífico Norte del Oeste 74	1-3 días.	Bazo: Disminución de la pulpa roja. Hígado: Pleomorfismo nuclear y focos de necrosis. Depleción de glicógeno en hepatocitos. Intestino grueso: Migración de leucocitos fuera de las placas de Peyer (49).
Ratones AG129 carentes de receptor de Interferón I y II	Inoculación intraperitoneal DENV-3 C0360/94	1-4 días.	SNC e intestino grueso: Sin hallazgos significativos. Bazo: Incremento de la pulpa blanca, transformación de centros germinales y disminución de pulpa roja. Esplenomegalia. Hígado: Vacuolización de hepatocitos. Disminución del glicógeno (50).

1.4 Virus del Nilo Occidental (WNV)

El WNV fue reportado, por primera vez, en Uganda, en 1937 (53-57). El virus se ha dividido genéticamente en dos linajes: el WNV 1, el cual está presente en Norteamérica y otras partes del mundo y el WNV 2, que se restringe en áreas enzoóticas de África (57).

La mayoría de las infecciones causadas por el WNV son asintomáticas, sin embargo, en un 20-30% de los casos, las personas pueden desarrollar la fiebre del WNV, cuyos síntomas incluyen dolor ocular, cefalea, mialgia, malestar gastrointestinal y prurito (55). En un 1% de los casos, el WNV produce una enfermedad neuro invasiva fatal (meningoencefalitis) (55).

Este virus se mantiene en la naturaleza a través de un ciclo endémico, el cual involucra las aves silvestres, los caballos y los seres humanos. Las aves actúan como hospederos amplificadores transmitiendo el virus a los mosquitos, principalmente a las especies de *Culex*, mientras que los humanos y los caballos actúan como hospederos incidentales terminales (53, 58). Los mosquitos infectados se alimentan de otros vertebrados, permitiendo que la enfermedad se transmita a un amplio número de hospederos (56).

En Estados Unidos, la infección causada por este virus se ha detectado en 208 especies de aves diferentes y 29 especies de mamíferos, también hay reportes ocasionales de infecciones en reptiles (54). Las aves silvestres desarrollan una viremia prolongada, en donde el virus se distribuye en casi todos los órganos, provocando miocarditis y hepatitis, en contraste con el caballo, en donde el virus se restringe al sistema nervioso central (57). Los hallazgos reportados incluyen miocarditis multifocal no supurativa, necrosis esplénica con depleción linfocítica, necrosis pancreática, necrosis hepática multifocal leve (59). Las lesiones en SNC incluyen meningoencefalitis no supurativa, agregados linfocíticos perivasculares, gliosis focal, degeneración neuronal y satelitosis (59). Las lesiones cerebelares incluyen focos de necrosis en la materia gris con necrosis de la capa de las células de Purkinje (59). En los caballos infectados la mortalidad puede alcanzar hasta un 50% y las lesiones histopatológicas incluyen encefalomielitis no supurativa, gliosis y formación de nódulos gliales, degeneración neuronal y necrosis (57), en casos severos, hay presencia de hemorragias y focos de necrosis en la región lumbar y torácica de la médula espinal (58). Un estudio realizado en la Península de Yucatán en México detectó la presencia de anticuerpos neutralizantes del WNV en mamíferos (incluyendo murciélagos), aves y reptiles, sin

embargo, los autores sugieren que la ausencia de enfermedad asociada a la presencia del agente viral en México puede estar relacionada con la circulación de una cepa avirulenta (54). Además, el virus fue aislado de murciélagos frugívoros en el Sur de India en 1968 y también se han encontrado anticuerpos en murciélagos en Estados Unidos (60).

1.5 Virus de la Encefalitis de San Luis (SLEV)

El virus de la encefalitis de San Luis es un *Flavivirus* (61-68), que fue descrito por primera vez en San Luis, Missouri, en 1933 (64, 68, 69). Las cepas de este virus pueden ser clasificadas en 8 serotipos (I-VIII), los genotipos I y II circulan en Norteamérica, los genotipos III-VIII en Centroamérica y Suramérica y el genotipo V es prevalente en Florida (64, 69).

Este virus circula enzoóticamente entre los mosquitos del género *Culex* spp. y las aves que actúan como hospederos amplificadores en Norteamérica (62, 63, 66, 67, 68), principalmente, aves paseriformes y columbiformes (64, 69). En el neotrópico se ha identificado la presencia del virus en aves de la familia *Formicariidae* y otros mamíferos como cingulados, murciélagos, folívoros, roedores y marsupiales (64). También se ha reportado la presencia del virus en otros vectores mosquitos pertenecientes al género *Aedes*, *Coquillettidia*, *Deinocerites*, *Mansonia*, *Psorophora*, *Sabethes* y *Wyeomyia* (64). No obstante, el rol potencial de estos artrópodos y vertebrados en ciclo de transmisión del virus no está bien determinado. Se especula que los otros vertebrados son hospederos terminales o accidentales (p.ej. fauna silvestre (cingulados, marsupiales, roedores), caballos y humanos) (63, 68).

La mayoría de las infecciones en seres humanos son asintomáticas (63, 66). Los pacientes presentan un cuadro similar al resfrío (63, 66), los casos severos desarrollan fiebre, disfunción neurológica, cefalea, encefalitis o meningoencefalitis (63, 66, 69, 70).

Aunque muchas especies animales pueden infectarse o son serológicamente positivas en regiones endémicas, la enfermedad no ha sido descrita en animales salvajes ni domésticos (63). Sin embargo, el virus fue aislado de un equino con síntomas neurológicos en Brasil (63). Posteriormente, el virus fue inoculado en ratones neonatos usando una ruta intracraneal. Los cerebros infectados fueron colectados para su análisis histopatológico y preparación de suspensiones para inocular nuevamente en ratones neonatos, realizando 7 pasajes (63). El

análisis histopatológico determinó la presencia de hiperemia y hemorragias discretas multifocales en el sistema nervioso central de todos los ratones neonatos infectados, degeneración neuronal, e infiltrados linfo-histiocíticos perivasculares (63). Otras lesiones incluyen hiperemia y hemorragias multifocales en riñones, hígado, pulmón y corazón (63).

Adicionalmente, en un estudio experimental inoculando ratones, se observaron las lesiones histopatológicas y la presencia de viremia asociada a la inoculación de dos cepas distintas de SLEV (71). Los hallazgos más relevantes de este estudio se representan en la Tabla 4. Es importante señalar que en este estudio los hallazgos histopatológicos no neurotrópicos difieren del estudio anterior, y que no se evidenció la replicación del virus en el bazo a pesar de los cambios histológicos encontrados previamente por Rosa *et al* 2003 (51).

Tabla 4: Lesiones histopatológicas reportadas con la infección experimental de 2 cepas de SLEV en Ratón Rockefeller Suizo Albino, mediante inoculación subcutánea.

Modelo animal	Vía de inoculación	Días de infección al momento del análisis	Lesiones histopatológicas
Ratón Rockefeller suizo albino R-W1	Inoculación subcutánea con SLEV (genotipo VII) CorAn-9275 <i>Mus musculus</i>	7 días.	Bazo: Incremento de folículos linfoides, centros germinales muy prominentes. Hiperplasia megacariocítica. Riñón: Sin hallazgos significativos. Pulmón: Sin hallazgos significativos. SNC: Sin hallazgos significativos (71).
Ratón Rockefeller suizo albino R-W1	Inoculación subcutánea con SLEV (genotipo III) CbaAr-4005 <i>Culex quinquefasciatus</i>	7 días.	Bazo: reducción de folículos, baja celularidad en centros germinales, áreas de baja celularidad en pulpa roja y focos de necrosis. Atrofia de folículos linfoides de células B. Hiperplasia megacariocítica. Riñón: Sin hallazgos significativos. Pulmón: Neumonía intersticial, engrosamiento de septos alveolares e infiltrado linfocítico. SNC: Infiltrado inflamatorio linfocitario en meninges y perivascular. Apoptosis de celular en la corteza (71).

En Costa Rica no se han reportado casos de encefalitis asociados a SLEV en animales o seres humanos. La presencia de SLEV, en el país, fue documentada en un estudio que evaluó la presencia de arbovirus en perezosos de dos dedos (*Choloepus hoffmanni*) y perezosos de tres dedos (*Bradypus variegatus*) (72). Un 80% de los perezosos presentaron anticuerpos contra SLEV, mediante la prueba de fijación del complemento y la prueba de inhibición de la hemaglutinina (72).

Se han descrito otros modelos animales que incluyen ratones C57BL/6J y Balb/c (66) en donde los principales hallazgos histopatológicos son encefalitis y meningoencefalitis mononuclear, lo que demuestra que la inflamación del sistema nervioso central es un componente esencial en los modelos animales experimentales con esta enfermedad (66).

1.6 Virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEEV)

El Virus de la Encefalitis Equina Venezolana representa una enfermedad zoonótica emergente (73-81) y fue aislado, por primera vez, en 1938, después de brotes de encefalitis en Colombia, Venezuela y Trinidad (73, 82, 83). Este virus se divide en 6 diferentes subtipos antigénicos (I-VI) (76, 80, 83). Se ha clasificado en dos grupos epidemiológicos: cepas enzoóticas (subtipo I variedad D-E y subtipos II-IV) y epizoóticas (subtipo I variedad A-B y C) (73-76, 84).

Las cepas epizoóticas IAB y IC son muy virulentas para los caballos causando fatalidad en un 20-80% de los casos reportados (73, 77, 83). Otros animales domésticos como los cerdos pueden desarrollar infecciones asintomáticas, sin embargo, no son relevantes para la propagación natural de la enfermedad (57). Los terneros son susceptibles mediante la inoculación intracerebral, pero se recuperan luego de dos semanas (57). Los roedores y conejillos de indias son muy susceptibles mientras que los perros y gatos son refractarios (57).

Los cambios histológicos se limitan casi exclusivamente a la materia gris, en donde se encuentran focos de necrosis, infiltrados de neutrófilos, vasculitis necrotizante, trombosis, malasia cerebro-cortical y agregados perivasculares de linfocitos y neutrófilos. Las lesiones más severas se encuentran en la corteza cerebral especialmente en las áreas frontal, riencefálicas y occipitales (57).

Los humanos pueden verse afectados por brotes de cepas enzoóticas y epizoóticas (60). La enfermedad descrita en humanos se caracteriza por síntomas como cefalea, mialgia, fatiga, fiebre, náusea y faringitis (74, 82). En un 14% de los casos hay presencia de complicaciones neurológicas a causa de la encefalitis como confusión, convulsiones, fotofobia y coma (76, 82). Solamente en <1% de los casos, la infección es fatal (73, 74, 76, 83). Estudios en modelos murinos han evidenciado encefalitis, daño neuronal y afección del tejido linfoide (83).

En Panamá se han identificado anticuerpos con VEEV en diferentes especies de animales silvestres, incluyendo *Proechimys* spp. (ratas espinosas), *Sigmodon* spp. (rata algodónera), *Marmosa* spp. (ratones marsupiales), *Didelphis marsupialis* (zarigüeyas) y murciélagos (73). En un estudio realizado en el Sur de México (Calakmul en Campeche y Montes Azules en Chiapas), se detectó VEEV mediante RT-PCR en muestras de tejido esplénico de murciélagos de las siguientes especies: *Artibeus lituratus*, *Carollia sowelli*, *Glossophaga soricina* y *Sturnira parvidens* (85) y en tejido esplénico de las siguientes especies de roedores: *Sigmodon hispidus* y *Oryzomys alfaroi* (85).

La presencia de VEEV en Costa Rica ha sido evaluada por medio de diferentes estudios desde hace 4 décadas, la mayoría evidencia la presencia de anticuerpos contra el virus en animales domésticos, salvajes y seres humanos. Los primeros reportes de VEEV datan de 1970, en un estudio en donde se comprobó una seroprevalencia del 80% de anticuerpos neutralizantes en equinos y 21% en humanos, realizado en Guanacaste, mediante PRNT (86). Además, en el mismo estudio, el virus fue aislado de 20 equinos y 4 humanos (86). La presencia de VEEV en el país también fue documentada en un estudio que evaluó la presencia de arbovirus en perezosos de dos dedos (*Choloepus hoffmanni*) y perezosos de tres dedos (*Bradypus variegatus*) entre el 2005-2007 (72). Un 11% de los perezosos presentaron anticuerpos contra VEEV mediante PRNT y la prueba de inhibición de la hemaglutinina (72).

Entre el 2009-2016, el VEEV fue reportado en caballos por medio de serología, usando un ELISA de captura de IgM. Un total de 156 casos de caballos con enfermedad neurológica provenientes de Guanacaste, Alajuela y Puntarenas fueron diagnosticados serológicamente (6, 87). También se realizó un pequeño muestreo para VEEV en la zona de Sixaola, frontera con Panamá, en bovinos, caninos y equinos, encontrándose prevalencias de 87,5%, 12,5% y 47,0% respectivamente (6). En humanos, en Costa Rica se han reportado 7

casos de encefalitis confirmadas por laboratorio entre el año 2011-2014, de estos casos, 3 fueron diagnosticados con VEEV mediante ELISA de captura de IgM en Nicoya, Guanacaste (88). Sin embargo, hasta la fecha se desconoce el impacto y la magnitud de este virus en la población humana en el país (88).

1.7 Virus de la Encefalitis Equina del Este (EEEV)

El EEEV es un virus *Alfavirus* de la familia *Togaviridae* (89-93). Fue aislado, por primera vez, en 1933, de caballos infectados en Virginia y Nueva Jersey (83). EEEV fue reportado, la primera vez, en seres humanos en 1938, en Massachusetts (94).

El EEEV consiste en 4 linajes distintos. El linaje I se considera la variante de Norteamérica, el este del río Mississippi y el Caribe Sur y se denomina cepa NA EEEV (94, 95). Los linajes II, III y IV comprenden los linajes de Suramérica (95) y se denominan cepas SA EEEV (94). Las cepas SA EEEV han sido reclasificadas como el *Virus Madariaga* (94), por lo que la designación de EEEV sólo corresponde al linaje I o NA EEEV (94). El ciclo de transmisión de EEEV involucra las aves y los mosquitos (83, 94), el principal vector del ciclo selvático es *Culiseta melanura* (89). Se cree que los principales reservorios del virus son las aves paseriformes en donde la infección viral, generalmente, no es fatal (96). Los principales vectores artrópodos que transmiten EEEV hacia los humanos o el caballo son *Aedes*, *Coquillettidia* y *Culex*, a diferencia de *Culiseta melanura* que se alimenta sólo de aves (83, 96).

EEEV puede causar una enfermedad neurológica severa en algunas especies de aves, caballos y perros, sin embargo, los caballos no son considerados hospederos amplificadores durante los brotes epidémicos (83).

Este agente provoca una enfermedad zoonótica en personas, que puede resultar en invasión neuronal, encefalitis y la muerte en un 33-70% de los casos (70, 78-79, 81-84). El período de incubación es de 4-10 días (83).

En equinos, la infección causada por la EEEV es fatal en un 80-90% de los casos, un 66% de los animales que sobreviven la infección terminan con secuelas neurológicas (95). Las lesiones histopatológicas en SNC son idénticas a las descritas en infecciones por VEEV (57).

En Costa Rica, se ha demostrado la presencia de EEEV en sueros equinos mediante un ELISA de captura de IgM. Los 4 casos positivos por serología, fueron encontrados en brotes de enfermedad neurológica en equinos provenientes de Guanacaste, Alajuela y Puntarenas (6, 87). En Costa Rica, no se han reportados casos de EEEV en seres humanos (88).

La infección de EEEV ha sido evaluada en modelos animales experimentales utilizando ratones, hámsteres, conejillos de indias y macacos (83). Los ratones Balb/c inoculados mediante aerosoles desarrollan sintomatología nerviosa y una severa meningoencefalitis (98). En los modelos con hámsteres y ratones, la inflamación se caracteriza por la presencia de macrófagos, linfocitos y neutrófilos (83).

1.8 Virus de la Fiebre Amarilla (YFV)

El Virus de la Fiebre Amarilla pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* (99-104) y se aisló, por primera vez, en 1927 (99). El YFV es un virus con un único serotipo antigénico (99). YFV se considera endémico en 32 países de África y 13 países en Suramérica (99, 105, 106).

El YFV se mantiene en la naturaleza a través de un ciclo de transmisión entre los primates no humanos (PNH) y los mosquitos del género *Aedes* en África y las especies del género *Haemagogus* y *Sabethes* en América (99, 106). En África, el principal vector artrópodo involucrado en el ciclo selvático es el *Aedes africanus*, mientras que los PNH más importantes en este ciclo, pertenecen al género *Cercopithecus* y *Colobus* (100). En América, la circulación del YFV se ha descrito en Cuba, Trinidad, Brasil, Argentina, Paraguay, Venezuela, Bolivia, Colombia y Perú, principalmente en monos araña (*Ateles*), monos nocturnos (*Aotus*), monos ardilla (*Saimiri*) y monos aulladores (*Alouatta*) (100). Los humanos se infectan cuando un mosquito selvático portador del YFV se alimenta de ellos, posteriormente, la infección urbana se mantiene a través del mosquito *Aedes aegypti* (99, 100).

Los seres humanos desarrollan sintomatología 4 días después de ser picados por el mosquito (99). El YFV en seres humanos afecta al hígado y otros tejidos como el corazón, riñones y los pulmones, los cuales también son sitios primarios de replicación (107). Los síntomas clínicos en infecciones severas incluyen fiebre hemorrágica y la muerte (106, 107).

En Costa Rica, en 1901, 1903 y 1910, se reportaron brotes de YFV (108). La infección natural en monos y mosquitos fue documentada cerca de 1950 (108). Sin embargo, actualmente, el virus no es endémico en Costa Rica (108).

La infección de YFV ha sido evaluada en modelos animales experimentales, con hámsteres, ratones deficientes del factor $INF\alpha\beta\gamma$ y macacos (106). Histopatológicamente, las principales lesiones observadas son focos de necrosis hepatocelular, con formación de cuerpos de Councilman (apoptosis de hepatocitos) y cuerpos de Torres (inclusiones virales intranucleares), además de la degeneración lipídica de los hepatocitos. También hay depleción linfoide prominente en los folículos esplénicos y en los ganglios linfáticos (109).

2. Justificación

Con este trabajo de investigación se pretende identificar las lesiones histopatológicas asociadas a la infección en animales silvestres (murciélagos y aves) causadas por los arbovirus CHIKV, ZIKV, DENV y WNV.

Los arbovirus utilizan una gran cantidad de artrópodos vectores e infectan muchas especies de animales silvestres y seres humanos (110). Más de 200 virus de 27 familias distintas, incluyendo *Flaviviridae* y *Togaviridae* han sido aislados o detectados en murciélagos, lo que sugiere que algunos animales silvestres pueden ser hospederos incidentales de los virus o reservorios competentes capaces de transmitir los virus a otros vertebrados (35). Los murciélagos han sido considerados como posibles reservorios de los arbovirus desde 1930 y han sido aislados de muchas especies (2).

El estado de la cuestión de este proyecto es establecer el diagnóstico de una infección natural en estos animales. La evidencia de la infección, junto con la evidencia de ARN viral de los tejidos, podría ser el primer paso para determinar si la fauna silvestre desempeña un papel como potencial reservorio de los arbovirus que circulan en el país y afectan a la población costarricense. Hace falta mucha información sobre las posibles especies que pueden ser posibles reservorios de arbovirus y cómo estas infecciones afectan a los animales silvestres. A raíz de estas premisas, surge la necesidad de contestar interrogantes como: ¿Cuáles otros animales silvestres además de los primates no humanos o aves pueden ser infectados por arbovirus en América y específicamente en Costa Rica? ¿Cuáles virus circulan en los animales silvestres en áreas urbanas y periurbanas? ¿Tienen estos virus algún efecto en la fauna silvestre y la biodiversidad causando enfermedad y/o mortalidad?

Los estudios de arbovirus en animales domésticos y silvestres en el continente americano han ayudado a comprender su potencial como hospederos en el ciclo selvático y los ha convertido en objeto de vigilancia en la transmisión enzoótica de los arbovirus (25). Sin embargo, la infección natural no ha sido demostrada en todos los animales infectados por los arbovirus. Es por esta razón que se han desarrollado gran cantidad de modelos experimentales, con el objetivo de recrear la infección clínica en humanos y estudiar las lesiones asociadas. No obstante, muchos de estos estudios bajo condiciones de laboratorio han sido considerados irrelevantes y no reproducibles, debido a que se desarrollan en

animales inmunodeficientes (2). Debido a esta razón los estudios en fauna silvestre siguen siendo muy necesarios en la descripción de las infecciones causadas por estos agentes etiológicos.

¿Qué impacto tendría el demostrar que los animales silvestres desarrollan una infección causada por los arbovirus? Si se lograra demostrar que hay susceptibilidad, la posibilidad de que estos animales desarrollen una enfermedad, viremia y sean reservorios sería mayor. Si existieran reservorios en Costa Rica, estos virus podrían establecer un ciclo enzoótico en el país, lo que haría imposible erradicarlos. La alta diversidad de especies silvestres, incrementa el potencial de establecer el ciclo selvático de estas enfermedades (25). El establecimiento de un ciclo enzoótico de los arbovirus en el nuevo mundo tendría un impacto inmediato en la salud pública debido que hasta la fecha no hay métodos eficientes para el control de la circulación enzoótica de ningún arbovirus (12). Por esta razón es que los estudios epidemiológicos insisten que se incluya a la vida silvestre, con el objetivo de comprender su posible papel como hospederos de los diferentes arbovirus y para el control de las epidemias (25).

Finalmente, para entender la importancia de estas enfermedades en la humanidad se debe dimensionar su impacto en la salud pública; por ejemplo, el DENV es la enfermedad transmitida por mosquitos más distribuida en el mundo y se le atribuyen un estimado de 390 millones de infecciones al año (111). El WNV es responsable por 44000 casos clínicos anualmente en Estados Unidos (110). Desde el 2013, otros arbovirus emergentes se han distribuido ampliamente en América, como el CHIKV y el ZIKV (12, 19). En Costa Rica, estos virus han sido reportados como agentes causales de enfermedad en seres humanos (2-5).

3. Pregunta de Investigación

¿Cuáles son los hallazgos histopatológicos asociados a la presencia de arbovirus (CHIKV, ZIKV, DENV, WNV, SLEV, VEEV, EEEV, YFV) en murciélagos y aves silvestres de ambientes rurales domiciliarios y peri domiciliarios?

4. Hipótesis

Los murciélagos y aves silvestres en ambientes rurales domiciliarios y peri domiciliarios desarrollan lesiones histopatológicas en diferentes órganos asociados a la infección por los arbovirus CHIKV, ZIKV, DENV, WNV, SLEV, VEEV, EEEV y/o YFV.

5. Objetivo general

Identificar los hallazgos histopatológicos en aves y murciélagos silvestres, asociados a la presencia de los arbovirus CHIKV, ZIKV, DENV, WNV, SLEV, VEEV, EEEV, YFV en ambientes domiciliarios y peri domiciliarios para determinar la infección viral de estos animales.

5.1 Objetivos específicos

5.1.1 Determinar la presencia (RT-PCR, IHQ) de los CHIKV, ZIKV, DENV, WNV, SLEV, VEEV, EEEV, YFV y/o contacto (anticuerpos contra estos virus) en aves y murciélagos de ambientes domiciliarios y peri domiciliarios.

5.1.2 Describir las lesiones histopatológicas encontradas en aves y murciélagos silvestres de ambientes domiciliarios y peri domiciliarios asociadas a la presencia del CHIKV, ZIKV, DENV, WNV, SLEV, VEEV, EEEV, YFV.

5.1.3 Determinar si la presencia del ARN viral, anticuerpos anti estos virus en suero y/o antígeno viral correlaciona con las lesiones histopatológicas encontradas en las aves y murciélagos silvestres de ambientes domiciliarios y peri domiciliarios.

6. Estrategia metodológica

Se realizó un muestreo de aves y murciélagos silvestres en dos zonas endémicas para algunos arbovirus, a saber: 8 casas de la comunidad de Ostional del Cantón de Santa Cruz en Guanacaste y 8 casas en las comunidades de Cahuita, Hone Creek y Sixaola en el cantón de Talamanca en Limón, durante la época seca y lluviosa

Los animales fueron identificados taxonómicamente y se les aplicó la eutanasia siguiendo el protocolo aprobado por el Comité Institucional para el Cuido y Uso de Animales (CICUA) de la UCR (Anexo 1).

Se efectuó el procedimiento de necropsia completo, colectando muestras de suero y órganos (de forma individual y en conjunto) para realizar pruebas de diagnóstico molecular. Además, todos los órganos fueron colectados en formalina tamponada al 10%. Mediante la técnica de RT-PCR, se determinó la presencia del ARN viral de *Flavivirus* o *Alfavirus* en el conjunto de órganos y el suero. Posteriormente, aquellas muestras que arrojaron un resultado positivo, se le realizó a cada órgano RT-PCR específico para CHIKV, ZIKV, DENV, WNV, SLEV, VEEV, EEEV, YFV. Adicionalmente, se efectuó una prueba semicuantitativa para determinar la presencia de anticuerpos contra estos virus (PRNT) a una única dilución (1:10) de suero. Se realizó estudio histopatológico completo de todos los órganos fijados en formalina.

Los hallazgos histopatológicos fueron correlacionados con el diagnóstico molecular y serológico. Con base en estos resultados se determinó si los animales silvestres han sido infectados por los virus en estudio y si esta infección se puede correlacionar con los hallazgos histopatológicos encontrados.

7. Materiales y métodos

7.1 Recolección de las muestras

Las muestras fueron colectadas durante la época lluviosa (más de 250 mm de lluvia por mes) y la época seca (menos de 100 mm de lluvia por mes) en la comunidad de Ostional, del cantón de Santa Cruz en Guanacaste (10°16'00"N 85°39'00"O), el distrito Sixaola (09°30'03"N, 82°36'55"O) y el cantón de Talamanca (09°44'28"N, 82°50'46"O) en la provincia de Limón, en donde se han reportado casos de ZIKV, CHIKV y DENV por parte del Ministerio de Salud (2, 3, 4).

La metodología empleada fue el muestreo por bola de nieve, en 8 casas de la comunidad de Ostional, Cahuita, Hone Creek y Sixaola durante las dos estaciones (seca y lluviosa), lo que correspondió con 16 puntos de recolección en el Pacífico Norte y 16 en el Caribe Sur, para un total de 32 puntos de colecta. En cada punto se colectó 5 aves y 5 murciélagos, para un total de 320 animales.

Para la colecta de los animales se contó con los siguientes permisos: Permiso del Comité Institucional para el Cuido y Uso de Animales (CICUA), Vicerrectoría de Investigación, UCR (Anexo 1). Permiso del Sistema Nacional de Áreas de Conservación, Área de Conservación del Tempisque, MINAE (Anexo 2), Permiso de la Comisión Institucional de Biodiversidad, Vicerrectoría de Investigación de la UCR (Anexo 3), Permiso del Sistema Nacional de Áreas de Conservación, Área de Conservación La Amistad Caribe Sur, MINAE (Anexo 4) y Permiso de colecta científica (Pasaporte científico) otorgado por el Sistema Nacional de Áreas de Conservación, Área de Conservación La Amistad Caribe Sur, MINAE (Anexo 5). El criterio de selección para las casas incluía las siguientes características: ser habitadas por al menos una persona, poseer caballos cerca de la propiedad o en el traspatio y otros animales domésticos (perros, gallinas, cerdos, vacas) y tener parches de bosque cercanos. Los murciélagos y aves fueron capturados utilizando redes de niebla colocadas cerca de la casa (trampas domiciliarias) y en áreas de bosque cercanas a las casas (trampas peri domiciliarias). Los animales capturados fueron taxonómicamente identificados, además se determinó el sexo, la edad, el estatus reproductivo y peso. Posteriormente, se les aplicó la eutanasia con una sobredosis intramuscular de anestesia (ketamina 10 mg/kg + xilacina 1 mg/kg) siguiendo el protocolo aprobado por el CICUA de la UCR (CICUA-36-

13). Se realizó el procedimiento completo de necropsia en donde se tomaron muestras de cerebro, corazón, pulmones, hígado, bazo, riñones, vejiga, gónadas (ovarios o testículos), intestino delgado, estómago, ojo, rodilla y una mezcla de estos órganos y se preservaron en 200 μ L de Solución de Estabilización RNAlater (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.) a -80°C . Se tomó una muestra de sangre de cada animal en tubos sin anticoagulante para obtener el suero, posteriormente, la muestra se centrifugó durante 5 minutos a 10000 revoluciones por minuto (rpm) para separarlo del coágulo sanguíneo. Luego, se conservó el suero y el coágulo a -80°C . Además, se colectó muestras de todos los órganos y se colocaron en formalina tamponada al 10% para su estudio histopatológico.

7.2 Extracción del ARN viral

El ARN viral fue extraído de la mezcla de órganos y la sangre utilizando el Reactivo de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Se realizó el protocolo descrito a continuación: las mezclas de los órganos y los coágulos fueron maceradas con pistilos estériles en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Se tomaron 100 mg de la mezcla de órganos y se le añadió un 1 mL del reactivo TRIzol. Se dejó la muestra con el reactivo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se le añadió 200 μ L de cloroformo, éste se precipitó en el fondo del tubo de microcentrífuga. El cloroformo fue mezclado con el reactivo TRIzol con el vórtex. Se dejó la muestra reposar durante 5 minutos, y posteriormente, se centrifugó durante 15 minutos a 14000 rpm. El sobrenadante de cada tubo de microcentrífuga fue trasvasado hacia un nuevo tubo, que contenía 500 μ L de Isopropanol al 100% concentración molar (2-Propanol, IPA, Sigma-Aldrich) y 2 μ L de GlycoBlue™ Coprecipitant AM9515 (15 mg/mL) (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, MA, USA). El GlycoBlue consiste en un tinte azul unido de forma covalente al glicógeno, utilizado para visualizar los ácidos nucleicos precipitados por el isopropanol. La muestra se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente, y luego, fue centrifugada durante 10 minutos a 14000 rpm. Al terminar la centrifugación, un precipitado azul fue visualizado en el fondo del tubo de microcentrífuga. El sobrenadante fue decantado y fue añadido a cada tubo 1 ml de Etanol al 75% concentración molar (Alcohol etílico absoluto, Sigma-Aldrich). Las muestras fueron centrifugadas nuevamente, durante 5

minutos a 10000 rpm. Consecutivamente, se decantó el sobrenadante, dejando el precipitado azul únicamente. Los tubos se colocaron con la boca hacia abajo y se dejaron reposar durante 10 minutos o hasta que se observaran secos. Luego, 50 μL de Agua libre de nucleasas (ThermoFisher Scientific, MA, USA) fueron añadidos a cada muestra y se colocaron los tubos en un bloque de calor durante 15 minutos a 56°C .

Se realizó una cuantificación de la pureza de las extracciones de ARN y se midió la concentración mediante espectrofotometría utilizando el NanoDropTM 2000/2000c (Thermo ScientificTM).

7.3 Obtención del ADN complementario (ADNc) a partir del ARN

Para la síntesis del ADNc, a partir del ARN viral extraído, se utilizó el RevertAidTM RT Kit K#1691 (Thermo Scientific, MA, USA). Para el proceso de retro transcripción se preparó la mezcla en tubos de microcentrífuga con una capacidad de 200 μL . Se mezclaron 11 μL del ARN extraído de las muestras con 9 μL de la muestra de reactivos. Esta mezcla de reactivos se compone de: 1 μL de Random Hexamer Primer, 4 μL de Buffer de Reacción (5X), 1 μL de RiboLock RNase Inhibitor (20U/ μL), 2 μL de 10 mM dNTP Mix y 1 μL RevertAid RT (200 U/ μL). Se mezcló de forma gentil y se centrifugó rápidamente. Posteriormente, la mezcla se colocó en el termociclador y se incubó a 25°C por 5 minutos, seguido por una incubación a 42°C durante 1 hora. Para terminar la reacción, se incubó la muestra a 70°C durante 5 minutos.

7.4 Protocolo del RT-PCR para la detección de los virus del género *Flavivirus* y *Alfavirus*

El ARN viral presente en la sangre y la mezcla de órganos fue identificado mediante la técnica de PCR.

Para la detección de las especies del género *Flavivirus* se utilizó un RT-PCR, donde se amplificó la región del gen NS5, el cual es muy conservado en los flavivirus (19). Para la amplificación se utilizaron los cebadores de la Tabla 5 (112). A continuación, se especifica en detalle el procedimiento.

Tabla 5: Secuencias y localizaciones de los cebadores para la detección de *Flavivirus*.

Localización del cebador	Secuencia	Temperatura de recocido (°C)	Localización
cFD2	GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAG C	53	NS5
MAMD	AACATGATGGGRAARAGRGARAA	53	NS5
FS 778	AARGGHAGYMCDGCHATHTGGT	54	NS5

La reacción de mezcla fue incubada a 37°C por 1 hora y a 95 °C por 10 minutos. Los PCR se realizaron en 100 µL que contienen: 10 µL de 10X *Taq* tampón, 3 µL de 50 mM MgCl₂ (concentración final, 1.5 mM), 2 µL de 10 mM dNTP (concentración final, 200 µM), 2.5 µL de 10 µM del cebador reverso (cFD2) y 2.5 µL de 10 µM del cebador sensor (MAMD) (concentración final, 500 nM), 3 UI de *Taq* DNA polimerasa (GIBCO BRL) y 70 µL de agua DEPC-pretratada ultra pura. Luego, se añadieron 10 µL de ADNc. Los PCR semianidados se desarrollaron con una mezcla de 100 µL que contiene: 10 µL de 10 X *Taq* buffer, 3 µL de 50 mM MgCl₂ (concentración final, 1.5 mM), 2 µL de 10 mM dNTP (concentración final, 200 µM), 2.5 µL de 10 µM de cebador reverso (cFD2), 2.5 µL de 10 µM de cebador sensor (FS788) (concentración final, 500 nM), 3 UI de *Taq* DNA polimerasa (GIBCO BRL) y 75 µL agua pura. Luego se añadieron 5 µL de los productos del PCR anterior. Los ciclos de incubación termal en los PCR, que se usaron para los cebadores amplificadores cFD2 y MAMD fueron los siguientes: 1 ciclo de apertura de la hebra de ADN a 95°C durante 1 minuto, seguido por la amplificación inicial de 25 ciclos de incubación 94, 53 and 72 °C durante 1 minuto cada uno, y 1 ciclo de cierre de la hebra de ADN a 72 °C durante 7 minutos y 4 °C. La incubación a la amplificación con los cebadores anidados cFD2 y FS 778, inicia con 1 ciclo de apertura de la hebra de ADN a 94°C durante 1 minuto, luego sigue con 35 ciclos de incubación a 94, 54 y 72°C durante 1 minuto cada uno, y finaliza con 1 ciclo para el cierre de la hebra de ADN, a 72 °C durante 7 minutos y 4 °C (112). Los ciclos térmicos se desarrollaron con un equipo PE Applied Biosystems 2400.

Los amplicones obtenidos por medio del RT-PCR (220 pb) fueron analizados mediante electroforesis utilizando el equipo QIAxcel Advanced (QIAGEN), la interpretación de los resultados se realizó con el Software QIAxcel ScreenGel 1.6.0. Se utilizaron como controles positivos muestras de virus de referencia, DENV-3 Nicaragua (D3/NI/30-94/1994) y DENV-4 Dominica (D4/DM/ 814669/1981).

Para la detección de especies de *Alfavirus* se utilizó un ensayo de RT-PCR genérico, el cual amplifica la región codificante del gen de una proteína no estructural nsP4 (113), que es altamente conservado en este género. A continuación, se describe el procedimiento de este protocolo. La primera reacción de amplificación de la mezcla (12 μ L) contiene 1 μ L de ADNc, 0.5 μ L de albúmina de suero bovino (BSA), 0.3 μ L de Superscript III/Platinum *Taq* Enzymes (Invitrogen), 1 x tampón y los cebadores TTTAAGTTTGGTGCATGATGAAGTC y GCATCTATGATATTGACTTCCATGTT (500 nM cada uno). La segunda ronda de mezcla (50 μ L) contiene 1 μ L del producto de la primera ronda del PCR, 1 μ L de BSA, 1.6 mM MgCl₂, 0.16mM (cada uno) de desoxinucleósido trifosfato (dNTP) y 0.1 μ L de Platinum *Taq* (Invitrogen), al igual que los cebadores GGTGCGATGATGAAGTCTGGGATGT (200nM), CTATGATATTGACTTCCATGTTCATCCA (100nM), y CTATGATATTGACTTCCATGTTCAGCCA (100nM).

La primera fase del PCR, incluye 15 minutos a 45 °C, 3 minutos a 95 °C; un elemento cíclico compuesto por 10 ciclos de 95°C por 20 segundos, 65°C (-1°C por ciclo) por 20 segundos y 72°C por 20 segundos, y un elemento cíclico principal compuesto por 30 ciclos de 95°C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos y 72°C por 20 segundos. La segunda fase del PCR involucra 2 minutos a 95°C y 40 ciclos de 95°C por 20 segundos, 58°C por 20 segundos y 72°C por 20 segundos (113). Los amplicones obtenidos durante la segunda fase del PCR (210 pb) fueron analizados mediante electroforesis, utilizando el equipo QIAxcel Advanced (QIAGEN), la interpretación de los resultados se realizó con el Software QIAxcel ScreenGel 1.6.0. Se utilizaron, como controles positivos muestras de la vacuna TC83 del VEEV.

Los productos de PCR positivos fueron tratados con el reactivo ExoSAP-IT™ 78200 (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific, MA, USA). La reacción se preparó mezclando 2 μ L Exonucleasa I (Exo I) 20U/ μ L con 5 μ L del producto del PCR. Se incubaron

en el termociclador a 37⁰C durante 30 minutos, seguido por una inactivación de la reacción a 95⁰C durante 5 minutos.

Para una identificación presuntiva, los productos fueron enviados a Macrogen Inc. para su secuenciación. Los datos fueron interpretados utilizando el Software Mega 10.1 (BETA) Molecular Evolutionary Genetics Analysis. La identificación de la secuencia se realizó cuando el porcentaje de identidad del amplicón era mayor de un 90% con respecto a la secuencia de referencia (MF004387 DENV-4, MF004387.1 DENV-4, JX669501.1 DENV-3, JF937642.1 DENV-3, LC322991.1 ZIKV, MK560178.1 ZIKV), tomadas de la biblioteca GenBank ® del NIH (*por sus siglas en inglés*), utilizando el programa RefSeq: NCBI Reference Sequences para llevar a cabo el BLAST.

Aquellos que fueron identificados como *Flavivirus* mediante la secuenciación, se les realizó un PCR específico de especie, siguiendo los protocolos publicados y verificados en el laboratorio de Virología Médica, Facultad de Microbiología, UCR. Se realizaron RT-PCR específicos para DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 y ZIKA respectivamente a cada muestra utilizando controles positivos para los 4 serotipos de DENV (DENV-1 Angola (D1/AO/XX/1988), DENV-2 Jamaica (D2/JM/1409/1983), DENV-3 Nicaragua (D3/NI/30-94/1994), DENV-4 Dominica (D4/DM/ 814669/1981) y para ZIKV (VR 1848 ATCC). El protocolo de RT-PCR para DENV es un PCR semianidado en el cual se usan los cebadores D1 y D2 en una reacción de amplificación primaria en conjunto con el ADNc para obtener un fragmento de 511bp de los genes de cápside y pre membrana (C/prM). Posteriormente, la amplificación secundaria utiliza el primer producto del PCR diluido en conjunto con los cebadores D1 y TS1-TS2-TS3-TS4 generando amplicones de diferentes tamaños para cada serotipo (482bp para DENV-1, 119bp para DENV-2, 290bp para DENV-3 y 392bp para DENV-4) (114). Todas las secuencias de estos cebadores se presentan en la Tabla 6. El protocolo de RT-PCR para ZIKV consiste en un PCR simple que utiliza los cebadores ZIKVENF y ZIKENR (correspondientes a los genes de envoltura E) en conjunto con el ADNc. El producto de PCR final tiene un tamaño de 364bp (115). Las secuencias de estos cebadores se presentan en la Tabla 7.

Tabla 6: Secuencias y localizaciones de los cebadores para la detección de los serotipos de DENV.

Cebador	Secuencia 5'-3'	Localización
D1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	134-161
D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	616-644
TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	568-586
TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	232-252
TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC	400-421
TS4	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	506-527

Tabla 7: Secuencias y localizaciones de los cebadores para la detección de ZIKV.

Cebador	Secuencia 5'-3'	Localización
ZIKVENVF	GCTGGDGCRGACACHGGRCT	1538-1558
ZIKVENVR	RTCYACYGCCATYTGGRCTG	1902-1883

7.5 Análisis semicuantitativo para la determinación de la presencia de anticuerpos neutralizantes contra Flavivirus y Alfavirus mediante PRNT

Para el estudio semicuantitativo de anticuerpos se utilizó ensayos de Neutralización (PRNT, *plaque reduction neutralization test*, por sus siglas en inglés). El PRNT se realizó con cultivo de células Vero (ATCC, CCL-81) preparadas en matraz de cultivo celular de 75 cm², posteriormente cultivadas en placas de 96 pozos. Las semillas preparadas a partir de los virus, fueron tituladas. Consecutivamente, se realizaron diluciones con el propósito de tener 24 unidades formadores de placa (PFU por sus siglas en inglés) del virus para el ensayo de PRNT. Los protocolos utilizados desde la titulación de las semillas hasta la tinción de las placas se describen a continuación.

Para el ensayo se utilizaron semillas preparadas a partir de los siguientes virus: Chimerivax SLEV (TCD00392 WSV), Chimerivax WNV (TC00391 WSV), Chimerivax DENV-3 (TC00691-2 WSV), Chimerivax DENV-4 (TC00692-2 WSV), Chimerivax DENV-1 (TC00693-2 WSV), Chimerivax DENV-2 (TC00689-2 WSV), EEEV Sindbis (quimérico),

VEEV (vacuna TC83 252296), Zika VR 1848 ATCC y YFV vacuna 17D. Las semillas virales fueron preparadas utilizando células Vero cultivadas en un matraz de 75 cm² agregando medio mínimo esencial al 2% (MEM) y 100 mL del virus (MOI 0.1). La mezcla se incubó durante 1 hora a 37⁰C, y luego se añadieron 8 mL del MEM al 2%. La mezcla se dejó incubando a 37⁰C durante 5 días (hasta que las células se desprendieron). El sobrenadante se colectó en un tubo cónico y se agregaron 2.5 mL de suero fetal bovino al 20%. Este se centrifugó durante 5 minutos, 4⁰C a 1500 rpm. Posteriormente, se almacenaron en alícuotas de 500 µL a -70 ⁰C.

Las semillas virales preparadas fueron tituladas en placas de cultivo celular de 96 pozos. Se colocaron 4 virus por placa, en cada pozo se colocaron un total de 270 µL del MEM al 2% salvo en la primera columna. Inicialmente, 100 µL de la semilla fue mezclada con 900 µL del MEM 2%, después, se colocaron 200 µL de esta mezcla en la primera columna de la placa. Luego, se trasvasaron 30 µL a la siguiente columna; de esta mezcla se trasvasaron 30 µL a la siguiente y se repitió este proceso 3 veces más para que de esta manera, las diluciones quedaran seriadas hasta el sexto pozo (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶). Posteriormente, en placas en las que previamente se sembraron células Vero, posterior al descarte del medio, se colocaron 50 µL de cada una de estas diluciones y se incubaron a 37⁰C durante 1 hora. Luego se descartó el inóculo y se añadieron 100 µL con la pipeta multicanal a cada pozo de Caboximetil celulosa al 1.5% (CMC) y se incubaron a 37 ⁰C al 5% de CO₂ durante 3 días.

Las placas del cultivo celular fueron fijadas y teñidas mediante el siguiente método. Primero se descartó el CMC y se añadió a cada pozo 100 µL de formalina al 3.7% (dilución 1:10 con PBS 1X) y se dejó reposar durante 30 minutos. Luego, la formalina fue descartada y se colocaron 50 µL de cristal violeta al 1% diluido en alcohol al 10% y se dejaron reposar durante 5 minutos. Se descartó el cristal violeta, lavando enérgicamente con agua y se dejaron secar las placas de cultivo celular en la estufa a 37 ⁰C durante 20 minutos.

El conteo de unidades formadores de placa (UFP) fue realizado con el estereoscopio, eligiendo una dilución apropiada (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶) y se cuantificaron los espacios vacíos en el fondo del pozo, que representan el efecto citopático del virus sobre la monocapa de células. Posteriormente, se sumaron y se obtuvo un promedio dividiendo entre el número de pozos.

Los sueros de los animales fueron analizados mediante la prueba PRNT con una dilución 1:10 del suero, en placas de cultivo celular de 96 pozos, con células Vero. Antes de la prueba, el suero se inactivó a 56°C por 30 minutos y luego fue diluido a razón 1:5 en MEM al 2% para preparar 400 µL. En total se diluyeron 80 µL del suero en 320 µL del MEM 2%.

Las diluciones de trabajo del virus (24 unidades formadoras de placa por 0.1 mL) utilizando los virus antes mencionados, fueron preparadas mezclándolas con MEM al 2%. El virus y los sueros fueron mezclados en igual proporción (30 µL de cada uno) e incubados a 37 °C por 60 minutos antes de la inoculación de 50 µL en las monocapas de cultivo celular. Sólo se realizó una única dilución del suero, debido a la limitada cantidad de suero. El inóculo fue adsorbido por 1 hora a 37 °C. Después de la adsorción, el inóculo virus y suero fue removido y se colocaron 100 µL de carboximetilcelulosa al 1.5% (CMC) (Sigma-Aldrich, USA). Posteriormente, las placas fueron incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ durante 72 horas. En cada una de las pruebas se colocaron controles del suero al cual no se le añadió el virus y se conocía que tenía anticuerpos contra ese virus y controles de los virus sin el suero. Seguidamente, las placas fueron fijadas y teñidas, usando el método descrito anteriormente. Los títulos de punto final se basan en la reducción del 90% comparado con el promedio del virus de los pozos control (116, 117, 118).

7.6 Evaluación histológica de las lesiones en los tejidos animales

Los tejidos fijados en formalina tamponada al 10% fueron embebidos en parafina, seccionados en cortes de 3 µm y teñidos con hematoxilina & eosina para su evaluación histopatológica de rutina (119). Los tejidos fueron distribuidos en los casetes de inclusión siguiendo el siguiente orden:

- Casete 1) Corazón, pulmón, riñón (dos cortes de ambos), hígado con la vesícula biliar, y corte transversal del esófago y la tráquea;
- Casete 2) Estómago, bazo, páncreas, duodeno, ganglios linfáticos;
- Casete 3) segmento longitudinal del bloque de órganos de la cavidad pélvica o genitourinario (incluye el pene/vulva, vejiga, glándulas sexuales accesorias como la próstata, testículos/ovarios, útero y recto);
- Casete 4) segmentos longitudinales del intestino delgado e intestino grueso;

- Casete 5) SNC, de rostral hacia caudal incluyendo corteza cerebral, núcleos caudados, hipocampo, tercer ventrículo, tálamo, cerebelo y médula bulbo raquídeo.

Se realizó una descripción detallada de los hallazgos histopatológicos de todos los órganos, incluyendo el diagnóstico morfológico, con la caracterización de la población celular, cronicidad, distribución y severidad de la inflamación. La evaluación histopatológica también incluyó la determinación y descripción de otros agentes etiológicos presentes, como parásitos (nemátodos, tremátodos, protozoarios), hongos y bacterias. La visualización de estos agentes se hizo mediante el uso de tinciones histológicas especiales como Tinción del Ácido Peryódico de Schiff, Tinción de Plata Metenamina de Gomori y Grocott, Tinción Gram Brown Brenner, Warthin Starry, Ziehl Neelsen, Azul de Toluidina o Giemsa según correspondía. Finalmente, se planteó realizar en aquellos tejidos que fueran positivos por medio de RT-PCR a arbovirus, la técnica de tinción inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos anti-flavivirus y anti-alfavirus (116).

La descripción de las lesiones histopatológicas en murciélagos y aves silvestres se limita debido a que no existe una estandarización histológica por especie, lo cual es una limitante en este trabajo. Por lo tanto, se seleccionaron individuos de forma aleatoria en las localidades de muestreo y se utilizaron como "controles" bajo el criterio de que sean negativos tanto para RT-PCR como para PRNT. De esta manera se comparó las lesiones en animales negativos (serológicamente y molecularmente) con aquellos positivos y la evidencia de las lesiones histológicas.

7.7 Análisis estadístico de las muestras obtenidas en la colecta realizada en las dos localidades Pacífico Norte (Santa Cruz) y Caribe Sur (Talamanca)

Para aquellos individuos (aves o murciélagos) que fueron positivos mediante RT-PCR o PRNT 1:10, se realizó un análisis de factores como género, edad, estatus reproductivo, localidad de muestreo (Santa Cruz o Talamanca), estación (Seca o lluviosa) y ubicación de la red de niebla (peridomiciliar o en el bosque) y fueron sometidos a la prueba de Chi cuadrado (X^2). Cada factor mencionado fue considerado como una variable categórica. El valor de significancia o valor de p equivale al 5% ($p=0.05$).

Hipótesis nula (H_0) = Las variables son estadísticamente independientes.

Hipótesis alternativa (H_a) = Las variables son dependientes.

El análisis de los datos se llevó a cabo usando el Software IBM SPSS Statistics 19.0.

8. Resultados

8.1 Dieciséis puntos de muestreo fueron seleccionados, a saber: 8 casas de la zona del Pacífico Norte y 8 casas de la Zona del Caribe Sur que cumplieron los criterios de inclusión para realizar el muestreo durante la época seca y la época lluviosa

En la Figura 1 se muestran la ubicación de las casas seleccionadas en Guanacaste. Estos sitios de muestreo cumplieron con los criterios de inclusión, los cuales eran: ser habitadas por al menos una persona, poseer caballos cerca de la propiedad o en el traspatio y otros animales domésticos (perros, gallinas, cerdos, vacas) y tener parches de bosque cercanos.

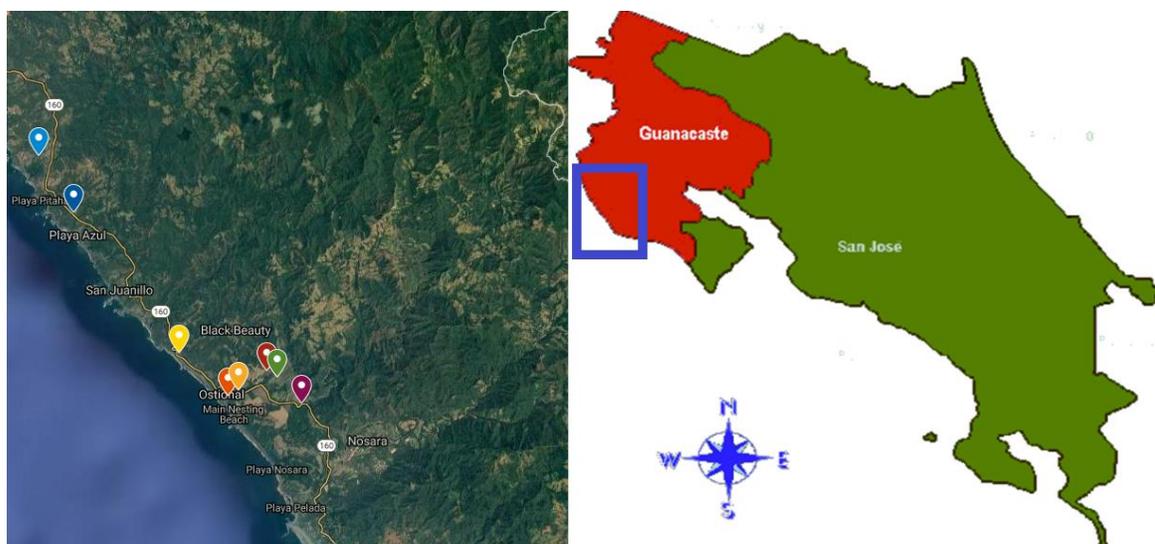


Figura 1: Puntos de muestreo en el Cantón de Santa Cruz, Guanacaste.

Casas: CSCA y CSCI, coordenadas: $09^{\circ}59.599N$ $085^{\circ}40.367W$ ■ Casas: CSCB y CSCJ, coordenadas: $10^{\circ}0'17.57N$ $085^{\circ}41'7.96W$ ■. Casas: CSCC y CSCK, coordenadas: $09^{\circ}59'45.12N$ $085^{\circ}41'58.87W$ ■. Casas: CSCD y CSCL, coordenadas: $09^{\circ}59'52.57N$ $085^{\circ}41'44.99W$ ■. Casas: CSCE y CSCM, coordenadas: $10^{\circ}0'41.32N$ $085^{\circ}43'3.11W$ ■. Casas: CSCF y CSCN, coordenadas: $10^{\circ}0'10.19N$ $085^{\circ}40'54.41W$ ■. Casas: CSCG y CSCO, coordenadas: $10^{\circ}3'44.67N$ $085^{\circ}45'20.85W$ ■. Casas CSCH y CSCP, coordenadas: $10^{\circ}4'59.05N$ $085^{\circ}46'6.44W$ ■. Realizado con Google Maps (Alphabet Inc.).

Sur). Las otras dos especies más abundantes en este muestreo fueron *Glossophaga soricina* (16 individuos en total, 7 colectados en Pacífico Norte y 9 en Caribe Sur) y *Uroderma convexum* (1 individuo en Pacífico Norte y 15 en Caribe Sur).

La mayoría de los murciélagos fueron capturados en las redes colocadas en los parches de bosque cerca de las casas, 61,11% de los individuos en total (88/144). Un 52% del total de los animales eran machos (75/144) y 48% hembras (69/144). Del total de hembras capturadas, un 30.43% (21/69) se encontraban preñadas. En el Anexo 6 se presenta en detalle la información de todos los murciélagos colectados.

Se capturaron en total 140 aves, 52 en Pacífico Norte y 88 en el Caribe Sur de 42 especies diferentes pertenecientes a 37 géneros (La lista de especies se presenta en el Anexo 7). La especie más abundante fue *Sporophila morelleti* representada por 23 individuos capturados en la región del Caribe Sur. La segunda especie más abundante fue *Columbina inca* representada por 13 ejemplares colectados en la región del Pacífico Norte. Las otras especies más abundantes fueron *Pitangus sulphuratus* (8 individuos, 4 en Pacífico Norte y 4 en el Caribe Sur) y *Amazilia tzacatl* (8 individuos capturados en el Caribe Sur). Un 63.57% de las aves eran machos (89/140).

La mayoría de las aves capturadas proceden de las redes colocadas en las áreas de bosque aledañas a las casas, un 52.85% (74/140). El resto de los individuos, 47.15% (66/140) fueron capturados en las redes colocadas en los espacios peridomiciliares que incluyen establos, potreros, gallineros y elevaciones cercas de las casas como lomas. En el Anexo 7 se presenta la información detallada de todas las aves colectadas en la zona del Pacífico Norte y el Caribe Sur.

Cuadro 1: Resumen de Resultados 1.

Puntos más relevantes:
<ul style="list-style-type: none"> • Se capturaron 144 murciélagos en total, 72 en la región del Pacífico Norte y 72 en la región del Caribe Sur. • Se identificaron 26 especies diferentes de murciélagos, pertenecientes a 5 familias. • Las especies más abundantes fueron <i>Artibeus jamaicensis</i> y <i>Carollia perspicillata</i>. • Se capturaron 140 aves, 52 en la región de Santa Cruz y 88 en Talamanca. • Se identificaron 42 especies pertenecientes a 37 géneros. • Las especies más abundantes fueron <i>Sporophila moreletti</i> (Caribe Sur) y <i>Columbina inca</i> (Pacífico Norte). • La mayoría de los animales (murciélagos y aves) fueron machos y fueron colectados en las redes colocadas en parches de bosque.

8.3 No hay evidencia de ARN de *Flavivirus* o *Alfavirus* en los órganos o sangre de los animales colectados.

Se analizaron las mezclas de órganos y coágulos para determinar la presencia de ARN viral (*Flavivirus* o *Alfavirus*). Inicialmente sólo un 2.77% (4/144) de las mezclas de órganos de los murciélagos presentaron resultados, que concordaban con la banda resultante de la amplificación con los controles positivos en el gel de análisis en el caso de los *Flavivirus* (Figura 3 y 4). Estos resultados fueron purificados y enviados a secuenciar por medio del Método de Secuenciación de Sanger. En la Tabla 8 se presentan los resultados preliminares obtenidos de las secuenciaciones de los amplicones obtenidos.

Tabla 8: Resultados preliminares de la secuenciación de mezclas de órganos de murciélagos.

ID individuo	Especie	Sexo	Resultado Secuenciación	Código de Referencia GenBank NCBI
MTAB7	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Hembra preñada	DENV-4	MF004387
MTAB10	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Macho	DENV-4	MF004387.1
MTAB11	<i>Uroderma convexum</i>	Macho	DENV-3	JX669501.1 JF937642.1
MSCF5	<i>Desmodus rotundus</i>	Hembra	ZIKV	LC322991.1 MK560178.1

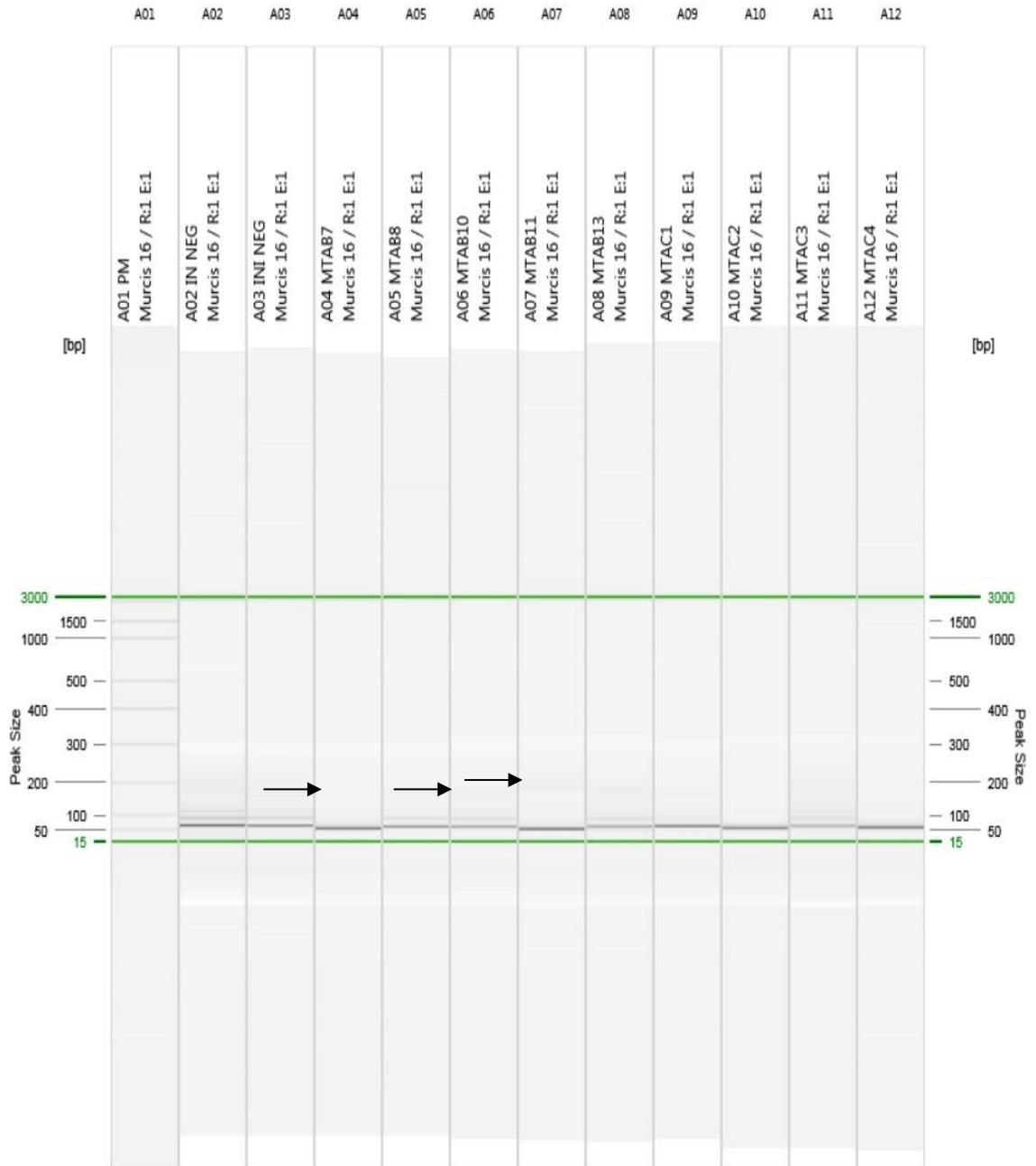


Figura 3: Experimento “Murcis 16”. Resultados preliminares del RT-PCR contra *Flavivirus*. Evidencia de bandas tenues con un peso molecular cercano a 220pb (individuos MTAB7, MTAB10 y MTAB11) (Flechas). Presencia de control negativo (IN NEG).

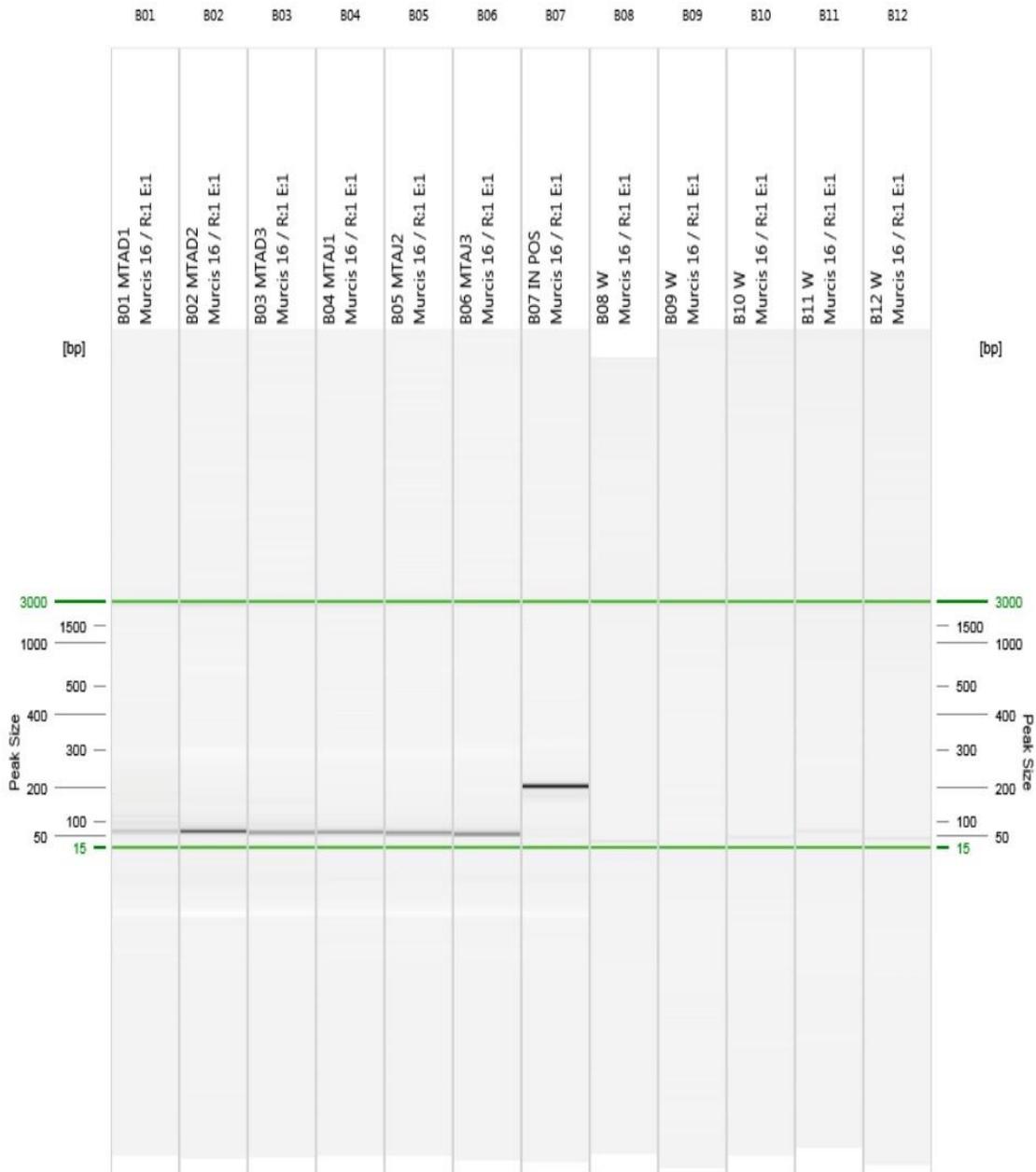


Figura 4: Experimento "Murcis 16" (continuación de la figura 3). Resultados preliminares del RT-PCR contra *Flavivirus* en murciélagos (MTAD1, MTAD2, MTAD3, MTAJ1, MTAJ2, MTAJ3 negativos). Evidencia de control positivo (IN POS).

Cada una de las muestras de los individuos presentes en la Tabla 6 fue sometida a su respectiva evaluación. Primero se llevó a cabo RT-PCR específico (DENV-3, DENV-4, ZIKV) en las mezclas de órganos de cada individuo y luego en cada uno de los órganos

individuales (cerebro, ojo, rodilla, hígado, bazo, riñón, pulmón, corazón, vejiga, sistema reproductor, intestino y estómago). Todos los resultados fueron negativos. Los controles positivos fueron positivos y los controles negativos siempre dieron un resultado negativo.

Se llevó a cabo RT-PCR para *Flavivirus* en los coágulos de los 144 murciélagos, todos fueron negativos. En el caso de las aves se realizó el mismo procedimiento para los 140 coágulos y 140 mezclas de órganos, los resultados también fueron negativos en este caso. Para cada reacción de RT-PCR, los controles positivos siempre dieron un resultado positivo y los controles negativos siempre fueran negativos como se observa como ejemplo en la Figura 5.

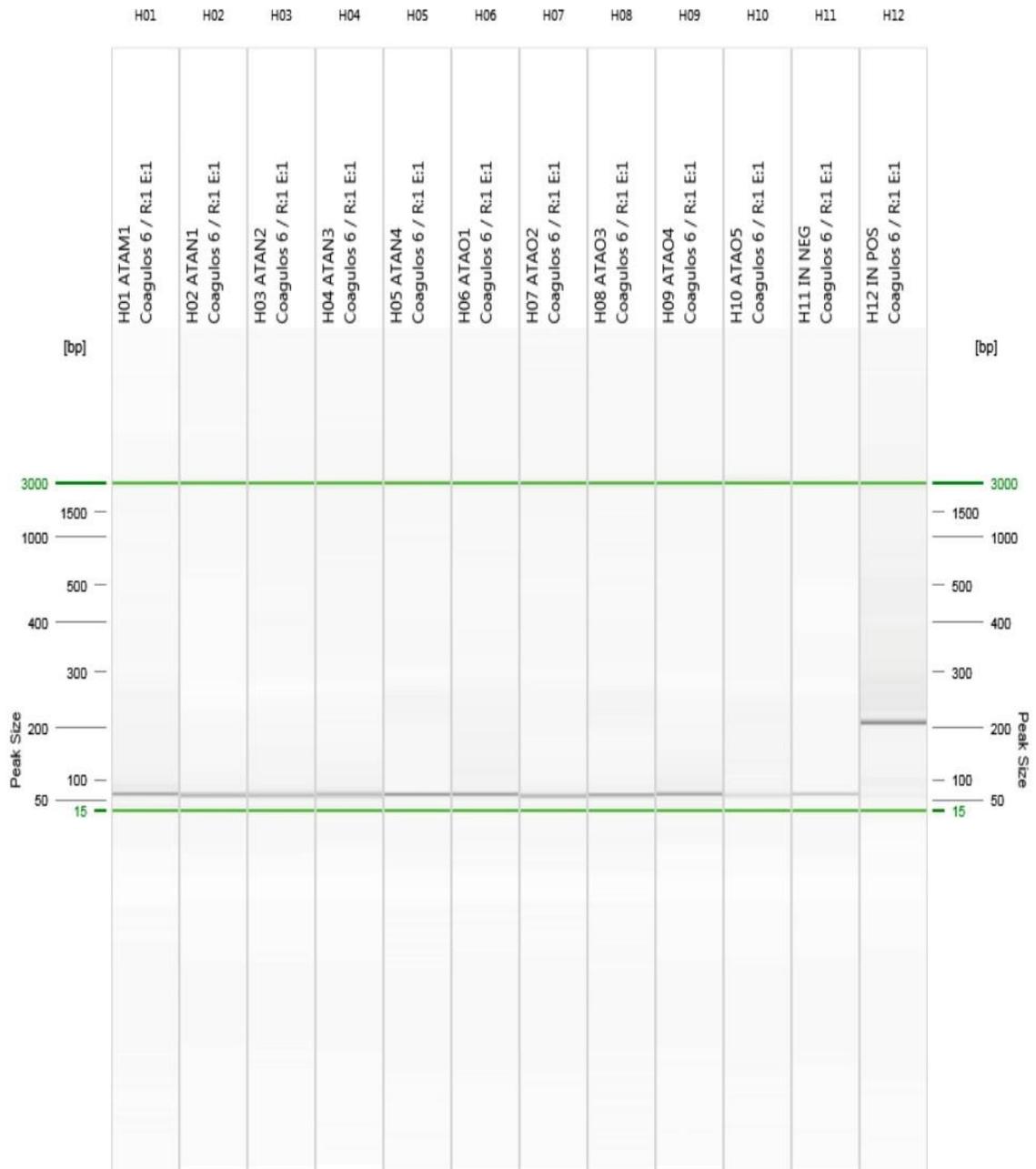


Figura 5: Experimento "Coágulos 6" Resultados negativos del RT-PCR para *Flavivirus* en coágulos de aves (ATAM1, ATAN1, ATAN2, ATAN3, ATAN4, ATAO1, ATAO2, ATAO3, ATAO4, ATAO5). Presencia de control negativo (IN NEG) y control positivo (IN POS).

En el caso de los *Alfavirus*, se utilizó como control positivo la extracción del sobrenadante del cultivo de la vacuna TC83 VEEV. Se realizó RT-PCR en cada una de las 144 mezclas de órganos y 144 coágulos de sangre de los murciélagos, los cuales fueron negativos. También, se obtuvieron resultados negativos cuando se realizó el RT-PCR en cada una de las 140 mezclas de órganos y las 140 muestras de coágulos sanguíneos de las aves. Para cada reacción se corroboró que el control positivo (TC83 VEEV) siempre fuera positivo y el control negativo siempre fuera negativo como ejemplo la Figura 6.

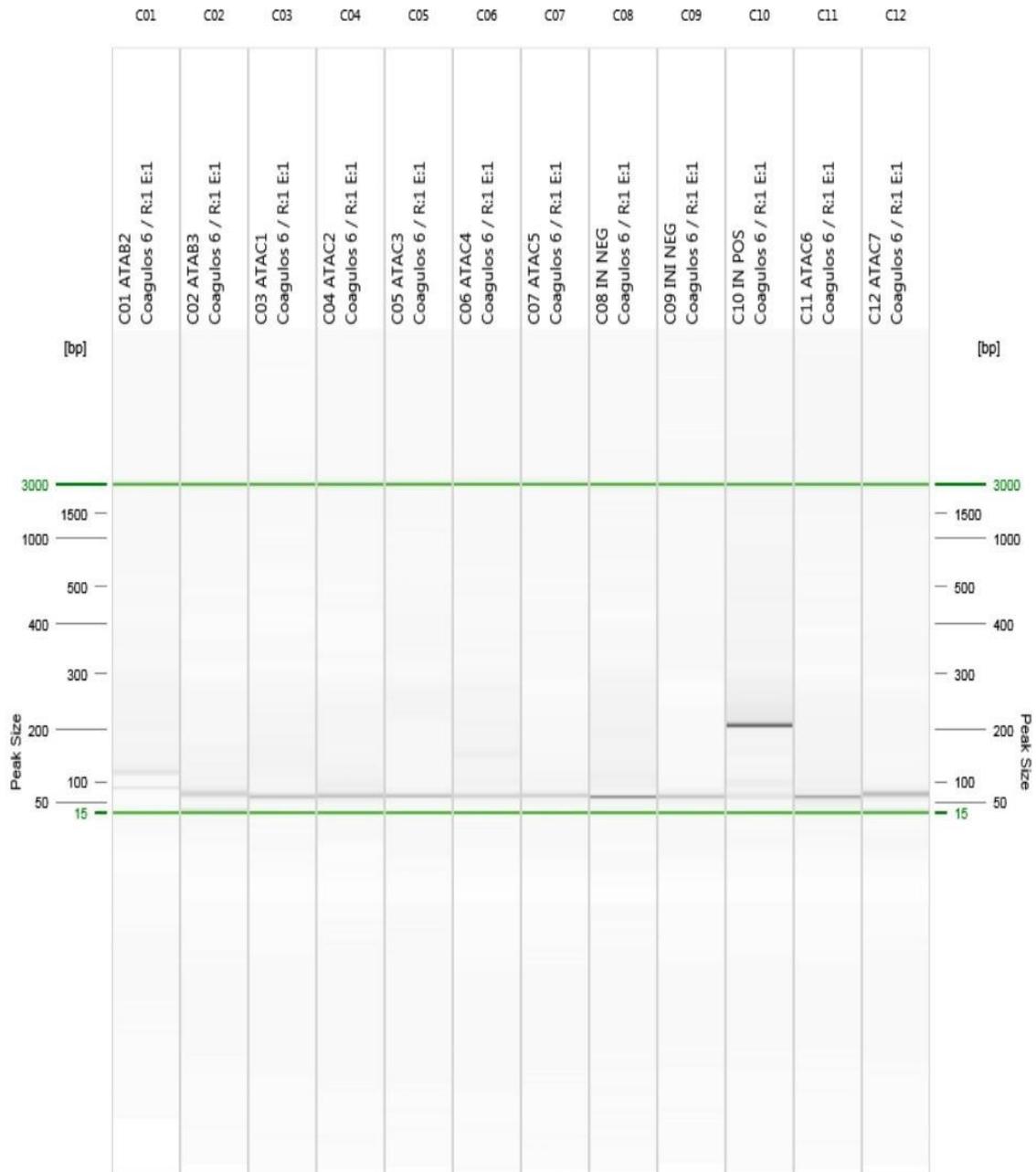


Figura 6: Experimento "Coágulos 6". Resultados negativos en RT-PCR de *Alfavirus*, en coágulos de las aves (ATAB2, ATAB3, ATAC1, ATAC2, ATAC3, ATAC4, ATAC5), con presencia de control negativo (IN NEG) y positivo (IN POS).

Por lo tanto, no se detectó la presencia de ARN viral de *Flavivirus* o *Alfavirus* mediante RT-PCR, realizado en las mezclas de órganos ni coágulos de los animales colectados.

Cuadro 2: Resumen de Resultados 2.

Puntos relevantes

- Todos los RT-PCR realizados en las muestras de sangre y en el pool de órganos resultaron negativos para la detección de ARN de flavivirus y alfavirus.

8.4 Hay evidencia serológica de *Flavivirus* y *Alfavirus* en los murciélagos y aves silvestres colectados en la región del Pacífico Norte y del Caribe Sur.

Utilizando los sueros, se llevó a cabo PRNT contra DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, ZIKV, YFV, SLEV, WNV, EEEV y VEEV a una única dilución (1:10) en el caso de los murciélagos. Los PRNT contra SLEV, WNV, EEEV y VEEV a una única dilución (1:10) en el caso de las aves, porque eran los virus con mayor probabilidad de encontrar, debido a la limitación del suero disponible y la exposición a los vectores ornitofílicos. Con este procedimiento se logró identificar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra los virus en cuestión que evidencia exposición pasada a estos agentes.

En el Anexo 9 se muestra el total de 56 murciélagos que demostraron la presencia de anticuerpos neutralizantes contra uno o varios *Flavivirus*, contra *Flavivirus* y *Alfavirus* o contra un único *Alfavirus*. En esta tabulación se puede apreciar el nombre científico de cada individuo y su peso corporal. Con respecto a la distribución geográfica, como se observa en el Anexo 7, de estos animales, 26 fueron colectados en Santa Cruz y 30 fueron colectados en Talamanca. En la Tabla 9 que se muestra a continuación se exponen estos datos organizados por especie.

Tabla 9: Murciélagos positivos mediante PRNT dilución 1:10 contra *Flavivirus* (DENV-1,2,3,4, ZIKV, YFV, WNV, SLEV) y *Alfavirus* (EEEV, VEEV).

Especie	Número de individuos	Machos	Hembras	Gestante
<i>Glossophaga soricina</i>	6	3	3	0
<i>Desmodus rotundus</i>	2	0	2	0
<i>Uroderma convexum</i>	6	4	2	0
<i>Artibeus phaeotis</i>	5	2	3	0
<i>Sturnira parvidens</i>	1	0	1	0
<i>Artibeus jamaicensis</i>	11	6	5	1
<i>Chiroderma salvini</i>	1	1	0	0
<i>Ptenorotus mesoamericanus</i>	1	0	1	1
<i>Carollia perspicillata</i>	8	4	4	0
<i>Phyllostomus discolor</i>	5	4	1	0
<i>Noctilio albiventris</i>	1	1	0	0
<i>Artibeus lituratus</i>	2	1	1	1
<i>Artibeus watsoni</i>	2	2	0	0
<i>Lonchophylla robusta</i>	1	0	1	0
<i>Myotis nigricans</i>	1	0	1	0
<i>Carollia castanea</i>	2	0	2	0
<i>Rhogeessa io</i>	1	0	1	0

En total, los animales positivos están representados por 17 de las 26 especies colectadas y fueron las siguientes: *Glossophaga soricina*, *Desmodus rotundus*, *Uroderma convexum*, *Artibeus phaeotis*, *Sturnira parvidens*, *Artibeus jamaicensis*, *Chiroderma salvini*, *Ptenorotus mesoamericanus*, *Carollia perspicillata*, *Phyllostomus discolor*, *Noctilio albiventris*, *Artibeus lituratus*, *Artibeus watsoni*, *Lonchophylla robusta*, *Myotis nigricans*, *Carollia castanea* y *Rhogeessa io*, miembros de las familias *Phyllostomidae*, *Noctilionidae*, *Mormoopidae* y *Vespertilionidae*.

En la Tabla 9 se muestra cuáles especies fueron positivas, aquellas con mayor cantidad de individuos capturados fueron las que presentaron mayor seropositividad. Por ejemplo, *Artibeus jamaicensis* fue la especie con más individuos positivos, 11 en total. Las otras dos especies con mayor cantidad de individuos que presentaron anticuerpos neutralizantes fueron *Carollia perspicillata* (8 individuos), *Glossophaga soricina* (6 individuos) y *Uroderma convexum* (6 individuos).

El análisis semicuantitativo para detectar la presencia de anticuerpos por medio de PRNT a una dilución única 1:10 sólo se pudo realizar en 123 de los individuos colectados, debido a que no había suficiente volumen de suero en todas las muestras. Las razones que limitaban la cantidad de suero disponible eran varias; en primer lugar, el tamaño de los animales, aunque el peso de las especies colectadas oscilaba entre los 2 gramos a los 65 gramos, la mayoría no alcanzaba los 20 gramos de peso; en segundo lugar, la sangre coagulaba muy rápidamente, lo cual dificultaba la separación del suero durante la centrifugación; en tercer lugar, el método de eutanasia influía en el escaso volumen, esto debido a que la punción en los músculos dorsales anchos en el caso de los murciélagos y el músculo pectoral en el caso de las aves, producía hemorragias que limitaban el volumen de sangre disponible. Finalmente, la punción intracardiaca favorecía la hemólisis de la sangre. La sangre hemolizada se precipitaba al inactivar el suero en baño maría seco a 56⁰C, antes de realizar las micro neutralizaciones.

En murciélagos, mediante PRNT 1:10, se determinó la presencia de anticuerpos neutralizantes contra DENV-1 en el 34.95% (43/123), DENV-2 en el 16.26% (20/123), DENV-3 en el 5.69% (7/123) y DENV-4 en el 4.87% (6/123) de las muestras. De los demás *Flavivirus*, se identificaron anticuerpos neutralizantes contra YFV en un 0.81% (1/123), WNV en 2.43% (3/123) y SLEV en un 4.87% (6/123). No se identificaron animales positivos contra ZIKV. Con respecto a los *Alfavirus*, los anticuerpos contra EEEV y VEEV fueron detectados en un 7.31% (9/123) de las muestras contra EEEV y 0.81% (1/123) en el caso de VEEV, respectivamente.

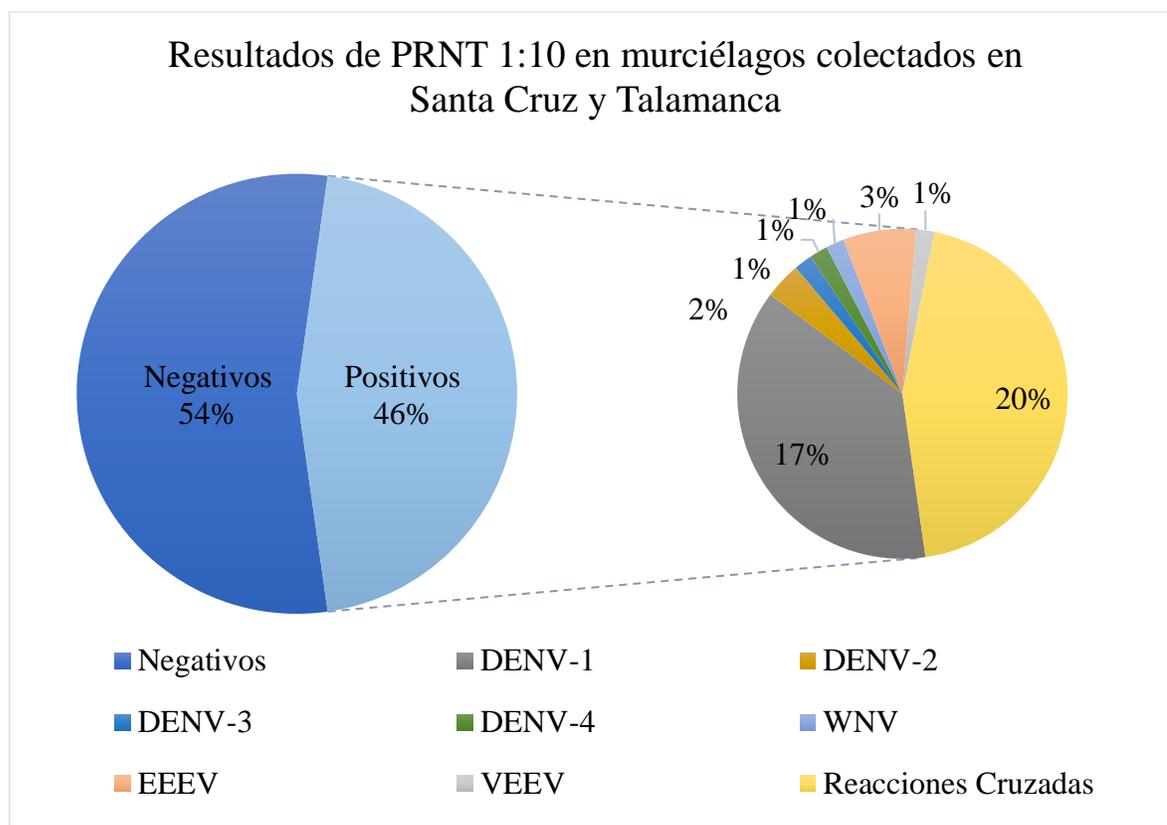
Se determinó la presencia de anticuerpos neutralizantes contra DENV-1 en al menos uno de los individuos de cada una de las especies colectadas. En el caso de DENV-2, las especies con presencia de anticuerpos neutralizantes fueron 8 (*Glossophaga soricina*, *Artibeus jamaicensis*, *Artibeus phaeotis*, *Phyllostomus discolor*, *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata*, *Uroderma convexum* y *Artibeus watsoni*). En el caso de DENV-3, 6 especies demostraron anticuerpos neutralizantes (*Glossophaga soricina*, *Artibeus phaeotis*, *Phyllostomus discolor*, *Artibeus lituratus*, *Artibeus watsoni*, y *Uroderma convexum*). Solamente 5 especies demostraron la presencia de anticuerpos neutralizantes contra DENV-4 (*Desmodus rotundus*, *Artibeus phaeotis*, *Artibeus watsoni*, *Glossophaga soricina*, y *Artibeus jamaicensis*).

Con respecto al resto de *Flavivirus*, la seropositividad contra WNV fue encontrada en 3 especies (*Artibeus jamaicensis*, *Carollia castanea*, *Artibeus phaeotis*), SLEV estuvo presente en 3 especies (*Artibeus phaeotis*, *Artibeus jamaicensis*, *Uroderma convexum*), y sólo una especie presentó anticuerpos neutralizantes contra YFV (*Artibeus jamaicensis*).

Los *Alfavirus* fueron representados con 4 especies positivas para EEEV (*Phyllostomus discolor*, *Noctilio albiventris*, *Artibeus jamaicensis* y *Carollia perspicillata*) y 1 especie en el caso de VEEV (*Carollia perspicillata*).

En la Tabla 10 y en la Figura 7 se representa el fenómeno de reacción cruzada, utilizando una tabla de colores y un gráfico de pastel, respectivamente.

Figura 7: Evidencia de reacción cruzada en anticuerpos neutralizantes contra arbovirus en murciélagos en Talamanca y Santa Cruz.



Como se puede observar en la Tabla 8 y en la Figura 7, solamente 21 (17%) individuos demostraron seropositividad exclusiva contra DENV-1. En el caso de DENV-2, solamente 2 individuos (1.62%) demostraron tener una seropositividad exclusiva. El 0.81% de las muestras (1/123) fueron positivos exclusivamente para DENV-3 y DENV-4. Sólo uno de los casos demostró tener anticuerpos neutralizantes contra WNV (0.81%) y 4 individuos fueron seropositivos exclusivamente para EEEV (3.25%). En el caso del VEEV, sólo un único individuo (0.81%) presentó anticuerpos neutralizantes exclusivos para este virus.

Del mismo modo, en la Tabla 8, se pueden apreciar las diferentes combinaciones que evidencian reacción cruzada contra varios tipos de *Flavivirus*, por ejemplo, 5 individuos (4.06%) fueron positivos contra DENV-1 y DENV-2, 1 individuo (0.81%) para DENV-1 y DENV-3, 1 individuo (0.81%) para DENV-1, DENV-2 y DENV-3. Hay 2 individuos (1.62%), que son seropositivos contra DENV-1, DENV-2 y DENV-4, e igual número para aquellos que son positivos para los 4 serotipos de DENV.

En la Tabla 10, se evidencian combinaciones entre los diferentes *Flavivirus*, no solamente para los serotipos de DENV, sino con otros *Flavivirus* como los son WNV, SLEV y YFV, lo cual evidencia una reacción cruzada.

Mediante el PRNT (1:10), se determinó la presencia de casos positivos contra *Flavivirus* y *Alfavirus*, los cuales se aprecian en la Tabla 8. Un individuo presentó anticuerpos neutralizantes contra DENV-1 y EEEV, otro presentó anticuerpos neutralizantes contra DENV-1-2-3 y EEEV y otro contra DENV-1, DENV-2 y EEEV. No hay ningún individuo que mostrara seropositividad en contra de ambos *Alfavirus* (EEEV y VEEV).

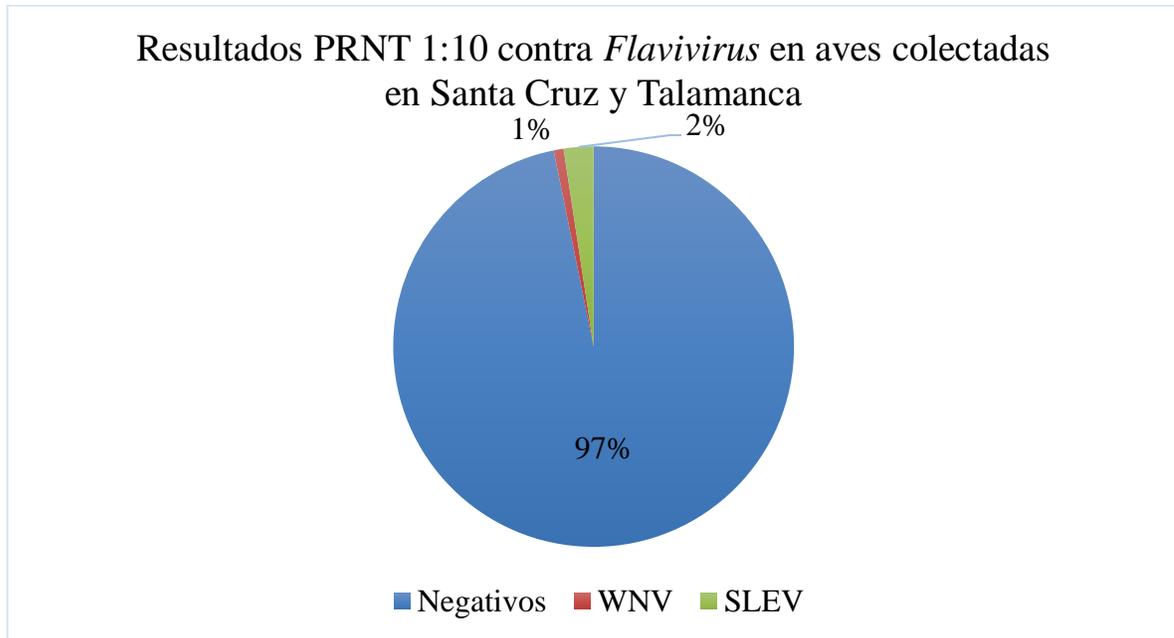
En la Tabla 11 se presenta los resultados de PRNT en aves. Un total de 11 aves presentaron anticuerpos neutralizantes contra *Flavivirus* o *Alfavirus*. En este grupo, 7 (63.63%) de los animales fueron colectados en Santa Cruz y los otros 4 (36.37%) en Talamanca. Las especies positivas fueron las siguientes: *Aimophila ruficauda*, *Turdus grayi*, *Pitangus sulphuratus* (2 individuos), *Quiscalus mexicanus*, *Icterus pustulatus* (2 individuos), *Campylorhynchus rufinucha*, *Crotophaga sulcirostris*, *Myzetetes similis* y *Empidonax virescens*. La mayoría de los individuos eran machos (8/11).

Tabla 11: Aves con presencia de anticuerpos neutralizantes mediante PRNT dilución 1:10 contra *Flavivirus* (WNV, SLEV) y *Alfavirus* (EEEV, VEEV).

ID de la muestra	Especie	Sexo	Resultado PRNT 1:10			
			WNV	SLEV	EEEV	VEEV
ASCA1	<i>Aimophila ruficauda</i>	Macho			■	
ASCD1	<i>Turdus grayi</i>	Macho		■		
ASCI6	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Hembra			■	
ASCK2	<i>Quiscalus mexicanus</i>	Hembra				■
ASCM6	<i>Icterus pustulatus</i>	Macho			■	■
ASCM8	<i>Icterus pustulatus</i>	Macho			■	
ASCM9	<i>Campylorhynchus rufinucha</i>	Hembra	■			
ATAA4	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Macho				■
ATAA8	<i>Crotophaga sulcirostris</i>	Macho			■	
ATAH5	<i>Myozetetes similis</i>	Macho		■		
ATAJ1	<i>Empidonax virescens</i>	Macho		■	■	■

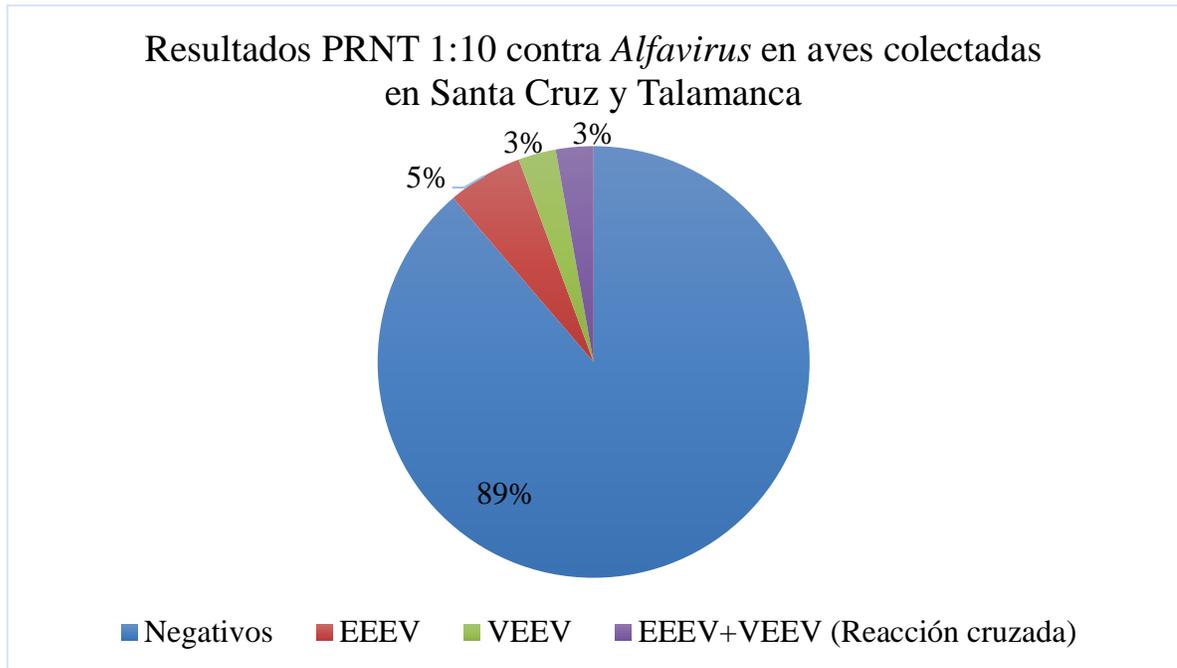
Se llevó a cabo PRNT contra *Flavivirus* a una dilución 1:10 en 124 de los 140 sueros de las aves, debido a que, en algunos casos, la muestra de sangre fue insuficiente. Como se representa en la Figura 8, sólo el 0.80% de los sueros (1/124) presentó anticuerpos neutralizantes contra WNV. Se trata de un *Campylorhynchus rufinucha*, hembra capturada en Santa Cruz. Un 2.41% (3/124) de los sueros presentó anticuerpos neutralizantes contra SLEV, un *Turdus grayi* capturado en Santa Cruz y *Myozetetes similis*, *Empidonax virescens* capturados en Talamanca. Sólo *Empidonax virescens* es un ave migratoria.

Figura 8: Aves capturadas en Santa Cruz y Tlamanca, con presencia de anticuerpos neutralizantes contra *Flavivirus* (WNV y SLEV) mediante PRNT dilución 1:10.



Los PRNT contra *Alfavirus* sólo se llevaron a cabo en 71 de las 140 aves, debido a que la muestra era insuficiente y se había utilizado para las pruebas en *Flavivirus*. En la Figura 9, un 8.45% de las aves (6/71) presentaban anticuerpos neutralizantes contra EEEV, 4 en Santa Cruz (*Aimophila ruficauda*, *Pitangus sulphuratus* y 2 *Icterus pustulatus*) y 2 en Tlamanca (*Crotophaga sulcirostris* y *Empidonax virescens*). Sólo un 5.63% (4/71) presentó anticuerpos neutralizantes contra VEEV, 2 capturados en San Cruz (*Quiscalus mexicanus* y *Icterus pustulatus*) y 2 en Tlamanca (*Pitangus sulphuratus* y *Empidonax virescens*). Dos de las aves presentaron anticuerpos neutralizantes para EEEV y VEEV, un *Icterus pustulatus* de la zona de Santa Cruz y un *Empidonax virescens* de Tlamanca; este último también presentó anticuerpos neutralizantes contra SLEV, por lo que es el único caso que presentó anticuerpos contra *Flavivirus* y *Alfavirus* en las aves.

Figura 9: Aves capturadas en Santa Cruz y Talamanca, con presencia de anticuerpos neutralizantes contra *Alfavirus* (EEEV, VEEV o ambos) mediante PRNT dilución 1:10.



Cuadro 3: Resumen de Resultados 3.

Puntos más relevantes:

- Un 45.52% de los murciélagos muestreados presentaron anticuerpos neutralizantes mediante la prueba de PRNT dilución 1:10 contra al menos un arbovirus (DENV 1, 2, 3, 4, ZIKV, YFV, WNV, SLEV, EEEV, VEEV).
- De los 56 animales seropositivos, 26 provienen de Santa Cruz y 30 de Talamanca.
- Se determinó la presencia de anticuerpos neutralizantes contra DENV-1 en el 34.95%, DENV-2 en el 16.26%, DENV-3 en el 5.69%, DENV-4 en el 4.87%, YFV en un 0.81%, WNV en 2.43%, SLEV en un 4.87%, EEEV en 7.31% y VEEV en 0.81%.
- No se identificaron anticuerpos neutralizantes contra ZIKV.
- De las muestras positivas en murciélagos, un 53.57% presentaron anticuerpos exclusivamente contra un arbovirus, siendo DENV-1 el más común (21 individuos).
- Un 46.42% de los individuos presentaron reacción cruzada entre dos o más tipos de arbovirus, incluyendo *Flavivirus*, *Alfavirus* o ambos.
- Sólo un 3.22% de las aves presentaron anticuerpos neutralizantes contra un *Flavivirus* (1 para WNV y 3 para SLEV).
- Un 11.26% de las muestras de sangre de aves, presentaron anticuerpos neutralizantes contra *Alfavirus* (4 para EEEV, 2 para VEEV y 2 para ambos).
- Sólo un caso de un ave (ATAJ1) proveniente de Talamanca presentó anticuerpos neutralizantes para *Alfavirus* y *Flavivirus* (EEEV, VEEV, SLEV).
- El único caso en aves con anticuerpos neutralizantes para WNV fue colectado en Santa Cruz.

8.5 El estudio histopatológico realizado revela lesiones presentes en 9 sistemas orgánicos en los murciélagos (hepatobiliar, gastrointestinal, hematopoyético, respiratorio, cardiovascular, urinario, reproductor, tegumentario y nervioso) y 5 en aves (hepatobiliar, gastrointestinal, hematopoyético, cardiovascular y urinario).

Los animales con resultados positivos mediante PRNT 1:10 o RT-PCR en la mezcla de órganos y coágulos sanguíneos fueron procesados para su estudio histopatológico. Los tejidos examinados en los murciélagos fueron los siguientes: corazón, hígado, vesícula biliar, pulmón, bazo, riñón, glándula adrenal, tráquea, esófago, estómago, páncreas, intestino delgado, intestino grueso, sistema reproductor, feto, ganglios linfáticos, vejiga urinaria, SNC, ojo, cráneo, médula ósea, cavidad nasal, tiroides, paratiroides, piel, lengua y timo. En total se realizó el estudio histopatológico completo de 56 individuos, más 9 individuos utilizados como control. Los individuos control fueron negativos tanto por PCR como por PRNT a los arbovirus de interés. En el Anexo 10 se muestran los hallazgos histopatológicos más relevantes en cada uno de los casos, en conjunto con los diagnósticos morfológicos.

En total 9 sistemas orgánicos presentaron lesiones. Los sistemas afectados incluyen: sistema hepatobiliar, gastrointestinal, hematopoyético, respiratorio, reproductor, cardiovascular, urinario, tegumentario y nervioso. En la Tabla 12 se presentan los hallazgos histopatológicos encontrados en el sistema hepatobiliar. En total 26 individuos (40%) presentaron lesiones inflamatorias o degenerativas en el hígado. Un total de 11 individuos (16.92%) exhibieron un patrón inflamatorio peri portal con células mononucleares y eosinófilos; de los 11 individuos, 6 eran positivos a DENV-1 (2 de forma exclusiva), 1 de forma exclusiva a DENV-2, un caso positivo a DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Hay 3 individuos con presencia de positividad ante DENV-1/EEEV, DENV-1/SLEV y DENV-1-2/YFV/WNV. Además, la hepatitis peri portal fue evidenciada en dos individuos utilizados como control. En 2 casos (3.07%) se evidenció un patrón inflamatorio con distribución aleatoria linfo-histiocítica y focos de necrosis de los hepatocitos. De estos individuos, uno era un control y el otro tenía una reacción cruzada entre DENV-1 y DENV-2. Un caso (1.53%) presentó necrosis hepática, con infiltrado inflamatorio piogranulomatoso

asociado a la presencia de nemátodos (MSCG14). En 3 de los casos (4.61%) se apreció degeneración hepática vacuolar, los individuos eran positivos a DENV-1, DENV-2 y un control. Sólo un caso (1.53%) presentó lipidosis hepática macro vesicular, y era positivo a DENV-1. Otras lesiones incluyen múltiples lipogranulomas con mineralización irregular y necrosis de la grasa, presentes en 7 individuos (10.76%), los animales eran positivos mediante PRNT a DENV-1, DENV-2, 2 para EEEV, VEEV, WNV y uno tenía reacción cruzada ante DENV-1-4/SLEV. Finalmente, se observó congestión hepática en un caso (1.53%) positivo a DENV-1 y DENV-3 y colecistitis eosinofílica en un caso positivo a EEEV.

Tabla 12: Principales hallazgos histopatológicos en el sistema hepatobiliar presentes en murciélagos positivos por medio de PRNT y RT-PCR, capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.

Diagnósticos morfológicos	# Individuos	Casos	Positividad mediante PRNT 1:10
1. Hepatitis periportal/paracentral o aleatoria linfo-histiocítica con eosinófilos crónico activa leve/moderada.	11	MSCC4	Control
		MSCM3	DENV-1/EEEV
		MSCM6	EEEV
		MSCM7	DENV-1-2-3/EEEV
		MTAB2	DENV-1-2-3-4
		MTAB4	DENV-2
		MTAB7	DENV-1/SLEV
		MTAB10	Control
		MTAG5	DENV-1-2/YFV/WNV
		MTAJ10	DENV-1
MTAK9	DENV-1		
2. Hepatitis necrotizante multifocal linfo-histiocítica con eosinófilos crónico activa moderada.	2	MSCG7	Control
		MTAJ5	DENV-1-2
3. Hepatitis necrotizante pio-granulomatosa con presencia intralesional de nemátodos.	1	MSCG14	DENV-1-2
4. Degeneración vacuolar hepática difusa leve.	3	MSCA6	DENV-2
		MSCB2	Control
		MTAO1	DENV-1
5. Lipidosis hepática macrovesicular leve.	1	MSCF4	DENV-1
6. Lipogranulomas hepáticos y mineralización multifocal hepática con necrosis de la grasa.	7	MSCH1	DENV-1
		MSCL3	VEEV
		MSCM4	EEEV
		MTAK5	DENV-1-4/SLEV
		MTAC2	DENV-2
		MTAJ7	EEEV
		MTAN7	WNV
7. Congestión hepática.	1	MSCD4	DENV-1-3
8. Colecistitis eosinofílica aguda severa.	1	MSCM6	EEEV

En total, 21 animales (32.30%) presentaron lesiones gastrointestinales. En la Tabla 13 se muestran las 7 lesiones inflamatorias encontradas en el tracto gastrointestinal; estas lesiones se extienden desde el esófago hasta el intestino. En el esófago, se encontró la presencia de inflamación eosinofílica en un caso (control) e inflamación linfo-plasmocítica en un caso positivo a DENV-1. En el estómago, dos patrones inflamatorios fueron identificados, 2 individuos (3.07%) presentaron gastritis folicular y eran positivos a DENV-1/EEEV y DENV-1/DENV-2. La segunda lesión inflamatoria en el estómago era gastritis eosinofílica aguda leve y se presentó en 3 casos (4.61%), uno de ellos era un caso control, los demás estaban positivos a EEEV. En el intestino, las lesiones se identificaron en intestino delgado y grueso. En un caso control se evidenció una enteritis necrotizante transmural, mientras que en un caso positivo a DENV-2, se observó una enteritis hemorrágica, necrotizante y neutrofílica. La lesión más frecuente en el estudio histopatológico del intestino fue la enteritis linfo-plasmocítica con eosinófilos de leve a moderada. Esta fue evidenciada en 15 individuos (23.07%). Tres de los individuos eran controles: los otros 12 fueron positivos mediante PRNT 1:10 a los arbovirus de interés, 5 eran positivos de forma exclusiva a DENV-1, 1 fue positivo para SLEV/EEEV, 1 para EEEV, otro para DENV-1/EEEV, 1 para 2 serotipos de DENV (1-2), 1 para tres serotipos de DENV (1-3) y EEEV y otro para los 4 serotipos de DENV. Sólo uno de los individuos con estas lesiones presentó una seropositividad ante DENV-1, DENV-2, YFV y WNV.

Tabla 13: Principales hallazgos histopatológicos en el sistema gastrointestinal presentes en murciélagos positivos por medio de PRNT y RT-PCR, capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.

Diagnósticos morfológicos	# Individuos	Casos	Positividad mediante PRNT 1:10
1. Esofagitis eosinofílica aguda leve.	1	MSCC4	Control
2. Esofagitis linfo-plasmocítica focal leve crónica.	1	MTAN5	DENV-1
3. Gastritis folicular.	2	MSCM3	DENV-1/EEEV
		MTAB8	DENV-1-2
4. Gastritis eosinofílica aguda leve.	3	MSCB2	Control
		MSCM4	EEEV
		MSCM6	EEEV
5. Enteritis neutrofílica y eosinofílica necrotizante transmural aguda moderada.	1	MSCB3	Control
6. Enteritis hemorrágica, necrotizante, neutrofílica, aguda severa.	1	MSCA6	DENV-2
7. Enteritis linfo-plasmocítica con eosinófilos crónico activa leve/moderada.	15	MSCB2	Control
		MSCC4	Control
		MSCG14	DENV-1-2
		MSCJ1	DENV-1
		MSCM3	DENV-1/EEEV
		MSCM6	EEEV
		MSCM7	DENV-1-2-3/EEEV
		MTAB10	Control
		MTAC4	DENV-1-2-3-4
		MTAD3	DENV-1
		MTAG5	DENV-1-2/YFV/WNV
		MTAJ10	DENV-1
		MTAK9	DENV-1
MTAM7	DENV-1		
MTAG7	SLEV/EEEV		

Las lesiones histopatológicas en el sistema hematopoyético estuvieron presentes en 12 individuos (18.46%) y están enumeradas en la Tabla 14. La lesión más frecuente fue la hiperplasia folicular esplénica, representada en 7 individuos (10.76% del total de los casos).

De estos animales, 3 eran controles. De los otros 4, 2 eran positivos contra DENV-1, 1 contra DENV-4 y 1 contra EEEV. Los ganglios linfáticos ubicados en la raíz mesentérica fueron evaluados. Los cambios histológicos presentes incluyen histiocitosis sinusal presente en 2 casos (3.07%) positivos a DENV-4 y DENV-1/DENV-2/DENV-3. La otra lesión evaluada en los ganglios linfáticos es la hiperplasia folicular, evidenciada en sólo un caso (MSCA6) positivo a DENV-2. En el bazo se observa la hematopoyesis extramedular en un caso positivo a EEEV, esplenitis eosinofílica y supurativa (positivo a DENV-1) y congestión esplénica (positivo a DENV-1 y EEEV).

Tabla 14: Principales hallazgos histopatológicos en el sistema hematopoyético presentes en murciélagos positivos por medio de PRNT y RT-PCR, capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.

Diagnósticos morfológicos	# Individuos	Casos	Positividad mediante PRNT 1:10
1. Hiperplasia folicular esplénica.	7	MSCB3	Control
		MSCC4	Control
		MSCF3	DENV-4
		MTAB10	Control
		MTAE1	EEEV
		MTAJ10	DENV-1
		MTAN5	DENV-1
2. Histiocitosis sinusal del ganglio linfático mesentérico.	2	MSCF3	DENV-4
		MSCL9	DENV-1-2-3
3. Hiperplasia folicular del Ganglio linfático mesentérico.	1	MSCA6	DENV-2
4. Hematopoyesis extramedular esplénica.	1	MTAE1	EEEV
5. Esplenitis neutrofílica y eosinofílica aguda moderada.	1	MSCI3	DENV-1
6. Congestión esplénica.	1	MSCN3	DENV-1/EEEV

En la tabla 15 se observa que solamente 5 animales (7.69%) presentaron lesiones en el sistema respiratorio. En el pulmón, 1 individuo presentó neumonía neutrofílica intersticial positivo a DENV-1, en 3 casos la neumonía fue granulomatosa. Estos individuos fueron

positivos a DENV-1, DENV-2 y el último a los 4 serotipos de DENV. Sólo en un caso, la tráquea presentó una moderada inflamación crónica y era positivo para DENV-2.

Tabla 15: Principales hallazgos histopatológicos en el sistema respiratorio presentes en murciélagos positivos por medio de PRNT y RT-PCR, capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.

Diagnósticos morfológicos	# Individuos	Casos	Positividad mediante PRNT 1:10
Neumonía neutrofílica intersticial aguda moderada.	1	MSCI3	DENV-1
Neumonía granulomatosa focal con antracosis	3	MSCJ1	DENV-1
		MSCO7	DENV-2
		MTAB2	DENV-1-2-3-4
Traqueítis linfo-plasmocítica crónica moderada.	1	MSCO7	DENV-2

En la Tabla 16 se presentan los 7 casos (10.76%) con lesiones en el sistema cardiovascular. Solamente un caso presentó inflamación linfo-histiocítica en el miocardio. Este era positivo mediante PRNT a DENV-1. La otra lesión presente en el corazón fue la infiltración grasa del miocardio, presente en 3 animales (4.61%). Estos individuos eran positivos para DENV-1, EEEV y 1 era positivo para 3 serotipos de DENV (1-2-3) y EEEV.

La última lesión evaluada en el sistema cardiovascular se presentó en las arterias pulmonares, se trata de una arteritis eosinofílica multifocal con hipertrofia miointimal. Esta lesión fue observada en 3 casos (4.61%), de los cuales uno era control y los otros presentaban anticuerpos neutralizantes contra EEEV y DENV-1/DENV-2.

Tabla 16: Principales hallazgos histopatológicos en el sistema cardiovascular presentes en murciélagos positivos por medio de PRNT y RT-PCR, capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.

Diagnósticos morfológicos	# Individuos	Casos	Positividad mediante PRNT 1:10
Miocarditis focal linfo-histiocítica crónica leve.	1	MTAA1	DENV-1
Infiltración grasa en miocardio.	3	MSCF1	DENV-1
		MSCM4	EEEV
		MSCM7	DENV-1-2-3/EEEV
Arteritis eosinofílica multifocal con hipertrofia miointimal.	3	MSCC4	Control
		MSCM6	EEEV
		MSCO6	DENV-1-2

Solamente 4 individuos presentaron lesiones en el tracto reproductivo. Las lesiones fueron evidenciadas en 3 hembras y 1 macho. En la Tabla 17 se muestran las lesiones en el sistema reproductivo presentes en el 6.15% de los animales procesados. Sólo un individuo fue seropositivo a EEEV mediante PRNT y presentó inflamación prostática. Una hembra presentó secreción supurativa en el útero y era positiva a DENV-1. Otra hembra presentó el mismo tipo de secreción en el cérvix y tenía positividad cruzada para DENV-1 y DENV-3. Por último, un caso de una hembra preñada presentó focos de mineralización distrófica en la placenta sin alteraciones en el feto; este caso (MTAH4) presentaba anticuerpos neutralizantes en contra de DENV-1 y SLEV.

Tabla 17: Principales hallazgos histopatológicos en el sistema reproductivo presentes en murciélagos positivos por medio de PRNT y RT-PCR, capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.

Diagnósticos morfológicos	# Individuos	Casos	Positividad mediante PRNT 1:10

Prostatitis necrotizante supurativa con espermatocelo y granuloma espermático.	1	MSCM4	EEEV
Secreción uterina supurativa.	1	MTAD3	DENV-1
Cervicitis supurativa aguda severa.	1	MSCD4	DENV-1-3
Mineralización distrófica en la placenta.	1	MTAH4	DENV-1-2/SLEV

Un 6.15% de los individuos mostraron lesiones en el sistema urinario. En la Tabla 18 se muestran las dos lesiones halladas, la primera nefritis intersticial linfo-plasmocítica multifocal crónica leve, presente en dos individuos seropositivos a DENV-1 y DENV-1/EEEV. La segunda lesión es la urolitiasis renal presente en 2 individuos (3.07%) con presencia de anticuerpos neutralizantes contra DENV-1.

Tabla 18: Principales hallazgos histopatológicos en el sistema urinario presentes en murciélagos positivos por medio de PRNT y RT-PCR, capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.

Diagnósticos morfológicos	# Individuos	Casos	Positividad mediante PRNT 1:10
Nefritis linfo-plasmocítica intersticial multifocal crónica leve.	2	MSCM3	DENV-1/EEEV
		MTAJ10	DENV-1
Urolitiasis renal	2	MSCH1	DENV-1
		MTAN9	DENV-1

Se evidencian lesiones en el sistema tegumentario y el SNC. Sólo un caso control exhibió la presencia de un Papiloma escamoso en el plano nasal, el caso MSCG7 (*Artibeus jamaicensis*). Este animal era un caso control. El caso MSCI3 fue el único con evidencia de una leve meningitis linfo-histiocítica focal con escasos eosinófilos. Este caso también presentó una esplenitis neutrofílica y eosinofílica y una neumonía neutrofílica intersticial. Estos hallazgos fueron representados en las Tablas 14 y 15.

En 18 de los animales procesados (27.69%) se observan agentes etiológicos, los cuales son parásitos (metazoarios y protozoarios) en el tracto gastrointestinal, hígado y/o

vesícula biliar, con lesiones inflamatorias asociadas (necrosis hepática en 1 caso y enteritis eosinofílica en 4 casos). En la Tabla 19 se observa la distribución de los parásitos en cada órgano.

Tabla 19: Cantidad de murciélagos capturados en Santa Cruz y Talamanca con presencia de parásitos (metazoarios y protozoarios) en cada órgano.

Metazoarios y protozoarios	# Individuos	Casos	Positividad mediante PRNT 1:10
Nemátodos en el esófago.	1	MSCN3	DENV-1/EEEEV
Céstodos en estómago.	1	MTAJ3	DENV-1
Nemátodos en el hígado	1	MSCG14	DENV-1-2
Tremátodos en vesícula biliar	1	MTAD3	DENV-1
Céstodos en intestino.	4	MSCM4	EEEEV
		MTAH2	DENV-1-2-3/SLEV
		MTAM7	DENV-1
		MTA07	DENV-1
Tremátodos en intestino	8	MSCL3	VEEV
		MTAB7	DENV-1/SLEV
		MTAD3	DENV-1
		MTAG1	Control
		MTAJ5	DENV-1-2
		MTAL3	DENV-1
		MTAM1	DENV-1
MTAN7	WNV		
Nemátodos en intestino.	3	MSCM7	DENV-1-2-3/EEEEV
		MSCN3	DENV-1/EEEEV
		MTAN9	DENV-1
Coccidios en intestino.	2	MSCF5	DENV-1
		MSCM3	DENV-1/EEEEV

En las siguientes Figuras 10 a 19 se ilustran los principales hallazgos histopatológicos encontrados en los tejidos de murciélagos analizados.

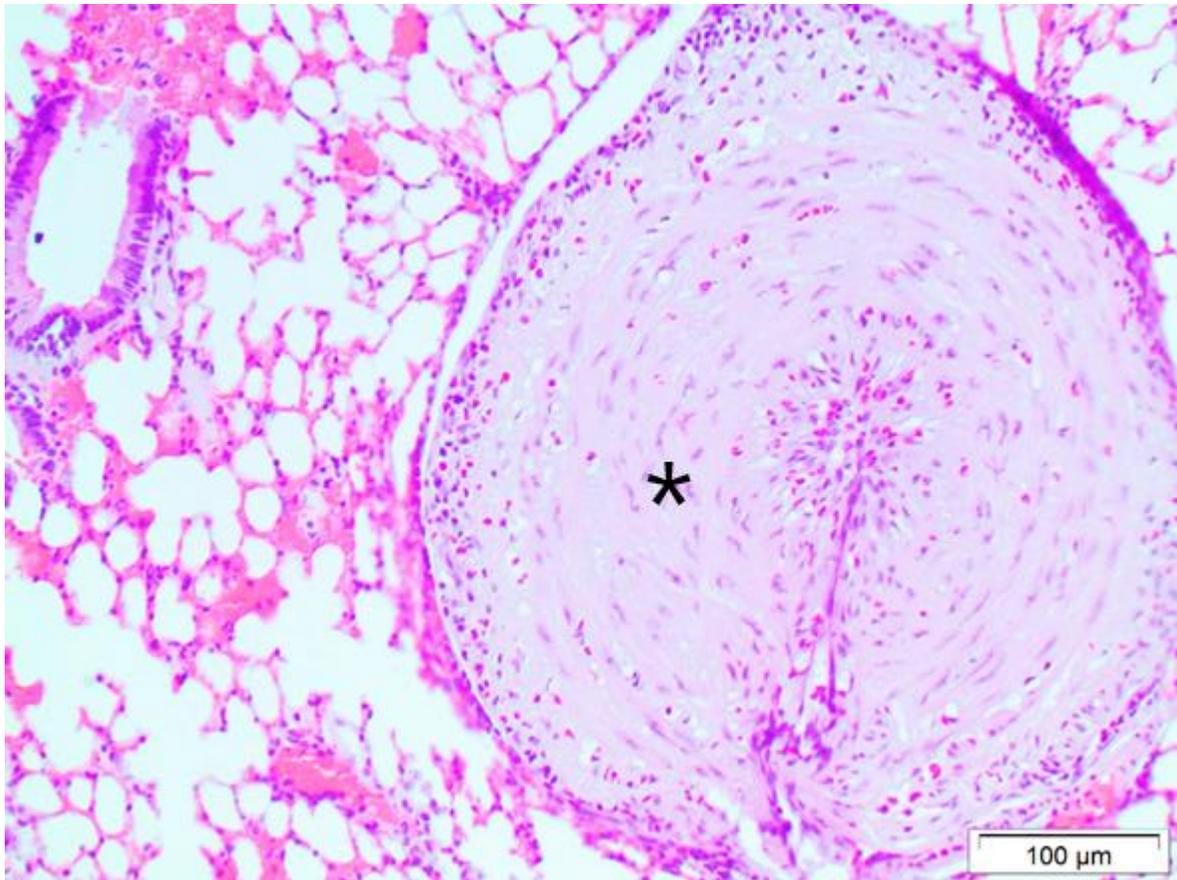


Figura 10: Pulmón, *Phyllostomus discolor* (MSCC4). Marcada hipertrofia de la túnica íntima y media de la arteria pulmonar (*asterisco*) con un moderado infiltrado inflamatorio compuesto por eosinófilos y linfocitos. Arteritis eosinofílica e hipertrofia miointimal. Tinción H&E. 200X.

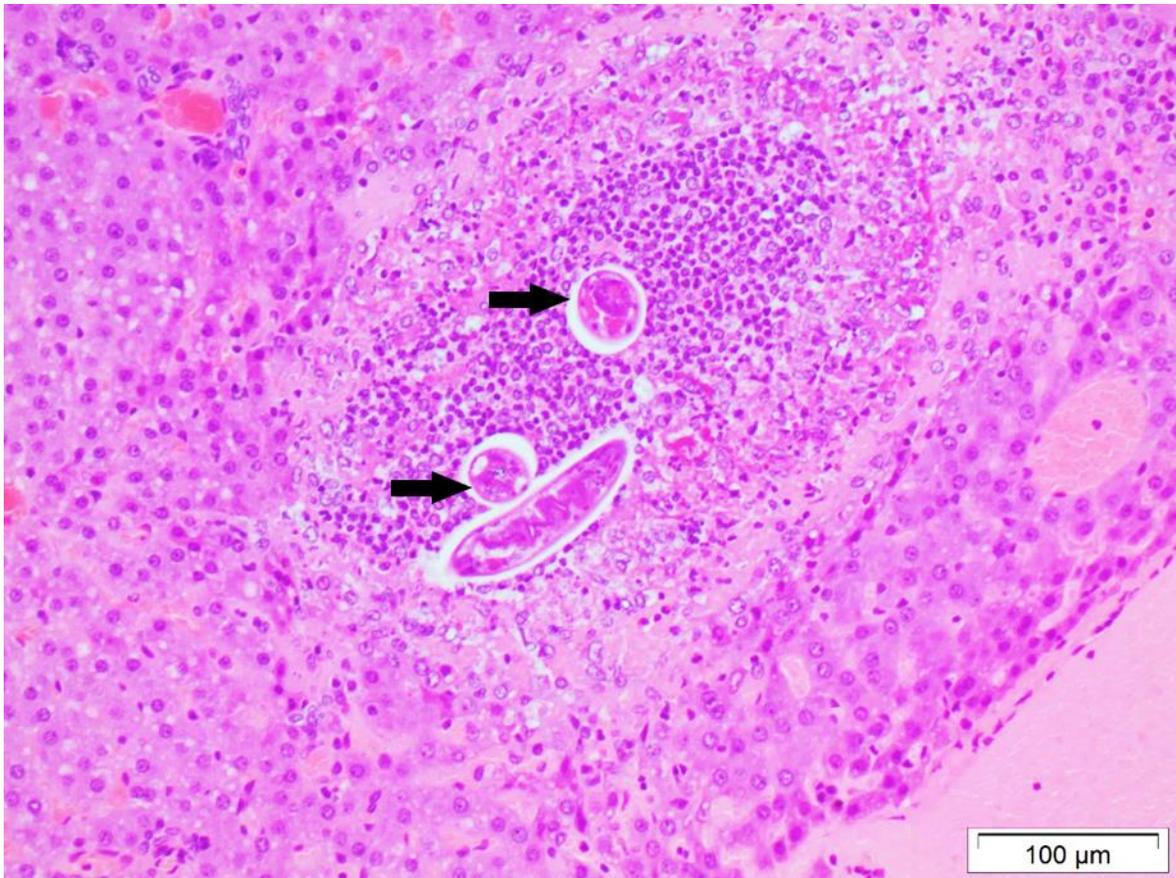


Figura 11: Hígado, *Artibeus jamaicensis* (MSCG14). Presencia de un infiltrado inflamatorio focal, piogranulomatoso, con necrosis del parénquima hepático y presencia intralesional de nemátodos (*flechas*). Hepatitis piogranulomatosa y necrotizante multifocal crónico activa severa. Tinción H&E. 200X.

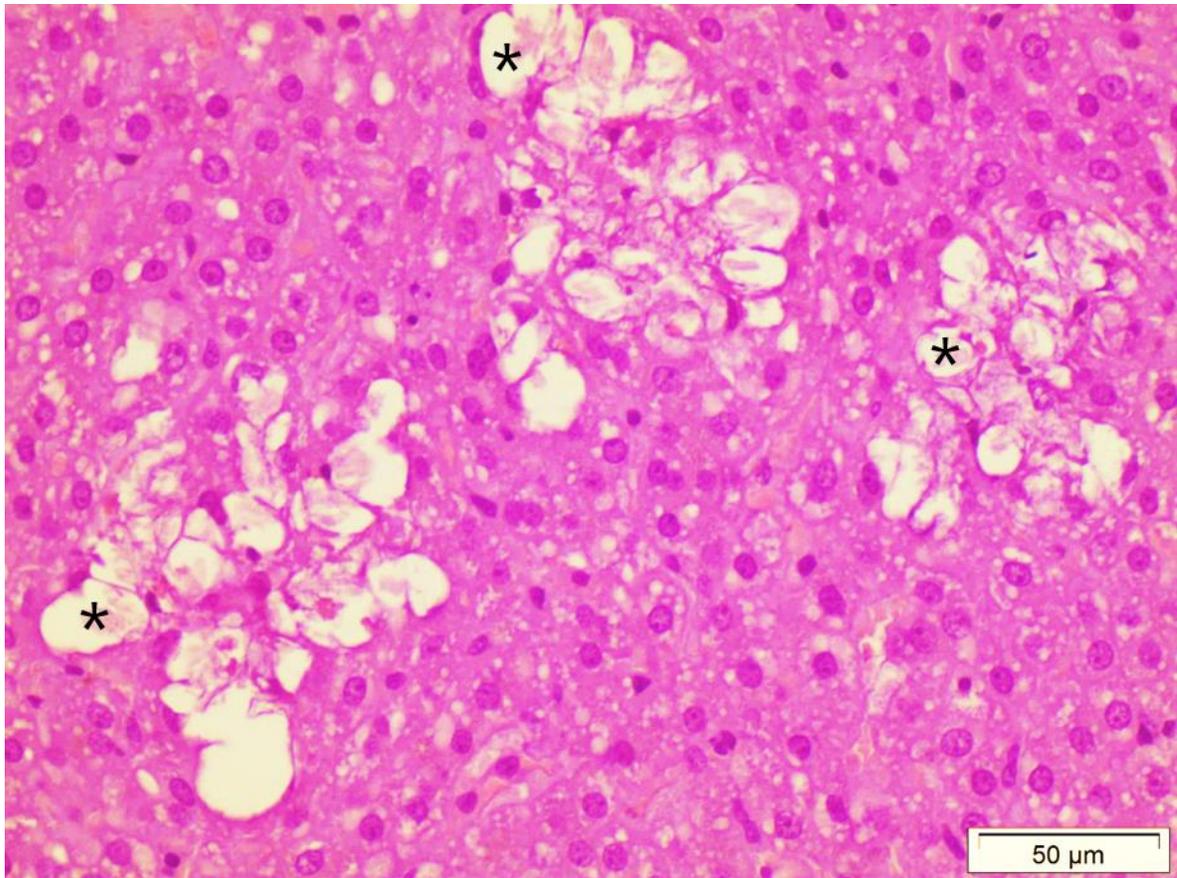


Figura 12: Hígado, *Artibeus jamaicensis* (MSCH1), focos de mineralización (asteriscos) asociado a las necrosis de la grasa (Lipogranulomas hepáticos). Tinción H&E. 400X.

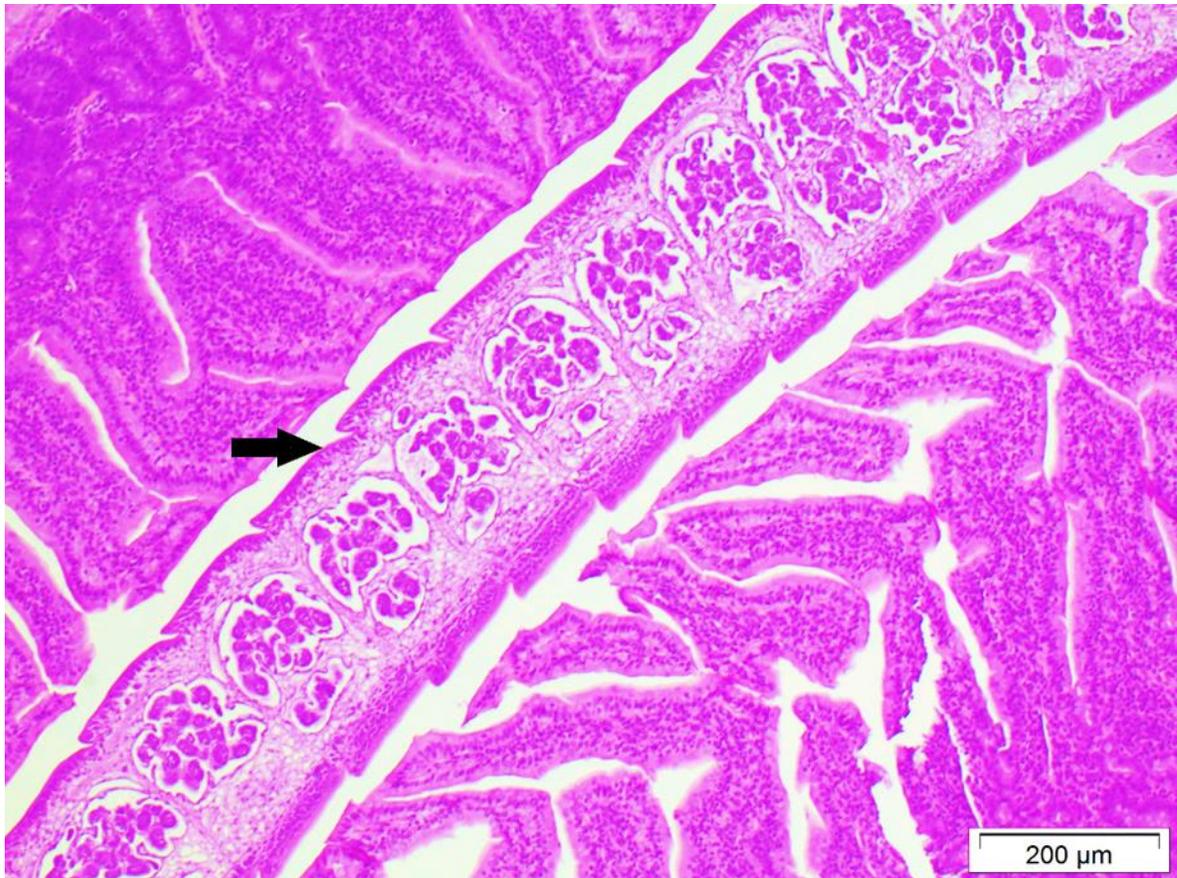


Figura 13: Intestino delgado (yeyuno), *Phyllostomus discolor* (MSCM4). Presencia de un cestodo en el lumen intestinal (*flecha*). Tinción H&E. 100X.

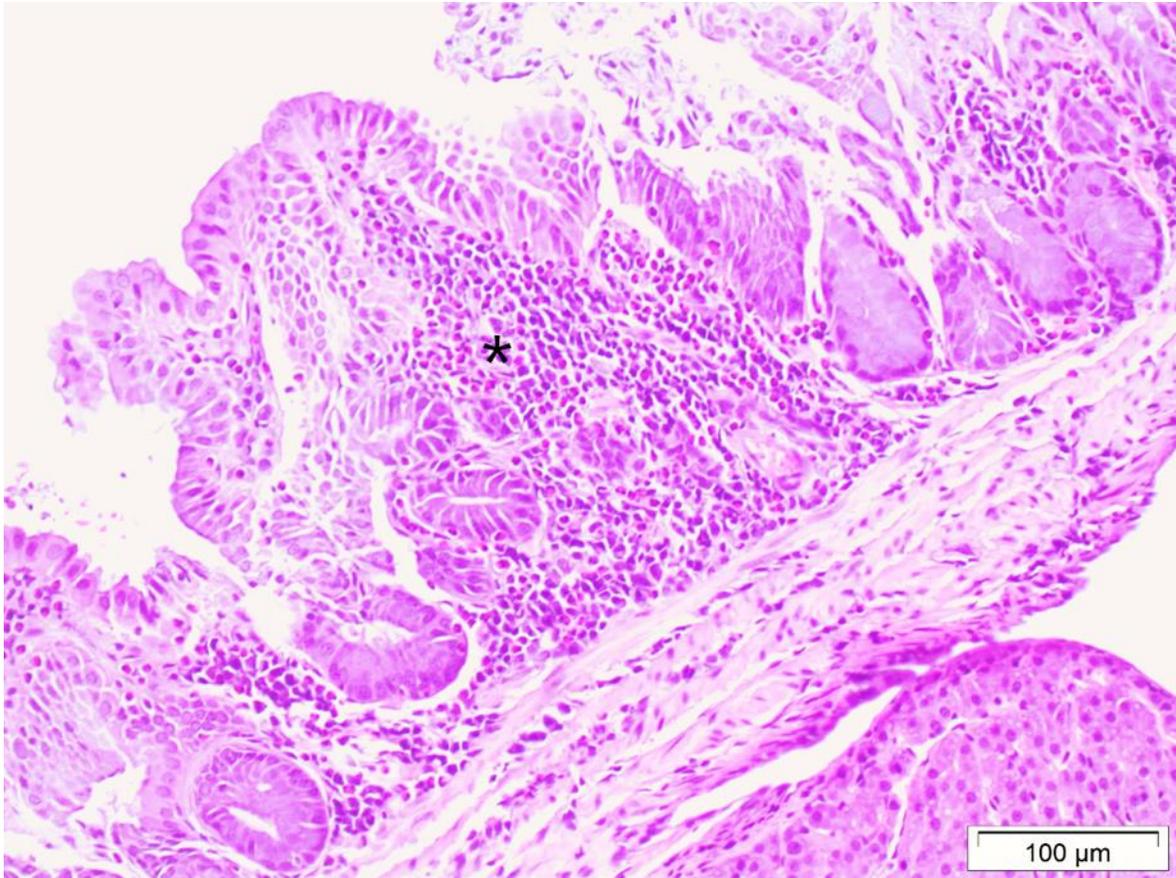


Figura 14: Vesícula biliar, *Phyllostomus discolor* (MSCM6). Presencia de un infiltrado inflamatorio severo compuesto por linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos en lamina propia de la mucosa (*asterisco*). Colecistitis linfo-plasmocítica eosinofílica crónico activa severa. Tinción H&E. 200X.

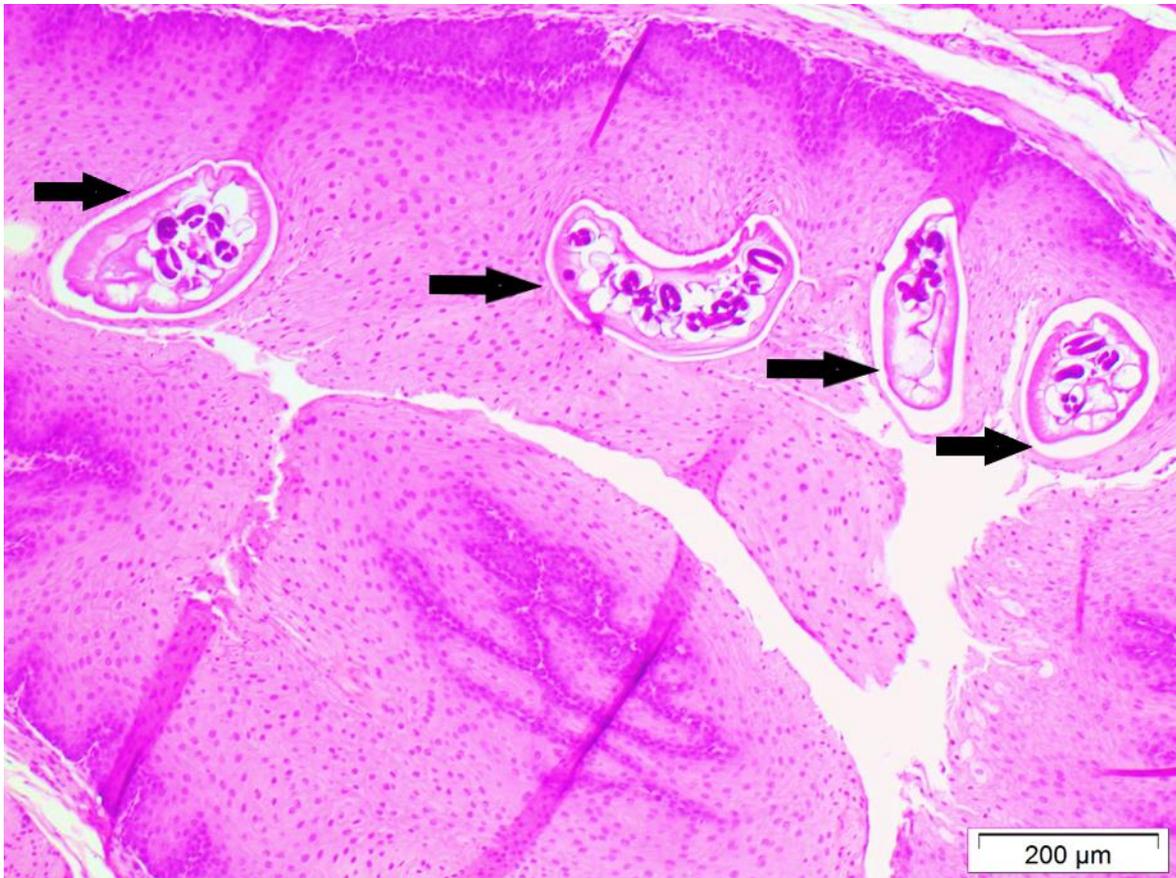


Figura 15: Esófago, *Noctilio albiventris* (MSCN3). Presencia de múltiples nemátodos embebidos en el epitelio plano estratificado queratinizado (*flechas*), con hiperplasia del estrato espinoso. Tinción H&E. 100X.

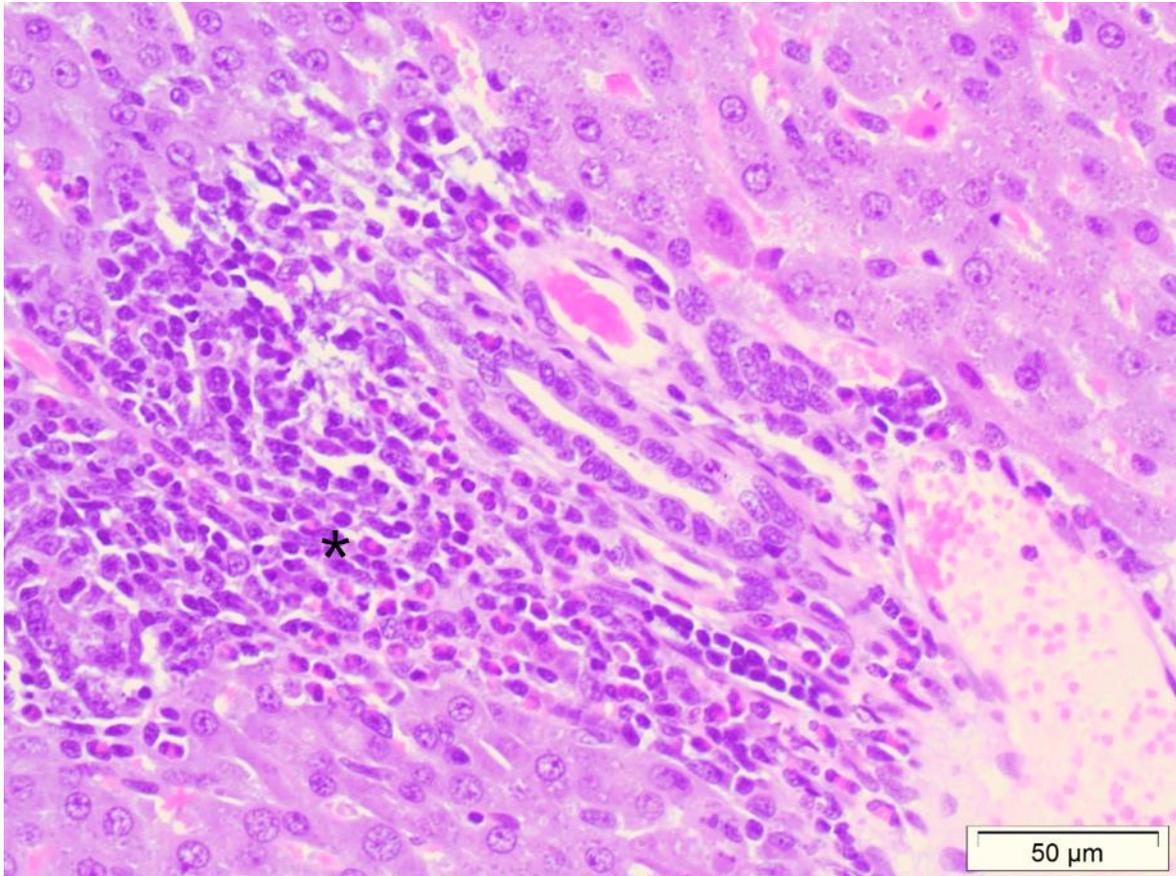


Figura 16: Hígado, *Artibeus watsoni* (MTAB2). Infiltrado inflamatorio periportal compuesto por linfocitos, histiocitos, células plasmáticas y eosinófilos (*asterisco*). Hepatitis periportal linfo-histio-plasmocítica con eosinófilos, crónico activa moderada. Tinción H&E. 400X.

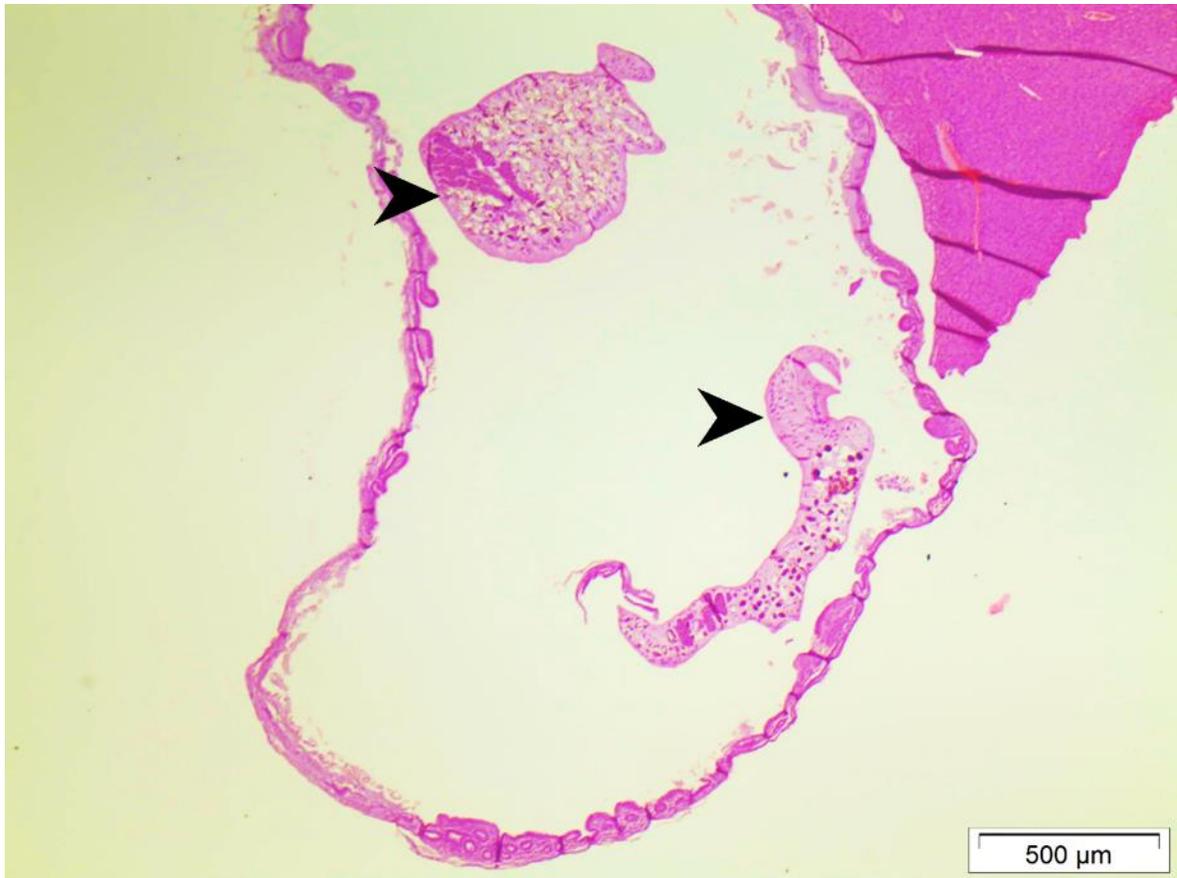


Figura 17: Vesícula biliar, *Lonchophylla robusta* (MTAD3). Presencia de tremátodos en el lumen de la vesícula biliar (*flechas con punta*) sin inflamación asociada. Tinción H&E. 40X.

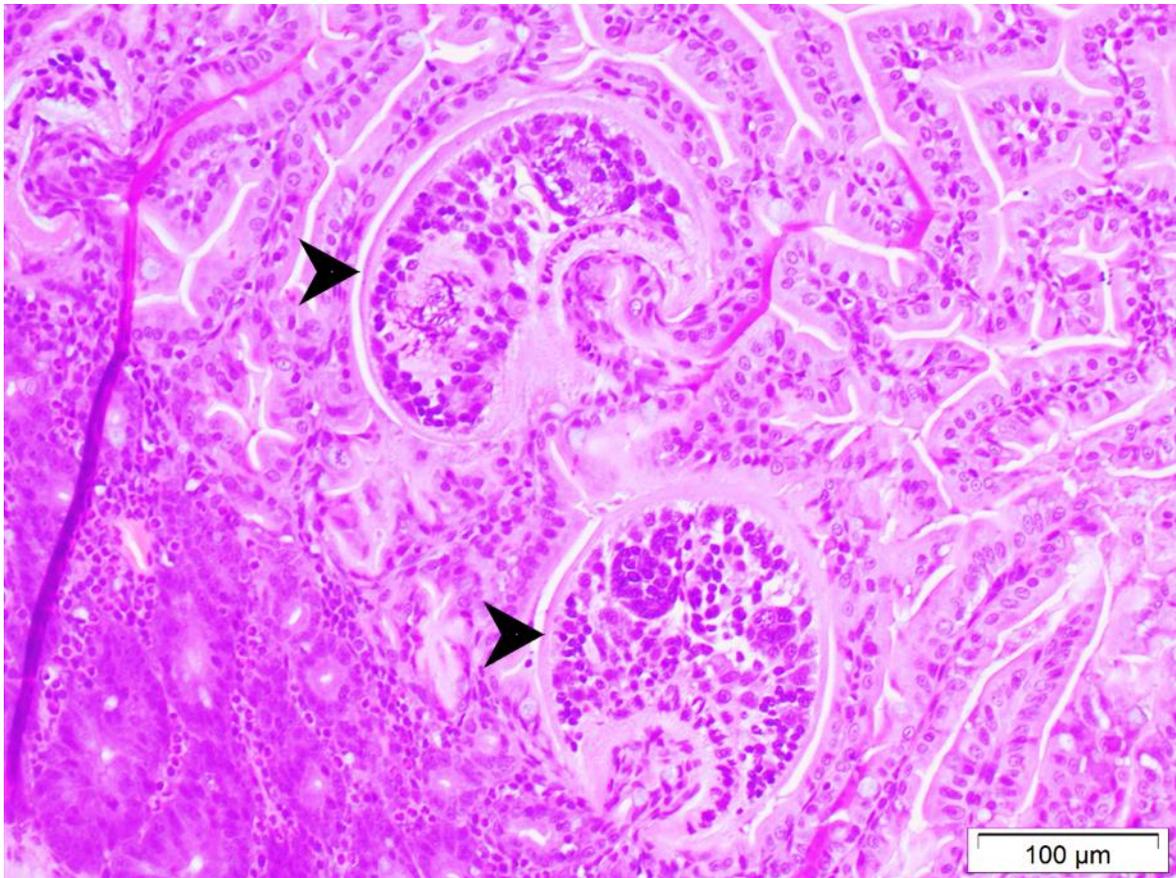


Figura 18: Intestino delgado (yeyuno), *Lonchophylla robusta* (MTAD3). Múltiples céstodos anclados en las vellosidades intestinales (*flechas con punta*). Tinción H&E. 200X.

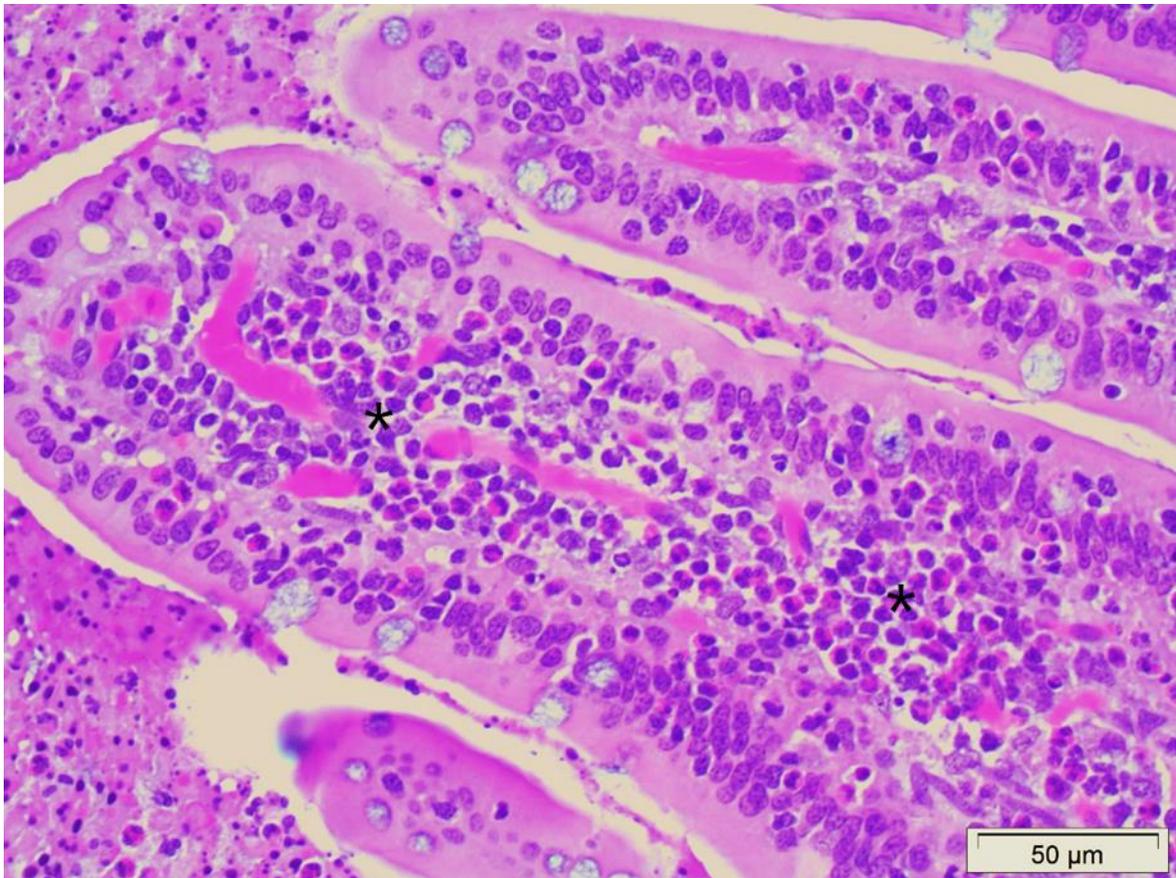


Figura 19: Yeyuno, *Artibeus jamaicensis* (MTAK9). En lamina propia hay un infiltrado compuesto por linfocitos, células plasmáticas y abundantes eosinófilos (15-20 células por campo de alto poder (400X)) (*asteriscos*). Enteritis linfo-plasmocitaria con eosinófilos crónico activa moderada. Tinción H&E. 400X.

Las aves que presentaron evidencia serológica (PRNT 1:10) o molecular (RT-PCR) de arbovirus fueron procesadas para su estudio histopatológico. Los órganos examinados incluyen: corazón, vesícula biliar, hígado, sacos aéreos, pulmón, bazo, riñón, tráquea, esófago, proventrículo, ventrículo, páncreas, duodeno, intestino delgado, intestino grueso, sistema reproductor (ovarios, testículos, oviducto), glándula adrenal, ganglios linfáticos, SNC, piel, cloaca, Bursa de Fabricio, Tiroides y médula ósea. En el Anexo 11 y en la Tabla 20 se presentan los hallazgos histológicos más relevantes y los diagnósticos morfológicos. Las aves presentaron lesiones histológicas en 5 sistemas orgánicos: hepatobiliar,

gastrointestinal, hematopoyético, respiratorio, cardiovascular y urinario. También, al igual que en murciélagos, hay evidencia de parásitos (protozoarios y metazoarios).

Tabla 20: Diagnósticos morfológicos presentes en aves positivas por PRNT capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.

Caso	Diagnóstico morfológico	Positividad PRNT 1:10
ASCD1	Hepatitis hiliar linfo-plasmocítica con heterófilos (celomitis o peritonitis heterofílica). Neumonía linfo-plasmocítica con heterófilos perivascular e intersticial crónico activa moderada. Nefritis intersticial linfocitaria crónica leve. Duodenitis heterofílica aguda leve. <i>Sarcocystis</i> spp. en músculo esquelético de la cloaca.	SLEV
ASCD2	Miocarditis, neumonía, hepatitis y esplenitis histiocítica multifocal crónica moderada. Colitis linfo-plasmocítica con heterófilos crónico activa leve.	Control
ASCI6	Microfilariasis sistémica. <i>Sarcocystis</i> spp. en músculo esquelético.	EEEV
ASCK2	Focos de mineralización secundaria a necrosis de la grasa. Antracosis pulmonar. Nefritis intersticial mononuclear (linfo-histio-plasmocítica) crónica moderada. Duodenitis necrotizante aguda severa con presencia de protozoarios.	VEEV
ASCM6	Miocarditis y neumonía linfo-histio-plasmocítica asociada a la presencia intralesional de protozoarios. Traqueítis fibrina supurativa asociada a <i>Sternostoma tracheacolum</i> . Protozoarios en el intestino.	EEEV VEEV
ASCM8	Miocarditis y endocarditis linfo-histio-plasmocítica crónica moderada con presencia de protozoarios. Focos de mineralización hepática asociados a la necrosis de la grasa. Neumonía intersticial focal linfo-histio-plasmocítica, con presencia de células gigantes y protozoarios. Protozoarios en la mucosa intestinal.	EEEV
ASCM9	Hemosiderosis esplénica.	WNV
ATAA4	Focos de mineralización hepática secundarios a la necrosis de la grasa. Antracosis pulmonar.	VEEV
ATAA8	Hepatitis granulomatosa y necrotizante con presencia intralesional de filarias. Nefritis intersticial mononuclear crónico leve. Nemátodos en lumen intestinal.	EEEV
ATAH5	Degeneración vacuolar hepática. Céstodos en el duodeno.	SLEV
ATAJ1	Leve lipidosis hepática. Céstodos en el duodeno.	SLEV EEEV VEEV

En las Figuras de la 20 a la 27 se muestran las principales lesiones histopatológicas en las aves.

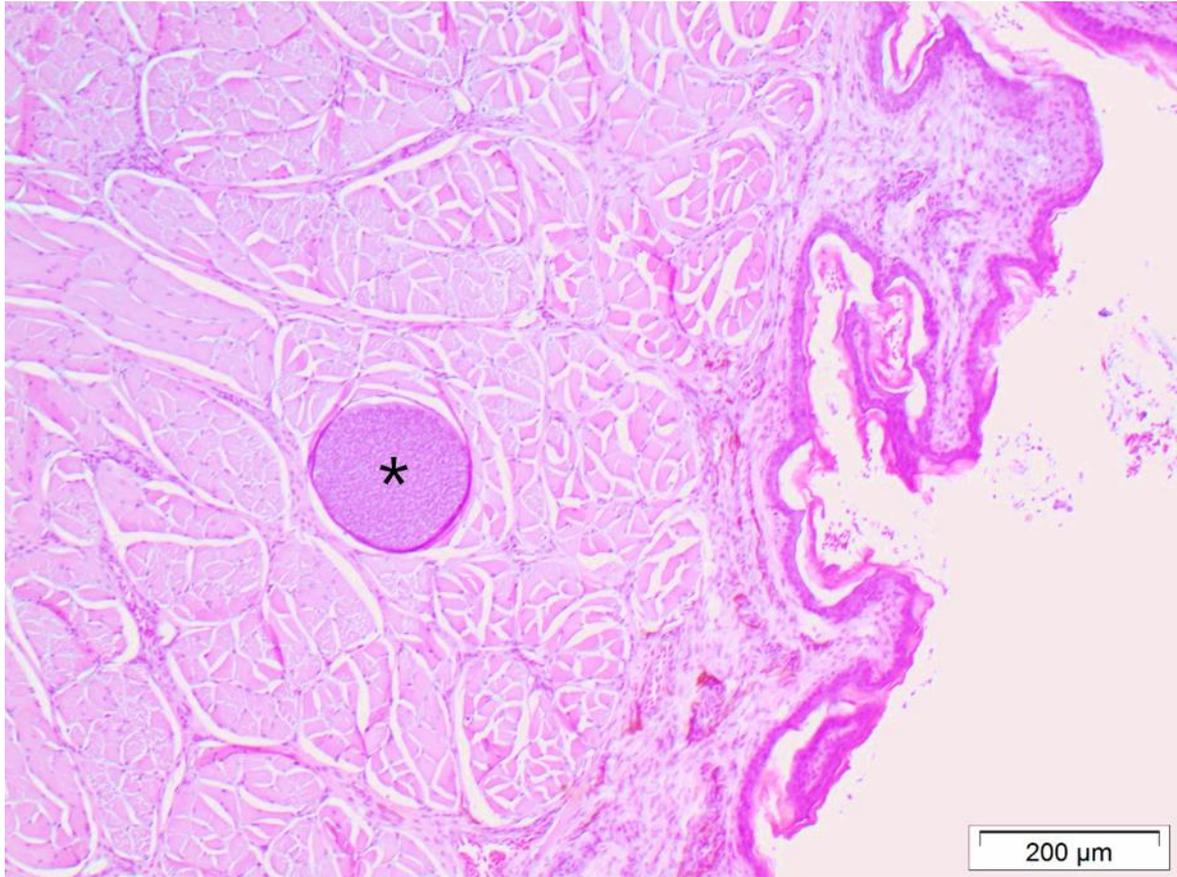


Figura 20: Cloaca, *Turdus grayi* (ASCD1). Presencia de *Sarcocystis* spp. en el músculo esquelético de la cloaca (*asterisco*). Tinción H&E. 100X.

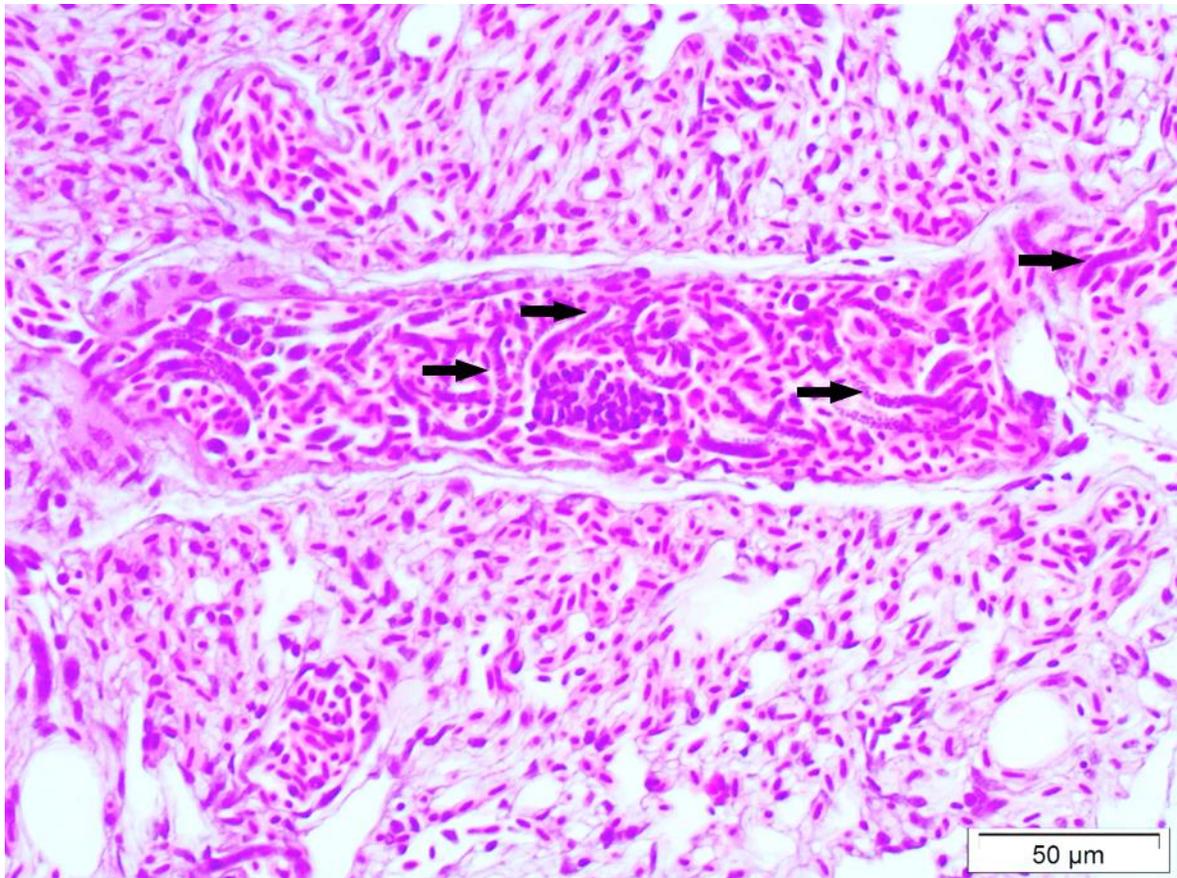


Figura 21: Pulmón, *Pitangus sulphuratus* (ASCI6). Presencia de múltiples microfilarias en el lumen del vaso sanguíneo pulmonar (*flechas*). Tinción H&E. 400X.

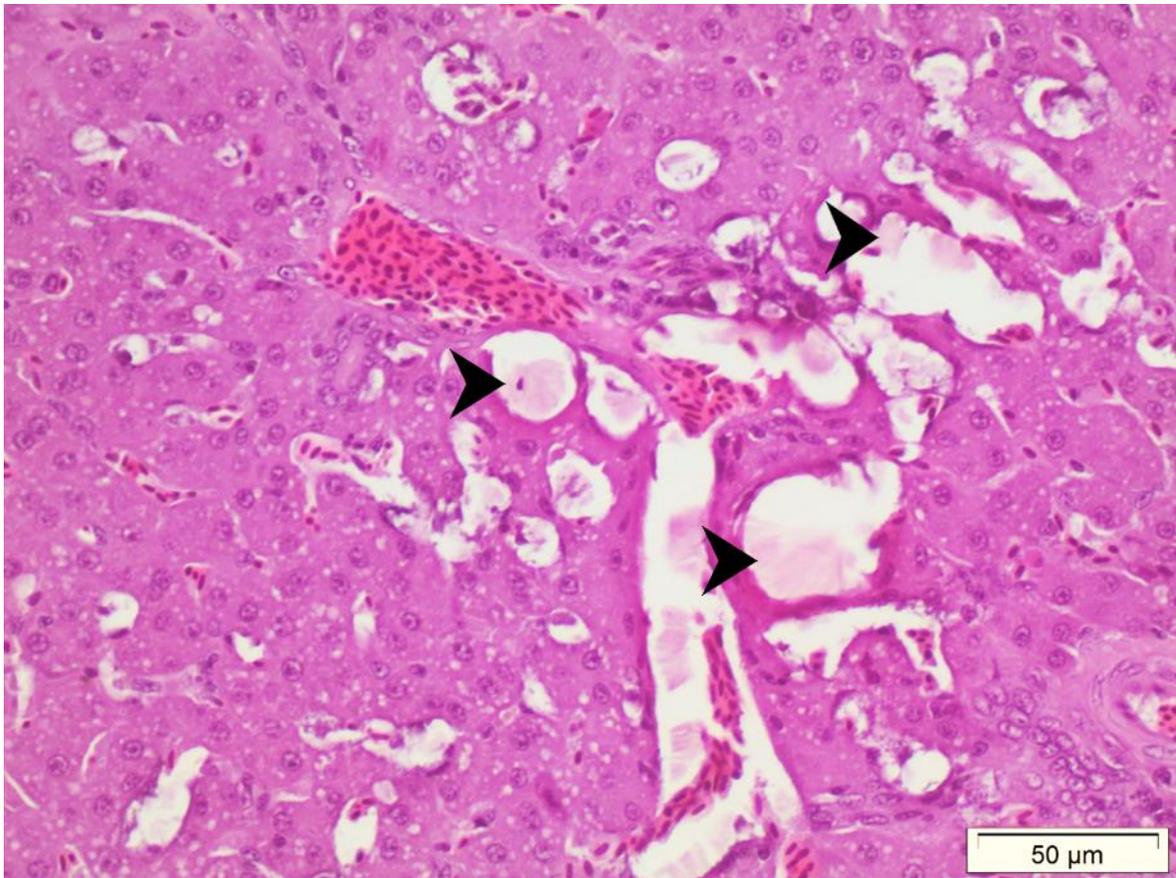


Figura 22: Hígado, *Quiscalus mexicanus* (ASCK2). Presencia de múltiples focos de mineralización asociados a la necrosis de la grasa (*flechas con punta*). Tinción H&E. 400X.

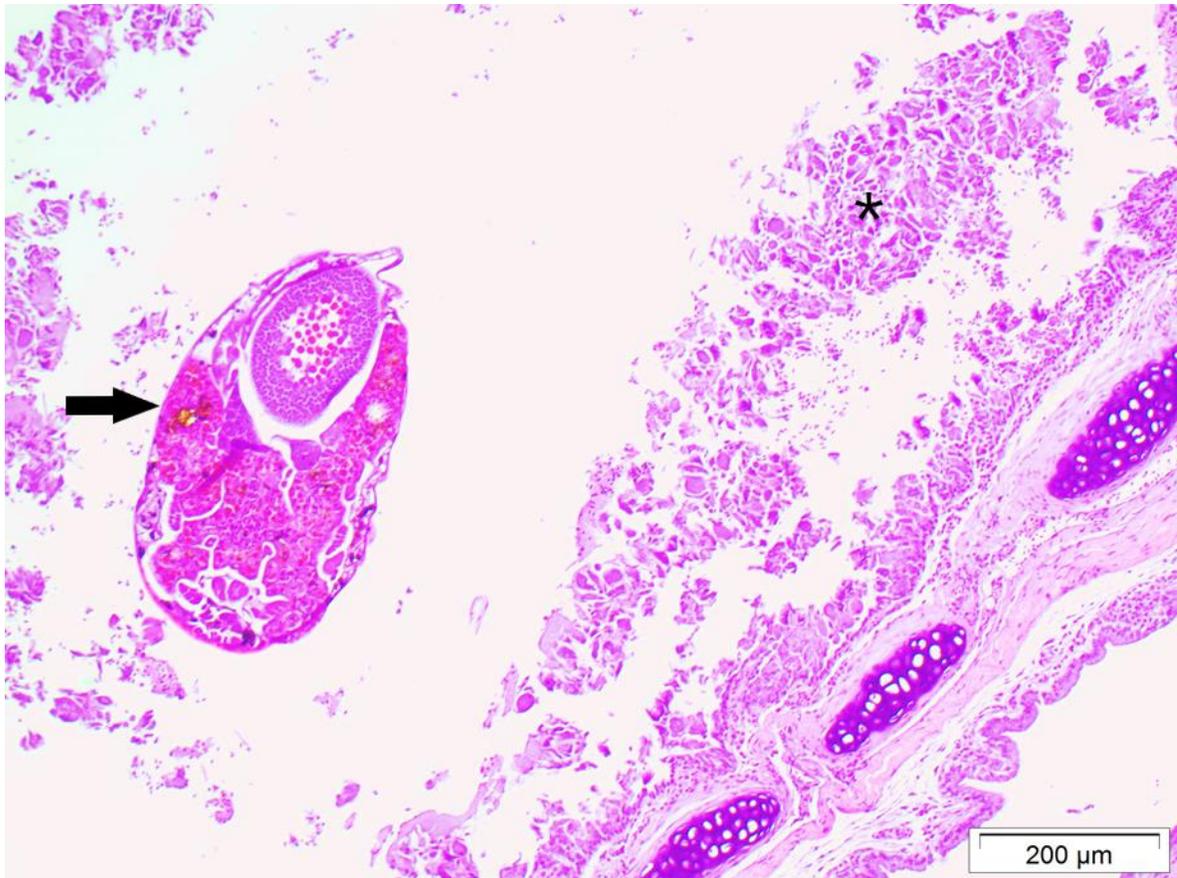


Figura 23: Tráquea, *Icterus pustulatus* (ASCM6). Presencia de artrópodos en el lumen traqueal, con la cutícula café y refringente y bandas estriadas de músculos en la cavidad corporal morfológicamente compatible con *Sternostoma tracheacolum* (*flecha*). Presencia de fibrina, detrito celular en el lumen de la tráquea (*asterisco*). Tinción H&E. 100X.

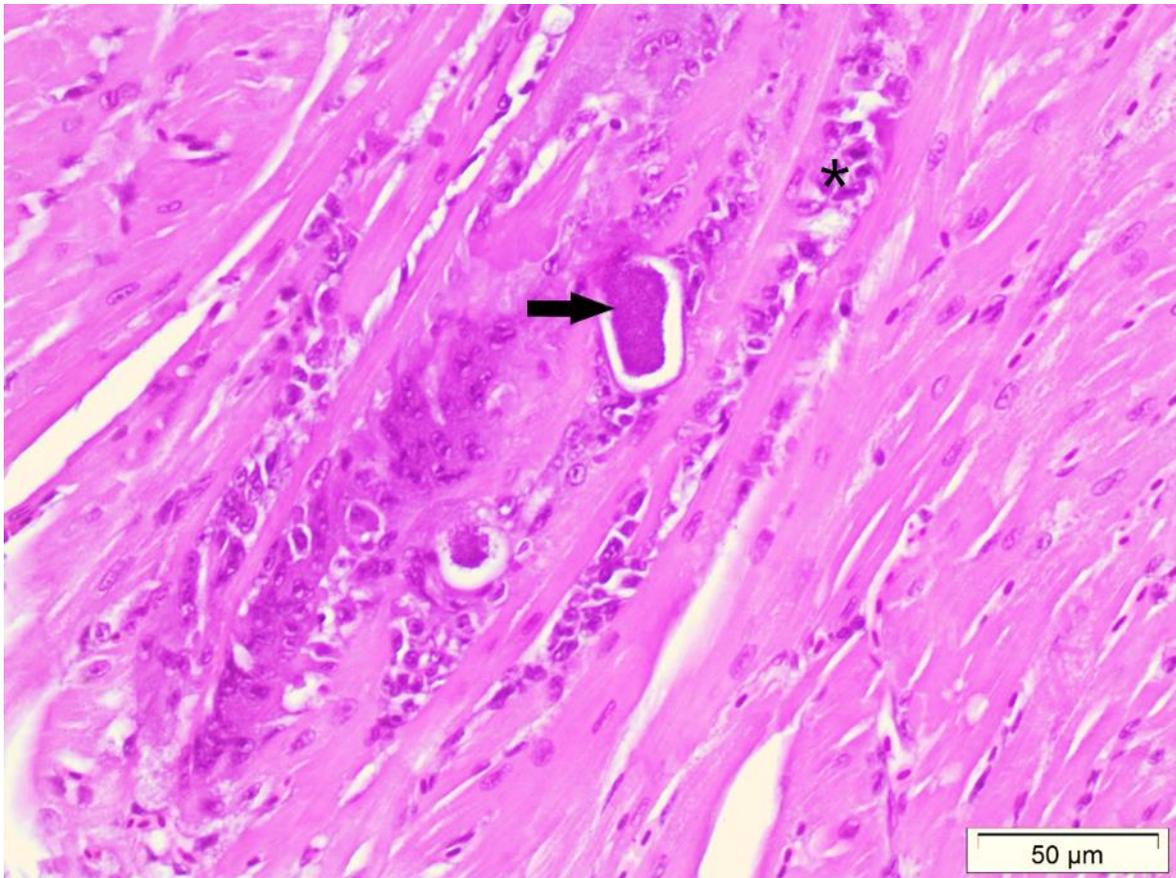


Figura 24: Corazón, *Icterus pustulatus* (ASCM6). Infiltrado inflamatorio linfocítico focal (*asterisco*), con necrosis de las fibras musculares cardíacas y presencia intralesional de una estructura parasitaria, protozooario (*flecha*). Tinción H&E. 400X.

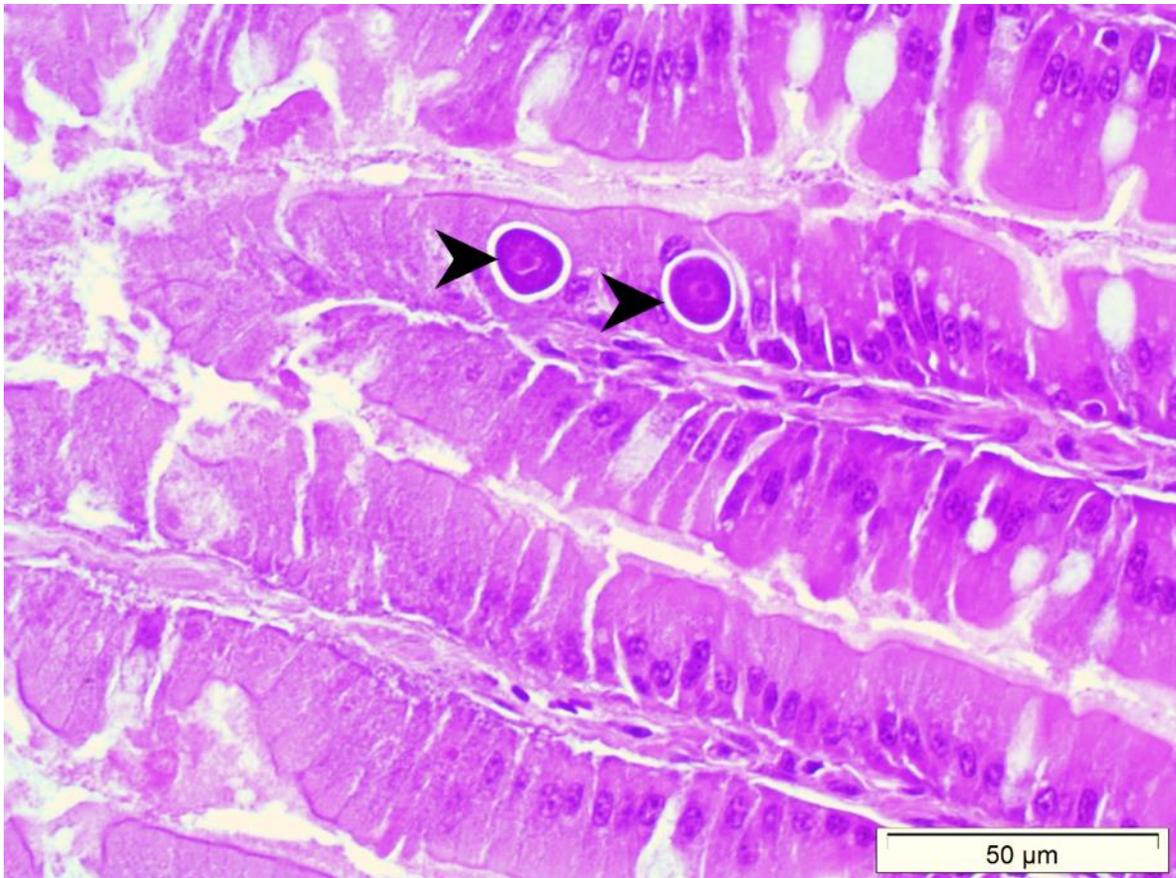


Figura 25: Intestino delgado, *Icterus pustulatus* (ASCM6). Presencia de protozoarios embebidos en la mucosa intestinal (*flechas con punta*). Tinción H&E. 600X.

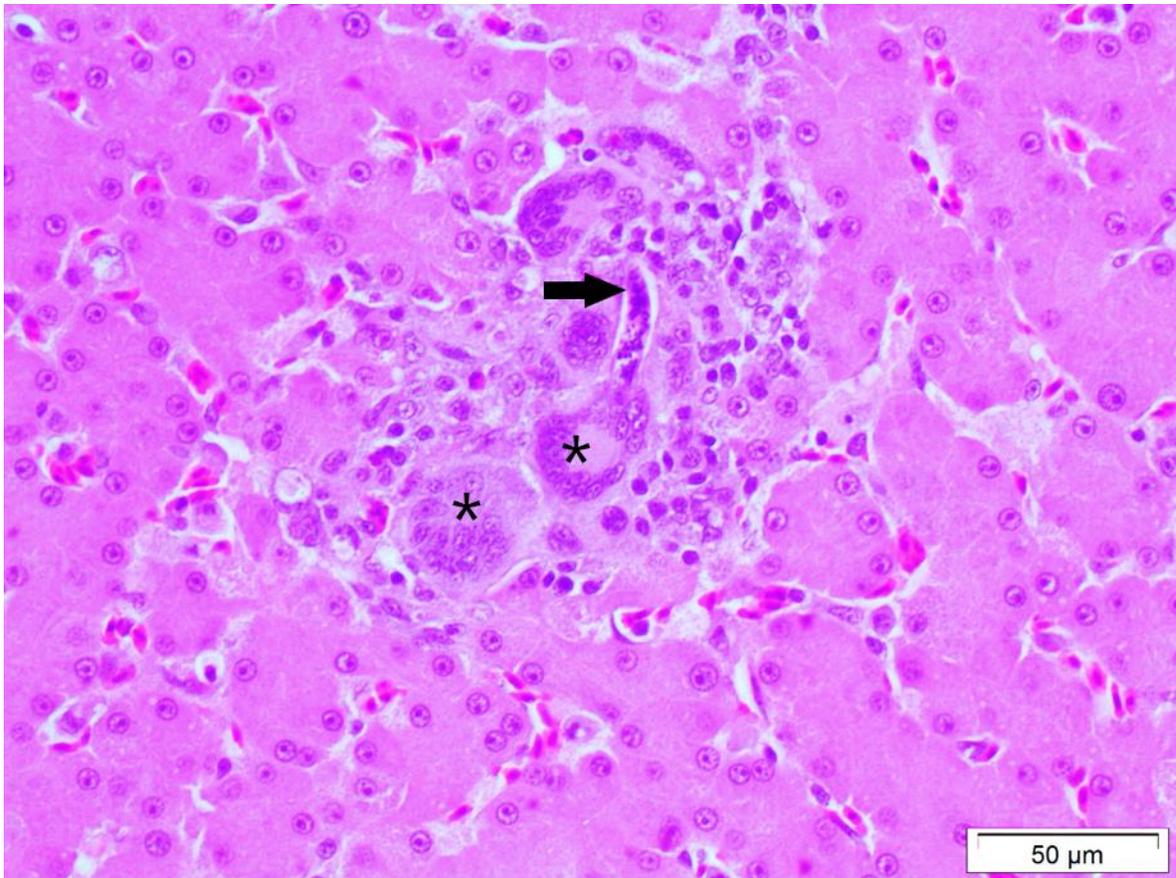


Figura 26: Hígado, *Crotophaga sulcirostris* (ATAA8). Focos de necrosis de los hepatocitos, infiltrado inflamatorio mononuclear (linfo-histiocítico) con células gigantes tipo Langhans (*asteriscos*) y presencia intralesional de filarias (*flechas*). Tinción H&E. 400X.

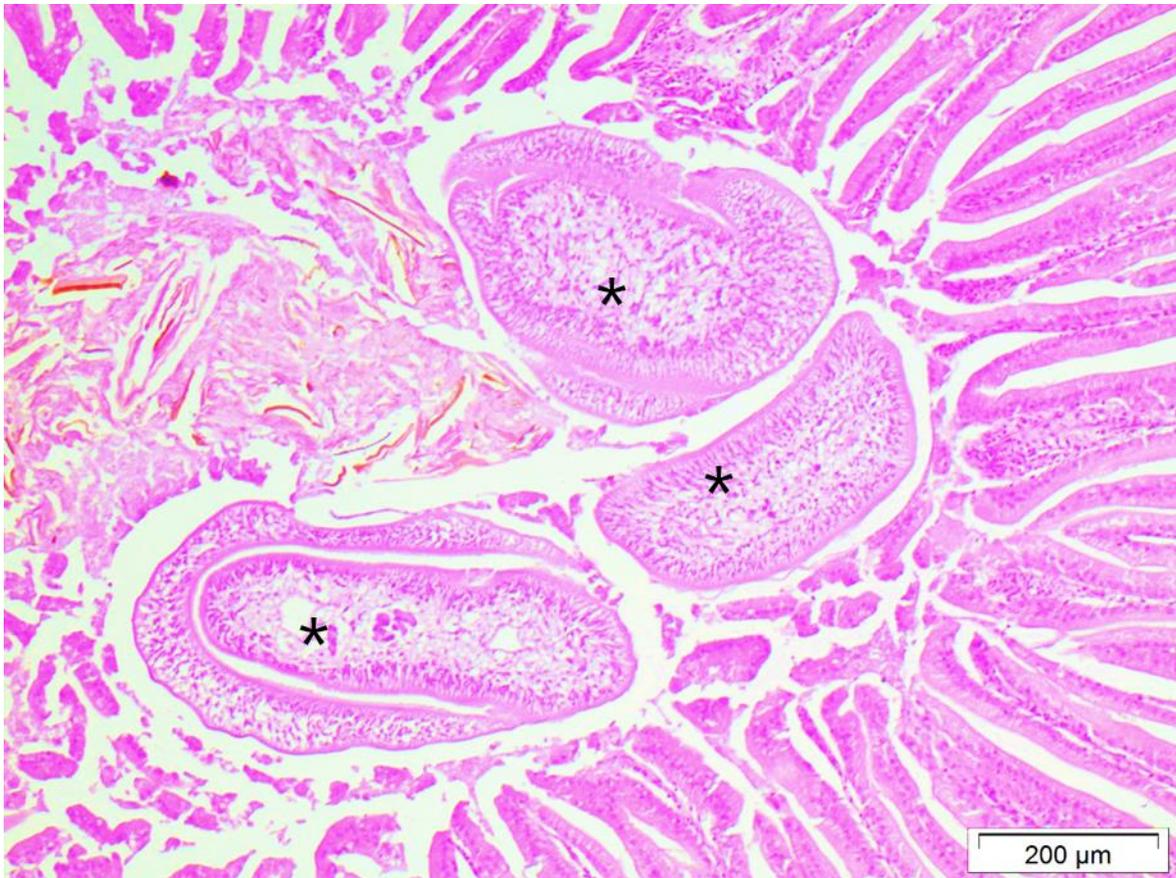


Figura 27: Duodeno, *Myiozetetes similis* (ATAH5). Presencia de tremátodos en el lumen intestinal (corte transversal) (*asteriscos*). Tinción H&E. 100X.

Cuadro 4: Resumen de Resultados 4.

Puntos relevantes:

- Un 40% de los murciélagos procesados presentaron lesiones en sistema hepatobiliar y un 32.3% en el TGI.
- Las lesiones más comunes en murciélagos fueron la enteritis mononuclear con eosinófilos crónica leve o moderada y la hepatitis periportal mononuclear.
- Sólo un caso en murciélagos (MSCI3) presentó una leve lesión en SNC. Ninguna de las aves presentó lesiones en SNC.
- Se identificaron gran cantidad de agentes etiológicos en los tejidos animales, los cuales incluyen metazoarios (céstodos, nemátodos, tremátodos), artrópodos y protozoarios.

8.6 El análisis estadístico sólo muestra relación estadísticamente significativa entre la seropositividad de los murciélagos y la estación en la que fueron colectados.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el cálculo del Chi Cuadrado (X^2) comparando dos variables categóricas distintas. La positividad ante el PRNT1:10 fue siempre la variable respuesta. En los murciélagos los factores evaluados fueron el género (hembra), edad, estado reproductivo, localidad de muestreo (Santa Cruz o Talamanca), estación durante la colecta (lluviosa o seca) y ubicación de la red de niebla (peridomiciliar o en el bosque).

El primero se realizó entre los resultados de serología (negativo o positivo) y el género de los individuos. Esta relación se muestra en la Tabla cruzada 21. H, corresponde a los individuos que son hembras y M a los que son machos. En total 73 murciélagos machos capturados (27 positivos ante la presencia de algún arbovirus por medio de PRNT) y 71 hembras (29 positivas mediante PRNT 1:10).

Tabla 21. Tabla de contingencia Resultado * Género de murciélagos capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.

		Género		Total
		H	M	
Resultado	Negativo	42	46	88
	Positivo	29	27	56
Total		71	73	144

En la Tabla 22 se muestran los resultados del cálculo del X^2 .

Tabla 22 Pruebas de chi-cuadrado^c para Resultados de Serología y Género.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.226 ^a	1	.635	.733	.381
Corrección por continuidad ^b	.092	1	.761		
Razón de verosimilitudes	.226	1	.635	.733	.381
Estadístico exacto de Fisher				.733	.381
N de casos válidos	144				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 27,61.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

c. Para las tablas de contingencia 2x2, se ofrecen los resultados exactos en lugar de los resultados de Monte Carlo.

El valor del X^2 es de 0.226, con un valor de $p=0.635$. Debido a que el valor de p es mayor a 0.05, se acepta la hipótesis nula, y las variables de positividad mediante PRNT y género son independientes. No hay una relación estadísticamente significativa entre la positividad mediante serología y el género de los murciélagos.

En la Tabla cruzada 23 se muestra las variables de seropositividad (negativo o positivo) versus la edad de los murciélagos capturados. Sólo había un individuo juvenil en la población de animales capturados.

Tabla 23 Tabla de contingencia Resultado * Edad en Murciélagos capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.

		Edad		Total
		Adulto	Juvenil	
Resultado	Negativo	88	0	88
	Positivo	55	1	56
Total		143	1	144

En la Tabla 24, se muestran los valores obtenidos mediante la prueba X^2 .

Tabla 24. Pruebas de chi-cuadrado^c para resultados de serología y edad de los murciélagos.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1.582 ^a	1	.208	.389	.389
Corrección por continuidad ^b	.052	1	.819		
Razón de verosimilitudes	1.900	1	.168	.389	.389
Estadístico exacto de Fisher				.389	.389
N de casos válidos	144				

a. 2 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,39.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

c. Para las tablas de contingencia 2x2, se ofrecen los resultados exactos en lugar de los resultados de Monte Carlo.

El valor del X^2 es de 1.582, con un valor de $p=0.208$. Debido a que el valor de p es mayor a 0.05, se acepta la hipótesis nula, y las variables de positividad mediante PRNT y edad de los murciélagos (adulto o juvenil) son independientes. No hay una relación estadística entre la seropositividad de los murciélagos y la edad.

La Tabla cruzada 25 representa aquellos individuos positivos mediante PRNT 1:10 versus su estatus reproductivo. En total 22 individuos se encontraban en estatus reproductivo activo (preñadas), 7 eran positivos para al menos un arbovirus de interés-

Tabla 25. Tabla de contingencia Resultado * Estado Reproductivo en murciélagos capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.

		Estado Reproductivo		Total
		Inactivo	Preñada	
Resultado	Negativo	73	15	88
	Positivo	49	7	56
Total		122	22	144

En la Tabla 26, se muestran los valores obtenidos mediante la prueba X^2 .

Tabla 26. Pruebas de chi-cuadrado^c para resultados de serología versus estatus reproductivo.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.546 ^a	1	.460	.489	.312
Corrección por continuidad ^b	.252	1	.616		
Razón de verosimilitudes	.558	1	.455	.489	.312
Estadístico exacto de Fisher				.635	.312
N de casos válidos	144				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 8,56.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

c. Para las tablas de contingencia 2x2, se ofrecen los resultados exactos en lugar de los resultados de Monte Carlo.

El valor del X^2 es de 0.456, con un valor de $p=0.460$. Debido a que el valor de p es mayor a 0.05, se acepta la hipótesis nula, y las variables de positividad mediante PRNT y estatus reproductivo de los murciélagos son independientes. No hay una relación estadística entre la seropositividad de los murciélagos y su estatus reproductivo.

La Tabla cruzada 27 representa aquellos individuos positivos mediante PRNT 1:10 versus la localidad en donde fueron colectados (Santa Cruz o Talamanca). De los individuos positivos, 26 fueron capturados en Santa Cruz y 30 en Talamanca.

Tabla 27. Tabla de contingencia Resultado * Localidad en murciélagos capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.

		Localidad		Total
		Santa Cruz	Talamanca	
Resultado	Negativo	46	42	88
	Positivo	26	30	56
Total		72	72	144

En la Tabla 28, se muestran los valores obtenidos mediante la prueba X^2 .

Tabla 28. Pruebas de chi-cuadrado^c para resultados de serología versus localidad de muestreo.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.468 ^a	1	.494	.608	.304
Corrección por continuidad ^b	.263	1	.608		
Razón de verosimilitudes	.468	1	.494	.608	.304
Estadístico exacto de Fisher				.608	.304
N de casos válidos	144				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 28,00.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

c. Para las tablas de contingencia 2x2, se ofrecen los resultados exactos en lugar de los resultados de Monte Carlo.

El valor del X^2 es de 0.468, con un valor de $p=0.494$. Debido a que el valor de p es mayor a 0.05, se acepta la hipótesis nula, y las variables de positividad mediante PRNT y la localidad de muestreo de los murciélagos son independientes. No hay una relación estadísticamente significativa entre la positividad de los murciélagos mediante PRNT 1:10 y la localidad en donde fueron muestreados.

La Tabla cruzada 29 representa aquellos individuos positivos mediante PRNT 1:10 versus la estación en la que fueron colectados (seca o lluviosa). Treinta y tres de

los animales positivos fueron colectados en la estación seca, y 23 fueron colectados en la estación lluviosa.

Tabla 29. Tabla de contingencia Resultado * Estación en los murciélagos capturados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.

		Estación		Total
		Lluviosa	Seca	
Resultado	Negativo	57	31	88
	Positivo	23	33	56
Total		80	64	144

En la Tabla 30, se muestran los valores obtenidos mediante la prueba X^2 .

Tabla 30. Pruebas de chi-cuadrado^c para resultados de serología versus estación (seca o lluviosa) durante la colecta de murciélagos.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	7.786 ^a	1	.005	.006	.004
Corrección por continuidad ^b	6.856	1	.009		
Razón de verosimilitudes	7.812	1	.005	.006	.004
Estadístico exacto de Fisher				.006	.004
N de casos válidos	144				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 24,89.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

c. Para las tablas de contingencia 2x2, se ofrecen los resultados exactos en lugar de los resultados de Monte Carlo.

El valor del X^2 es de 7.786, con un valor de $p=0.005$. Debido a que el valor de p es menor a 0.05, se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto existe una relación estadística entre la seropositividad de los individuos y la estación en la que fueron colectados.

La Tabla cruzada 31 representa aquellos individuos positivos mediante PRNT 1:10 versus la ubicación de la red de niebla en la que fueron colectados. Las redes se

colocan en zonas peridomiciliares (domiciliares, gallineros, potreros) y las redes ubicadas en los parches de bosque cercanos o en los ríos. Treinta y ocho animales positivos fueron colectados en las redes colocadas en los parches de bosque y 18 en las redes peridomiciliares.

Tabla 31 Tabla de contingencia Resultado * Ubicación de la Red de Niebla en los murciélagos colectados en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.

		Ubicación de la Red de Niebla		Total
		Bosque	Peridomiciliar	
Resultado	Negativo	55	33	88
	Positivo	38	18	56
Total		93	51	144

En la Tabla 32, se muestran los valores obtenidos mediante la prueba X^2 .

Tabla 32. Pruebas de chi-cuadrado^c para resultados de serología versus la ubicación de las redes de niebla para la captura de los murciélagos.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.429 ^a	1	.512	.593	.318
Corrección por continuidad ^b	.227	1	.634		
Razón de verosimilitudes	.432	1	.511	.593	.318
Estadístico exacto de Fisher				.593	.318
N de casos válidos	144				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 19,83.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

c. Para las tablas de contingencia 2x2, se ofrecen los resultados exactos en lugar de los resultados de Monte Carlo.

El valor del X^2 es de 0.429, con un valor de $p=0.512$. Debido a que el valor de p es mayor a 0.05, se acepta la hipótesis nula, por lo tanto las variables de la positividad

ante el PRNT 1:10 y la ubicación de las redes de niebla son independientes y no tienen una relación estadística.

El análisis estadístico también se realizó en las aves que presentaron resultados positivos por medio de PRNT 1:10. Los factores evaluados mediante la prueba del X^2 fueron el género de las aves, la localidad de muestreo (Santa Cruz o Talamanca), la estación en la que fueron colectadas (seca o lluviosa) y la ubicación de las redes de niebla. Es importante recalcar que las variables de estatus reproductivo y edad no fueron analizadas debido a que todas las aves eran inactivas reproductivamente y adultas.

La Tabla cruzada 33 muestra la comparación entre los animales positivos versus el género. La letra H indica hembras y la letra M indica machos. Ocho de los animales positivos eran machos y sólo 3 eran hembras.

Tabla 33. Tabla de contingencia Resultado * Género en las aves colectadas en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.

		Género		Total
		H	M	
Resultado	Negativo	47	82	129
	Positivo	3	8	11
Total		50	90	140

En la Tabla 34, se muestran los valores obtenidos mediante la prueba X^2 .

Tabla 34. Pruebas de chi-cuadrado^c para resultados de serología versus género de las aves colectadas.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.371 ^a	1	.543	.746	.400
Corrección por continuidad ^b	.079	1	.779		
Razón de verosimilitudes	.385	1	.535	.746	.400
Estadístico exacto de Fisher				.746	.400
N de casos válidos	140				

a. 1 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 3,93.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

c. Para las tablas de contingencia 2x2, se ofrecen los resultados exactos en lugar de los resultados de Monte Carlo.

El valor del X^2 es de 0.371, con un valor de $p=0.543$. Debido a que el valor de p es mayor a 0.05, se acepta la hipótesis nula, por lo tanto las variables de la positividad ante el PRNT 1:10 y el género de las aves son independientes y no tienen una relación estadísticamente significativa.

En la Tabla cruzada 35 se muestran los resultados de serología en contraste con la localidad de muestreo. Siete de los 11 individuos fueron colectados en Santa Cruz y 4 en Talamanca.

Tabla 35. Tabla de contingencia Resultado * Localidad en las aves colectadas en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.

		Localidad		Total
		Santa Cruz	Talamanca	
Resultado	Negativo	45	84	129
	Positivo	7	4	11
Total		52	88	140

En la Tabla 36, se muestran los valores obtenidos mediante la prueba X^2 .

Tabla 36. Pruebas de chi-cuadrado^c para resultados de serología versus localidad (Santa Cruz o Talamanca) en las aves colectadas.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3.589 ^a	1	.058	.100	.060
Corrección por continuidad ^b	2.463	1	.117		
Razón de verosimilitudes	3.444	1	.063	.100	.060
Estadístico exacto de Fisher				.100	.060
N de casos válidos	140				

a. 1 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 4,09.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

c. Para las tablas de contingencia 2x2, se ofrecen los resultados exactos en lugar de los resultados de Monte Carlo.

El valor del X^2 es de 3.589, con un valor de $p=0.058$. Debido a que el valor de p es mayor a 0.05, se acepta la hipótesis nula, por lo tanto las variables de la positividad ante el PRNT 1:10 y la localidad en las que las aves fueron colectadas son independientes y no tienen una relación estadística.

En la Tabla cruzada 37 se muestran los resultados de serología en contraste con la estación (seca o lluviosa) en la que las aves fueron colectadas. Seis de las 11 aves fueron colectadas durante la época seca y 5 durante la época lluviosa.

Tabla 37. Tabla de contingencia Resultado * Estación en las aves colectadas en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.

		Estación		Total
		Seca	Lluviosa	
Resultado	Negativo	59	70	129
	Positivo	6	5	11
Total		65	75	140

En la Tabla 38, se muestran los valores obtenidos mediante la prueba X^2 .

Tabla 38. Pruebas de chi-cuadrado^c realizadas con las variables de resultados de serología y estación de colecta en las aves capturadas.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.316 ^a	1	.574	.755	.401
Corrección por continuidad ^b	.061	1	.805		
Razón de verosimilitudes	.315	1	.574	.755	.401
Estadístico exacto de Fisher				.755	.401
N de casos válidos	140				

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 5,11.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

c. Para las tablas de contingencia 2x2, se ofrecen los resultados exactos en lugar de los resultados de Monte Carlo.

El valor del X^2 es de 0.316, con un valor de $p=0.574$. Debido a que el valor de p es mayor a 0.05, se acepta la hipótesis nula, por lo tanto las variables de la positividad ante el PRNT 1:10 y la estación (seca o lluviosa) en las que las aves fueron colectadas son independientes y no tienen una relación estadística.

En la Tabla cruzada 39 se muestran los resultados de serología en contraste con la ubicación de las redes de niebla en donde las aves fueron capturadas.(bosque o peridomiciliar). Cinco de las 11 aves fueron colectadas en las redes de niebla ubicadas en el bosque y 6 en las redes de niebla peridomiciliares.

Tabla 39. Tabla de contingencia Resultado * Ubicación de la red de niebla en las aves capturadas en los cantones de Santa Cruz y Talamanca.

		Ubicación de la red de niebla		Total
		Bosque	Peridomiciliar	
Resultado	Negativo	74	55	129
	Positivo	5	6	11
Total		79	61	140

En la Tabla 40 se muestran los valores obtenidos mediante la prueba X^2 .

Tabla 40. Pruebas de chi-cuadrado^c realizadas con las variables de resultados ante serología y ubicación de las redes de niebla en las aves colectadas.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.585 ^a	1	.444	.533	.325
Corrección por continuidad ^b	.201	1	.654		
Razón de verosimilitudes	.579	1	.447	.533	.325
Estadístico exacto de Fisher				.533	.325
N de casos válidos	140				

a. 1 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 4,79.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

c. Para las tablas de contingencia 2x2, se ofrecen los resultados exactos en lugar de los resultados de Monte Carlo.

El valor del X^2 es de 0.585, con un valor de $p=0.444$. Debido a que el valor de p es mayor a 0.05, se acepta la hipótesis nula, por lo tanto las variables de la positividad ante el PRNT 1:10 y la ubicación de las redes de niebla en las que las aves fueron colectadas son independientes y no tienen una relación estadística.

Cuadro 5. Resumen de Resultados 5.

- No hay relación estadística entre la seropositividad de los murciélagos y el género, edad, estatus reproductivo, localidad de muestreo ni ubicación de las redes de niebla.
- Hay relación estadística entre la seropositividad de los murciélagos y la estación en la que fueron colectados.
- No hay relación estadística entre la seropositividad de las aves y factores como el género, localidad, estación ni ubicación de las redes de niebla.

9. Discusión

Actualmente, existe un gran interés en identificar los posibles reservorios silvestres de los principales arbovirus de importancia en salud pública, debido a la posibilidad que estos agentes virales establezcan un ciclo selvático en América como lo ha hecho YFV (120). Numerosos estudios se han enfocado en demostrar la infección natural causada por arbovirus, ya sea por medio de aislamiento viral, RT-PCR o PRNT (120). Se han reconocido 140 mamíferos (de 5536 especies) y 277 aves (de 10424) como hospederos de *Flavivirus* (120). Por ejemplo, para SLEV, se han identificado 72 especies con potencial de reservorio, 7 para ZIKV, 11 para YFV, 27 para DENV y 194 para WNV (120). En este proyecto, se eligieron los murciélagos y aves como órdenes de interés en la búsqueda de infección causada por arbovirus.

En Costa Rica se han registrado un total de 249 especies de mamíferos, el orden con mayor número de especies es *Chiróptera*, con 114 (más del 45% del total de especies del país) (121). En el caso de las aves, Costa Rica posee una diversidad extraordinaria, representada por 922 especies diferentes registradas (122), estas especies incluyen también a las aves migratorias (122), ya que Costa Rica representa un territorio de migración (122).

Como objetivo principal de este trabajo se planteó encontrar las lesiones histopatológicas en animales silvestres asociadas a la infección causada por los *Flavivirus* (DENV, ZIKV, YFV, WNV, SLEV) y *Alfavirus* (CHIKV, EEEV, VEEV), sin embargo, no se pudo demostrar la presencia de ARN viral mediante los métodos moleculares (RT-PCR) en los órganos, ni en la sangre de los animales analizados. Los arbovirus están caracterizados por presentar una enfermedad aguda febril y no una infección latente en seres humanos y animales (123). Los casos analizados por histopatología fueron los que presentaron anticuerpos neutralizantes en contra de los agentes de interés, de forma exclusiva o en combinación. La evidencia de anticuerpos sugiere que el animal estuvo expuesto al virus, pero no es una evidencia de una infección activa (123). Es por esta razón que las lesiones histopatológicas presentes no pueden ser atribuidas a los arbovirus de interés. Muchas de las lesiones encontradas ni siquiera se han reportado en infecciones en animales domésticos, salvajes o de laboratorio. Tampoco se han reportado en casos de seres humanos, aunque haya evidencia de exposición a algún virus en específico, como el DENV-1, con este trabajo no se

puede concluir que haya una infección en curso. Por lo tanto, el análisis y correlación de estos hallazgos debe ser cauteloso, debido a que no se puede demostrar una causalidad.

Otro punto importante de mencionar es que, aunque para cada virus hay al menos una lesión descrita, la mayoría fue descrita en modelos experimentales, individuos inmunocomprometidos inoculados de forma intraperitoneal, intracraneal o subcutánea con suspensiones virales de altos títulos. A continuación, se describirán las lesiones encontradas por sistema orgánico y se hará una discusión de estos hallazgos correlacionándolos con las lesiones descritas en la literatura.

Las lesiones en el hígado fueron las más comunes, 40% del total de individuos las presentaron. Las lesiones reportadas en el caso de DENV-2 y DENV-3, generalmente incluyen necrosis de los hepatocitos e infiltrado inflamatorio mononuclear, e inclusive pleomorfismo celular (49); aunque la hepatitis necrotizante fue hallada en un caso con presencia de anticuerpos en contra de DENV-1 y DENV-2, también se evidenció en uno de los casos control; en este caso (MTAJ5), la necrosis era moderada, y en los focos necrotizantes había presencia de histiocitos, linfocitos y eosinófilos. El infiltrado inflamatorio no es eosinofílico en los modelos presentados con DENV-1 y DENV-2 y la necrosis es de carácter agudo, ya que la lesión es evaluada en el día 1 (49). Otro estudio reporta focos de necrosis centrolobulillar e infiltrado inflamatorio mononuclear sin evidencia de eosinófilos, esteatosis macrovesicular y hemorragias. No obstante, el caso MTAJ5 no presentó hemorragias y esteatosis macrovesicular (44). El caso MSCG14 presentó una hepatitis necrotizante también, sin embargo, el infiltrado era piogranulomatoso con eosinófilos. En las secciones evaluadas se observaba la presencia clara de nemátodos embebidos en el infiltrado inflamatorio, por lo que se atribuyen estas lesiones a esos agentes etiológicos. En el caso MTAJ5, la distribución de la necrosis y el infiltrado no corresponde con los estudios reportados (44). Adicionalmente, este animal presentó tremátodos intestinales, lo cual hace sospechar la presencia de parásitos como agentes causales de la necrosis hepática. Sin embargo, éstos no fueron observados en las secciones evaluadas. Tampoco se pudo determinar la presencia de ningún agente etiológico como hongos, ni la presencia del ARN viral, por lo que no se puede asegurar que esta necrosis está asociada a la infección por DENV-1 o DENV-2, el SNC, el bazo, corazón y riñones tampoco presentaron

lesiones como sí fueron reportadas en los modelos experimentales (46). La sangre fue negativa por medio del RT-PCR para el ARN viral, por lo que una viremia fue descartada.

La lesión más común fue la hepatitis periportal linfo-histiocítica, la cual estuvo presente en 11 individuos. El patrón inflamatorio periportal leve a moderado, con ausencia de focos de necrosis en los hepatocitos se denomina típicamente como hepatitis reactiva no específica. Este hallazgo corresponde a un proceso inflamatorio en el lecho esplácnico, comúnmente el tracto gastrointestinal (124); de los individuos con este patrón, 9 casos (MSCB2, MSCC4, MSCM3, MSCM6, MSCM7, MTAB10, MTAG5, MTAJ10, MTAK9) presentaron enteritis linfo-plasmocítica con eosinófilos, lo cual sustenta la idea de que este hallazgo es inespecífico y está relacionado con la inflamación intestinal. Además, 2 de los 11 individuos eran controles. No hay evidencia de ARN viral en la sangre u órganos de estos animales y ninguno de estos individuos presentó focos de necrosis hepática (124).

La degeneración vacuolar hepática, también conocida como edema hepatocelular o degeneración hidrópica es una lesión inespecífica. Se presenta como respuesta a cualquier forma de daño celular en donde las células hepáticas son incapaces de mantener homeostasis de iones y por ende acumulan agua (125). Esta lesión sólo ha sido reportada en modelos infectados con DENV-3, en este estudio fue evaluada en 2 individuos positivos a DENV-1 y DENV-2 y también, en un caso control. Estos animales no manifestaron lesiones en ningún otro órgano (SNC, bazo, riñón).

La lipidosis hepática es un hallazgo asociado a la infección del DENV-2 en modelos experimentales en conjunto con hemorragias hepáticas e infiltración mononuclear (38-50). La lipidosis hepática sólo fue evidenciada en un caso (MSCF4) como única lesión aislada. En los animales domésticos está relacionada con la alta movilización de los triglicéridos en el metabolismo hepático (126). Los lipogranulomas hepáticos son otra lesión observada en los murciélagos. Estuvo presente en 7 individuos (MSCH1, MSCL3, MSCM4, MTAK5, MTAC2, MTAJ7, MTAN7). Estos individuos fueron positivos para DENV-1, VEEV, EEEV, DENV-1/DENV-4/SLEV, DENV-2, EEEV y WNV. Cuando los lípidos se acumulan formando vacuolas, las células tienden a agregarse formando agrupaciones conocidos como quistes lipídicos, que eventualmente tienden a romperse y presentar una inflamación de células multinucleadas conocidos como lipogranulomas (127). La saponificación de la grasa produce la formación de focos de mineralización (127). Los lipogranulomas hepáticos y

necrosis de la grasa son lesiones incidentales, degenerativas que tampoco han sido reportadas en casos de arbovirosis.

La congestión centrolobulillar es una lesión reportada con modelos que utilizan el DENV-2 (38-50). Sólo un caso presentó una congestión hepática generalizada, sin evidencia de necrosis centrolobulillar y con seropositividad cruzada ante DENV-1 y DENV-3. La última lesión fue la colecistitis eosinofílica, tampoco ha sido reportada en casos de EEEV. La inflamación de la vesícula biliar es muy infrecuente y casi siempre se asocia al reflujo de bacterias e inflamación del TGI (128). La inflamación eosinofílica está asociada con la presencia de parásitos o reacciones de hipersensibilidad (129). Este caso (MSCM6) presentó gastritis eosinofílica, enteritis eosinofílica, arteritis eosinofílica y hepatitis periportal, lo que puede justificar la inflamación en el lecho esplácnico como una causa de la inflamación la vesícula biliar, pero no se observaron parásitos en las secciones procesadas. Sólo se puede concluir que estas no se asocian a una infección viral aguda, ya que no hay evidencia de ARN de EEEV en estos órganos y el hecho de que este virus es neurotrópico y las lesiones se limitan al SNC (130, 131, 132).

Las lesiones en el tracto gastrointestinal se extendieron desde el esófago hasta el intestino. En los modelos experimentales reportados, la mayoría de los arbovirus de interés no presentan lesiones en tracto gastrointestinal. Solamente un modelo experimental con DENV-2, reporta agregados mononucleares en el intestino delgado (46). Las lesiones como esofagitis eosinofílica y linfo-histiocítica son muy leves y sólo están en dos casos (uno de ellos control) y el otro con seropositividad exclusiva al DENV-1. La gastritis folicular es un patrón inflamatorio crónico e inespecífico (133), tampoco se ha reportado en modelos experimentales con DENV ni EEEV. La gastritis eosinofílica estuvo presente en 3 casos (1 control y dos positivos a EEEV), el cual nuevamente es un virus neurotrópico sin lesiones reportadas a nivel estomacal. La enteritis hemorrágica no es un hallazgo reportado en modelos de DENV-2. No está asociada a una infección arboviral, se debe a procesos septicémicos, neoplásicos o traumáticos (133). Durante la necropsia se descartó la posibilidad de un objeto extraño o neoplasia, por lo que la causa traumática es la más probable. La enteritis linfo-plasmocítica con eosinófilos leve o moderada estuvo presente en 15 individuos; de esta población, 9 presentaron de forma conjunta hepatitis periportal (patrón inflamatorio asociado a la inflamación del lecho esplácnico). Además 4 de estos individuos

presentaron parásitos a nivel intestinal. La enteritis linfo-plasmocítica y eosinofílica no es un hallazgo asociado con la infección causada por YFV, WNV, SLEV ni EEEV (57, 71, 109). La inflamación era leve en la mayoría de los animales y delimitada al intestino delgado. Tampoco se acompañaba de hemorragias o necrosis. Este patrón inflamatorio está asociado a síndromes eosinofílicos sistémicos, intolerancia alimentaria y parasitosis (133).

En el sistema hematopoyético se identificaron varias lesiones en el bazo. La más frecuente fue la hiperplasia folicular esplénica, generalmente asociada a un estímulo antigénico (134). La hiperplasia folicular esplénica implica una hiperplasia de los centros germinales y las células plasmáticas (134). De los animales, 3 eran controles; los otros 4 individuos eran positivos para EEEV, DENV-4 y 2 para DENV-1. En DENV-1 la disminución de la pulpa roja es la lesión reportada en los modelos experimentales (49). En DENV-4, sí hay un aumento en la pulpa blanca con hiperplasia de los centros germinales (47), aunque no se detectara ARN viral, en este caso, el hallazgo sí ha sido reportado. Este individuo no presentó alteraciones en ningún otro sistema orgánico incluyendo el SNC, el hígado o los pulmones; únicamente, la hiperplasia folicular. Además, no hubo evidencia de ARN viral en sangre o en los órganos. Aunque la hiperplasia folicular pueda estar asociada a una infección causada por DENV-4, la falta de lesiones características y la presencia de esta lesión en los controles, resta relevancia y causalidad, por lo que se determina que es un hallazgo incidental. Los ganglios linfáticos presentaron hiperplasia en un caso con presencia de anticuerpos neutralizantes en contra de 3 serotipos de DENV (1-2-3). Sin embargo, este caso (MSCA6) presentaba enteritis hemorrágica, por lo que la reacción del ganglio linfático es consecuente con la inflamación intestinal. La hematopoyesis extramedular esplénica es el hallazgo más común en el bazo (135) y no se ha reportado en casos de infección causada por EEEV al igual que la congestión esplénica. Solamente, el caso MSCI3 presentó una esplenitis neutrofílica y eosinofílica, el cual no es un hallazgo descrito para la infección con DENV-1, pero que se discutirá con más detalle en los siguientes párrafos.

Las lesiones en pulmones fueron escasas (4 individuos) y los animales eran positivos para DENV-1, 2 para DENV-2 y 1 presentó una seropositividad para los 4 serotipos de DENV. Sólo en modelos animales que utilizan DENV-2 se ha reportado una neumonía mononuclear intersticial con hiperplasia bronquial (44). Este hallazgo no fue identificado. La traqueítis tampoco ha sido descrita en modelos experimentales con DENV (38-50). La

neumonía granulomatosa está asociada con la presencia de otros agentes etiológicos como *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Actinobacillus*, *Actinomyces*, *Nocardia*, *Blastomyces*, *Cryptococcus*, *Coccidioides* y parásitos como *Angyostrongylus* y *Dictyocaulus* (animales domésticos) (136). También existen causas no infecciosas de neumonía granulomatosa con neumonitis por hipersensibilidad, histiocitosis alveolar e inhalación de objetos extraños (136, 137).

Las lesiones en el sistema reproductivo se limitan a las descritas en los testículos causados por el ZIKV (24). No se han descrito lesiones reproductivas en próstata causada por EEEV (130, 131, 132), aunque las prostatitis necrotizantes y supurativas son por infecciones ascendentes en vejiga (138). Los patógenos como *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, estreptococos y estafilococos invaden el ducto prostático a través de la uretra (138). La secreción supurativa en cervix y útero puede ser secundaria a la involución de miometrio después del ciclo estral de los animales (139, 140). No se han descrito en casos de DENV-1 ni DENV-3 (38-50). La mineralización distrófica de la placenta tampoco es una lesión descrita en DENV-1 ni SLEV (38-50, 71).

En el sistema cardiovascular, las lesiones halladas no son consistentes con arbovirus. Sólo un caso presentó una miocarditis leve focal, y era positivo para DENV-1. Los agregados mononucleares en el miocardio sólo se han descrito en modelos animales infectados con DENV-2, son multifocales y severos (46). No hay una descripción de infiltración grasa en miocardio asociado a DENV-1, DENV-2, DENV-3 ni EEEV. Este hallazgo se asocia con la condición corporal alta y con la edad (141). En estos animales, la infiltración grasa era muy leve. La arteritis eosinofílica tampoco corresponde a un hallazgo causado por DENV-1, DENV-2 o EEEV y estuvo presente en uno de los controles. La hipertrofia de la túnica media de los vasos pulmonares se ha reportado en gatos, sin embargo, carece de relevancia clínica. Estos hallazgos han sido asociados a parásitos como *Dirofilaria immitis*, *Aelurostrongylus abstrusus* (142) no hay evidencia de agentes etiológicos en los casos examinados en murciélagos.

Las lesiones en sistema urinario se presentaron en pacientes positivos a DENV-1 y EEEV. La nefritis intersticial multifocal leve fue descrita en dos casos. Los agregados mononucleares en riñón sólo se han descrito en infecciones experimentales con DENV-2 (46). En los casos evidenciados (MSCM3, MTAJ10), la inflamación renal es muy leve y

focal. La nefritis intersticial crónica es un hallazgo morfológico de interpretación cuidadosa, ya que no se puede identificar el agente causal de la lesión inicial (143). Generalmente, las causas iniciales son desconocidas, y algunas lesiones pueden deberse a persistencia antigénica. Sin embargo, su evolución depende de la intensidad del insulto y la eficiencia del sistema inmune del hospedero (143). La urolitiasis renal es otro hallazgo incidental, influido por daño renal agudo, dieta o problemas en la irrigación del tejido renal (144). Este hallazgo no ha sido descrito en casos infectados con DENV-1 (38-50).

Finalmente, las lesiones restantes fueron 2, a saber: un Papiloma Escamoso, en un caso control irrelevante en este trabajo, y la segunda lesión fue la única localizada en el SNC, una meningitis linfo-histiocítica focal con eosinófilos, crónica activa leve. La lesión se ubicaba cerca de corteza cerebral. El infiltrado inflamatorio apenas era visible. Este caso MSC13, presentaba la particularidad de tener una esplenitis supurativa y eosinofílica y una neumonía intersticial neutrofílica. El animal era positivo para DENV-1. En los modelos experimentales con DENV-2, las lesiones más importantes en SNC incluyen hemorragias intracerebrales, proliferación de astrocitos, apoptosis de células de Purkinje e infiltrado inflamatorio perivascular en el neuropilo y mononuclear en la piamadre (45). En este caso, la inflamación se delimita únicamente en las meninges. No hay lesiones en el neuropilo ni degeneración neuronal. Además, la lesión es focal y muy leve. Las regiones como los núcleos caudados, corteza occipital y cerebelo no presentaron alteraciones. Tampoco se evidenció sangrado periventricular, ni desprendimiento del epitelio endimario. En este individuo, el ARN viral no fue detectado en los órganos, ni en la sangre. La inflamación neutrofílica presente en el bazo y el pulmón era aguda. En el pulmón, las células inflamatorias estaban presentes en el intersticio alveolar y todavía no existía migración hacia los alvéolos pulmonares. El infiltrado en la pulpa roja se componía de polimorfos nucleares (eosinófilos y neutrófilos), por lo que, en ambos órganos, la inflamación fue caracterizada como aguda. No existían lesiones en el hígado, médula ósea, corazón o riñones. La interpretación de estas lesiones en el contexto de la necropsia y los hallazgos serológicos y moleculares no son compatibles con una infección causada por un arbovirus, sino más bien un proceso septicémico agudo. La septicemia es la complicación de una bacteriemia en donde hay presencia de microorganismos y toxinas en el torrente sanguíneo, la inflamación no está localizada en el sitio de la lesión, sino más bien es generalizada (145). En una septicemia hay

producción de citoquinas, quininas, aminas vasoactivas, mediadores lipídicos de la inflamación, daño endotelial y células inflamatorias fagocíticas como los neutrófilos en diferentes sistemas orgánicos (145).

La evaluación histopatológica en los tejidos de las aves tampoco fue concluyente de una infección causada por algún *Flavivirus* (WNV, SLEV) o *Alfavirus* (EEEV, VEEV). Las lesiones en aves infectadas con WNV incluyen encefalitis, miocarditis y hepatitis mononuclear (57), además de focos de necrosis en páncreas, bazo e hígado. Solamente un caso fue seropositivo mediante PRNT 1:10 al WNV. Este fue el caso ASCM9, el cual presentó hemosiderosis esplénica. La hemosiderina se presenta en individuos con un recambio rápido de los eritrocitos, anemia hemolítica, transfusiones o shunt portosistémico (146), en el contexto de este análisis histopatológico, la hemosiderosis se considera un hallazgo incidental.

Las lesiones asociadas a SLEV en modelos experimentales en ratones inoculados con una cepa asilada en un caballo en Brasil, demostraron hemorragias y necrosis en el SNC, riñón, hígado, corazón y pulmones (63). Un estudio realizado en Argentina reporta otros hallazgos diferentes en órganos como el bazo (reducción de folículos, baja celularidad en centros germinales, áreas de baja celularidad en pulpa roja y focos de necrosis, atrofia de folículos linfoides de células B e hiperplasia megacariocítica), pulmón (neumonía linfocítica intersticial) y SNC (infiltrado inflamatorio linfocitario en meninges y perivascular, apoptosis de células en la corteza) (71). Los hallazgos difieren entre los modelos, debido a las cepas de SLEV utilizadas y la vía de inoculación (intracerebral y subcutánea). Tres individuos presentaron anticuerpos neutralizantes contra SLEV, los casos ASCD1, ATAH5 y ATAJ1. El caso ASCD1 (*Turdus grayi*) presentó una hepatitis hiliar linfo-plasmocítica con heterófilos, compatible con una peritonitis heterofílica, enteritis heterofílica y neumonía linfo-plasmocítica perivascular e intersticial con heterófilos, y una nefritis intersticial leve. La neumonía, en este caso, no es linfocítica sino mixta y con la evidencia de heterófilos en el intestino y cavidad celómica, la infección bacteriana es más probable. Las peritonitis (celomitis) en aves, casi siempre son de etiología bacteriana, causadas por agentes como *Mycoplasma* o *Escherichia coli* (147). Estas lesiones son secundarias a infecciones o perforación del TGI (147). En este caso, la enteritis heterofílica apoya esta conclusión. No hay lesiones hemorrágicas en el intestino, riñón, pulmón ni corazón. Tampoco existen

lesiones inflamatorias en el sistema nervioso central. El caso ATAH5 (*Miozetetes similis*) presentó una leve degeneración vacuolar en el hígado y céstodos en el intestino. No hubo evidencia de lesiones en SNC, hígado o bazo. El ATAJ1 (*Empidonax virescens*) presentó una leve lipidosis hepática y céstodos intestinales. Estos hallazgos no están relacionados con SLEV, ya que la única lesión reportada en modelos animales en el hígado son las hemorragias hepáticas.

Finalmente, el análisis histopatológico culmina con los casos con anticuerpos neutralizantes en contra de EEEV *Los Alfavirus*, como VEEV y EEEV causan focos de necrosis y vasculitis necrotizante en el SNC (57). Ninguna de las aves analizadas con presencia de anticuerpos neutralizantes contra EEEV (ASCA1, ASCI6, ASCM8, ATAA8), contra VEEV (ASCK2, ATAA4) o ambas (ASCM6, ATAJ1) presentaba alteraciones en SNC. VEEV también es viscerotrópico y en caballos ha sido relacionado con esplenitis, linfadenitis y pancreatitis necrotizante (57), sin embargo, estas lesiones no fueron evidenciadas en los casos con seropositividad ante VEEV.

En este estudio, tampoco se observan lesiones reportadas en seres humanos, por ejemplo, el CHIKV en personas causa una severa miocarditis y nefritis adicionalmente a las lesiones en SNC (meningoencefalitis) (9, 11). No se demostró la presencia de ARN viral de CHIKV en ninguno de los animales analizados. En seres humanos, el ZIKV produce microcefalia (1, 17, 18), lesiones que tampoco fueron evidenciadas en los animales. El DENV se caracteriza por producir una enfermedad febril autolimitante y DHF/DSS (32), pero no se encontraron lesiones compatibles con esta enfermedad en los tejidos animales. En humanos, WNV causa trastornos en SNC (meningitis, encefalitis y meningoencefalitis) (55), pero tampoco fue evidenciada en los animales capturados. Estas lesiones también se reportan en humanos infectados con SLEV (63, 66, 69). La encefalitis es una lesión observada en seres humanos con VEEV y EEEV (83). En los pacientes humanos afectados con EEEV, la vasculitis y hemorragias también son evidentes en SNC (96). Ninguno de estos hallazgos fue evidenciado en el SNC de los murciélagos y aves. En seres humanos, YFV tiene una presentación clínica en donde hay afección del hígado, corazón, riñones y pulmones (99, 106). A nivel hepático, las principales lesiones son necrosis, inflamación, hemorragias y acumulación de bilirrubina con ictericia marcada (99). Sólo un caso presentó anticuerpos neutralizantes contra YFV (MTAG5), aunque de forma concomitante tuvo una reacción

cruzada con WNV, DENV-1 y DENV-2. Sin embargo, como se discutió con anterioridad, la hepatitis periportal está relacionada con la inflamación del lecho esplácnico y este individuo presentó, además, una enteritis eosinofílica.

En ausencia de la presencia viral en los tejidos, la inmunohistoquímica no fue realizada. En conjunto con el diagnóstico molecular, se procedió a realizar el análisis semicuantitativo serológico. Mediante serología (PRNT 1:10), se logró demostrar la presencia de anticuerpos neutralizantes en las muestras de suero. Esto evidencia la exposición pasada al antígeno, no una infección activa con viremia. La prueba serológica más específica para el diagnóstico de la infección causada por arbovirus es la prueba de neutralización viral mediante PRNT (123). La prueba de ELISA es utilizada también para la detección de anticuerpos (148), sin embargo, sólo evalúa la unión del anticuerpo con el antígeno de interés, la proteína que se encuentre en el fondo de la placa y requiere el uso de un anticuerpo secundario específico (148). Esta interacción es inespecífica por lo que puede haber falsos positivos lo cual disminuye la sensibilidad de la prueba (148). Además, no existe un anti IgG para alguna de las 26 especies de murciélagos capturados o de las 42 especies de aves capturadas. Por lo tanto, se realizaron pruebas de neutralización viral. La prueba de neutralización es más específica que el ELISA, porque permite evaluar el reconocimiento de antígenos virales a través de la disminución de la infectividad de las partículas virales. Al mismo tiempo, los antígenos que se reconocen en los procesos de neutralización son más específicos que los que se reconocen en la prueba de ELISA (123) y no hay necesidad de utilizar anticuerpos secundarios (148). El objetivo de la prueba es medir los anticuerpos neutralizantes que impiden la infección en el monocapa celular y, por ende, el efecto citopático. Los virus son neutralizados debido a que los anticuerpos bloquean sus sitios de unión a las células, mediante la unión a epítomos específicos (149). Estos epítomos específicos de unión, son regiones específicas de las proteínas de envoltura (E), las cuales son glicoproteínas específicas utilizadas por las partículas virales para infectar a las células del hospedero (123) y son muy conservadas en las familias *Flaviviridae* y *Togaviridae* (123). No obstante, estas pruebas serológicas poseen ciertas desventajas. Una de ellas y la principal limitante en este estudio fue la presencia de anticuerpos con reacción cruzada, debido a que antígenos de distintos virus comparten epítomos con el antígeno del virus de interés (148, 123). En este estudio, la reacción cruzada es evidenciada en un 43.46% de las muestras en

murciélagos y un 18.18% de las aves. La reacción cruzada entre los *Flavivirus* se da por las similitudes en la estructura de la proteína E (123). En el caso de los *Alfavirus*, la reacción cruzada está dada por las similitudes en la estructura de la glicoproteína E2, la cual posee los epítomos más importantes para los anticuerpos neutralizantes (123).

Debido a que estos epítomos son compartidos entre los miembros de las familias virales analizadas en este estudio y producen una reacción cruzada, es necesario realizar la titulación de anticuerpos para diferenciar específicamente ante cuál *Flavivirus* o *Alfavirus* los anticuerpos están reaccionando. En este estudio no se llevó a cabo la titulación de los anticuerpos debido al volumen limitado de las muestras. Sin embargo, aún con las limitaciones del volumen, se pudo realizar la prueba de PRNT a una única dilución 1:10. Esto evidenció que el 17% de los animales positivos (21 individuos) presentaron anticuerpos neutralizantes contra DENV-1. Aunque con una única dilución no se puede establecer que el animal estuvo infectado con este agente, se puede intuir que tuvo contacto con el mismo o con un virus parecido. En estudios futuros, basados en esta información, se le podrá dar una prioridad a este agente para titular los sueros, en vez de realizar una prueba de tamizaje con muchos agentes.

A pesar de que la detección de anticuerpos es suficiente para muchos procesos diagnósticos, en algunos casos, es necesario cuantificar la reacción mediante la titulación. El título se define como el recíproco de la dilución sérica más alta que produce una reacción inequívocamente positiva en una prueba serológica (123). El título se determina al someter al suero a una serie de diluciones para probar su nivel de actividad de anticuerpos (123). La titulación permite determinar específicamente contra qué virus hay anticuerpos neutralizantes en el caso de reacciones cruzadas al determinar la dilución más alta y la diferencia de 4 diluciones en el título de dos virus determinados. No obstante, el volumen de suero era muy limitado y no permitió realizar la titulación. Esto representa una limitante en el estudio, ya que no se puede establecer individualmente contra cuál *Flavivirus* o *Alfavirus* hay una reacción específica de neutralización. Lo que se puede determinar inequívocamente es que estos animales silvestres (murciélagos y aves) de la región del Pacífico Norte y Caribe Sur han sido expuestos a estos arbovirus.

Los anticuerpos ante una infección causada por arbovirus empiezan a evidenciarse aproximadamente a partir del día 10 post infección (IgM) o a partir del mes después de la

infección (IgG) (123). Para evaluar la seroconversión se debe realizar la toma de dos muestras separadas por un intervalo de 15 días para determinar si el título de anticuerpos cambia con el tiempo (123). Por esta razón, en nuestro estudio, sólo se pudo demostrar la exposición ante los arbovirus en un intervalo de 10 días hasta meses inclusive, después de la infección. Es por esta razón que muchas de las lesiones halladas en el análisis histopatológico no pueden ser caracterizadas como per agudas o agudas (en un rango de 1-4 días), ya que aún no habría respuesta humoral, y la evidencia de exposición ante los virus fueron realizada únicamente mediante serología. La evidencia del ARN viral en los órganos o en la sangre sería la clave para poder detectar una infección aguda o viremia.

El rol de los murciélagos en la transmisión y ecología de DENV, WNV, SLEV, YFV no está totalmente elucidado, sin embargo, hay estudios que han demostrado que algunas especies de murciélagos son susceptibles a la infección causada por estos virus y algunos de ellos han detectado estos agentes por medio de técnicas moleculares o serológicas (60). La presencia de anticuerpos contra DENV ha sido reportada en especies de murciélagos en Costa Rica, con una seroprevalencia de 21.2% (54/241) en tres zonas endémicas para este virus del país, Sarapiquí (23 individuos), Valle Central (14 individuos) y Nicoya (15 individuos) (36). La presencia de anticuerpos fue detectada mediante PRNT, dilución 1:20. DENV-3 fue el serotipo más reportado en Sarapiquí, Nicoya y el Valle Central. Varios individuos presentaron anticuerpos ante más de un serotipo de DENV, (DENV-1-DENV-3, DENV-2-DENV-3, DENV-1-DENV-4, DENV-2-DENV-4, DENV-2-DENV-3). La mayoría de los animales positivos pertenecían al género *Molossus*, de la Familia *Molossidae* (*M. sinaloe*, *M. Rufus*, *M. pretiosus*). Sólo uno de los animales positivos para DENV-1, en Sarapiquí, pertenecía a la familia *Vespertilionidae* (*Rhogessa io*) y era positivo a DENV-3 (36). En Nicoya, un espécimen era de la familia *Emballonuridae* (*Balantiopterix plicata*) positivo a DENV-3 (36). En el Valle Central a parte de los molósidos, se identificaron anticuerpos contra DENV-2 y DENV-3 en *Vespertilionidae* (*Rhogessa bickhami*) y *Phyllostomidae* (*Glossophaga soricina*) (36).

En el presente trabajo, se identificaron anticuerpos neutralizantes contra DENV en 18 especies: *Glossophaga soricina*, *Desmodus rotundus*, *Uroderma convexum*, *Artibeus phaeotis*, *Sturnira parvidens*, *Artibeus jamaicensis*, *Chiroderma salvini*, *Ptenorotus mesoamericanus*, *Carollia perspicillata*, *Phyllostomus discolor*, *Noctilio albiventris*,

Artibeus lituratus, *Artibeus watsoni*, *Lonchophylla robusta*, *Myotis nigricans*, *Carollia castanea* y *Rhogeessa io*, miembros de las 4 familias *Phyllostomidae*, *Noctilionidae*, *Mormoopidae* y *Vespertilionidae*. Es importante establecer que no se atrapó ningún individuo perteneciente a la Familia *Molossidae*. Estos murciélagos son de vuelo alto, e insectívoros, mientras que la mayoría de los murciélagos capturados en este trabajo son frugívoros (150). Además, el serotipo con mayor seroprevalencia fue DENV-1 y no DENV-3.

Vicente-Santos *et al* (2017), demostró la presencia de ARN viral en el 8.8% de los individuos (28/318), de los cuales, 11 intestinos fueron analizados por medio de RT-PCR y se identificó ARN de DENV en 2 de los casos (36). Los autores especularon que la positividad podría estar dada por la ingestión de mosquitos (36), pero en nuestro estudio no se detectó la presencia de ARN viral en los órganos ni en la sangre. En esta investigación, los animales capturados eran insectívoros, la mayoría de los individuos son frugívoros con poca capacidad de ecolocalización (150). Por lo que es poco probable la ingestión de mosquitos. Además, en la evaluación histológica no se encontraron restos de exoesqueleto o material compatible con artrópodos en el lumen intestinal, sólo abundante materia vegetal.

En América, en general, los 4 serotipos de DENV han sido identificados mediante técnicas moleculares o serológicas en las siguientes especies: *Myotis nigricans*, *Pteronotus mesoamericanus*, *Natalus stramineus*, *Artibeus jamaicensis*, *Carollia brevicauda* (60). Otros *Flavivirus* han sido identificados en murciélagos, por ejemplo, WNV fue aislado en murciélagos frugívoros en el Sur de la India en 1968, en la especie *Rousettus leschenaulti* (148). En América hubo evidencia serológica de WNV en murciélagos de las especies: *Eptesiscus fuscus*, *Tadarida brasiliensis*, *Myotis lucifugus*, *Myotis septentrionalis*, en la península de Yucatán en México y Norte América (54, 60). Durante el muestreo, anticuerpos neutralizantes contra WNV fueron identificados en 3 individuos (*Artibeus jamaicensis*, *Carollia castanea*, *Artibeus phaeotis*), sin embargo, sólo uno presentó anticuerpos exclusivamente contra WNV, los demás presentaron anticuerpos neutralizantes contra DENV-1, DENV-2 y/o SLEV. Esta es la primera evidencia de anticuerpos neutralizantes contra WNV en murciélagos en Costa Rica. SLEV fue evidenciado serológicamente en *Tadarida brasiliensis mexicana*, también en la Península de Yucatán en México (54, 60). En este trabajo se identificaron 3 especies con la presencia de anticuerpos contra SLEV, a saber: *Artibeus phaeotis*, *Artibeus jamaicensis* y *Uroderma convexum*. Sin embargo, no fueron

exclusivos para SLEV, debido a que estos individuos tuvieron una reacción cruzada con DENV-1, DENV-2, DENV-3 y/o WNV. En Costa Rica sólo se había demostrado la presencia de SLEV en perezosos de dos y tres dedos mediante serología (72). La reacción cruzada con otros *Flavivirus* no permite concluir la presencia inequívoca de SLEV en murciélagos en el país. Sin embargo, como se evidenció en otro trabajo existe evidencia de circulación del virus en el país tanto en caballos como en seres humanos. Por lo que es probable que exista en murciélagos. Utilizan los mismos vectores que WNV (151).

No hay evidencia concluyente de que YFV esté presente en murciélagos salvajes, sin embargo, existen reportes que indican que los murciélagos pueden infectarse al ingerir mosquitos (60). La baja prevalencia de anticuerpos contra YFV en murciélagos puede estar dada por la reacción cruzada por la infección de otros *Flavivirus* (60). En este estudio, sólo hay un caso con evidencia de anticuerpos neutralizantes contra YFV, un *Artibeus jamaicensis* (MTAG5), sin embargo, tal y como se ha reportado en la bibliografía, también hubo seropositividad contra DENV-1, DENV-2 y WNV, lo cual podría indicar una reacción cruzada con otros *Flavivirus*. Sin embargo, este es el primer indicio de YFV en murciélagos en Costa Rica.

Muy pocos *Alfavirus* causantes de enfermedad en humanos se han reportado en murciélagos en América. Se han detectado anticuerpos contra VEEV en *Desmodus rotundus*, *Uroderma convexum*, *Artibeus phaeotis*, *Artibeus turpis*, *Carollia perspicillata* (60). En el caso de EEEV se han detectado anticuerpos en *Myotis* sp., *Eptesicus* sp. (60). CHIKV no ha sido reportado en murciélagos en América, pero hay evidencia serológica en las siguientes especies: *Scotophilus* sp., *Rousettus aegyptiacus*, *Rousettus leschenaultia*, *Hipposideros caffer*, *Chaerephon pumilus* (60). En este estudio, los *Alfavirus* fueron representados con 4 especies positivas para EEEV (*Phyllostomus discolor*, *Noctilio albiventris*, *Artibeus jamaicensis* y *Carollia perspicillata*) y 1 especie en el caso de VEEV (*Carollia perspicillata*), en algunos casos, de forma concomitante, con *Flavivirus* como DENV-1, DENV-2 y/o DENV-3. En Costa Rica, estos *Alfavirus* no habían sido reportados mediante serología en animales silvestres. Estos hallazgos sugieren un posible rol de los murciélagos en el mantenimiento del ciclo enzoótico de transmisión y la diseminación de estos virus zoonóticos, sin embargo, se necesitan más estudios para clarificar el rol de los murciélagos como amplificadores o reservorios de estos *Alfavirus*.

En pájaros, diversos estudios se han llevado a cabo para determinar la presencia de WNV. En Turquía, un estudio determinó la prevalencia de 5.5% de WNV (4/71) mediante PCR en tejidos como cerebro, bazo, hígado, riñón y pulmón (152). Otro estudio realizado en Malasia determinó la prevalencia de la seroconversión en aves y cuervos en un 7% y un 30% respectivamente, para WNV (56). Las especies como *Passer domesticus* y *Cyanocitta cristata* son fuentes de infección viral para los mosquitos (69). En un estudio llevado a cabo en la Península de Yucatán en México, en donde se muestrearon 257 aves, la seroprevalencia de aves seropositivas mediante ELISA fue del 4.3% (11/257) (54). Finalmente, en Trinidad, un estudio en donde se muestrearon 140 aves de vida libre se detectaron anticuerpos por medio de la prueba de inhibición de la hemaglutinina contra SLEV en 1.4% de las aves (2/140) (153). Estos datos representan una baja prevalencia en general, en muestreos con aves silvestres que son congruentes con este estudio, en el cual sólo un 3.22% (4/124) de las aves presentaron anticuerpos neutralizantes contra un *Flavivirus* (1 para WNV y 3 para SLEV). WNV y SLEV tienen una reacción cruzada serológica en las aves hospedadas (69). Estudios de laboratorio demostraron que especies como *Haemorrhous mexicanus* infectados experimentalmente con WNV, desarrollan una inmunidad que previene la reinfección con WNV y SLEV (69). Esto supone que la introducción de WNV en un ecosistema excluye de forma competitiva transmisión de SLEV (69). WNV sólo fue identificado en el Pacífico Norte, SLEV fue identificado en ambas localizaciones.

Los *Alfavirus*, como EEEV, han sido reportados en aves silvestres. Las especies como *Agelaius phoeniceus*, *Cardinalis*, *Passer domesticus*, *Bombycilla cedrorum* y *Chrysolophus pictus*, son especialmente susceptibles ante la infección de los virus de las encefalitis equinas (EEEV y VEEV) (57). En Costa Rica, EEEV sólo ha sido reportada en sueros equinos mediante ELISA de captura de IgM (6, 87). En el caso de VEEV, ha sido reportado en perezosos de tres y dos dedos y en sueros equinos mediante la misma metodología (6, 72, 87). Sin embargo, en el país, la presencia mediante serología no había sido documentada en aves silvestres. En el caso de los individuos, solamente 2 presentaron anticuerpos neutralizantes tanto para EEEV como para VEEV, lo cual refleja una reacción cruzada. Cuatro individuos fueron positivos exclusivamente para EEEV y 2 lo fueron de forma exclusiva para VEEV. No obstante, no se identificó presencia del ARN viral en los órganos o coágulos sanguíneos ni lesiones histopatológicas sugestivas de la infección viral. Las

especies con seropositividad (*Aimophila ruficauda*, *Pitangus sulphuratus*, *Icterus pustulatus*, *Crotophaga sulcirostris*, *Empidonax virescens* y *Quiscalus mexicanus*) nunca antes habían sido reportados con la presencia de anticuerpos en contra de EEEV o VEEV.

Recientemente, ha existido un interés en los murciélagos y su capacidad de actuar como reservorios virales y una fuente potencial de zoonosis emergentes (154). Un estudio realizado en Brasil, en el Estado de Sao Paulo y el Estado de Bahía, se enfocó en analizar la presencia de *Alfavirus* y *Flavivirus* en muestras de suero, hígado, pulmones e intestino de 103 murciélagos mediante RT-PCR anidado y prueba de inhibición de la hemaglutinina (154). A pesar de que todas las muestras fueron negativas para la presencia de los arbovirus y no se comprobó una infección activa o pasada en los murciélagos, los autores determinan que probablemente los animales muestreados no constituyen reservorios del virus en las áreas estudiadas (154), sin embargo, insisten que deben realizarse más estudios para comprender el rol de los murciélagos en estas enfermedades zoonóticas (154). Nuestros hallazgos son compatibles con este estudio, sin embargo, sí se logró identificar una exposición previa mediante PRNT 1:10. Otros estudios sólo se han enfocado en la exposición previa a los arbovirus, por ejemplo, en Trinidad, se evaluaron 384 sueros de murciélagos para la presencia de *Alfavirus* y *Flavivirus*, mediante ELISA y prueba de inhibición de la hemaglutinina. Los autores determinaron la presencia de anticuerpos contra VEEV por medio de ELISA en el 2.9% de los murciélagos (11/384) (155). Estos resultados son congruentes con nuestro estudio en donde sólo el 0.81% de los individuos demostró la presencia de anticuerpos neutralizantes en contra de VEEV, acentuando la baja incidencia de este virus en murciélagos.

Las aves son expuestas a los arbovirus como el WNV, SLEV y EEEV a través de la picadura de mosquitos del género *Culex* spp. (123), no obstante, es diferente con respecto a los murciélagos en donde constantemente surge la interrogante acerca de cómo se exponen los murciélagos a los arbovirus; hay evidencia de que los mosquitos se alimentan de los murciélagos, sin embargo, determinar la frecuencia de este fenómeno en el campo es difícil (156). Para comprobar esto se necesitaría realizar estudios en donde los mosquitos sean colectados en lugares en donde haya actividad de estos murciélagos frugívoros, durante los picos de actividad. Al colectar los mosquitos se evaluaría la preferencia alimentaria, mediante la identificación del citocromo de murciélago en los mosquitos y determinar si existen ciertas

preferencias alimentarias en estos períodos de tiempo. Adicionalmente, la ingestión de mosquitos se ha propuesto como una vía de exposición (36), sin embargo, es difícil de establecer en nuestro estudio, debido a la historia natural de la mayoría de las especies capturadas y la no evidencia de mosquitos en los intestinos. Esto puede explicar por qué en nuestro proyecto, no hubo evidencia de ARN viral en los órganos o en la sangre de los murciélagos. Como se mencionó anteriormente la mayoría de los animales capturados pertenecen a la subfamilia *Sternodermatinae*, que en su mayoría son animales frugívoros, sin adaptaciones óptimas para la ecolocalización y depredación de insectos pequeños como mosquitos (150). En el estudio realizado con anterioridad, los murciélagos capturados en su mayoría pertenecen a la Familia *Molossidae* (36), los cuales son insectívoros adaptados a la ecolocalización en vuelo alto (150). Además, en ese trabajo, se analizó también la preferencia alimenticia de los mosquitos colectados en esas zonas, y ninguno demostró la presencia de sangre de murciélago (150). Es por eso que los autores justifican una posible infección y evidencia del ARN viral en los intestinos a raíz de la ingestión de mosquitos positivos, pero esta teoría no fue comprobada en este proyecto por las razones expuestas con anterioridad.

En este trabajo se sostiene la teoría de que la infección en murciélagos está dada por la picadura de los mosquitos. La infección no pudo ser demostrada, sólo la exposición mediante serología en un rango que se extiende desde los 10 días hasta meses después de la infección. Inicialmente, se obtuvieron resultados positivos (Tabla 8) en 4 individuos, sin embargo, al realizar el PCR específico, las muestras fueron negativas. Posiblemente, porque la concentración de ARN era muy baja en las muestras y no se pudieron obtener amplicones como para llevar a cabo la reacción de PCR. Aunque las muestras fueron inicialmente positivas para DENV-3, DENV-4 y ZIKV con un porcentaje de identidad de hasta el 93%, también lo fueron para otros *Flavivirus* de mosquitos, ya que el segmento era de 180 bp. ¿Qué pasa si lo detectado no corresponde a *Flavivirus* de interés en la población humana y son *Flavivirus* de murciélagos? Estos virus, como Dakar Bat Virus, Bukalasa Bat Virus, Carey Island Virus, Entebbe Bat, Phnom-Penh Bat virus, Rio Bravo Bat Virus, Montana Myotis Leukoencephalitis Virus (MML), Yokose Virus, Tamana Bat Virus (TABV), Sokuluk Virus son agentes virales aislados únicamente en murciélagos y no se ha determinado un vector específico (60). Comparten características antigénicas similares a otros miembros de la Familia *Flaviviridae* como YFV (60). Ante esta evidencia se puede

suponer que la serología positiva presente en los murciélagos también pueda estar dada por la presencia de *Flavivirus* específicos de murciélagos no identificados previamente, a parte de la exposición a los vectores.

La vigilancia serológica y aislamiento viral han determinado la presencia de grupos de arbovirus (*Flaviviridae*, *Togaviridae*) en aves y murciélagos de vida libre (156). A pesar de que en este estudio no se puede establecer la presencia de lesiones histopatológicas asociadas con la infección por arbovirus, sí se pudo evidenciar una exposición previa, lo cual nuevamente da indicios sobre la posible importancia de murciélagos y aves como reservorios de estos agentes. El potencial de estos animales como reservorios debe analizarse en conjunto con sus asociaciones ecológicas con vectores virales hematófagos (mosquitos consumen sangre de los murciélagos, murciélagos consumen mosquitos) y ectoparásitos (*Cimicidae*, *Nycteribiidae*, *Streblidae*) (157).

Al no existir una correlación entre la serología y los hallazgos histopatológicos, no es posible dimensionar el impacto de los arbovirus como el DENV, ZIKV, YFV, SLEV, WNV, CHIKV, EEEV, VEEV en la fauna silvestre. Es posible que la circulación de estos agentes tenga algún impacto en la biodiversidad, pero al no existir evidencia de enfermedad ante la exposición es difícil de afirmarlo. La forma de dar continuidad a este tipo de investigación sería realizar los muestreos en otras áreas con presencia de infecciones causadas por Arbovirus como Alajuela y Puntarenas (2-4) deben ser incluidos para establecer puntos de referencia en la búsqueda de estos virus en Costa Rica. Se recomienda incluir los muestreos utilizando una metodología diferente, con redes de niebla de hasta 4 metros de alto en zonas peridomiciliarias y urbanas con presencia de murciélagos adaptados a perchar en edificios y domicilios. Estos individuos serían de la Familia *Molossidae* y *Vespertilionidae*, los cuales por sus características ecológicas tienen un contacto más directo con las poblaciones humanas (150).

Otro aspecto importante es la búsqueda de otros posibles reservorios. Los roedores no fueron incluidos en este estudio, debido a que el muestreo de estos animales implica la colocación de numerosas trampas especiales (Sherman) en lugares estratégicos, y una continua inspección de las trampas al amanecer y al anochecer durante días e incluso, semanas. En términos prácticos, esto no se pudo realizar en el proyecto, sin embargo, de las 249 especies de mamíferos en Costa Rica, el Orden *Rodentia* está representado por 47

especies, siendo el segundo orden más diverso después de *Chiróptera* (121). Por abundancia, diversidad y distribución, los roedores deben ser tomados en cuenta en muestreos futuros. Aun cuando la metodología de muestreo se cambiará, se capturaren más individuos o se realizaran los muestreos en otras localizaciones geográficas, existe la posibilidad de que no se pueda hacer la detección del ARN viral o anticuerpos mediante PRNT. Inclusive, si se demostrara la presencia de ARN viral, podría no existir lesiones histopatológicas asociadas, como en estudios previos (36). La solución radicaría en la inoculación experimental de murciélagos utilizando diferentes vías de inoculación (intraperitoneal, intracraneal y subcutánea). También sería necesaria la exposición de los murciélagos y las aves ante mosquitos infectados. El objetivo de estos modelos sería determinar si los animales pueden desarrollar la infección que se ha reportado en seres humanos, en condiciones controladas en donde se puedan realizar muestreo de sangre y órganos en grupos controles y animales infectados, cada día. El problema es que en el caso del DENV, los modelos animales no han podido recrear la enfermedad en seres humanos, porque el virus no logra replicarse bien en tejidos animales (50).

El impacto de los hallazgos de este estudio en la salud pública del país es controversial. Según los datos del Centro Nacional de Referencia Virología (CNRV) del Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA), la vigilancia epidemiológica de arbovirus en Costa Rica se centra únicamente en ZIKV, DENV, CHIKV, Virus de Mayaro y a partir del 2018 YFV (158). SLEV, WNV, EEEV, VEEV no son tomados en cuenta para la vigilancia epidemiológica o diagnóstico habitual; por lo que la evidencia de estos virus, con excepción de WNV, en la región del Pacífico Norte y el Caribe Sur podría suponer un rango mayor en la distribución del país. Anticuerpos contra WNV, EEEV y VEEV en caballos fueron detectados en Alajuela, Puntarenas y Guanacaste (6, 87), ya que en el Pacífico Norte se encontró evidencia serológica de estos virus, es posible suponer que podrían estar presentes en animales salvajes y domésticos en esas localizaciones también. SLEV sólo ha sido descrito mediante la presencia de anticuerpos en perezosos provenientes de Upala (Alajuela) y Pueblo Nuevo de Duacaré en Limón (región noreste) (72). No hay un traslape de este sitio de muestreo con las dos localidades presentes en este estudio, sin embargo, hay un indicio de que SLEV circula en animales silvestres tanto en la región norte, Caribe Sur y Pacífico Norte. Sólo una especie de las aves positivas a SLEV

(*Empidonax virescens*) es migratoria, por lo tanto, los demás casos detectados pueden ser de transmisión local. Un ave fue positiva, de forma exclusiva, para SLEV en el Pacífico Norte y un murciélago lo fue para WNV en el Caribe Sur. Los demás presentaron una reacción cruzada con varios tipos de DENV. El problema radica en que no hay casos demostrados de infección en seres humanos, aunque la mayoría sean asintomáticos (55, 63, 66). Aún con esta evidencia previa, la información es insuficiente como para establecer infecciones activas en la población costarricense, sin que se haya demostrado la enfermedad en animales. Si estos agentes deben incluirse o no en el diagnóstico habitual de arbovirus sigue siendo debatible, debido a la baja prevalencia aún en animales silvestres y seres humanos. No hay casos reportados de YFV en seres humanos en el país (158).

Según los datos del INCIENSA, durante el 2017 y 2018 no se reportaron casos de DENV en el cantón de Santa Cruz (158). En el 2018, se registraron 8 casos confirmados mediante PCR de DENV-1 en seres humanos en el cantón de Talamanca (158). Esto concuerda con nuestros hallazgos, ya que DENV-1 fue el de mayor prevalencia en murciélagos en Talamanca (24/30). Esto evidencia que pueda existir una relación entre la prevalencia de un serotipo de DENV en seres humanos y la evidencia en animales silvestres. Aún con las limitaciones de este estudio, DENV-1 parece ser el arbovirus que podría tener alguna relación con la vida silvestre en Costa Rica.

ZIKV y CHIKV no fueron identificados mediante pruebas de diagnóstico molecular. ZIKV tampoco fue evidenciado mediante serología. Por lo que se determina que no hay circulación de este virus, al menos en aves y murciélagos silvestres de las localidades en estudio.

Con este proyecto no se puede demostrar que las aves y los murciélagos silvestres son reservorios de los arbovirus en estudio. Los vectores, corresponden a vertebrados capaces de mantener viremias persistentes, que los convierten en fuente de infección para los vectores artrópodos y otros animales (2). No se pudo evidenciar una viremia en estos animales, pero si una exposición ante estos agentes por medio de serología, por lo tanto, determinamos que son hospederos de estos arbovirus. Al no poder haber una replicación viral en los órganos o en la sangre, se presume que sean hospederos incidentales y que no tienen la capacidad de seguir con el ciclo de transmisión. Los vectores deben cumplir con ciertas condiciones adicionales. Por ejemplo, los arbovirus deben de aislarse de forma continua o intermitente de

estos animales durante un período de cese de alimentación del vector o período de interrupción (mínimo 2 semanas y no más de tres meses) (2). Otra condición es que no debe haber introducción de vertebrados o vectores infectados en el ambiente durante el período de interrupción (2). La última condición es que el virus debe ser aislado en la sangre después de este período de interrupción (2). La demostración de estas condiciones en estudios de campo es difícil, ya que no se pueden controlar todas las variables como la introducción de otros animales o vectores infectados a un ecosistema. El análisis estadístico, permitió evaluar si existe alguna correlación entre los factores ambientales (la estación, localidad o ubicación de las redes de niebla) y biológicos (edad, género, estatus reproductivo) con la seropositividad encontrada en las aves y los murciélagos. Solamente se pudo constatar de una relación estadísticamente significativa entre la seropositividad de los murciélagos y la estación en la que fueron colectados, siendo mayor la cantidad de individuos positivos durante la estación seca. La prueba de X^2 nos permite establecer una relación estadística entre las dos variables categóricas no necesariamente una causalidad. Posiblemente la razón de una mayor seropositividad durante la época seca esté influenciada por la dinámica de los vectores. En los trópicos el período interrumpido está en la época seca, debido a que los vectores son menos abundantes y hay un cese en la actividad de alimentación (2). Debido a que la época seca está precedida por la época lluviosa en donde hay mayor abundancia de vectores, es posible que los animales con evidencia serológica ante arbovirus en esta estación, hayan sido expuestos durante la época lluviosa anterior, la viremia haya sido breve y posteriormente hayan desarrollado los anticuerpos neutralizantes. Hay factores ecológicos que pueden estar involucrados, sin embargo, la mayoría de las especies colectadas son de la familia *Phyllostomidae* (Subfamilias *Glossophaginae*, *Sternodermatinae*, *Carollinae* y *Desmodontinae*), *Vespertilionidae*, *Mormoopidae*, *Noctilionidae* y *Emballonuridae*, y se caracterizan por tener una amplia distribución en el Caribe, Noroeste y Sureste del país en tierras bajas y medias (150). Por lo tanto, la presencia de anticuerpos en estas localidades no quiere decir que sean exclusivas ya que la mayoría de estas especies son muy abundantes.

Este proyecto evidencia que los animales silvestres han sido expuestos ante los Arbovirus zoonóticos que circulan en el país y recalca la importancia de la investigación en vida silvestre para elucidar la dinámica de las enfermedades en los diferentes ecotonos.

10. Conclusiones

- No hay evidencia de infección aguda o viremia causada por *Flavivirus* o *Alfavirus* en los murciélagos y aves silvestres capturados en Santa Cruz y en Talamanca.
- Hay evidencia de exposición a *Flavivirus* (DENV, WNV, SLEV, YFV) y *Alfavirus* (VEEV y EEEV) en murciélagos y aves silvestres muestreados en Santa Cruz y Talamanca mediante la presencia de anticuerpos neutralizantes por medio de PRNT 1:10.
- No hay relación entre la presencia de anticuerpos mediante PRNT con la presencia de lesiones histopatológicas.
- No se puede determinar la presencia de lesiones histopatológicas asociadas a una infección activa causada por los *Flavivirus* (DENV, CHIKV, ZIKV, WNV, YFV, SLEV) y *Alfavirus* (EEEV y VEEV) en los murciélagos y aves muestreados en Santa Cruz y Talamanca.
- Es preciso realizar estudios experimentales *in vivo* en donde se inoculen a los murciélagos y aves con dosis específicas de los agentes virales de interés, para determinar si desarrollan una infección aguda y títulos de viremia alta. Es necesario probar diferentes vías de exposición a los agentes virales (nasal, oral, intraperitoneal y subcutánea), así como también ponerlos en contacto con mosquitos infectados en un bioterio de alto nivel de bioseguridad.
- Se deben realizar muestreos en otros sectores del país, en donde exista alta incidencia (por ejemplo, Puntarenas) de casos de infección arboviral en humanos y baja incidencia (por ejemplo, Valle Central) para realizar una comparación sobre la prevalencia de agentes virales por región geográfica en el país.
- Los roedores deben ser tomados en cuenta en futuros estudios en fauna silvestre debido a su diversidad, abundancia y distribución, estas características los convertiría en reservorios potenciales.
- En ensayos serológicos se debe dar prioridad a la titulación de los anticuerpos neutralizantes para DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 y EEEV por la cantidad de individuos que fueron positivos (de forma exclusiva o por reacción cruzada) ante estos agentes.

- Es necesario utilizar una alternativa en la técnica de eutanasia, como cámaras de CO₂ con el fin de maximizar la cantidad de suero disponible.
- Con este estudio no es posible determinar a los murciélagos y aves como reservorios de arbovirus en Costa Rica, debido a que no hay evidencia de una infección aguda o viremia.
- En este proyecto se determina que las aves y los murciélagos son hospederos terminales de los arbovirus (DENV, SLEV, WNV, EEEV, VEEV) en Costa Rica.
- Este trabajo demuestra la primera evidencia de WNV en murciélagos en Centroamérica.

11. Referencias

1. Mayer SV, Tesh RB, Vasilakis N. 2017. The emergence of arthropod-borne viral diseases: a global prospective on Dengue, Chikungunya and Zika Fevers. *Act Tropica* 166: 155-163. DOI: 10.1016/j.actatropica.2016.11.020.
2. Kuno G, Mackenzie JS, Junglen S, Hubálek Z, Plyusnin A, Gubler DJ. 2017. Vertebrate Reservoirs of Arboviruses: Myth, Synonym of Amplifier, or Reality? *Viruses*. 13;9 (7). pii: E185. DOI: 10.3390/v9070185.
3. Ministerio de Salud de Costa Rica. Análisis de la situación de salud: Dengue 2017 [Internet]. 2017 [Citado 15 Set 2017]. <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/analisis-de-situacion-de-salud/3280-dengue-2017/file>.
4. Ministerio de Salud de Costa Rica. Análisis de la situación de salud: Zika 2017 [Internet]. 2017 [Citado 15 Set 2017]. <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/analisis-de-situacion-de-salud/3278-zika-2017/file>.
5. Ministerio de Salud de Costa Rica. Análisis de la situación de salud: Chikungunya 2017 [Internet]. 2017 [Citado 15 Set 2017]. <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/analisis-de-situacion-de-salud/3279-chikungunya-2017/file>.
6. Jiménez C, Romero M, Baldi M, Piche M, Alfaro A, Chaves A, Morales J, León B, Hutter S, Corrales E. 2016. Arboviral Infections (Eastern Equine Encephalitis, Western Equine Encephalitis, Venezuelan Equine Encephalitis and West Nile Encephalitis) in horses of Costa Rica. *J Equi Vet Scien* 39:31. DOI: <https://DOI.org/10.1016/j.ijid.2016.11.375>.
7. Singh SK, Unni SK. 2011. Chikungunya virus: host pathogen interaction. *Rev Med Virol* 21: 78–88. DOI: 10.1002/rmv.681. Tsetsarkin KA, Chen R, Weaver SC. 2016. Interspecies transmission and chikungunya virus emergence. *Curr Opin Virol*. 16: 143–150. DOI: 10.1002/rmv.681.
8. Tsetsarkin KA, Chen R, Weaver SC. 2016. Interspecies transmission and chikungunya virus emergence. *Curr Opin Virol* 16: 143–150. DOI: 10.1016/j.coviro.2016.02.007.

9. Krutikov M, Manson J. 2016. Chikungunya Virus Infection: An Update on Joint Manifestations and Management. *Rambam Maimonides Med J* 7 (4): e0033. DOI:10.5041/RMMJ.10260.
10. Goupil BA, McNulty MA, Martin MJ, McCracken MK, Christofferson RC, Mores NC. 2016. Novel Lesions of Bones and Joints Associated with Chikungunya Virus Infection in Two Mouse Models of Disease: New Insights into Disease Pathogenesis. *PLoS ONE* 11(5): e0155243. DOI: 10.1371/journal.pone.0155243.
11. Burt JF, Chen W, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, Kohl A, Rudd PA, Taylor A, Herrero LJ, Zaid A, Fong L, Mahalingam S. 2017. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infect Dis* 17: e107–17. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30385-1.
12. Lourenço-de-Oliveira R, Failloux AB. 2017. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. *PLoS Negl Trop Dis* 11(6): e0005698. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005698.
13. Fong L. 2017. Immunopathology of Chikungunya Virus Infection: Lessons Learned from Patients and Animal Models. *Ann Rev of Vir* 4:413-427. DOI: 10.1146/annurev-virology-101416-041808.
14. Teo TH, Lum FM, Lee WL, Ng LFP. 2012. Mouse models for Chikungunya virus: deciphering immune mechanisms responsible for disease and pathology. *Immunol Res* (2012) 53:136–147. DOI 10.1007/s12026-012-8266-x.
15. Labadie K, Larcher T, Joubert C, Mannioui A, Delache B, Brochard P, Guigand L, Dubreil L, Lebon P, Verrier B, Lamballerie X, Suhrbier A, Cherel Y, Le Grand R, Roques P. 2010. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *J Clin Invest* 120(3):894–906. DOI:10.1172/JCI40104.
16. Chen CI, Clark DC, Pesavento P, Lerche NW, Luciw PA, Reisen WK, Brault AC. 2010. Comparative Pathogenesis of Epidemic and Enzootic Chikungunya Viruses in a Pregnant Rhesus Macaque Model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83(6): 1249–1258. DOI:10.4269/ajtmh.2010.10-0290.
17. Vasilakis N, Weaver SC. 2017. Flavivirus transmission focusing on Zika. *Curr Opin in Vir* 22:30–35. DOI: 10.1016/j.coviro.2016.11.007.

18. Sharma A, Lal SK. 2017. Zika Virus: Transmission, Detection, Control, and Prevention. *Front. Microbiol.*8:110. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00110.
19. Aziz H, Zia A, Anwer A, Aziz M, Fatima S, Faheem M. 2017. Zika Virus: Global Health Challenge, threat and current situation. *J Med Virol* 89:943–951. DOI: 10.1002/jmv.24731.
20. Tripathi S, Balasubramaniam VRMT, Brown JA, Mena I, Grant A, Bardina SV, Maringer K, Schwarz MC, Maestre AM, Sourisseau M, Albrecht RA, Krammer F, Evans MJ, Fernandez-Sesma A, Lim JK, García-Sastre A. 2017. A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. *PLoS Pathol* 13(3): e1006258. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006258.
21. Althouse BM, Vasilakis N, Sall AA, Diallo M, Weaver SC, Hanley KA. 2016. Potential for Zika Virus to Establish a Sylvatic Transmission Cycle in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis* 10(12): e0005055. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005055.
22. Yu J, Liu X, Ke C, Wu Q, Lu W, Qin Z, He X, Liu Y, Deng J, Xu S, Li Y, Zhu L, Wan C, Zhang Q, Xiao W, Xie Q, Zhang B, Zhao W. 2017. Effective Suckling C57BL/6, Kunming, and BALB/c Mouse Models with Remarkable Neurological Manifestation for Zika Virus Infection. *Viruses* 9 (7):165. DOI:10.3390/v9070165
23. Shirley DAT, Nataro JP. 2017. Zika Virus Infection. *Pediatr Clin N Am* 64: 937–951. DOI:10.1016/j.pcl.2017.03.012.
24. Griffin BD, Muthumani K, Warner BM, Majer A, Hagan M, Audet J, Stein DR, Ranadheera C, Racine T, De La Vega MA, Piret J, Kucas S, Tran KN, Frost KL, De Graff C, Soule G, Scharikow L, Scott J, McTavish G, Smid V, Park YK, Maslow JN, Sardesai NY, Kim JJ, Yao XJ, Bello A, Lindsay R, Boivin G, Booth SA, Kobasa D, Embury-Hyatt C, Safronetz D, Weiner DB, Kobinger GP. 2017. DNA vaccination protects mice against Zika virus-induced damage to the testes. *Nat Comm* 8:15743. DOI: 10.1038/ncomms15743.
25. Galvão-Bueno M, Martinez N, Abdalla L, Duarte dos Santos CN, Chame M. 2016. Animals in the Zika Virus Life Cycle: What to Expect from Megadiverse Latin American Countries. *PLoS Negl Trop Dis* 10(12): e0005073. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005073.

26. Pawitwar SS, Dhar S Tiwari S, Ojha CR, Lapierre J, Martins K, Rodzinski A, Parira T Paudel I, Li J, Dutta RK, Silva MR, Kaushik A, El-Hage N. 2017. Overview on the Current Status of Zika Virus Pathogenesis and Animal Related Research. *J Neuro Phar* 12(3): 371-388. DOI: 10.1007/s11481-017-9743-8.
27. Rossi SL, Tesh RB, Azar SR, Muruato AE, Hanley KA, Auguste AJ, Langsjoen RM, Paessler S, Vasilakis N, Weaver SC. 2016. Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 94(6), 2016, pp. 1362–1369. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0111.
28. Siddharthan V, Van Wettere AJ, Li R, Miao J, Wang Z, Morrey JD, Julander JG. 2017. Zika virus infection of adult and fetal STAT2 knock-out hamsters. *Virolo* 507: 89–95. DOI: 10.1016/j.virol.2017.04.013.
29. Adams Waldorf KM, Stencel-Baerenwald JE, Kapur RP, Studholme C, Boldenow E, Vornhagen J, Baldessari A, Dighe MK, Thiel J, Merillat S, Armistead B, Tisoncik-Go J, Green RR, Davis MA, Dewey EC, Fairgrieve MR, Gatenby JC, Richards T, Garden GA, Diamond MS, Juul SE, Grant RF, Kuller L, Shaw DW, Ogle J, Gough GM, Lee W, English C, Hevner RF1, Dobyns WB, Gale M Jr, Rajagopal L. 2016. Fetal brain lesions after subcutaneous inoculation of Zika virus in a pregnant nonhuman primate. *Nat Med.* Nov;22(11):1256-1259. DOI: 10.1038/nm.4193.
30. Figueiredo MLG, Gomes A, Amarilla AA, Leandro AS, Orrico AS, Araujo RF, Castro JSM, Durigon EL, Aquino VH, Figueiredo LTM. 2010. Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. *Virol J* 7:152. DOI: 10.1186/1743-422X-7-152.
31. Hanley KA, Guerbois M, Kautz TF, Brown M, Whitehead SS, Weaver SC, Vasilakis N, Marx PA. 2014. Short Report: Infection Dynamics of Sylvatic Dengue Virus in a Natural Primate Host, the African Green Monkey. *Am J Trop Med Hyg* 91(4): 672–676. DOI:10.4269/ajtmh.13-0492.
32. Culshaw A, Mongkolsapaya J, Screaton GR. 2017. The immunopathology of dengue and Zika virus infections. *Curr Opin Immunol* 48:1–6. DOI10.1016/j.coi.2017.07.001.
33. Althouse BM, Lessler J, Sall AA, Diallo M, Hanley KA, Watts DM, Weaver SC, Cummings DAT. 2012. Synchrony of Sylvatic Dengue Isolations: A Multi-Host, Multi-Vector SIR Model of Dengue Virus Transmission in Senegal. *PLoS Negl Trop Dis* 6(11): e1928. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001928.

34. Durbin AP, Mayer SV, Rossi SL, Amaya-Larios IY, Ramos-Castaneda J, Ooi EE, Cardoso MJ, Munoz-Jordan JL, Tesh RB, Messer WB, Weaver SC, Vasilakis N. 2013. Emergence Potential of Sylvatic Dengue Virus Type 4 in the Urban Transmission Cycle is Restrained by Vaccination and Homotypic Immunity. *Virology* 439(1): 34–41. DOI: 10.1016/j.virol.2013.01.018.
35. Thoisy B, Lacoste V, Germain A, Muñoz-Jordán J, Colón C, Mauffrey JF, Delaval M, Catzeflis F, Kazanji M, Matheus S, Dussart P, Morvan J, Aguilar Setién A, Deparis X, Lavergne A. 2009. Dengue Infection in Neotropical Forest Mammals. *Vect and Zoon Dis* 9(2): 157-170. DOI: 10.1089/vbz.2007.0280.
36. Vicente-Santos A, Moreira-Soto A, Soto-Garita C, Chaverri LG, Chaves A, Drexler JF, Morales JA, Alfaro-Alarcón A, Rodríguez-Herrera B, Corrales-Aguilar E. 2017. Neotropical bats that co-habit with humans' function as dead-end hosts for dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis* 11(5): e0005537. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005537.
37. Hanley KA, Monath TP, Weaver SC, Rossi SL, Richman RL, Vasilakis N. 2013. Fever versus Fever: the role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. *Infect Genet Evol* 0: 292–311. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.03.008.
38. Póvoa TF, Alves AMB, Oliveira CAB, Nuovo GJ, Chagas VLA, et al. (2014) The Pathology of Severe Dengue in Multiple Organs of Human Fatal Cases: Histopathology, Ultrastructure and Virus Replication. *PLoS ONE* 9(4): e83386. DOI: 10.1371/journal.pone.0083386.
39. Vasilakis N, Weaver SC. 2008. The History and Evolution of Human Dengue Emergence. *Adv in Vir Researc* 72: 1-55. DOI: 10.1016/S0065-3527(08)00401-6.
40. Na W, Yeom M, Choi IK, Yook H, Song D. 2017. Animal models for dengue vaccine development and testing. *Clin Exp Vaccine Res* 6:104-110. DOI: 10.7774/cevr.2017.6.2.104.
41. Barth OM, Barreto DF, Paes MV, Takiya CM, Pinhão AT, Schatzmayr HG. 2006. Morphological studies in a model for dengue-2 virus infection in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(8): 905-915. DOI: 10.1590/S0074-02762006000800014.
42. Paes MV, Lenzi HL, Nogueira ACM, Nuovo GJ, Pinha AT, Mota EM, de-Oliveira CAB, Schatzmayr H, Barth OM, Alves AMB. 2009. Hepatic damage associated with dengue-

- 2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Lab Invest* 89: 1140–1151. DOI: 10.1038/labinvest.2009.83.
43. Barreto DF, Takiya CM, Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Farias-Filho JC, Barth OM. 2007. Histopathological and ultrastructural aspects of mice lungs experimentally infected with dengue virus serotype 2. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(2): 175-182. DOI: 10.1590/S0074-02762007005000007.
44. Sakinah S, Priya SP, Kumari S, Amira F, K P, Alsaedy H, Ling MP, Chee HY, Higuchi A, Alarfaj AA, Munusamy MA, Murugan K, Taib CN, Arulselvan P, Rajan M, Neela VK, Hamat RA, Benelli G, Kumar SS. 2017. Impact of dengue virus (serotype DENV-2) infection on liver of BALB/c mice: A histopathological analysis. *Tissue Cell*. 49(1):86-94. DOI: 10.1016/j.tice.2016.11.005.
45. Amorim JFS, Azevedo AS, Costa SM, Trindade GF, Basílio-de-Oliveira CA, Gonçalves AJS, Salomão NG, Rabelo K, Amaral R, Geraldo LHM, Lima FRS, Mohana-Borges R, Paes MV, Alves AMB. 2019. Dengue infection in mice inoculated by the intracerebral route: neuropathological effects and identification of target cells for virus replication. *Sci Rep*. Nov 29;9(1):17926. DOI: 10.1038/s41598-019-54474-7.
46. Pan P, Zhang Q, Liu W, Wang W, Yu Z, Lao Z, Zhang W, Shen M, Wan P, Xiao F, Shereen MA, Zhang W, Tan Q, Liu Y, Liu X, Wu K, Liu Y, Li G and Wu J (2019) Dengue Virus Infection Activates Interleukin-1 β to Induce Tissue Injury and Vascular Leakage. *Front. Microbiol.* 10:2637. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02637.
47. Sarathy VV, Milligan GN, Bourne N, Barrett AD. 2015. Mouse models of dengue virus infection for vaccine testing. *Vaccine*. 2015 Dec 10;33(50):7051-60. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.09.112.
48. Milligan GN, Sarathy VV, Infante E, Li L, Campbell GA, Beatty PR. 2015. A Dengue Virus Type 4 Model of Disseminated Lethal Infection in AG129 Mice. *PLoS ONE* 10 (5): e0125476. DOI: 10.1371/journal.pone.0125476.
49. Milligan GN, Sarathy VV, White MM, Greenberg MB, Campbell GA, Pyles RB, Barrett ADT, Bourne N. 2017. A lethal model of disseminated dengue virus type 1 infection in AG129 mice. *J Gen Virol*. 2017 Oct;98(10):2507-2519. DOI: 10.1099/jgv.0.000923.
50. Sarathy VV, Infante E, Li L, Campbell GA, Wang T, Paessler S, Robert Beatty P, Harris E, Milligan GN, Bourne N, Barrett ADT. 2015. Characterization of lethal dengue virus

- type 4 (DENV-4) TVP-376 infection in mice lacking both IFN- α/β and IFN- γ receptors (AG129) and comparison with the DENV-2 AG129 mouse model. *J Gen Virol.* Oct;96(10):3035-3048. DOI: 10.1099/jgv.0.000246.
51. Perea-Martínez L, Moreno-Sandoval HN, Moreno-Altamirano MM, Salas-Rojas M, García-Flores MM, Aréchiga-Ceballos N. 2013. Experimental infection of *Artibeus intermedius* bats with serotype-2 dengue virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 36: 193-198. DOI: 10.1016/j.cimid.2012.12.002.
 52. Cabrera-Romo S, Recio-Tótoro B, Alcalá AC, Lanz H, Del Ángel RM, Sánchez-Cordero V. 2014. Experimental inoculation of *Artibeus jamaicensis* bats with dengue virus serotypes 1 or 4 showed no evidence of sustained replication. *Am J Trop Med Hyg* 91: 1227-1234. DOI: 10.4269/ajtmh.14-0361.
 53. Lim SM, van den Ham HJ, Oduber M, Martina E, Zaaraoui-Boutahar F, Roose JM, van Ijcken WFJ, Osterhaus ADME, Andeweg AC, Koraka P, Martina BEE. 2017. Transcriptomic Analyses Reveal Differential Gene Expression of Immune and Cell Death Pathways in the Brains of Mice Infected with West Nile Virus and Chikungunya Virus. *Front Microbiol* 8: 1556. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01556.
 54. Farfán-Ale JA, Blitvich BJ, Marlenee NL, Loroño-Pino MA, Puerto-Manzano F, García-Rejón JE, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, Ortega-Salazar A, Chávez-Medina J, Cremieux-Grimaldi JC, Correa-Morales F, Hernández-Gaona G, Méndez-Galván JF, Beaty BJ. 2006. Antibodies to West Nile virus in asymptomatic mammals, birds, and reptiles in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 74(5):908-14. DOI: <https://DOI.org/10.4269/ajtmh.2006.74.908>.
 55. Yeung MW, Shing E, Nelder M, Sander B. 2017. Epidemiologic and clinical parameters of West Nile virus infections in humans: a scoping review. *BMC Infect Dis* 17:609. DOI: 10.1186/s12879-017-2637-9.
 56. DeCarlo C, Omar AH, Haroun MI, Bigler L, Rais MNB, Abu J, Omar AR, Mohammed HO. 2017. Potential Reservoir and Associated Factors for West Nile Virus in Three Distinct Climatological Zones. *Vect and Zoon Dis* 17(10): 709-713. DOI: 10.1089/vbz.2016.2098.

57. Hubálek Z, Rudolf I, Nowotny N. 2014. Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. *Adv Virus Res.* 2014; 89:201-75. DOI: 10.1016/B978-0-12-800172-1.00005-7.
58. Morales MA, Fabbri CM, Zunino GE, Kowalewski MM, Lupo VC, Enría DA, Levis SC, Calderón GE. 2017. Detection of the mosquito-borne flaviviruses, West Nile, Dengue, Saint Louis Encephalitis, Ilheus, Bussuquara, and Yellow Fever in free ranging black howlers (*Alouatta caraya*) of Northeastern Argentina. *PLoS Negl Trop Dis* 11(2): e0005351. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005351.
59. Senne DA, Pedersen JC, Hutto DL, Taylor WD, Schmitt BJ, Panigrahy B. 2000. Pathogenicity of West Nile virus in chickens. *Avian Dis.* Jul-Sep;44(3):642-9.
60. Queen K, Shi M, Anderson LJ, Tong S. 2015. Chapter 9: Other Bat-Borne Viruses p 217-248. In Wang LF, Cowled C (eds) *Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases*, 1st ed. Wiley Blackwell, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, US.
61. Steiner CD, Riemersma KK, Stuart JB, Singapur A, Lothrop HD, Coffey LL. 2018. Scented Sugar Baits Enhance Detection of St. Louis Encephalitis and West Nile Viruses in Mosquitoes in Suburban California. *J Med Ent* 55(5): 1307-1318. DOI: 10.1093/jme/tjy064.
62. Maharaj PD, Bosco-Lauth AM, Langevin SA, Anishchenko M, Bowen RA, Reisen WK, Brault AC. 2018. West Nile and St. Louis encephalitis viral genetic determinants of avian host competence. *PLoS Negl Trop Dis* 12(2): e0006302. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006302.
63. Rosa R, Costa EA, Marques RE, Oliveira TS, Furtini R, Quaresma Bomfim MR, Martins Teixeira M, Alves Paixa T, Lima Santos R. 2013. Isolation of Saint Louis Encephalitis Virus from a Horse with Neurological Disease in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 7(11): e2537. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002537.
64. Klopp A, Gillespie TR, Hobelsberger D, Estrada A, Harper JM, Miller RA, Eckerle I, Müller MA, Podsiadlowski L, Leendertz FH, Drosten C, Junglen S. 2013. Provenance and geographic spread of St. Louis encephalitis virus. *mBio* 4(3): e00322-13. DOI:10.1128/mBio.00322-13.

65. Gíreseme SB, Kramer LD, Van Slyke GA, Pata JD, Gohara DW, Cameron CE, Ciota AT. 2017. Mutagen resistance and mutation restriction of St. Louis encephalitis virus. *J of Gen Vir* 98:201–211. DOI 10.1099/jgv.0.000682.
66. Marques RE, Del Sarto JL, Rocha RPF, Gomes GF, Cramer A, Rachid MA, Souza DG, Nogueira ML, Teixeira MM. 2017. Development of a model of Saint Louis encephalitis infection and disease in mice. *Journal of Neuroinfl* 14:61 DOI 10.1186/s12974-017-0837-2.
67. Maharaj PD, Anishchenko M, Langevin SA, Fang Y, Reisen WK, Brault AC. 2012. Structural gene (prME) chimeras of St Louis encephalitis virus and West Nile virus exhibit altered in vitro cytopathic and growth phenotypes. *J of Gen Vir* 93: 39–49. DOI 10.1099/vir.0.033159-0.
68. Borges da Silva L, Nayara H, Pereira O, Fernandes B, Ferreira BH, Mendes dos Santos MA, Dutra FJ, Ariadne Jesus de Paula, D, Dutra V, Dezengrini-Slhessarenko R. 2015. Saint Louis Encephalitis Virus in Mato Grosso, Central Western Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 57(3):215-220. DOI: 10.1590/S0036-46652015000300006.
69. Diaz A, Coffey LL, Burkett-Cadena N, Day JF. 2018. Reemergence of St. Louis Encephalitis Virus in the Americas. *Emerg Infec Dis* 24(12): 2150-2157. DOI: DOI: 10.3201/eid2412.180372.
70. Wheeler SS, Ball CS, Langevin SA, Fang Y, Coffey LL, Meagher RJ. 2016. Surveillance for Western Equine Encephalitis, St. Louis Encephalitis, and West Nile Viruses Using Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plos One* 11(1): e0147962. DOI: 10.1371/journal.pone.0147962.
71. Rivarola ME, Albrieu-Llinás G, Pisano MB, Tauro LB, Gorosito-Serrán M, Beccaria CG, Díaz LA, Vázquez A, Quaglia A, López C, Spinsanti L, Gruppi A, Contigiani MS. 2017. Tissue tropism of Saint Louis encephalitis virus: Histopathology triggered by epidemic and non-epidemic strains isolated in Argentina. *Virology*. 2017 May; 505:181-192. DOI: 10.1016/j.virol.2017.02.023.
72. Medlin S, Deardorff ER, Hanley CS, Vergneau-Grosset C, Siudak-Campfield A, Dallwig R, Travassos da Rosa A, Tesh RB, Martin MP, Weaver SC, Vaughan C, Ramirez O, Sladky KK, Paul-Murphy J. 2016. Serosurvey of Selected Aboviral Pathogens in Free-Ranging, Two-Toed Sloths (*Choloepus hoffmani*) and Three-Toed

- Sloths (*Bradypus variegatus*) in Costa Rica, 2005-07. *J Wild Dis* 52(4): 883–892. DOI:10.7589/2015-02-040.
73. Carrara S, Gonzales M, Ferro C, Tamayo M, Aronson J, Paessler S, Anishchenko M, Boshell J, Weaver SC. 2005. Venezuelan Equine Encephalitis Virus Infection of Spiny Rats. *Emerg Infect Dis* 11 (5): 663-669. DOI: 10.3201/eid1105.041251.
74. Dupuy LC, Richards MJ, Livingston BD, Hannaman D, Schmaljohn CS. 2018. A Multiagent Alphavirus DNA Vaccine Delivered by Intramuscular Electroporation Elicits Robust and Durable Virus-Specific Immune Responses in Mice and Rabbits and Completely Protects Mice against Lethal Venezuelan, Western, and Eastern Equine Encephalitis Virus Aerosol Challenges. *J of Imm Res* 2018: 1-15. DOI: 10.1155/2018/8521060.
75. León B, Jiménez C, González R, Ramirez-Carvajal L. 2019. First complete coding sequence of a Venezuelan equine encephalitis virus strain isolated from an equine encephalitis case in Costa Rica. *Microbiol Resour Announc* 8: e00672-19. DOI: 10.1128/MRA.00672-19.
76. Guerbois M, Volkova E, Forrester NL, Rossi SL, Frolov I, et al. 2013. IRES-driven Expression of the Capsid Protein of the Venezuelan Equine Encephalitis Virus TC-83 Vaccine Strain Increases Its Attenuation and Safety. *PLoS Negl Trop Dis* 7(5): e2197. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002197.
77. Sharma A, Knollmann-Ritschel B. 2019. Current Understanding of the Molecular Basis of Venezuelan Equine Encephalitis Virus Pathogenesis and Vaccine Development. *Viruses* 11 (164): 2-32. DOI:10.3390/v11020164.
78. Atasheva S, Kim DY, Frolova EI, Frolov I. 2015. Venezuelan equine encephalitis virus variants lacking transcription inhibitory functions demonstrate highly attenuated phenotype. *J Virol* 89:71–82. DOI:10.1128/JVI.02252-14.
79. Reynaud JM, Lulla V, Kim DY, Frolova EI, Frolov I. 2016. The SD1 subdomain of Venezuelan equine encephalitis virus capsid protein plays a critical role in nucleocapsid and particle assembly. *J Virol* 90:2008–2020. DOI:10.1128/JVI.02680-15.
80. Baer A, Lundberg L, Swales D, Waybright N, Pinkham C, Dinman JD, Jacobs JL, Kehn-Hall K. 2016. Venezuelan equine encephalitis virus induces apoptosis through the

- unfolded protein response activation of EGR1. *J Virol* 90:3558–3572. DOI:10.1128/JVI.02827-15.
81. Foy NJ, Akhrymuk M, Shustov AV, Frolova EI, Frolov IF. 2013. Hypervariable Domain of Nonstructural Protein nsP3 of Venezuelan Equine Encephalitis Virus Determines Cell-Specific Mode of Virus Replication. *J of Vir* 87(13): 7569-7584. DOI:10.1128/JVI.00720-13.
 82. Carey BD, Ammosova T, Pinkham C, Lin X, Zhou W, Liotta LA, Nekhai S, Kehn-Hall K. 2018. Protein phosphatase 1 α interacts with Venezuelan equine encephalitis virus capsid protein and regulates viral replication through modulation of capsid phosphorylation. *J Virol* 92: e02068-17. DOI: 10.1128/JVI .02068-17.
 83. Zacks MA, Paessler S. 2010. Encephalitic Alphaviruses. *Vet Microbiol* 27; 140(3-4): 281. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.08.023.
 84. Deardorff ER, Estrada-Franco JG, Freier JE, Navarro-López R, Da Rosa AT, Tesh RB, Weaver SC. 2011. Candidate Vectors and Rodent Hosts of Venezuelan Equine Encephalitis Virus, Chiapas, 2006–2007. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 85(6):1146–1153. DOI:10.4269/ajtmh.2011.11-0094.
 85. Sotomayor-Bonilla J, Abella-Medrano CA, Chaves A, Álvarez Mendiza P, Rico-Chávez O, Ibáñez-Bernal S, Rostal MK, Ojeda-Flores R, Barbachano-Guerrero A, Gutiérrez-Espeleta G, Aguirre AA, Daszak P, Suzán G. 2017. Potential Sympatric Vectors and Mammalian Hosts of Venezuelan Equine Encephalitis Virus in Southern Mexico. *J of Wild Dis*, 53(3): 1-5. DOI: 10.7589/2016-11-249.
 86. Martin DH, Eddy GE, Sudia WD, Reeves WC, Newhouse VF, Johnson KM. 1972. An Epidemiologic Study of Venezuelan Equine Encephalomyelitis in Costa Rica, 1970. *Amer J of Epidem* 93(6): 565-578. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a121426.
 87. Jiménez C, Romero M, Baldi M, Piche M, Alfaro A, Chaves A, Morales JA, León B, Hutter S. 2017. Encefalitis arbovirales en caballos de Costa Rica: 2009-2017. *Rev. Cienc Vet*, 36(3): 27. DOI: 10.15359/rcv.36-3.17.
 88. Ministerio de Salud. 2015. Protocolo para la Vigilancia y Atención de las Encefalitis y Meningoencefalitis Virales (VNO, EEE, EEV, EEO). 1ra ed. San José, Costa Rica.
 89. Skaff NK, Armstrong PM, Andreadis TG, Cheruvilil KS. 2017. Wetland characteristics linked to broad-scale patterns in *Culiseta melanura* abundance and eastern equine

- encephalitis virus infection. *Par & Vect* 10 (501): 1-16. DOI 10.1186/s13071-017-2482-0.
90. Frolov I, Kim DY, Akhrymuk M, Mobley JA, Frolova EI. 2017. Hypervariable domain of eastern equine encephalitis virus nsP3 redundantly utilizes multiple cellular proteins for replication complex assembly. *J Virol* 91: e00371-17. DOI: 10.1128/JVI.00371-17.
 91. Kim AS, Austin K, Gardner CL, Zuiani A, Reed DS, Trobaugh DW, Sun C, Basore K, Williamson LE, Crowe Jr. JE, Slifka MK, Fremont DH, Klimstra WB, Diamond MS. 2019. Protective antibodies against Eastern equine encephalitis virus bind to epitopes in domains A and B of the E2 glycoprotein. *Nat Microbiol* 4(1): 187–197. DOI:10.1038/s41564-018-0286-4.
 92. Trobaugh DW, Sun C, Dunn MD, Reed DS, Klimstra WB. 2019. Rational design of a live attenuated eastern equine encephalitis virus vaccine through informed mutation of virulence determinants. *PLoS Pathog* 15(2): e1007584. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007584.
 93. Phillips AT, Schountz T, Toth AM, Rico AB, Jarvis DL, Powers AM, Olson KE. 2013. Liposome-Antigen-Nucleic Acid Complexes Protect Mice from Lethal Challenge with Western and Eastern Equine Encephalitis Viruses. *J of Vir* 88 (3): 1771-1780. DOI:10.1128/JVI.02297-13.
 94. Tan Y, Tommy Lam TT-Y, Heberlein Larson LA, Smole SC, Auguste AJ, Hennigan S, Halpin RA, Fedorova N, Puri V, Stockwell TB, Shilts MH, Andreadis T, Armstrong PM, Tesh RB, Weaver SC, Unnasch TR, Ciota AT, Kramer LD, DasSR. 2018. Large-scale complete-genome sequencing and phylodynamic analysis of eastern equine encephalitis virus reveals source-sink transmission dynamics in the United States. *J Virol* 92: e00074-18. DOI: 10.1128/JVI.00074-18.
 95. Porter AI, Erwin-Cohen RA, Twenhafel N, Chance T, Yee SB, Kern SJ, Norwood D, Hartman LJ, Parker MD, Glass PJ, DaSilva L. 2017. Characterization and pathogenesis of aerosolized eastern equine encephalitis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Vir J* 14 (25): 1-15. DOI: 10.1186/s12985-017-0687-7.
 96. Vander Kelen P, Downs JA, Unnasch T, Stark L. 2014. A risk index model for predicting eastern equine encephalitis virus transmission to horses in Florida. *Appl Geogr* 1 (48): 79–86. DOI:10.1016/j.apgeog.2014.05.012.

97. Hasan SS, Sun C, Kim AS, Watanabe Y, Chen CL, Klose T, Buda G, Crispin M, Diamond MS, Klimstra WB, Rossman MG. 2018. Cryo-EM Structures of Eastern Equine Encephalitis Virus Reveal Mechanisms of Virus Disassembly and Antibody Neutralization. *Cell Rep* 25: 3136-3147. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.11.067.
98. Phelps AL, O'Brien LM, Eastaugh LS, Davies C, Lever MS, Ennis J, Zeitlin L, Nunez A, Ulaeto DO. 2019. Aerosol infection of Balb/c mice with eastern equine encephalitis virus; susceptibility and lethality. *Vir J* 16(2): 1-12. DOI: 10.1186/s12985-018-1103-7.
99. Waggoner JJ, Rojas A, Pinsky BA. 2018. Yellow fever virus: diagnostics for a persistent arboviral threat. *J Clin Microbiol* 56: e00827-18. DOI: 10.1128/JCM.00827-18.
100. Klitting R, Gould EA, Paupy C, de Lamballerie X. 2018. What Does the Future Hold for Yellow Fever Virus? (I). *Genes* 9 (291): 1-27. DOI:10.3390/genes9060291.
101. McLinden JH, Bhattarai N, Stapleton JT, Chang Q, Kaufman TM, Cassel SL, Sutterwala FS, Haim H, Houtman JC, Xiang J. 2017. Yellow Fever Virus, but Not Zika Virus or Dengue Virus, Inhibits T-Cell Receptor–Mediated T-Cell Function by an RNA-Based Mechanism. *J Infect Dis* 216(9):1164-1175. DOI: 10.1093/infdis/jix462.
102. Douam F, Soto Albrecht YE, Hrebikova G, Sadimin E, Davidson C, Kotenko SV, Ploss A. 2017. Type III interferon-mediated signaling is critical for controlling live attenuated yellow fever virus infection in vivo. *mBio* 8: e00819-17. DOI: 10.1128/mBio.00819-17.
103. Erickson AK, Pfeiffer JK. 2015. Spectrum of disease outcomes in mice infected with YFV-17D. *J of Gen Vir* 96:1328–1339. DOI: 10.1099/vir.0.000075.
104. Guo F, Wu S, Julander J, Ma J, Zhang X, Kulp J, Cuconati A, Block TM, Du Y, Guo J-T, Chang J. 2016. A novel benzodiazepine compound inhibits yellow fever virus infection by specifically targeting NS4B protein. *J Virol* 90: 10774–10788. DOI:10.1128/JVI.01253-16.
105. Delatorre E, Abreu FVS, Ribeiro IP, Gómez MM, dos Santos AAC, Ferreira-de-Brito A, Neves MSAS, Bonelly I, de Miranda RM, Furtado ND, Raphael LMS, da Silva FF, de Castro MG, Ramos DG, Romano APM, Kallás EG, Vicente ACP, Bello G, Lourenço-de-Oliveira R and Bonaldo MC. 2019. Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions From 2015 to 2018. *Front. Microbiol.* 10:1079. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01079.

- 106.Engelmann F, Josset L, Girke T, Park B, Barron A, Dewane J, Hammarlund E, Lewis A, Axthelm MK, Slifka MK, Messaoudi I. 2014. Pathophysiologic and Transcriptomic Analyses of Viscerotropic Yellow Fever in a Rhesus Macaque Model. *PLoS Negl Trop Dis* 8(11): e3295. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003295.
- 107.Sinigaglia L, Gracias S, Décembre E, Fritz M, Bruni D, Smith N, Herbeuval JP, Martin A, Dreux M, Tangy F, Jouvenet N. 2018. Immature particles and capsid free viral RNA produced by Yellow fever virus-infected cells stimulate plasmacytoid dendritic cells to secrete interferons. *Scient Rep* 8: 10889.DOI:10.1038/s41598-018-29235-7.
- 108.Berger, S. 2019. Yellow Fever: Global Status: 2019 edition. Gideon E-Book Series. Gideon Informatic Inc. Los Angeles, CA, USA.
- 109.Wachtman L, Mansfield K. 2012. Viral Diseases of Nonhuman Primates, p 2-77. In Abee CR, Mansfield K, Tardif S, Morris T (eds) *Nonhuman Primates in Biomedical Research: Biology and Management*, 2nd ed, vol 2. Elsevier, San Diego, CA, USA.
- 110.Gould E, Pettersson J, Higgs S, Charrel R, Lamballerie X. 2017. Emerging arboviruses: Why today? *One Health* 2017: 1–13. DOI: 10.1016/j.onehlt.2017.06.001.
- 111.Alm E, Lindegren G, Falk KI, Lagerqvist N. 2015. One-step real-time RT-PCR assays for serotyping dengue virus in clinical samples. *BMC Infect Dis* 15:493. DOI: 10.1186/s12879-015-1226-z.
- 112.Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, Debriel DA, Stoll F, Garin D. 2001. Comparison of Flavivirus Universal Primer Pairs and Development of a Rapid, Highly Sensitive Heminested Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of Flaviviruses Targeted to a Conserved Region of the NS5 Gene Sequences. *J of Clinic Microb*, 39 (5): 1922-1927. DOI: 10.1128/JCM.39.5.1922–1927.2001.
- 113.Grywna K, Kupfer B, Panning M, Drexler JF, Emmerich P, Drosten C., Kümmerer BM. 2010. Detection of All Species of the Genus Alphavirus by Reverse Transcription-PCR with Diagnostic Sensitivity. *J of Clinic Microb*, 48 (9): 3386–3387. DOI:10.1128/JCM.00317-10.
- 114.Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam V. 1992. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *J of Clin Microb*. 30 (3): 545-551.

115. Faye O, Faye O, Dupressoir A, Weidmann M, Ndiaye M, Sall AA. 2008. One-Step RT-PCR for detection of Zika virus. *J of Clin Vir.* 43(1): 96-101. DOI: 10.1016/j.jcv.2008.05.005.
116. World Organization for Animal Health. Terrestrial Manual 2013 [Internet]. 2013 [Citado 21 Jun 2018]. <http://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/>.
117. Pugachev KV, Guirakhoo F, Mitchell F, Ocran SW, Parsons M, Johnson BW, Kosoy OL, Lanciotti RS, Roehrig JT, Trent DW, Monath TP. 2004. Construction of yellow fever/St. Louis encephalitis chimeric virus and the use of chimeras as a diagnostic tool. *Am J Trop Med Hyg.* Nov;71(5):639-45. DOI:10.4269/ajtmh.2004.71.639.
118. Komar N, Langevin S, Monath TP. 2009. Use of a Surrogate Chimeric Virus to Detect West Nile Virus-Neutralizing Antibodies in Avian and Equine Sera. *Clin Vaccine Immunol.* Jan;16(1):134-5. DOI: 10.1128/CVI.00220-08.
119. Maxie MG, Miller MA. 2016. Introduction to the Diagnostic Process p 1- 15. In Maxie GM (ed) Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals, 6th ed, vol 1. Elsevier, Missouri, MO.
120. Pandit PS, Doyle MM, Smart KM, Young CCW, Drape GW, Johnson CK. 2018. Predicting wildlife reservoirs and global vulnerability to zoonotic Flaviviruses. *Nat Commun.* 2018; 9: 5425. DOI: 10.1038/s41467-018-07896-2.
121. Rodríguez-Herrera B, Ramírez-Fernández JD, Villalobos-Chaves D, Sánchez R. 2014. Actualización de la Lista de Especies de Mamíferos Vivos de Costa Rica. *Mast Neotr,* 21(2): 275-289.
122. Garrigues, Richard., P. Camacho-Varela, M. Montoya, P. O'Donnell, O. Ramírez-Alán, J. Zook. 2018. Lista Oficial de las Aves de Costa Rica – Actualización 2018. Comité de Especies Raras y Registros Ornitológicos de Costa Rica (Comité Científico), Asociación Ornitológica de Costa Rica. *Zeledonia* 22:2. San José, Costa Rica. [Internet]. 2019. [Citado 4 Ener 2019]. <https://listaoficialavesdecostarica.wordpress.com/lista-oficial/lista-oficial-online/>.
123. Contigiani MA, Diaz LA, Spinsanti LI. 2017. General Aspects on Arboviruses p 61-71. In Brisola-Marcondes C (Ed) *Arthropod Borne Diseases*, 1st ed. Springer International Publishing, Switzerland.

124. Burt AD, Portmann BC, McSween RNM. 2002. Liver pathology associated with diseases of other organs of systems. In: McSween RNM, Burt AD, Portmann BC (eds). Pathology of the liver, 4th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, UK.
125. Luedde T, Kaplowitz N, Schwabe RF. 2014. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology*. 2014 Oct;147(4):765-783.e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.07.018.
126. Valtolina C, Favier RP. 2017. Feline Hepatic Lipidosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. May;47(3):683-702. DOI: 10.1016/j.cvsm.2016.11.014.
127. Kelly WR. 1992. The liver and the biliary system p 319-406. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N (eds). *Pathology of Domestic Animals*, 4th ed. San Diego: Academic Press; USA.
128. Center SA. 2009. Diseases of the gallbladder and biliary tree. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2009 May;39(3):543-98. DOI: 10.1016/j.cvsm.2009.01.004.
129. Bloom PB. 2006. Veterinary Clinics Small Animal Practice: Canine and Feline Eosinophilic Skin Diseases. *Vet Clin Small Anim* 36: 141-160. DOI: 10.1016/j.cvsm.2005.09.015.
130. Greenlee JE. 2014. The equine encephalitis. *Handb Clin Neurol*. 123:417-32. DOI: 10.1016/B978-0-444-53488-0.00019-5.
131. Steele KE, Twenhafel NA. 2010. REVIEW PAPER: pathology of animal models of alphavirus encephalitis. *Vet Pathol*. 2010 Sep;47(5):790-805. DOI: 10.1177/0300985810372508.
132. Zacks MA, Paessler S. 2010. Encephalitic alphaviruses. *Vet Microbiol*. 2010 Jan 27;140(3-4):281-6. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.08.023.
133. Day MJ, Bilzer T, Mansell J, Wilcock B, Hall EJ, Jergens A, Minami T, Willard M, Washabau R; World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. 2008. Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. *J Comp Pathol*. 2008 Feb-Apr;138 Suppl 1: S1-43. DOI: 10.1016/j.jcpa.2008.01.001.

134. Spangler WL, Kass PH. 1998. Pathologic and prognostic characteristics of splenomegaly in dogs due to fibrohistiocytic nodules: 98 cases. *Vet Pathol.* 1998 Nov;35(6):488-98. DOI: 10.1177/030098589803500603.
135. O'Keefe DA, Couto CG. 1987. Fine-needle aspiration of the spleen as an aid in the diagnosis of splenomegaly. *J Vet Intern Med.* 1987 Jul-Sep;1(3):102-9. DOI: 10.1111/j.1939-1676.1987.tb01997.x.
136. Bell SA, Drew CP, Wilson WD, Pusterla N. 2008. Idiopathic chronic eosinophilic pneumonia in 7 horses. *J Vet Intern Med.* 2008 May-Jun;22(3):648-53. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2008.0100.x.
137. Demedts M, Costabel U. 2002. ATS/ERS international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J.* 2002 May;19(5):794-6. DOI: 10.1183/09031936.02.00492002.
138. McEntee K. 1990. *Reproductive Pathology of Domestic Mammals.* Academic Press, p281.
139. Groppetti D, Pecile A, Barbero C, Martino PA. 2012. Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches: role on fertility. *Theriogenology.* May;77(8):1549-56. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.11.022.
140. Kustritz R MV. 2006. Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract. *Theriogenology* 66(3):567-74. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.05.003.
141. Miller LM, Gal A. 2017. Cardiovascular System and Lymphatic Vessels p 561-616. In Zachary JF (ed) *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 6th ed. Elsevier, St Louis, Missouri, MO.
142. Browne LE, Carter TD, Levy JK, Snyder PS, Johnson CM. 2005. Pulmonary arterial disease in cats seropositive for *Dirofilaria immitis* but lacking adult heartworms in the heart and lungs. *Am J Vet Res.* Sep;66(9):1544-9. DOI: 10.2460/ajvr.2005.66.1544.
143. Uzal FA, Dobrenov B, Smythe L, Norris M, Dohnt M, Symonds M, O'Boyle D, Schouten F, Kelly WR. 2002. A study of "white spotted kidneys" in cattle. *Vet Microbiol.* May 24;86(4):369-75. DOI: 10.1016/S0378-1135(02)00021-4.
144. Adams LG. 2013. Nephroliths and ureteroliths: a new stone age. *N Z Vet J.* Jul;61(4):212-6. DOI: 10.1080/00480169.2013.775691.

145. Shivachandra SB, Viswas KN, Kumar AA. 2011. A review of hemorrhagic septicemia in cattle and buffalo. *Anim Health Res Rev.* Jun;12(1):67-82. DOI: 10.1017/S146625231100003X.
146. Smedley R, Mullaney T, Rumberiha W. 2009. Copper-associated hepatitis in Labrador Retrievers. *Vet Pathol.* 2009 May;46(3):484-90. DOI: 10.1354/vp.08-VP-0197-S-FL.
147. Schmidt RE, Reavill D. 2002. Lesions of the avian peritoneal (coelomic) cavity and serous membranes. *Exotic DVM.* 4(5):29-33.
148. Day M. 2014. Chapter 4: Serological testing p 39-50. In Day M (ed) *Veterinary Immunology Principles and Practice*, 2th ed. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, US.
149. Tizard IR. 2013. Chapter 41: Immunodiagnostic Techniques p 495-508. In Tizard IR (ed) *Veterinary Immunology*, 9th ed. Elsevier Saunders, St Louis, Missouri, MO.
150. LaVal RK, Rodríguez-Herrera B. 2002. *Murciélagos de Costa Rica*. 1st ed. Editorial INBio, Costa Rica.
151. Piche-Ovares MM. Tesis de Maestría: Detección del virus del oeste del Nilo en dos localidades con antecedentes de enfermedad neurológica en equinos: determinación molecular en aves y mosquitos y serología en humanos, aves y equinos. Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología. [Internet]. 2019. [Citado 30 May 2020]. <http://hdl.handle.net/10669/79908>.
152. Hacıoglu S, Dincer E, Isler CT, Karapinar Z, Ataseven VS, Ozkul A, Ergunay K. 2017. A Snapshot Avian Surveillance Reveals West Nile Virus and Evidence of Wild Birds Participating in Toscana Virus Circulation. *Vect Born Zoon Dis.* Oct;17(10):698-708. DOI: 10.1089/vbz.2017.2138.
153. Thompson NN, Auguste AJ, Coombs D, Blitvich BJ, Carrington CV, da Rosa AP, Wang E, Chadee DD, Drebot MA, Tesh RB, Weaver SC, Adesiyun AA. 2012. Serological evidence of flaviviruses and alphaviruses in livestock and wildlife in Trinidad. *Vect Born Zoon Dis.* Nov;12(11):969-78. DOI: 10.1089/vbz.2012.0959.
154. Bittar C, Machado RRG, Comelis MT, Bueno LM, Morielle-Versute E, Beguelini MR, de Souza RP, Nogueira ML, Rahal P. 2018. Lack of serological and molecular evidence of arbovirus infections in bats from Brazil. *PLoS ONE* 13(11): e0207010. DOI: <https://DOI.org/10.1371/journal.pone.0207010>.

155. Thompson NN, Auguste AJ, Travassos da Rosa AP, Carrington CV, Blitvich BJ, Chadee DD, Tesh RB, Weaver SC, Adesiyun AA. 2015. Seroepidemiology of selected alphaviruses and flaviviruses in bats in Trinidad. *Zoon Pub Heal*. Feb;62(1):53-60. DOI: 10.1111/zph.12118.
156. Kading RC, Schountz T. 2016. Flavivirus Infections of Bats: Potential Role in Zika Virus Ecology. *Am J Trop Med Hyg*. 2016 Nov 2; 95(5): 993–996. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0625.
157. Fagre AC, Kading RC. 2019. Can Bats Serve as Reservoirs for Arboviruses? *Viruses*. Mar 3;11(3). pii: E215. DOI: 10.3390/v11030215.
158. Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud. Centro Nacional de Referencia de Virología. Informe de Arbovirus basada en laboratorio: Análisis de datos de virus Zika, Dengue, Chikungunya, Mayaro y Fiebre Amarilla. Costa Rica. [Internet]. 2018. [Citado 19 Abr 2020]. https://www.inciensa.sa.cr/vigilancia_epidemiologica/informes_vigilancia/2018/Virologia/Informe%20anual%20Arbovirus%202018%20MGE%20ESB.pdf

12. Anexos

Anexo 1. Permiso del Comité Institucional para el Cuido y Uso de Animales (CICUA), Vicerrectoría de Investigación, UCR.

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN
COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDO Y USO DE ANIMALES**

24 de mayo de 2017
CICUA-042-17

Dra. Eugenia Corrales Aguilar
CIET

Estimada señora:

El Comité Institucional para el Cuido y Uso de Animales (CICUA), en su sesión 165, del 18 de mayo del año en curso, valoró las aclaraciones en el proyecto "Dinámica de las arbovirosis en Costa Rica: Estudio de vectores, reservorios, aspectos virológicos y seroepidemiológicos del Zika, Dengue, Chikungunya y otras arbovirosis en una localidad endémica, Plan Piloto de la Universidad de Costa Rica (UCR)".

Se aceptan las aclaraciones con lo cual queda aprobado dicho proyecto.

Atentamente,


Dra. Sara González Camacho
Coordinadora
CICUA

Cc: Dr. Fernando García, Vicerrector de Investigación
— Archivo

Anexo 2. Permiso del Sistema Nacional de Áreas de Conservación, Área de Conservación del Tempisque, MINAE.



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
 ÁREA DE CONSERVACIÓN TEMPISQUE
 DIRECCIÓN TÉCNICA
 PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN Y MONITOREO ECOLÓGICO



09 de agosto de 2017
ACT-PIM-070-17

Señor
 Luis Mario Romero Vega
 Investigador
 Universidad de Costa Rica

ASUNTO: Trámite de permiso investigación

Estimado señor:

El pasado 07 de julio de 2017 me ingresó una solicitud suya para un permiso de investigación y colecta científica, procedente de la Secretaría Ejecutiva del SINAC.

En relación con el proyecto, el cual incluye acceso genético en su metodología, debo indicarle que su solicitud no es procedente.

Lo anterior en razón del marco normativo que rige su investigación: el Reglamento sobre el acceso a la biodiversidad en actividades de Docencia, Acción Social y de Investigación de la Universidad de Costa Rica, Resolución N° 5861-2005, publicado en el Alcance a La Gaceta N° 9-2005.

Por otra parte, debido a que los sitios de colecta identificados en el territorio del Área de Conservación Tempisque están fuera de nuestras áreas silvestres protegidas, tampoco procede un permiso de ingreso.

Cordialmente;

Firmado por: ROBERTO ZUÑIGA MUÑOZ (FIRMA)
 Motivo: FIRMA DIGITAL / LIC. ROBERTO ZUÑIGA MUÑOZ
 Localización: ACT - SINAC - MINAE
 Fecha y hora: 09.08.2017 09:59:41
 Lic. Roberto Zúñiga Muñoz
Coordinador, Investigación y Monitoreo Ecológico

RZM / rzm / Sustantivos / Investigación y Monitoreo / Coordinación*09.08.2017

C: Mauricio Méndez Venegas Director Técnico ACT
 Lourdes Vargas Fallas Gestora PI-SINAC
 Archivo de Gestión



Dirección: Hojancha, Guanacaste, diagonal esquina sureste
 Iglesia Católica
www.actempisque.org
 TELEFAX (506)2659 81 90, 2659 81 93, 2659 93 69



Anexo 3. Permiso de la Comisión Institucional de Biodiversidad, Vicerrectoría de Investigación, UCR.



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

VI Vicerrectoría de
Investigación

16 de mayo de 2017
VI-2994-2017



Dra. Eugenia Corrales Aguilar
Investigadora
CIET

Estimada señora:

De conformidad con lo dispuesto en el “Reglamento sobre el Acceso a la Biodiversidad en Actividades de Docencia, Acción Social y de Investigación en la Universidad de Costa Rica”, la Comisión Institucional de Biodiversidad revisó el proyecto "**Dinámica de las arbovirosis en Costa Rica: Estudio de vectores, reservorios, aspectos virológicos y seroepidemiológicos de Zika, Dengue, Chikungunya y otras arbovirosis en una localidad endémica, Plan Piloto de la Universidad de Costa Rica (UCR)**", el cual se encuentra bajo su coordinación.

Le comunico que la Comisión Institucional de Biodiversidad aprobó el permiso de acceso a los elementos de la biodiversidad que se indican en su proyecto de investigación. Por esta razón le envío la Resolución #096 de la Comisión mediante la cual se le comunican las condiciones con que se aprueba este permiso de acceso.

Le saluda con toda consideración,



M.Sc. Jorge Warner
Coordinador
Comisión Institucional de Biodiversidad

JW/lf

C. Dario Hernández Castro, Gestor, VI
Consejo Científico del CIET
Licda. Silvia Salazar F., PROINNOVA
Archivo/Comisión de Biodiversidad


RESOLUCIÓN No. 096

La Comisión Institucional de Biodiversidad de la Universidad de Costa Rica, conoce la solicitud de permiso de acceso a los elementos y recursos genéticos y bioquímicos de la biodiversidad.

RESULTANDO

Primero: Que se presentó para su revisión por parte de la Comisión Institucional de Biodiversidad el Proyecto denominado “**Dinámica de las arbovirosis en Costa Rica: Estudio de vectores, reservorios, aspectos virológicos y seroepidemiológicos de Zika, Dengue, Chikungunya y otras arbovirosis en una localidad endémica, Plan Piloto de la Universidad de Costa Rica (UCR)**”, propuesto por la Dra. Eugenia Corrales Aguilar, Investigadora del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET). El proyecto tiene como objetivo general analizar la dinámica de las arbovirosis en Costa Rica mediante el estudio de vectores, posibles reservorios (aves y mamíferos), aspectos virológicos y seroepidemiología del virus Zika, Chikungunya y otras arbovirosis en un área endémica para mejorar la comprensión y profilaxis de estas infecciones en humanos y animales domésticos.

Segundo: Que la Comisión decidió revisar este proyecto de investigación básica por cuanto se encuentra contemplado en las actividades enumeradas en el Reglamento de Acceso a los Elementos de la Biodiversidad en actividades de Docencia, Acción Social y de Investigación de la Universidad de Costa Rica de conformidad con los artículos 10, 22 a 27 del citado reglamento.

Tercero: Que de la evaluación de la documentación se concluye que el proyecto tiene acceso al material genético, y que lo utilizará solamente con fines de investigación básica.

Cuarto: Que para el análisis de este Proyecto y la emisión de la correspondiente Resolución se han tomado en consideración los Principios Generales, Objetivos y Criterios Aplicables contemplados en el Reglamento así como el marco legal internacional aplicable.

Quinto: Que el Reglamento de Acceso a los Elementos de la Biodiversidad en actividades de Docencia, Acción Social y de Investigación de la Universidad de Costa Rica otorga a la Comisión Institucional de Biodiversidad las competencias para hacer operativo el Reglamento y, entre otras atribuciones, la de aprobar los proyectos de investigación, docencia y acción social en los que haya acceso a los elementos de la biodiversidad.



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

VI Vicerrectoría de
Investigación

Resolución 096
Pág. 2 de 3

POR TANTO,

**LA COMISIÓN INSTITUCIONAL DE BIODIVERSIDAD
RESUELVE:**

PRIMERO: Aprobar el acceso a los elementos y recursos genéticos y bioquímicos de la biodiversidad que se indican en la propuesta para el desarrollo de la investigación básica denominada “**Dinámica de las arbovirosis en Costa Rica: Estudio de vectores, reservorios, aspectos virológicos y seroepidemiológicos de Zika, Dengue, Chikungunya y otras arbovirosis en una localidad endémica, Plan Piloto de la Universidad de Costa Rica (UCR)**”, propuesto por la Dra. Eugenia Corrales Aguilar, Investigadora del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET).

SEGUNDO: En caso de que el proyecto de investigación cambie por el efecto dinámico de la investigación y se ubique en las categorías de investigación aplicada, bioprospección o comercialización, la investigadora deberá comunicarlo por escrito a la Comisión para que esta proceda a determinar lo que corresponda, incluyendo la necesidad de emitir una nueva Resolución de conformidad con el tipo de proyecto.

TERCERO: Este permiso lo es únicamente para el acceso a los recursos genéticos y bioquímicos. La investigadora deberá solicitar por su cuenta, los permisos de recolecta y autorización para el ingreso a los sitios donde se realicen las recolectas o se materialice el acceso, los cuales deberán ser tramitados ante las instancias correspondientes del Sistema Nacional de Áreas de Conservación. Este permiso solo autoriza el acceso a los recursos genéticos y bioquímicos de conformidad con los términos del proyecto aprobado. La obtención de cualquier otro permiso para la realización del proyecto (CITES, certificado fitosanitario de exportación o de importación, etc.) es responsabilidad de la investigadora.

CUARTO: El material biológico que se requiera para referencia deberá depositarse en una colección institucional de la Universidad de Costa Rica.

QUINTO: Cualquier transferencia de material de origen biológico fuera de la Universidad de Costa Rica debe realizarse mediante un Acuerdo de Transferencia de Material (ATM) entre la institución receptora y la Universidad de Costa Rica. Los términos de este ATM se deben negociar con la participación de PROINNOVA y de la Comisión Institucional de Biodiversidad. Estos términos deben incluir lo relativo a la distribución de posibles beneficios que surjan de la investigación y el acceso al material.



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

VI Vicerrectoría de
Investigación

Resolución 096
Pág.3 de 3

SEXTO: La investigadora responsable del proyecto comunicará a la Comisión cualquier cambio en el proyecto que implique una modificación sustancial de las actividades con base en las cuales se otorgó el presente permiso.

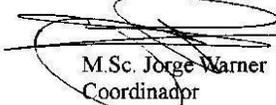
SÉTIMO: De conformidad con el cronograma del proyecto aprobado, el presente permiso de acceso se otorga hasta el 31 de diciembre de 2017. Al finalizar el proyecto, la investigadora responsable deberá enviar a esta Comisión un informe del acceso que realizó a los recursos genéticos y bioquímicos de la biodiversidad. Este informe debe incluir lo siguiente:

- Nombre científico y cantidad de muestras recolectadas
- Fecha en que se recolectaron las muestras
- Nombre de recolector o recolectora
- Número del permiso de recolecta otorgado por el SINAC con el cual fueron recolectadas las muestras.
- Nombre de la colección donde se depositaron las muestras.
- Información detallada de cualquier transferencia de material biológico realizada a otra institución.
- Breve resumen de los principales resultados científicos obtenidos a partir del estudio de las muestras recolectas.

OCTAVO: La Comisión se reserva el derecho de cancelar este permiso en el caso de que se incumpla con lo establecido en esta Resolución o con la normativa legal vigente. Contra esta Resolución tienen lugar los recursos ordinarios de revocatoria ante la Comisión y la apelación ante la persona que ocupe la Rectoría, dentro de los siete días hábiles siguientes a la notificación de la presente Resolución.

Ciudad Universitaria, "Rodrigo Facio", 16 de mayo de 2017

COMUNÍQUESE


M.Sc. Jorge Warner
Coordinador
Comisión Institucional de Biodiversidad



JWP/LFC

Anexo 4. Permiso del Sistema Nacional de Áreas de Conservación, Área de Conservación La Amistad Caribe Sur, MINAE.



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD CARIBE
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN



**RESOLUCIÓN N°
R-SINAC-PNI-ACLAC-054-2018
Exp. Dig. N° M-PC-SINAC-PNI-ACLAC-047-2018**

Ministerio Del Ambiente y Energía, Sistema Nacional de Áreas de Conservación, a través del Programa de Investigación del Área de Conservación La Amistad Caribe, a las nueve horas, treinta minutos del día 25 del mes de julio del año dos mil dieciocho,

RESULTANDO



PRIMERO: Que el día segundo del mes de julio del año dos mil dieciocho, se recibe vía electrónica solicitud de permiso de investigación y licencia de colecta científica de Luis Mario Romero Vega, costarricense, veterinario documento de identidad N° 1-1429-0716, dirección permanente: Dulce Nombre de Coronado. San José, Costa Rica, solicita permiso para desarrollar el proyecto: "Dinámica de las arbovirosis en Costa Rica: "Estudio de vectores (*Aedes aegypti*, *Culex* sp., etc.), reservorios (aves y mamíferos), aspectos virológicos y seroepidemiología de Zika, Chikungunya y otros arbovirus en dos localidades endémicas a Dengue, Encefalitis Equina Venezolana y Virus del Oeste del Nilo" (tesis de posgrado).

SEGUNDO: Que la investigación es apoyada por el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Universidad de Costa Rica - UCR (CIET-0316-2018). Tel. (506) 2511-8602, Fax. (506) 2225-4384. Web: <http://ciet.ucr.ac.cr>. Correo-e: ciet.fm@ucr.ac.cr.

TERCERO: Que se solicita autorizar la participación en esta investigación científica a Daniel Barrantes Murillo, costarricense, veterinario documento de identidad N° 2-0700-0565, María Martha Piche Ovares, costarricense, veterinaria documento de identidad N° 4-0197-0905, Eugenia Corrales Aguilar, costarricense, microbióloga documento de identidad N° 1-0995-0701 y Claudio Enrique Soto Garita, costarricense, microbiólogo documento de identidad N° 1-1480-0927, en calidad de coinvestigadores.

CUARTO: Que el día décimo segundo de mes de julio del año dos mil dieciocho, vía electrónica el solicitante cumplió con todos los requisitos establecidos en el Decreto N°32553-MINAE.

CONSIDERANDO

PRIMERO: Que la Ley de Conservación de la Vida Silvestre No.7317, del treinta de octubre de mil novecientos noventa y dos y sus reformas, en los artículos 1 y 3, establece que: "La vida silvestre está conformada por el conjunto de organismos que viven en condiciones naturales, temporales o permanentes en el territorio nacional,..." que "Se declara de dominio público la fauna silvestre que constituye un recurso natural renovable,.... De interés público la flora silvestre..." y que únicamente pueden ser objeto de apropiación particular y de comercio mediante las disposiciones contenidas en los tratados públicos, en los convenios



Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
Tel. (506) 22065516 • Fax: (506) 22065516 • Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD PACÍFICO
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN



R-SINAC-PNI-ACLAC-054-2018
Página 2 de 9

internacionales y en la presente Ley N° 7317 y su reglamento, artículos 3 y del 36 al 50 y otras normativas vinculantes.

SEGUNDO: Que según la ley N° 7317, Ley de Conservación de la Vida Silvestre y sus reformas, en el artículo 6 o, establece que el Sistema Nacional de Áreas de Conservación del Ministerio de Ambiente y Energía es el órgano competente en materia de planificación, desarrollo y control de la vida silvestre, en igual sentido dicha competencia se encuentra establecida en el artículo 22 de la ley de Biodiversidad N° 7788.

TERCERO: Que según la ley N° 7317, Ley de Conservación de la Vida Silvestre y sus reformas, en el artículo 7o, inciso e) establece que el Sistema Nacional de Áreas de Conservación del Ministerio de Ambiente y Energía tiene entre sus competencias el promover y ejecutar investigaciones en el campo de la Vida Silvestre.

CUARTO: Que según la ley N° 7317, Ley de Conservación de la Vida Silvestre y sus reformas, en el artículo 40 al 49, faculta al SINAC dar autorización para permisos de investigación, así como rechazar cualquier solicitud contraria al interés público y fiscalizar la ejecución de estas actividades.

QUINTO: Que según la ley No 4594, Duplicado Material Zoológico Botánico o Mineral a UCR y Museo Nacional del primero de julio del año mil novecientos setenta, en su artículo 1o indica que: "Artículo 1º.- Todo científico o institución que personalmente o en representación, recoja material botánico, zoológico o mineral con fines taxonómicos, en cualquier zona o lugar del territorio nacional, tiene la obligación de dejar duplicados de sus colecciones a la Universidad de Costa Rica y al Museo Nacional. La Universidad de Costa Rica y el Museo Nacional, conjuntamente, pueden exonerar al científico o institución de que se trata, de la obligación a que se refiere el párrafo anterior, tomando en consideración motivos calificados que el impidan dejar esos duplicados."

SEXTO: Que la Ley Forestal número siete mil quinientos setenta y cinco (Ley N° 7575, publicada en La Gaceta N° 72 del 16 de abril de 1996) y sus reformas, artículo dieciocho, determina la facultad del Estado para realizar o autorizar labores de investigación en el patrimonio natural del Estado.

SÉPTIMO: Que la Ley de Biodiversidad (Ley N° 7788) en su Artículo 89: Fomento de programas de investigación, divulgación e información; establece que el Ministerio del Ambiente y Energía y las demás instituciones públicas y privadas fomentarán el desarrollo de programas de investigación sobre la diversidad biológica.



Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
Tel. (506) 22065516 • Fax: (506) 22065516 • Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD PACÍFICO
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN



R-SINAC-PNI-ACLAC-054-2018
Página 3 de 9

OCTAVO: Que la Ley de Conservación de la Vida Silvestre (Ley N°7317), en su Artículo 2, define como Estudio Científico: Toda investigación que aplica el método científico; coleccionar: acción de recoger, cortar, capturar o separar de su medio especies orgánicas, sus productos o subproductos; Colecta Científica: la captura o extracción de animales o plantas, sus productos o subproductos, con fines de estudio científico.

NOVENO: Que la Estrategia Nacional de Conservación y Uso Sostenible de la Biodiversidad, establece dentro de sus políticas: el impulso a las investigaciones dirigidas a conocer el estado de las especies y ecosistemas de interés particular para la conservación.

DÉCIMO: Que las Políticas para las Áreas Silvestres Protegidas establecen que se debe: - fomentar el desarrollo de la investigación básica y aplicada dentro de las áreas silvestres protegidas, de acuerdo con las necesidades identificadas por la institución; - autorizar aquellas investigaciones que se realicen en las áreas silvestres protegidas de conformidad con lo que establece la legislación vigente, la reglamentación interna del Área de Conservación y las prioridades de investigación identificadas por las áreas silvestres protegidas. Políticas que priorizan como actividad el que: cada Área de Conservación deberá fomentar, emitir lineamientos, participar y colaborar en el desarrollo de investigaciones básicas e inventarios de biodiversidad con las instituciones interesadas en este campo; para lograr lo antes posible un mejor entendimiento de la biodiversidad presente en las ASP y en los bosques patrimonio del Estado tanto en áreas estatales como privadas.

DECIMO PRIMERO: Que las Áreas de Conservación tienen un Coordinador de Investigación que tiene como objetivo, promover, coordinar y facilitar procesos de investigación y monitoreo de manera que la información generada y sistematizada oriente la toma de decisiones para la conservación, manejo y uso sostenible de los recursos naturales y culturales presentes en el Área de Conservación.

DECIMO SEGUNDO: Que en el Manual de Procedimientos para realizar Investigación en Biodiversidad y Recursos Culturales en las Áreas de Conservación, establecido por el Comité Técnico de Investigación del SINAC (decreto ejecutivo N°28993-MINAE) y oficializado por el SINAC (oficios SINAC-DG-147 y DG-149, del 2002 y por el decreto ejecutivo N°32553-MINAE) se establece como función de los encargados de los Programas de Investigación, entre otras, las siguientes: a) Tramitar, evaluar y resolver los proyectos de investigación que se presenten ante su oficina regional, para realizar estudios científicos en su área de conservación. b) Elaborar las resoluciones respectivas y otorgar el pasaporte científico (licencia de recolecta científica). c) Recibir y analizar toda solicitud de permiso de investigación que se presente ante su oficina regional, para realizar estudios científicos en su área de conservación. d) Establecer acuerdos de Transferencia de Material cuando sea considerado necesario por la naturaleza de la investigación



Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
Tel. (506) 22065516 • Fax: (506) 22065516 • Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD PACÍFICO
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN



R-SINAC-PNI-ACLAC-054-2018
Página 4 de 9

DÉCIMO TERCERO: Que de conformidad con el criterio de la Secretaría Técnica Nacional Ambiental (SETENA), según acuerdo ACP-70-2015, del 23 de junio de 2015, de la Sesión Ordinaria 088-2015-SETENA de su Comisión Plenaria, la evaluación de impacto ambiental no resulta de aplicación para los permisos de investigación ni las licencias de colecta científica o académica, a que se refiere el numeral 26 de la Ley de Conservación de la Vida Silvestre 7317.

DECIMO CUARTO: Que los objetivos de la investigación concuerdan con los objetivos de conservación del SINAC-MINAE, detallados en su Plan Estratégico respectivo cuando procede; así como en los objetivos de investigación que se enmarcan en la Estrategia Nacional de Investigación.

DÉCIMO QUINTO: Que las personas físicas o jurídicas que acrediten personal de apoyo al proceso de investigación deberán especificar la condición de dicho personal (asistentes). En caso de manejo de vida silvestre únicamente lo podrá realizar las personas que sean acreditadas por el investigador como asistentes de la investigación y que se encuentren facultadas para tal manejo según los fines y métodos de la investigación. Se aclara que en el caso de colaboradores que participen del proyecto de investigación en forma ad honorem (como voluntarios), por tratarse de una relación entre particulares, esta no se encuentra regulada por la normativa del Decreto de voluntariado del SINAC vigente, Decreto Ejecutivo N° 36812.

Por tanto,

El Programa de Investigación del Área de Conservación La Amistad – Caribe



RESUELVE:

PRIMERO: Aprobar la solicitud presentada por Luis Mario Romero Vega, documento de identidad N° 1-1429-0716, para desarrollar la investigación científica “Dinámica de las arbovirosis en Costa Rica: Estudio de vectores (*Aedes aegypti*, *Culex* sp., etc.), reservorios (aves y mamíferos), aspectos virológicos y seroepidemiología de Zika, Chikungunya y otros arbovirus en dos localidades endémicas a Dengue, Encefalitis Equina Venezolana y Virus del Oeste del Nilo”, con el objetivo principal de: - Analizar la dinámica de las arbovirosis en Costa Rica mediante el estudio de vectores, posibles reservorios (aves y mamíferos), aspectos virológicos y seroepidemiología del virus Zika, Chikungunya y otras arbovirosis en dos áreas endémicas para mejorar la comprensión y profilaxis de estas infecciones en humanos y animales domésticos. Los objetivos específicos de: - Complementar el cuadro epidemiológico de Alfa y Flavivirus en dos localidades de Costa Rica para mejorar el conocimiento de las arbovirosis en nuestro medio. - Brindar apoyo al sector salud y veterinario para el diagnóstico de las arbovirosis causadas por Flavivirus y Alfavirus. - Realizar análisis filogenético Bayesiano de



Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
Tel. (506) 22065516 • Fax: (506) 22065516 • Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD PACÍFICO
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN



R-SINAC-PNI-ACLAC-054-2018
Página 5 de 9

las secuencias virales obtenidas en el estudio para determinar la diversidad de los virus circulantes.

SEGUNDO: Autorizar la participación en esta investigación científica a Luis Mario Romero Vega, documento de identidad N° 1-1429-0716, como investigador principal. A Daniel Barrantes Murillo, documento de identidad N° 2-0700-0565, María Martha Piche Ovares, documento de identidad N° 4-0197-0905, Eugenia Corrales Aguilar, documento de identidad N° 1-0995-0701 y Claudio Enrique Soto Garita, documento de identidad N° 1-1480-0927, como coinvestigadores.

TERCERO: Otorgar licencias de colecta científica N° ACLAC-262-2018 a Luis Mario Romero Vega, N° ACLAC-263-2018 a Daniel Barrantes Murillo, N° ACLAC-264-2018 a María Martha Piche Ovares, N° ACLAC-265-2018 a Eugenia Corrales Aguilar y N° ACLAC-266-2018 a Claudio Enrique Soto Garita, para la **Colecta permanente** de:

Cantidad a coleccionar/localidad	Material a coleccionar	Grupo Taxonómico
25 individuos	roedores	Clase: Mammalia – Orden: Rodentia
10 individuos	aves	Clase: Aves – Orden: Passeriformes :No Passeriformes
1000 o más individuos	mosquitos	Clase: Insecta: Orden: Diptera

- Toma de variables biométricas y fotografías.
- **Manipulación temporal** del hábitat para la colocación de las *trampas Sherman* para roedores y para la colocación y manipulación de las *redes de niebla* para la avifauna.
- No se permite la **colecta permanente** de los individuos de las especies de roedores y aves que se capturen y se encuentran en los listados de **ESPECIES EN PELIGRO DE EXTINCIÓN**, con **POBLACIONES REDUCIDAS** y en los listados de **CITES** para Costa Rica, según la Resolución: **R-SINAC-CONAC-092-2017**.

CUARTO: Descripción del lugar de acceso. Que el área específica donde se llevará a cabo la investigación corresponde a fincas privadas siguientes:

- 1 - Don Paco Chavarría - Julio Chavarría, Hone Creek Sur: 9°44'1.62"N - 82°52'23.67"O
- 2 - José Antonio Bolívar, Hone Creek Norte: 9°44'32.28"N - 82°53'37.53"O
- 3 - Deyogen, Hone Creek Norte: 9°41'59.18"N - 82°54'19.85"O



Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
Tel. (506) 22065516 • Fax: (506) 22065516 • Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD PACÍFICO
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN



R-SINAC-PNI-ACLAC-054-2018
Página 6 de 9

4 - Joseph a.k.a Big Joe – Dra. Grace, Cahuita: 9°43'52.73"N - 82°50'26.41"O

Las fincas se localizan dentro del cantón de Talamanca, provincia de Limón, Área de Conservación La Amistad Caribe.

QUINTO: El Sistema Nacional de Áreas de Conservación únicamente autorizará los métodos de recolecta científica enumerados en el reglamento # 32633 de la Ley de Conservación de la Vida Silvestre N° 7317 y sus reformas.

SEXTO: De la metodología científica. - Captura y Muestreo roedores: Se colectarán un máximo de 25 roedores. En los sitios de muestreo se colocarán 70 trampas Sherman (Woodman, 1997) con 10 metros de distancia de una a la otra, formando una escuadra 100x70 metros cuadrados. Las trampas serán cebadas con una mezcla de mantequilla de maní, avena y esencia de vainilla. Serán colocadas entre las 14:00 y 17:00 horas y revisadas a la mañana siguiente. Estas serán colocadas un mínimo de 2 noches seguidas. Los roedores capturados serán recolectados permanentemente. La eutanasia será realizada introduciendo la trampa Sherman en una bolsa Ziploc, la cual contiene un algodón impregnado de Isoflurano. Se dejará al animal en un lugar calmado y a la sombra durante diez minutos, al cabo de este tiempo se evaluaron los signos vitales (palpación de ritmo cardíaco y reflejo corneal). Si al cabo de este tiempo el animal aún presenta algún signo vital, se procederá a la dislocación cervical. Una vez eutanasiados se procederá a obtener una muestra de sangre vía intracardiaca. Posteriormente se tomarán fotos y medidas del cuerpo, cola, oreja y tarsos para su identificación (Reid, 2009). La necropsia será realizada de acuerdo al protocolo descrito por Elvang, 2011. Los órganos (Pulmón, hígado, riñón, bazo, cerebro) se preservarán tanto en formalina al 10% como en ARN later para la preservación de material genético. - Captura y Muestreo de Aves: En los mismos sitios de captura de roedores se colocarán 10 redes de niebla para la captura de aves de acuerdo con lo recomendado por varios autores (NABC, 2001; Gosler, 2004). En caso de lluvia intensa, las redes serán cerradas hasta que la lluvia cese para ser reabiertas nuevamente. Las redes estarán abiertas desde las 15:00 horas hasta las 17:00 horas. Las aves capturadas serán clasificadas por especie y posteriormente se les tomará una muestra sanguínea. Al menos diez aves por sitio serán capturadas permanentemente. El procedimiento de eutanasia se realizará igual que el de roedores. Posteriormente se les realizará necropsia y se tomaran muestras de órganos (Pulmón, hígado, riñón, bazo, cerebro) los cuales se preservaran tanto en formalina al 10% como en RNA later para la preservación de material genético. - Colectar e identificar vectores (mosquitos): Se colocarán trampas para mosquitos en la misma zona de captura. Las trampas utilizadas serán las trampas tipo "CDC" de CO2 y luz, así como trampas para hembras grávidas. Estas serán colocadas en áreas boscosas, en los dormideros de los animales domésticos y en las casas de habitación presentes en las áreas de estudio. Estarán activadas durante todo el día y la noche, por un total de dos días seguidos. Las trampas serán revisadas y recargadas con hielo seco como fuente de CO2 cada 9-12 horas y los mosquitos recolectados



Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
Tel. (506) 22065516 • Fax: (506) 22065516 • Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD PACÍFICO
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN



R-SINAC-PNI-ACLAC-054-2018
Página 7 de 9

serán almacenados en frío para su traslado e identificación en el Laboratorio de Entomología Médica de la UCR. Una vez identificados, se almacenarán en RNA Later para la posterior extracción de ácidos nucleicos, utilizando Trizol®. Todo el material genético será depositado en el Laboratorio de Virología y en el Laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

SEPTIMO: Para la inscripción de personas adicionales en la investigación y/o el otorgamiento de pasaportes de colecta científica adicionales a coinvestigadores y asistentes de investigación, se deben presentar en físico o mediante medio electrónico de acuerdo a la legislación vigente, los requisitos siguientes: Una fotografía reciente tamaño pasaporte (4,5cmx3,5cm) de frente que cubra toda la cara hasta los hombros, sin lentes oscuros, sombrero, gorra u otro accesorio, hoja de Vida en idioma español para cada uno de los asistentes, copia de la cédula de identidad o pasaporte de cada uno de los asistentes, una carta de solicitud de inclusión de los asistentes dentro de la investigación.

OCTAVO: El presente permiso no autoriza la comercialización de plantas o animales ni subproductos de éstos.

NOVENO: Cuando los especímenes obtenidos mediante colecta científica o cultural se destinen a instituciones extranjeras, el Sistema Nacional de Áreas de Conservación, exigirá, antes de otorgar el permiso de exportación con fines científicos o culturales, la entrega de ejemplares idénticos para el Museo Nacional y a la Universidad de Costa Rica, para los jardines botánicos y los zoológicos estatales, única y exclusivamente. (Artículo 46 Ley No 7317). Así, también se exigirá la devolución de los especímenes colectados (vivos o muertos) al Museo de Zoología de la UCR.

DÉCIMO: Este permiso no faculta para coleccionar en finca particulares o en Territorio Indígena sin el respectivo permiso de quien está legalmente autorizado para otorgarlo. La eficacia de este permiso queda sujeta a la existencia de una autorización adicional por parte del propietario de dichos terrenos privados o de quien estuviera legalmente facultado para ello.

DÉCIMO PRIMERO: El Área de Conservación La Amistad Caribe se reserva el derecho de cancelar este permiso sin responsabilidad alguna para el Estado, cuando se compruebe que se ha incumplido el mismo.

DÉCIMO SEGUNDO: El permisionario no puede ceder ni en modo alguno enajenar este permiso, pues el mismo es personal e intransferible. Del mismo modo, cuando el investigador principal o alguno de sus coinvestigadores desee incluir nuevos asistentes de investigación no autorizados en el **resuelve SEGUNDO** de este permiso, deberá solicitarlo por escrito al Programa de Investigación del Área de Conservación La Amistad Caribe con al menos 8 días



Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
Tel. (506) 22065516 + Fax: (506) 22065516+ Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
 ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD PACÍFICO
 PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN



R-SINAC-PNI-ACLAC-054-2018
 Página 8 de 9

de antelación. No se autoriza el uso de este permiso y sus respectivas licencias de colecta para otros fines ajenos a las labores científicas del presente proyecto, debiendo forzosamente solicitarse otros permisos y licencias adicionales para la realización de giras de campo, prácticas supervisadas, tesis de grado o posgrado y otras actividades similares que formen parte de los programas de estudios universitarios.

DÉCIMO TERCERO: El permisionario deberá permitir a los funcionarios (as) del Sistema Nacional de Áreas de Conservación, el ingreso al lugar donde se realizará el acceso o al lugar donde se realiza la investigación.

DÉCIMO CUARTO: El Sistema Nacional de Áreas de Conservación salva la responsabilidad sobre cualquier accidente o situación que afecte y/o ponga en peligro la integridad de las personas (investigadores, asistentes de campo) que participan en el desarrollo de las actividades de la investigación.

DÉCIMO QUINTO: Del Informe Final. El investigador principal deberá rendir ante el Área de Conservación La Amistad Caribe - ACLAC un informe escrito/digital (en formato del SINAC) antes del **25 de octubre del 2019**, en idioma español, en cumplimiento de lo establecido por el artículo 38 de la Ley de Conservación de la Vida Silvestre N° 7317 y su Reglamento decreto Ejecutivo N° 32633-MINAE. El incumplimiento de este requisito será sancionado (a) con la imposibilidad, para los (as) científicos (as) en forma personal o para la institución que representa, de obtener nuevas autorizaciones, de estudios o investigaciones, hasta por un período de cinco años.

DÉCIMO SÉXTO: El permisionario deberá acatar las recomendaciones técnicas dadas por el Sistema Nacional de Áreas de Conservación y se compromete a enviar copia a la Biblioteca Nacional y al Área de Conservación las publicaciones que genere el presente permiso de investigación.

DECIMO SÉPTIMO: De la Vigencia. Este permiso rige a partir del **26 de julio del 2018** y hasta el día **25 de julio del 2019**, pudiendo solicitarse un nuevo permiso para el mismo proyecto, desde treinta días antes de su vencimiento.

DÉCIMO OCTAVO: De comprobarse el incumplimiento parcial o total de algunas de las cláusulas citadas en la presente resolución o a la Ley de Vida Silvestre número 7317 y su reglamento, se cancelaría el permiso, con las consecuencias administrativas, civiles y penales, que consecuentemente se deriven y se interpondrá sin mayor demora la denuncia penal o administrativa ante la autoridad correspondiente.



Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
 Tel. (506) 22065516 • Fax: (506) 22065516 • Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
 ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD PACÍFICO
 PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN



R-SINAC-PNI-ACLAC-054-2018
 Página 9 de 9

DÉCIMO NOVENO: Contra la presente resolución proceden los recursos ordinarios de revocatoria y / o apelación, de conformidad con los artículos 343 y siguientes de la Ley General de la Administración Pública, los cuales serán resueltos, el de revocatoria por el mismo órgano que lo dictó y el de apelación por el Consejo Nacional de Áreas de Conservación. Los recursos deberán interponerse ante el órgano que dicta esta resolución dentro de los tres días tratándose de acto final y de veinticuatro horas en los demás casos, contados, en ambos casos, posteriores a su notificación.

VIGÉSIMO: Notifíquese contra la presente.

JORGE
 ARTURO
 GONZALEZ
 VILLALOBOS
 (FIRMA)

Firmado digitalmente por
 JORGE ARTURO
 GONZALEZ
 VILLALOBOS (FIRMA)
 Fecha: 2018.07.25
 21:48:15 -06'00'



Jorge González Villalobos
 Programa de Investigación
 ACLAC-SINAC-MINAE

C: Donald Campbell, Jefe Subregión Limón-Talamanca-ACLAC-SINAC-MINAE
 José Masis, Jefe Unidad Protección-Control-ACLAC-SINAC-MINAE
 Gina Cuza, Directora de Áreas Silvestres Protegidas-ACLAC-SINAC-MINAE
 Archivo Programa de Investigación-ACLAC-SINAC-MINAE

NOTIFICADO VIA CORREO ELECTRÓNICO

Este documento está firmado digitalmente, por lo que corresponde al documento original en su archivo electrónico, por favor portarlo en algún dispositivo de almacenamiento con el fin de mostrarlo a las autoridades cuando lo soliciten



Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
 Tel. (506) 22065516 • Fax: (506) 22065516 • Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
 ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD CARIBE
 PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN



RESOLUCIÓN N°
R-SINAC-PNI-ACLAC-055-2018
Exp. Dig. N° M-PC-SINAC-PNI-ACLAC-050-2018

Ministerio Del Ambiente y Energía, Sistema Nacional de Áreas de Conservación, a través del Programa de Investigación del Área de Conservación La Amistad Caribe, a las quince horas, treinta minutos del día 25 del mes de julio del año dos mil dieciocho.

RESULTANDO



PRIMERO: Que el día segundo del mes de julio del año dos mil dieciocho, se recibe vía electrónica solicitud de permiso de investigación y licencia de colecta científica de María Marta Piche Ovares, costarricense, veterinaria documento de identidad N° 4-0197-0905, dirección permanente: Heredia - San José, Costa Rica, solicita permiso para desarrollar el proyecto: "Murciélagos y roedores en ambientes peridomiciliarios: ¿Reservorios del virus del Zika?" (Tesis de posgrado).

SEGUNDO: Que la investigación es apoyada por el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Universidad de Costa Rica - UCR (CIET-0316-2018). Tel. (506) 2511-8602, Fax. (506) 2225-4384. Web: <http://ciet.ucr.ac.cr>. Correo-e: ciet.fm@ucr.ac.cr.

TERCERO: Que se solicita autorizar la participación en esta investigación científica a Daniel Barrantes Murillo, costarricense, veterinario documento de identidad N° 2-0700-0565, Luis Mario Romero Vega, costarricense, veterinario documento de identidad N° 1-1429-0716, Eugenia Corrales Aguilar, costarricense, microbióloga documento de identidad N° 1-0995-0701 y Claudio Enrique Soto Garita, costarricense, microbiólogo documento de identidad N° 1-1480-0927, en calidad de coinvestigadores.

CUARTO: Que el día décimo segundo de mes de julio del año dos mil dieciocho, vía electrónica la solicitante cumplió con todos los requisitos establecidos en el Decreto N°32553-MINAE.

CONSIDERANDO

PRIMERO: Que la Ley de Conservación de la Vida Silvestre No.7317, del treinta de octubre de mil novecientos noventa y dos y sus reformas, en los artículos 1 y 3, establece que: "La vida silvestre está conformada por el conjunto de organismos que viven en condiciones naturales, temporales o permanentes en el territorio nacional,..." que "Se declara de dominio público la fauna silvestre que constituye un recurso natural renovable,.... De interés público la flora silvestre..." y que únicamente pueden ser objeto de apropiación particular y de comercio mediante las disposiciones contenidas en los tratados públicos, en los convenios internacionales y en la presente Ley N° 7317 y su reglamento, artículos 3 y del 36 al 50 y otras normativas vinculantes.



Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
 Tel. (506) 22065516 • Fax: (506) 22065516 • Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD PACÍFICO
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN



R-SINAC-PNI-ACLAC-055-2018
Página 2 de 9

SEGUNDO: Que según la ley N° 7317, Ley de Conservación de la Vida Silvestre y sus reformas, en el artículo 6 o, establece que el Sistema Nacional de Áreas de Conservación del Ministerio de Ambiente y Energía es el órgano competente en materia de planificación, desarrollo y control de la vida silvestre, en igual sentido dicha competencia se encuentra establecida en el artículo 22 de la ley de Biodiversidad N° 7788.

TERCERO: Que según la ley N° 7317, Ley de Conservación de la Vida Silvestre y sus reformas, en el artículo 7o, inciso e) establece que el Sistema Nacional de Áreas de Conservación del Ministerio de Ambiente y Energía tiene entre sus competencias el promover y ejecutar investigaciones en el campo de la Vida Silvestre.

CUARTO: Que según la ley N° 7317, Ley de Conservación de la Vida Silvestre y sus reformas, en el artículo 40 al 49, faculta al SINAC dar autorización para permisos de investigación, así como rechazar cualquier solicitud contraria al interés público y fiscalizar la ejecución de estas actividades.

QUINTO: Que según la ley No 4594, Duplicado Material Zoológico Botánico o Mineral a UCR y Museo Nacional del primero de julio del año mil novecientos setenta, en su artículo 1o indica que: "Artículo 1º.- Todo científico o institución que personalmente o en representación, recoja material botánico, zoológico o mineral con fines taxonómicos, en cualquier zona o lugar del territorio nacional, tiene la obligación de dejar duplicados de sus colecciones a la Universidad de Costa Rica y al Museo Nacional. La Universidad de Costa Rica y el Museo Nacional, conjuntamente, pueden exonerar al científico o institución de que se trata, de la obligación a que se refiere el párrafo anterior, tomando en consideración motivos calificados que el impidan dejar esos duplicados."

SEXTO: Que la Ley Forestal número siete mil quinientos setenta y cinco (Ley N° 7575, publicada en La Gaceta N° 72 del 16 de abril de 1996) y sus reformas, artículo dieciocho, determina la facultad del Estado para realizar o autorizar labores de investigación en el patrimonio natural del Estado.

SÉPTIMO: Que la Ley de Biodiversidad (Ley N° 7788) en su Artículo 89: Fomento de programas de investigación, divulgación e información; establece que el Ministerio del Ambiente y Energía y las demás instituciones públicas y privadas fomentarán el desarrollo de programas de investigación sobre la diversidad biológica.

OCTAVO: Que la Ley de Conservación de la Vida Silvestre (Ley N°7317), en su Artículo 2, define como Estudio Científico: Toda investigación que aplica el método científico; coleccionar: acción de recoger, cortar, capturar o separar de su medio especies orgánicas, sus productos o



Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
Tel. (506) 22065516 • Fax: (506) 22065516 • Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD PACÍFICO
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN



R-SINAC-PNI-ACLAC-055-2018
Página 3 de 9

subproductos; Colecta Científica: la captura o extracción de animales o plantas, sus productos o subproductos, con fines de estudio científico.

NOVENO: Que la Estrategia Nacional de Conservación y Uso Sostenible de la Biodiversidad, establece dentro de sus políticas: el impulso a las investigaciones dirigidas a conocer el estado de las especies y ecosistemas de interés particular para la conservación.

DÉCIMO: Que las Políticas para las Áreas Silvestres Protegidas establecen que se debe: - fomentar el desarrollo de la investigación básica y aplicada dentro de las áreas silvestres protegidas, de acuerdo con las necesidades identificadas por la institución; - autorizar aquellas investigaciones que se realicen en las áreas silvestres protegidas de conformidad con lo que establece la legislación vigente, la reglamentación interna del Área de Conservación y las prioridades de investigación identificadas por las áreas silvestres protegidas. Políticas que priorizan como actividad el que: cada Área de Conservación deberá fomentar, emitir lineamientos, participar y colaborar en el desarrollo de investigaciones básicas e inventarios de biodiversidad con las instituciones interesadas en este campo; para lograr lo antes posible un mejor entendimiento de la biodiversidad presente en las ASP y en los bosques patrimonio del Estado tanto en áreas estatales como privadas.

DECIMO PRIMERO: Que las Áreas de Conservación tienen un Coordinador de Investigación que tiene como objetivo, promover, coordinar y facilitar procesos de investigación y monitoreo de manera que la información generada y sistematizada oriente la toma de decisiones para la conservación, manejo y uso sostenible de los recursos naturales y culturales presentes en el Área de Conservación.

DECIMO SEGUNDO: Que en el Manual de Procedimientos para realizar Investigación en Biodiversidad y Recursos Culturales en las Áreas de Conservación, establecido por el Comité Técnico de Investigación del SINAC (decreto ejecutivo N°28993-MINAE) y oficializado por el SINAC (oficios SINAC-DG-147 y DG-149, del 2002 y por el decreto ejecutivo N°32553-MINAE) se establece como función de los encargados de los Programas de Investigación, entre otras, las siguientes: a) Tramitar, evaluar y resolver los proyectos de investigación que se presenten ante su oficina regional, para realizar estudios científicos en su área de conservación. b) Elaborar las resoluciones respectivas y otorgar el pasaporte científico (licencia de recolecta científica). c) Recibir y analizar toda solicitud de permiso de investigación que se presente ante su oficina regional, para realizar estudios científicos en su área de conservación. d) Establecer acuerdos de Transferencia de Material cuando sea considerado necesario por la naturaleza de la investigación.

DÉCIMO TERCERO: Que de conformidad con el criterio de la Secretaría Técnica Nacional Ambiental (SETENA), según acuerdo ACP-70-2015, del 23 de junio de 2015, de la Sesión



Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
Tel. (506) 22065516 • Fax: (506) 22065516 • Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD PACÍFICO
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN



R-SINAC-PNI-ACLAC-055-2018
Página 4 de 9

Ordinaria 088-2015-SETENA de su Comisión Plenaria, la evaluación de impacto ambiental no resulta de aplicación para los permisos de investigación ni las licencias de colecta científica o académica, a que se refiere el numeral 26 de la Ley de Conservación de la Vida Silvestre 7317.

DECIMO CUARTO: Que los objetivos de la investigación concuerdan con los objetivos de conservación del SINAC-MINAE, detallados en su Plan Estratégico respectivo cuando procede; así como en los objetivos de investigación que se enmarcan en la Estrategia Nacional de Investigación.

DÉCIMO QUINTO: Que las personas físicas o jurídicas que acrediten personal de apoyo al proceso de investigación deberán especificar la condición de dicho personal (asistentes). En caso de manejo de vida silvestre únicamente lo podrá realizar las personas que sean acreditadas por el investigador como asistentes de la investigación y que se encuentren facultadas para tal manejo según los fines y métodos de la investigación. Se aclara que en el caso de colaboradores que participen del proyecto de investigación en forma ad honorem (como voluntarios), por tratarse de una relación entre particulares, esta no se encuentra regulada por la normativa del Decreto de voluntariado del SINAC vigente, Decreto Ejecutivo N° 36812.

Por tanto,



El Programa de Investigación del Área de Conservación La Amistad – Caribe

RESUELVE:

PRIMERO: Aprobar la solicitud presentada por María Marta Piche Ovares, documento de identidad N° 4-0197-0905, para desarrollar la investigación científica: "Murciélagos y roedores en ambientes peridomiciliares: ¿Reservorios del virus del Zika?", con el objetivo principal de: Determinar la presencia del Zika en murciélagos, roedores y seres humanos que cohabitan en un mismo sitio domiciliar para evidenciar factores biológicos, virológicos y ecológicos que podrían involucrar a estos mamíferos en un posible ciclo de transmisión viral. Los objetivos específicos de: - Definir la presencia (RT-PCR y aislamiento viral) y frecuencia (serología) del Zika en murciélagos y roedores que habitan casas en sitios de alta y baja incidencia de dengue y zika en Costa Rica para determinar la circulación de virus en estos mamíferos. - Identificar posibles factores que favorezcan la prevalencia del Zika en murciélagos y roedores, relacionados con la ecología de estos mamíferos y con variables virológicas y biológicas.

SEGUNDO: Autorizar la participación en esta investigación científica a María Marta Piche Ovares, documento de identidad N° 4-0197-0905, como investigadora principal. A Daniel Barrantes Murillo, documento de identidad N° 2-0700-0565, Luis Mario Romero Vega,



Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
Tel. (506) 22065516 • Fax: (506) 22065516 • Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD PACÍFICO
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN



R-SINAC-PNI-ACLAC-055-2018
Página 5 de 9

documento de identidad N° 1-1429-0716, Eugenia Corrales Aguilar, documento de identidad N° 1-0995-0701 y Claudio Enrique Soto Garita, documento de identidad N° 1-1480-0927, como coinvestigadores.

TERCERO: Otorgar licencias de colecta científica N° ACLAC-267-2018 a María Martha Piche Ovares, N° ACLAC-268-2018 a Daniel Barrantes Murillo, N° ACLAC-269-2018 a Luis Mario Romero Vega, N° ACLAC-270-2018 a Eugenia Corrales Aguilar y N° ACLAC-271-2018 a Claudio Enrique Soto Garita, para la **Colecta permanente** de:

Cantidad a coleccionar/localidad	Material a coleccionar	Grupo Taxonómico
5 individuos	Murciélagos	Clase: Mammalia – Orden: Chiroptera
100 muestras	sangre	Clase: Mammalia – Orden: Chiroptera
1000 o más individuos	mosquitos	Clase: Insecta: Orden: Diptera

- Toma de variables biométricas y fotografías.
- **Manipulación temporal** del hábitat para la colocación y manipulación de las *redes de niebla* para los murciélagos.

- No se permite la **colecta permanente** de los individuos de las especies de murciélagos que se capturen y se encuentran en los listados de **ESPECIES EN PELIGRO DE EXTINCIÓN**, con **POBLACIONES REDUCIDAS** y en los listados de **CITES** para Costa Rica, según la Resolución: **R-SINAC-CONAC-092-2017**.

CUARTO: Descripción del lugar de acceso. Que el área específica donde se llevará a cabo la investigación corresponde a fincas privadas siguientes:

- 1 - Don Paco Chavarría - Julio Chavarría, Hone Creek Sur: 9°44'1.62"N - 82°52'23.67"O
- 2 - José Antonio Bolívar, Hone Creek Norte: 9°44'32.28"N - 82°53'37.53"O
- 3 - Deyogen, Hone Creek Norte: 9°41'59.18"N - 82°54'19.85"O
- 4 - Joseph a.k.a Big Joe – Dra. Grace, Cahuita: 9°43'52.73"N - 82°50'26.41"O

Las fincas se localizan dentro del cantón de Talamanca, provincia de Limón, Área de Conservación La Amistad Caribe.



Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
Tel. (506) 22065516 • Fax: (506) 22065516 • Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD PACÍFICO
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN



R-SINAC-PNI-ACLAC-055-2018
Página 6 de 9

QUINTO: El Sistema Nacional de Áreas de Conservación únicamente autorizará los métodos de recolección científica enumerados en el reglamento # 32633 de la Ley de Conservación de la Vida Silvestre N° 7317 y sus reformas.

SEXTO: De la metodología científica. - Captura y Muestreo de Murciélagos (Chiroptera): En cada sitio de muestreo se colocarán redes de niebla para capturar a los murciélagos que se encuentren en los refugios encontrados en casas. Después se procederá a la identificación de los murciélagos capturados y la toma de los datos morfométricos. Protección del operador El personal que trabaja con los murciélagos debe estar debidamente entrenado y estar inmunizado contra la rabia. Además cuando esté realizando la toma de muestras debe estar debidamente protegido, debe tener como mínimo un par de guantes de látex, un par de guantes lavaplatos, una máscara, protección ocular, gabacha y delantal de PVC. La necropsia deberá realizarse en una cámara de flujo laminar con extracción. Toma de muestras Murciélagos: De los murciélagos capturados se tomarán muestras de sangre de máximo 100 individuos por sitio. Además, se colectarán permanentemente 5 individuos por sitio, serán anestesiados con anestesia general utilizando tiletamina/zolazepam a una dosis de 15 mg/kg intramuscular o intraperitoneal (Watanabe et al. 2010) para la toma de muestras de orina y sangre. Se colectarán aproximadamente 0.75 ml de sangre por punción cardíaca y 1 ml de orina en tubos de recolección de suero estériles y guardadas a -70 °C. Luego se procederá a la eutanasia con una sobredosis del fármaco. Durante la necropsia se colectarán los órganos en eppendorf estériles y se congelan a -70 °C inmediatamente. Brevemente se colectarán el corazón, cerebro, riñón, hígado, pulmones, bazo, intestino, órganos reproductores y ciertos órganos fetales de ser posible. Un reporte de necropsia detallado será elaborado, que incluya especie, historia clínica, origen, lista de muestras tomadas y hallazgos macroscópicos de la necropsia. Para las capturas de animales y eutanasia se gestionarán todos los permisos requeridos por la Ley de Vida Silvestre y de Bienestar Animal vigentes en el país. Además, ningún animal en peligro de extinción será utilizado para este estudio. Seres humanos: De los mismos sitios de muestreo, se colectará suero de los habitantes de la casa donde se encuentran los murciélagos - Colectar e identificar vectores (mosquitos): Se colocarán trampas para mosquitos en la misma zona de captura. Las trampas utilizadas serán las trampas tipo "CDC" de CO₂ y luz, así como trampas para hembras grávidas. Estas serán colocadas en áreas boscosas, en los dormitorios de los animales domésticos y en las casas de habitación presentes en las áreas de estudio. Estarán activadas durante todo el día y la noche, por un total de dos días seguidos. Las trampas serán revisadas y recargadas con hielo seco como fuente de CO₂ cada 9-12 horas y los mosquitos recolectados serán almacenados en frío para su traslado e identificación en el Laboratorio de Entomología Médica de la UCR. Una vez identificados, se almacenarán en RNA Later para la posterior extracción de ácidos nucleicos, utilizando Trizol®. Todo el material genético será depositado en el Laboratorio de Virología y en el Laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica. Las pieles de los murciélagos serán depositadas en el Museo de Zoología de la Universidad de Costa Rica



Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
Tel. (506) 22065516 • Fax: (506) 22065516 • Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD PACÍFICO
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN



R-SINAC-PNI-ACLAC-055-2018
Página 7 de 9

SEPTIMO: Para la inscripción de personas adicionales en la investigación y/o el otorgamiento de pasaportes de colecta científica adicionales a coinvestigadores y asistentes de investigación, se deben presentar en físico o mediante medio electrónico de acuerdo a la legislación vigente, los requisitos siguientes: Una fotografía reciente tamaño pasaporte (4,5cmx3,5cm) de frente que cubra toda la cara hasta los hombros, sin lentes oscuros, sombrero, gorra u otro accesorio, hoja de Vida en idioma español para cada uno de los asistentes, copia de la cédula de identidad o pasaporte de cada uno de los asistentes, una carta de solicitud de inclusión de los asistentes dentro de la investigación.

OCTAVO: El presente permiso no autoriza la comercialización de plantas o animales ni subproductos de éstos.

NOVENO: Cuando los especímenes obtenidos mediante colecta científica o cultural se destinen a instituciones extranjeras, el Sistema Nacional de Áreas de Conservación, exigirá, antes de otorgar el permiso de exportación con fines científicos o culturales, la entrega de ejemplares idénticos para el Museo Nacional y a la Universidad de Costa Rica, para los jardines botánicos y los zoológicos estatales, única y exclusivamente. (Artículo 46 Ley No 7317). Así, también se exigirá la devolución de los especímenes colectados (vivos o muertos) al Museo de Zoología de la UCR.

DÉCIMO: Este permiso no faculta para coleccionar en finca particulares o en Territorio Indígena sin el respectivo permiso de quien está legalmente autorizado para otorgarlo. La eficacia de este permiso queda sujeta a la existencia de una autorización adicional por parte del propietario de dichos terrenos privados o de quien estuviera legalmente facultado para ello.

DÉCIMO PRIMERO: El Área de Conservación La Amistad Caribe se reserva el derecho de cancelar este permiso sin responsabilidad alguna para el Estado, cuando se compruebe que se ha incumplido el mismo.

DÉCIMO SEGUNDO: La permissionaria no puede ceder ni en modo alguno enajenar este permiso, pues el mismo es personal e intransferible. Del mismo modo, cuando la investigadora principal o alguno de sus coinvestigadores desee incluir nuevos asistentes de investigación no autorizados en el **resuelve SEGUNDO** de este permiso, deberá solicitarlo por escrito al Programa de Investigación del Área de Conservación La Amistad Caribe con al menos 8 días de antelación. No se autoriza el uso de este permiso y sus respectivas licencias de colecta para otros fines ajenos a las labores científicas del presente proyecto, debiendo forzosamente solicitarse otros permisos y licencias adicionales para la realización de giras de campo, prácticas supervisadas, tesis de grado o posgrado y otras actividades similares que formen parte de los programas de estudios universitarios.



Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
Tel. (506) 22065516 • Fax: (506) 22065516 • Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
 ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD PACÍFICO
 PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN



R-SINAC-PNI-ACLAC-055-2018
 Página 8 de 9

DÉCIMO TERCERO: La permisionaria deberá permitir a los funcionarios (as) del Sistema Nacional de Áreas de Conservación, el ingreso al lugar donde se realizará el acceso o al lugar donde se realiza la investigación.

DÉCIMO CUARTO: El Sistema Nacional de Áreas de Conservación salva la responsabilidad sobre cualquier accidente o situación que afecte y/o ponga en peligro la integridad de las personas (investigadores, asistentes de campo) que participan en el desarrollo de las actividades de la investigación.

DÉCIMO QUINTO: Del Informe Final. La investigadora principal deberá rendir ante el Área de Conservación La Amistad Caribe - ACLAC un informe escrito/digital (en formato del SINAC) antes del **25 de octubre del 2019**, en idioma español, en cumplimiento de lo establecido por el artículo 38 de la Ley de Conservación de la Vida Silvestre N° 7317 y su Reglamento decreto Ejecutivo N° 32633-MINAE. El incumplimiento de este requisito será sancionado (a) con la imposibilidad, para los (as) científicos (as) en forma personal o para la institución que representa, de obtener nuevas autorizaciones, de estudios o investigaciones, hasta por un período de cinco años.

DÉCIMO SEXTO: La permisionaria deberá acatar las recomendaciones técnicas dadas por el Sistema Nacional de Áreas de Conservación y se compromete a enviar copia a la Biblioteca Nacional y al Área de Conservación las publicaciones que genere el presente permiso de investigación.

DECIMO SÉPTIMO: De la Vigencia. Este permiso rige a partir del **26 de julio del 2018** y hasta el día **25 de julio del 2019**, pudiendo solicitarse un nuevo permiso para el mismo proyecto, desde treinta días antes de su vencimiento.

DÉCIMO OCTAVO: De comprobarse el incumplimiento parcial o total de algunas de las cláusulas citadas en la presente resolución o a la Ley de Vida Silvestre número 7317 y su reglamento, se cancelaría el permiso, con las consecuencias administrativas, civiles y penales, que consecuentemente se deriven y se interpondrá sin mayor demora la denuncia penal o administrativa ante la autoridad correspondiente.

DÉCIMO NOVENO: Contra la presente resolución proceden los recursos ordinarios de revocatoria y / o apelación, de conformidad con los artículos 343 y siguientes de la Ley General de la Administración Pública, los cuales serán resueltos, el de revocatoria por el mismo órgano que lo dictó y el de apelación por el Consejo Nacional de Áreas de Conservación. Los recursos deberán interponerse ante el órgano que dicta esta resolución dentro de los tres días tratándose de acto final y de veinticuatro horas en los demás casos, contados, en ambos casos, posteriores a su notificación.



Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
 Tel. (506) 22065516 • Fax: (506) 22065516 • Apdo.: 1077-7300.

Limón-Costa Rica



SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD PACÍFICO
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN



R-SINAC-PNI-ACLAC-055-2018
Página 9 de 9

VIGÉSIMO: Notifíquese contra la presente.

**JORGE
ARTURO
GONZALEZ
VILLALOBO
S (FIRMA)** Firmado
digitalmente por
JORGE ARTURO
GONZALEZ
VILLALOBOS
(FIRMA)
Fecha: 2018.07.25
22:09:15 -06'00'



Jorge González Villalobos
Programa de Investigación
ACLAC-SINAC-MINAE

C: Donald Campbell, Jefe Subregión Limón-Talamanca-ACLAC-SINAC-MINAE
José Masis, Jefe Unidad Protección-Control-ACLAC-SINAC-MINAE
Gina Cuza, Directora de Áreas Silvestres Protegidas-ACLAC-SINAC-MINAE
Archivo Programa de Investigación-ACLAC-SINAC-MINAE

NOTIFICADO VIA CORREO ELECTRÓNICO

Este documento está firmado digitalmente, por lo que corresponde al documento original en su archivo electrónico, por favor portarlo en algún dispositivo de almacenamiento con el fin de mostrarlo a las autoridades cuando lo soliciten



Dirección: Reserva Biológica Hitoy Cerere, Valle La Estrella.
Tel. (506) 22065516 + Fax: (506) 22065516+ Apdo.: 1077-
7300.

Limón-Costa Rica

Anexo 5. Permiso de colecta científica (Pasaporte científico) otorgado por el Sistema Nacional de Áreas de Conservación, Área de Conservación La Amistad Caribe Sur, MINAE.



MINISTERIO DE AMBIENTE Y ENERGÍA
SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD CARIBE

LICENCIA DE COLECTA CIENTÍFICA / ACADÉMICA
SCIENTIFIC / ACADEMIC LICENSE TO COLLECT
(Pasaporte Científico / *Scientific Passport*)

N° ACLAC-263-2018

Nombre / *Name*: **Daniel**
Apellidos / *Last name*: **Barrantes Murillo**
N° de identificación / *Identification N°*: **2-0700-0565**
Nacionalidad / *Nationality*: **costarricense**
Universidad o centro de investigación / *University or research center*: **Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Universidad de Costa Rica - UCR**
Nombre, dirección de correo electrónico y teléfono de persona a contactar en caso de emergencia / *Name, E-mail address and phone number of the person to be contacted in case of an emergency*:
Nombre / *Name*: **Laura Ríos**
Dirección de correo electrónico / *E-mail*: **malari14@gmail.com**
Teléfono/Phone Number: **(506) 8867-6029**



Título de la Investigación / *Research title*: **Estudio de vectores (*Aedes aegypti*, *Culex sp.*, etc.), reservorios (aves y mamíferos), aspectos virológicos y seroepidemiología de Zika, Chikungunya y otros arbovirus en dos localidades endémicas a Dengue, Encefalitis Equina Venezolana y Virus del Oeste del Nilo**

Área(s) de conservación donde se autoriza la colecta / *Authorized conservation areas to collect*: - **Fincas privadas: 1 - Don Paco Chavarría - Julio Chavarría, Hone Creek Sur: 9°44'1.62"N - 82°52'23.67"O. 2 - José Antonio Bolívar, Hone Creek Norte: 9°44'32.28"N - 82°53'37.53"O. 3 - Deyogen, Hone Creek Norte: 9°41'59.18"N - 82°54'19.85"O. 4 - Joseph a.k.a Big Joe – Dra. Grace, Cahuita: 9°43'52.73"N - 82°50'26.41"O.**

Período de vigencia de esta licencia de colecta / *Authorized period to collect*:

Inicio / *Start*: **26-julio-2018**

Finalización / *Finish*: **25-julio-2019**

Descripción del tipo(s) y cantidad(es) de material autorizado(s) a coleccionar / *Description of the type(s) and amount(s) of authorized material(s) to collect*: **Colecta Permanente: - 25 individuos de especies de roedores. - 10 individuos de especies de aves, - 1000 o más individuos de especies de mosquitos. - Toma de variables biométricas y fotografías. - Manipulación temporal del hábitat para la colocación de las trampas Sherman para roedores y para la colocación y manipulación de las redes de niebla para la avifauna. Considerar: R-SINAC-CONAC-092-2017. Ver resolución del permiso de investigación.**

N° de resolución (permiso de investigación) / *Research permit N°*: **R-SINAC-PNI-ACLAC-054-2018**

Fecha de entrega del Informe Final / *Date to deliver the collection report*: **25-octubre-2019**

JORGE
ARTURO
GONZALEZ
VILLALOBOS
(FIRMA)

Firmado digitalmente por
JORGE ARTURO
GONZALEZ
VILLALOBOS (FIRMA)
Fecha: 2018.07.25
21:49:31 -06'00'



Firma / *Signature*

Fecha / *Date*: **25-07-2018**

Nulo sin el sello oficial y la firma autorizada / *Invalid without the official stamp and authorized signature*

Notificado electrónicamente

Este documento está firmado digitalmente, por lo que corresponde al documento original en su archivo electrónico, por favor portarlo en algún dispositivo de almacenamiento con el fin de mostrarlo a las autoridades cuando lo soliciten



COMPROMISOS DEL INVESTIGADOR:

Acatar lo estipulado en las regulaciones vigentes para la colecta científica o académica y para la realización de investigaciones, incluyendo lo establecido en los decretos ejecutivos y en las leyes de Costa Rica, así como todas las indicaciones dadas por los funcionarios(as) en el área (s) donde se realizará la colecta.

Acatar todas las disposiciones que se anotan en la(s) resolución(es) correspondiente(s) al permiso(s) de investigación que acompaña(n) esta licencia.

AVISO:

Esta licencia sólo puede utilizarse si se cuenta además con un permiso de investigación vigente, debidamente otorgado por las autoridades competentes del Gobierno de Costa Rica. Además, cuando se realice la colecta de materiales en propiedades privadas, se requerirá del visto bueno adicional de la persona legalmente facultada para otorgarlo.

RESEARCHER COMMITMENTS:

Comply with the current regulations to collect and research in Costa Rica, including those established in the Costa Rican decrees and laws, as well as following all the instructions issued by the officers in the area(s) where the authorized material(s) will be collected.

Comply with all the regulations, terms and conditions indicated in the research permit(s) linked to this license.

NOTICE:

This license will only be valid as far as there is an additional research permit in force, duly issued by the qualified authorities of the Costa Rican Government. Further, whenever the collect tasks are carried out in private properties an additional authorization from the owners (or from their legal representative) will be asked.



Este documento está firmado digitalmente, por lo que corresponde al documento original en su archivo electrónico, por favor portarlo en algún dispositivo de almacenamiento con el fin de mostrarlo a las autoridades cuando lo soliciten



MINISTERIO DE AMBIENTE Y ENERGÍA
SISTEMA NACIONAL DE ÁREAS DE CONSERVACIÓN
ÁREA DE CONSERVACIÓN LA AMISTAD CARIBE

LICENCIA DE COLECTA CIENTÍFICA / ACADÉMICA
SCIENTIFIC / ACADEMIC LICENSE TO COLLECT
(Pasaporte Científico / Scientific Passport)

N° ACLAC-268-2018

Nombre / Name: **Daniel**
Apellidos / Last name: **Barrantes Murillo**
N° de identificación / Identification N°: **2-0700-0565**
Nacionalidad / Nationality: **costarricense**
Universidad o centro de investigación / University or research center: **Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Universidad de Costa Rica - UCR**
Nombre, dirección de correo electrónico y teléfono de persona a contactar en caso de emergencia / Name, E-mail address and phone number of the person to be contacted in case of an emergency:
Nombre / Name: **Alejandro Alfaro Alarcón**
Dirección de correo electrónico / E-mail: Haga clic aquí para escribir texto.
Teléfono/Phone Number: **(506) 8832-0260**



Título de la Investigación / Research title: **Murciélagos y roedores en ambientes peridomiciliarios: ¿Reservorios del virus del Zika?**

Área(s) de conservación donde se autoriza la colecta / Authorized conservation areas to collect: - **Fincas privadas: 1 - Don Paco Chavarría - Julio Chavarría, Hone Creek Sur: 9°44'1.62"N - 82°52'23.67"O. 2 - José Antonio Bolívar, Hone Creek Norte: 9°44'32.28"N - 82°53'37.53"O. 3 - Deyogen, Hone Creek Norte: 9°41'59.18"N - 82°54'19.85"O. 4 - Joseph a.k.a Big Joe - Dra. Grace, Cahuita: 9°43'52.73"N - 82°50'26.41"O.**

Período de vigencia de esta licencia de colecta / Authorized period to collect:

Inicio / Start: **26-julio-2018**

Finalización / Finish: **25-julio-2019**

Descripción del tipo(s) y cantidad(es) de material autorizado(s) a colectar / Description of the type(s) and amount(s) of authorized material(s) to collect: **Colecta Permanente: - 5 individuos de especies de murciélagos por sitio de colecta, - 100 muestras de sangre de murciélagos, - 1000 o más individuos de especies de mosquitos, - Toma de variables biométricas y fotografías. - Manipulación temporal del hábitat para la colocación y manipulación de las redes de niebla para los murciélagos. Considerar: R-SINAC-CONAC-092-2017.**

N° de resolución (permiso de investigación) / Research permit N°: **R-SINAC-PNI-ACLAC-055-2018**

Fecha de entrega del Informe Final / Date to deliver the collection report: **25-octubre-2019**

JORGE
ARTURO
GONZALEZ
VILLALOBOS
(FIRMA)

Firmado digitalmente por
JORGE ARTURO
GONZALEZ
VILLALOBOS (FIRMA)
Fecha: 2018.07.25
21:53:14 -06'00'



Firma / Signature

Fecha / Date: 25-07-2018

Nulo sin el sello oficial y la firma autorizada / Invalid without the official stamp and authorized signature

Notificado electrónicamente

Este documento está firmado digitalmente, por lo que corresponde al documento original en su archivo electrónico, por favor portarlo en algún dispositivo de almacenamiento con el fin de mostrarlo a las autoridades cuando lo soliciten





COMPROMISOS DEL INVESTIGADOR:

Acatar lo estipulado en las regulaciones vigentes para la colecta científica o académica y para la realización de investigaciones, incluyendo lo establecido en los decretos ejecutivos y en las leyes de Costa Rica, así como todas las indicaciones dadas por los funcionarios(as) en el área (s) donde se realizará la colecta.

Acatar todas las disposiciones que se anotan en la(s) resolución(es) correspondiente(s) al permiso(s) de investigación que acompaña(n) esta licencia.

AVISO:

Esta licencia sólo puede utilizarse si se cuenta además con un permiso de investigación vigente, debidamente otorgado por las autoridades competentes del Gobierno de Costa Rica. Además, cuando se realice la colecta de material en propiedades privadas, se requerirá del visto bueno adicional de la persona legalmente facultada para otorgarlo.

RESEARCHER COMMITMENTS:

Comply with the current regulations to collect and research in Costa Rica, including those established in the Costa Rican decrees and laws, as well as following all the instructions issued by the officers in the area(s) where the authorized material(s) will be collected.

Comply with all the regulations, terms and conditions indicated in the research permit(s) linked to this license.

NOTICE:

This license will only be valid as far as there is an additional research permit in force, duly issued by the qualified authorities of the Costa Rican Government. Further, whenever the collect tasks are carried out in private properties, an additional authorization from the owners (or from their legal representative) will be asked.



Este documento está firmado digitalmente, por lo que corresponde al documento original en su archivo electrónico, por favor portarlo en algún dispositivo de almacenamiento con el fin de mostrarlo a las autoridades cuando lo soliciten

Anexo 6. Lista de murciélagos capturados en los puntos de muestreo en Ostional, Santa Cruz y Hone Creek, Cahuita y Sixaola en el cantón de Talamanca

ID del individuo	Especie	Sexo	Edad	Estado Reproductivo	Peso (gr)	ID de la Casa	Ubicación de la Red de Niebla
MSCA2	<i>Saccopteryx leptura</i>	H	Adulto	Inactivo	5	CSCA	Establo
MSCA4	<i>Saccopteryx bilineata</i>	M	Adulto	Inactivo	6	CSCA	Establo
MSCA6	<i>Glossophaga soricina</i>	H	Adulto	Inactivo	9	CSCA	Bosque
MSCA7	<i>Saccopteryx leptura</i>	NA	Adulto	Inactivo	4	CSCA	Establo
MSCA14	<i>Glossophaga soricina</i>	H	Adulto	Inactivo	11	CSCA	Bosque
MSCB1	<i>Artibeus jamaicensis</i>	M	Adulto	Inactivo	41.5	CSCB	Bosque
MSCB2	<i>Carollia perspicillata</i>	NA	Adulto	Inactivo	19	CSCB	Bosque
MSCB3	<i>Noctilio leporinus</i>	M	Adulto	Inactivo	55	CSCB	Casa
MSCB4	<i>Noctilio leporinus</i>	NA	Adulto	Inactivo	50	CSCB	Casa
MSCB5	<i>Artibeus jamaicensis</i>	M	Adulto	Inactivo	21.5	CSCB	Casa
MSCC1	<i>Uroderma convexum</i>	M	Juvenil	Inactivo	9	CSCC	Bosque
MSCC2	<i>Micronycteris hirsuta</i>	H	Adulto	Lactante	19	CSCC	Bosque
MSCC3	<i>Glossophaga soricina</i>	H	Adulto	Inactivo	8.5	CSCC	Peridomiciliar
MSCC4	<i>Phyllostomus discolor</i>	M	Adulto	Inactivo	39	CSCC	Bosque
MSCC5	<i>Phyllostomus discolor</i>	H	Adulto	Preñada	39	CSCC	Bosque
MSCD1	<i>Artibeus jamaicensis</i>	M	Adulto	Inactivo	39	CSCD	Peridomiciliar
MSCD2	<i>Rhogeessa tumida</i>	H	Adulto	Inactivo	4.5	CSCD	Peridomiciliar
MSCD3	<i>Artibeus jamaicensis</i>	M	Adulto	Inactivo	NA	CSCD	Bosque
MSCD4	<i>Glossophaga soricina</i>	H	Adulto	Inactivo	9	CSCD	Bosque
MSCE1	<i>Artibeus phaeotis</i>	M	Adulto	Inactivo	11	CSCE	Bosque

ID del individuo	Especie	Sexo	Edad	Estado Reproductivo	Peso (gr)	ID de la Casa	Ubicación de la Red de Niebla
MSCF1	<i>Chiroderma trinitatum</i>	H	Adulto	Inactivo	11	CSCF	Establo
MSCF2	<i>Myotis nigricans</i>	H	Adulto	Inactivo	4	CSCF	Establo
MSCF3	<i>Desmodus rotundus</i>	H	Adulto	Inactivo	45	CSCF	No especificada
MSCF4	<i>Artibeus phaeotis</i>	M	Adulto	Inactivo	11	CSCF	Casa
MSCF5	<i>Desmodus rotundus</i>	H	Adulto	Inactivo	53	CSCF	Casa
MSCG3	<i>Saccopteryx leptura</i>	H	Adulto	Inactivo	7	CSCG	Domiciliar
MSCG4	<i>Artibeus jamaicensis</i>	H	Adulto	Inactivo	46	CSCG	Bosque
MSCG5	<i>Artibeus jamaicensis</i>	M	Adulto	Inactivo	34	CSCG	Bosque
MSCG7	<i>Artibeus jamaicensis</i>	M	Adulto	Inactivo	49	CSCG	Domiciliar
MSCG9	<i>Sturnira parvidens</i>	H	Adulto	Inactivo	13	CSCG	Bosque
MSCG11	<i>Glossophaga soricina</i>	M	Adulto	Inactivo	17	CSCG	Domiciliar
MSCG12	<i>Artibeus jamaicensis</i>	H	Adulto	Inactivo	33	CSCG	Bosque
MSCG14	<i>Artibeus jamaicensis</i>	H	Adulto	Inactivo	28	CSCG	Bosque
MSCG17	<i>Glossophaga soricina</i>	H	Adulto	Inactivo	14	CSCG	Bosque
MSCH1	<i>Artibeus jamaicensis</i>	M	Adulto	Inactivo	41	CSCH	Bosque
MSCH2	<i>Sturnira parvidens</i>	H	Adulto	Preñada	16	CSCH	Domiciliar
MSCH4	<i>Sturnira parvidens</i>	H	Adulto	Preñada	16	CSCH	Bosque
MSCH6	<i>Artibeus jamaicensis</i>	M	Adulto	Inactivo	37	CSCH	Bosque
MSCH8	<i>Artibeus jamaicensis</i>	M	Adulto	Inactivo	36	CSCH	Bosque
MSCH10	<i>Sturnira parvidens</i>	H	Adulto	Preñada	20	CSCH	Bosque
MSCH11	<i>Sturnira parvidens</i>	H	Adulto	Preñada	21	CSCH	Bosque
MSCI1	<i>Artibeus jamaicensis</i>	M	Adulto	Inactivo	49	CSCA	Río
MSCI2	<i>Artibeus phaeotis</i>	H	Adulto	Inactivo	12	CSCA	Río
MSCI3	<i>Chiroderma salvini</i>	M	Adulto	Inactivo	16	CSCA	Río

ID del individuo	Especie	Sexo	Edad	Estado Reproductivo	Peso (gr)	ID de la Casa	Ubicación de la Red de Niebla
MSCI4	<i>Artibeus phaeotis</i>	H	Adulto	Preñada	12	CSCA	Bosque
MSCI5	<i>Sturnira parvidens</i>	H	Adulto	Preñada	21	CSCA	Bosque
MSCJ1	<i>Pteronotus mesoamericanusi</i>	H	Adulto	Preñada	18.5	CSCB	Establo
MSCJ5	<i>Pteronotus mesoamericanusi</i>	H	Adulto	Preñada	19	CSCB	Establo
MSCJ7	<i>Sturnira parvidens</i>	H	Adulto	Inactivo	14	CSCB	Establo
MSCJ9	<i>Artibeus jamaicensis</i>	M	Adulto	Inactivo	38.5	CSCB	Bosque
MSCJ13	<i>Carollia perspicillata</i>	M	Adulto	Inactivo	19	CSCB	Bosque
MSCK1	<i>Carollia perspicillata</i>	H	Adulto	Inactivo	19	CSCC	Bosque
MSCK2	<i>Rhynchonycteris naso</i>	H	Adulto	Inactivo	4	CSCC	Peridomiciliar
MSCL1	<i>Hylonycteris underwoodi</i>	H	Adulto	Inactivo	10	CSCD	Bosque
MSCL3	<i>Carollia perspicillata</i>	M	Adulto	Inactivo	18.5	CSCD	Bosque
MSCL5	<i>Rhogeessa tumida</i>	H	Adulto	Preñada (gemelos)	4	CSCD	Peridomiciliar
MSCL7	<i>Carollia perspicillata</i>	H	Adulto	Inactivo	15	CSCD	Bosque
MSCL9	<i>Desmodus rotundus</i>	H	Adulto	Inactivo	32	CSCD	Bosque
MSCM3	<i>Phyllostomus discolor</i>	NA	Adulto	Inactivo	41	CSCE	Bosque
MSCM4	<i>Phyllostomus discolor</i>	M	Adulto	Inactivo	43	CSCE	Bosque
MSCM5	<i>Phyllostomus discolor</i>	M	Adulto	Inactivo	35	CSCE	Bosque
MSCM6	<i>Phyllostomus discolor</i>	M	Adulto	Inactivo	41	CSCE	Bosque
MSCM7	<i>Phyllostomus discolor</i>	H	Adulto	Inactivo	37.5	CSCE	Bosque
MSCN1	<i>Artibeus lituratus</i>	H	Adulto	Preñada	66	CSCF	Bosque
MSCN2	<i>Pteronotus mesoamericanusi</i>	H	Adulto	Inactivo	18	CSCF	Bosque
MSCN3	<i>Noctilio albiventris</i>	M	Adulto	Inactivo	36	CSCF	Bosque
MSCN4	<i>Artibeus lituratus</i>	H	Adulto	Preñada	62	CSCF	Bosque

ID del individuo	Especie	Sexo	Edad	Estado Reproductivo	Peso (gr)	ID de la Casa	Ubicación de la Red de Niebla
MSCN6	<i>Glossophaga soricina</i>	M	Adulto	Inactivo	9	CSCF	Bosque
MSCO1	<i>Artibeus jamaicensis</i>	M	Adulto	Inactivo	41	CSCH	Bosque
MSCO2	<i>Artibeus jamaicensis</i>	H	Adulto	Preñada	43	CSCH	Bosque
MSCO4	<i>Artibeus phaeotis</i>	M	Adulto	Inactivo	10	CSCH	Casa
MSCO6	<i>Carollia perspicillata</i>	M	Adulto	Inactivo	17.5	CSCH	Bosque
MSCO7	<i>Artibeus lituratus</i>	M	Adulto	Inactivo	61	CSCH	Bosque
MTAA1	<i>Uroderma convexum</i>	M	Adulto	Inactivo	15	CTAA	Peridomiciliar
MTAB1	<i>Noctilio leporinus</i>	M	Adulto	Inactivo	66	CTAB	Bosque
MTAB2	<i>Artibeus watsoni</i>	M	Adulto	Inactivo	10.5	CTAB	Peridomiciliar
MTAB4	<i>Artibeus watsoni</i>	M	Adulto	Inactivo	10.5	CTAB	Bosque
MTAB5	<i>Carollia perspicillata</i>	M	Adulto	Inactivo	18.5	CTAB	Bosque
MTAB7	<i>Artibeus jamaicensis</i>	H	Adulto	Preñada	57	CTAB	Bosque
MTAB8	<i>Carollia perspicillata</i>	M	Adulto	Inactivo	18	CTAB	Bosque
MTAB10	<i>Artibeus jamaicensis</i>	M	Adulto	Inactivo	46	CTAB	Bosque
MTAB11	<i>Uroderma convexum</i>	M	Adulto	Inactivo	14	CTAB	Bosque
MTAB13	<i>Carollia perspicillata</i>	H	Adulto	Preñada	23	CTAB	Bosque
MTAC1	<i>Uroderma convexum</i>	H	Adulto	Inactivo	15	CTAC	Bosque
MTAC2	<i>Glossophaga soricina</i>	M	Adulto	Inactivo	9.5	CTAC	Peridomiciliar
MTAC3	<i>Glossophaga soricina</i>	M	Adulto	Inactivo	9	CTAC	Bosque
MTAC4	<i>Glossophaga soricina</i>	H	Adulto	Preñada	12	CTAC	Bosque
MTAD1	<i>Carollia perspicillata</i>	M	Adulto	Inactivo	22	CTAD	Bosque
MTAD2	<i>Carollia perspicillata</i>	M	Adulto	Inactivo	24	CTAD	Bosque
MTAD3	<i>Lonchophylla robusta</i>	H	Adulto	Inactivo	14	CTAD	Bosque
MTAE1	<i>Carollia perspicillata</i>	H	Adulto	Inactivo	16	CTAE	Bosque

ID del individuo	Especie	Sexo	Edad	Estado Reproductivo	Peso (gr)	ID de la Casa	Ubicación de la Red de Niebla
MTAE3	<i>Carollia castanea</i>	M	Adulto	Inactivo	10.5	CTAE	Bosque
MTAE5	<i>Glossophaga soricina</i>	M	Adulto	Inactivo	8.5	CTAE	Bosque
MTAE7	<i>Platyrrhinus helleri</i>	M	Adulto	Inactivo	15	CTAE	Bosque
MTAE9	<i>Glossophaga soricina</i>	M	Adulto	Inactivo	9.5	CTAE	Bosque
MTAE11	<i>Uroderma convexum</i>	M	Adulto	Inactivo	17	CTAE	Bosque
MTAE13	<i>Glossophaga soricina</i>	H	Adulto	Inactivo	10	CTAE	Bosque
MTAE15	<i>Glossophaga soricina</i>	M	Adulto	Inactivo	9	CTAE	Bosque
MTAF1	<i>Carollia perspicillata</i>	M	Adulto	Inactivo	16	CTAF	Peridomiciliar
MTAF3	<i>Uroderma convexum</i>	M	Adulto	Inactivo	16	CTAF	Peridomiciliar
MTAF5	<i>Artibeus lituratus</i>	M	Adulto	Inactivo	58	CTAF	Peridomiciliar
MTAF7	<i>Uroderma convexum</i>	M	Adulto	Inactivo	17	CTAF	Peridomiciliar
MTAF9	<i>Carollia perspicillata</i>	H	Adulto	Preñada	22.5	CTAF	Peridomiciliar
MTAG1	<i>Rogheessa io</i>	M	Adulto	Inactivo	4	CTAG	Bosque
MTAG3	<i>Saccopteryx bilineata</i>	M	Adulto	Inactivo	4	CTAG	Bosque
MTAG5	<i>Artibeus jamaicensis</i>	H	Adulto	Inactivo	42	CTAG	Peridomiciliar
MTAG7	<i>Artibeus jamaicensis</i>	H	Adulto	Inactivo	45	CTAG	Bosque
MTAG9	<i>Artibeus jamaicensis</i>	H	Adulto	Inactivo	53	CTAG	Bosque
MTAH1	<i>Uroderma convexum</i>	H	Adulto	Preñada	27	CTAH	Peridomiciliar
MTAH2	<i>Uroderma convexum</i>	H	Adulto	Inactivo	16	CTAH	Peridomiciliar
MTAH3	<i>Uroderma convexum</i>	M	Adulto	Inactivo	16	CTAH	Peridomiciliar
MTAH4	<i>Uroderma convexum</i>	H	Adulto	Preñada	22	CTAH	Peridomiciliar
MTAH5	<i>Uroderma convexum</i>	M	Adulto	Inactivo	16	CTAH	Peridomiciliar
MTAJ1	<i>Carollia castanea</i>	M	Adulto	Inactivo	13	CTAB	Bosque
MTAJ2	<i>Carollia castanea</i>	H	Adulto	Preñada	15	CTAB	Río

ID del individuo	Especie	Sexo	Edad	Estado Reproductivo	Peso (gr)	ID de la Casa	Ubicación de la Red de Niebla
MTAJ3	<i>Myotis nigricans</i>	H	Adulto	Preñada	5.5	CTAB	Río
MTAJ5	<i>Carollia perspicillata</i>	H	Adulto	Inactivo	20	CTAB	Bosque
MTAJ6	<i>Artibeus jamaicensis</i>	M	Adulto	Inactivo	52	CTAB	Bosque
MTAJ7	<i>Artibeus jamaicensis</i>	M	Adulto	Inactivo	46	CTAB	Bosque
MTAJ8	<i>Carollia castanea</i>	M	Adulto	Inactivo	12	CTAB	Peridomiciliar
MTAJ9	<i>Carollia castanea</i>	H	Adulto	Inactivo	11	CTAB	Peridomiciliar
MTAJ10	<i>Phyllostomus discolor</i>	M	Adulto	Inactivo	44	CTAB	Río
MTAK1	<i>Artibeus jamaicensis</i>	H	Adulto	Inactivo	54	CTAD	Bosque
MTAK3	<i>Artibeus jamaicensis</i>	M	Adulto	Inactivo	50	CTAD	Bosque
MTAK5	<i>Artibeus jamaicensis</i>	M	Adulto	Inactivo	52	CTAD	Bosque
MTAK9	<i>Artibeus jamaicensis</i>	M	Adulto	Inactivo	45	CTAD	Peridomiciliar
MTAK10	<i>Rhogeessa io</i>	H	Adulto	Inactivo	3.5	CTAD	Gallinero
MTAL1	<i>Artibeus jamaicensis</i>	M	Adulto	Inactivo	45	CTAC	Peridomiciliar
MTAL2	<i>Artibeus jamaicensis</i>	H	Adulto	Inactivo	44	CTAC	Bosque
MTAL3	<i>Glossophaga soricina</i>	M	Adulto	Inactivo	10.5	CTAC	Bosque
MTAM1	<i>Carollia perspicillata</i>	H	Adulto	Inactivo	20	CTAF	Peridomiciliar
MTAM3	<i>Carollia perspicillata</i>	M	Adulto	Inactivo	22	CTAF	Bosque
MTAM5	<i>Carollia perspicillata</i>	M	Adulto	Inactivo	20	CTAF	Bosque
MTAM7	<i>Artibeus jamaicensis</i>	H	Adulto	Inactivo	39	CTAF	Peridomiciliar
MTAM9	<i>Carollia perspicillata</i>	M	Adulto	Inactivo	21	CTAF	Bosque
MTAN1	<i>Glossophaga soricina</i>	H	Adulto	Inactivo	10	CTAE	Bosque
MTAN3	<i>Artibeus jamaicensis</i>	H	Adulto	Inactivo	56	CTAE	Bosque
MTAN5	<i>Uroderma convexum</i>	M	Adulto	Inactivo	18	CTAE	Bosque
MTAN7	<i>Carollia castanea</i>	H	Adulto	Inactivo	12.5	CTAE	Peridomiciliar

ID del individuo	Especie	Sexo	Edad	Estado Reproductivo	Peso (gr)	ID de la Casa	Ubicación de la Red de Niebla
MTAN9	<i>Carollia castanea</i>	H	Adulto	Inactivo	13	CTAE	Peridomiciliar
MTAO1	<i>Rhogeessa io</i>	H	Adulto	Inactivo	4.5	CTAH	Peridomiciliar
MTAO3	<i>Uroderma convexum</i>	H	Adulto	Inactivo	16	CTAH	Peridomiciliar
MTAO5	<i>Uroderma convexum</i>	M	Adulto	Inactivo	16.5	CTAH	Peridomiciliar
MTAO7	<i>Uroderma convexum</i>	M	Adulto	Inactivo	17.5	CTAH	Peridomiciliar
MTAO9	<i>Carollia perspicillata</i>	H	Adulto	Inactivo	20.5	CTAH	Bosque

Anexo 7. Lista de aves capturadas en los puntos de muestreo en Ostional, Santa Cruz y Hone Creek, Cahuita y Sixaola en el cantón de Talamanca.

ID del individuo	Especie	Sexo	Edad	Estado Reproductivo	Peso (gr)	ID de la casa	Ubicación de la red de niebla
ASCA1	<i>Aimophila ruficauda</i>	M	Adulto	Inactivo	37	CSCA	Peridomiciliar
ASCA2	<i>Aimophila ruficauda</i>	M	Adulto	Inactivo	40	CSCA	Peridomiciliar
ASCA3	<i>Amazilia rutila</i>	NA	Adulto	Inactivo	10	CSCA	Peridomiciliar
ASCA4	<i>Aimophila ruficauda</i>	M	Adulto	Inactivo	36	CSCA	Peridomiciliar
ASCA5	<i>Euphonia hirundinacea</i>	M	Adulto	Inactivo	17	CSCA	Peridomiciliar
ASCA6	<i>Columbina inca</i>	NA	Adulto	NA	NA	CSCA	Peridomiciliar
ASCB1	<i>Pitangus sulphuratus</i>	M	Adulto	Inactivo	80	CSCB	Peridomiciliar
ASCC1	<i>Polioptila plúmbea</i>	M	Adulto	Inactivo	7	CSCC	Bosque
ASCC2	<i>Columbina inca</i>	H	Adulto	Inactivo	54	CSCC	Bosque
ASCD1	<i>Turdus grayi</i>	M	Adulto	Inactivo	82	CSCD	Bosque
ASCD2	<i>Turdus grayi</i>	M	Adulto	Inactivo	80	CSCD	Bosque
ASCE1	<i>Amazilia rutila</i>	H	Adulto	Inactivo	4	CSCE	Bosque
ASCE2	<i>Amazilia rutila</i>	H	Adulto	Inactivo	4	CSCE	Bosque
ASCH1	<i>Campylorhynchus rufinucha</i>	M	Adulto	Inactivo	28	CSCH	Peridomiciliar 1
ASCH2	<i>Campylorhynchus rufinucha</i>	M	Adulto	Inactivo	29	CSCH	Peridomiciliar 1
ASCH3	<i>Campylorhynchus rufinucha</i>	M	Adulto	Inactivo	35	CSCH	Peridomiciliar 1
ASCI1	<i>Eumomota superciliosa</i>	H	Adulto	Inactivo	57	CSCA	Río
ASCI2	<i>Columbina inca</i>	H	Adulto	Inactivo	36	CSCA	Río 2
ASCI3	<i>Columbina inca</i>	M	Adulto	Inactivo	52	CSCA	Río 2
ASCI4	<i>Columbina inca</i>	H	Adulto	Inactivo	38	CSCA	Río 1

ID del individuo	Especie	Sexo	Edad	Estado Reproductivo	Peso (gr)	ID de la casa	Ubicación de la red de niebla
ASCI5	<i>Quiscalus mexicanus</i>	H	Adulto	Inactivo	120	CSCA	Río 1
ASCI6	<i>Pitangus sulphuratus</i>	H	Adulto	Inactivo	65	CSCA	Bosque
ASCI7	<i>Pitangus sulphuratus</i>	H	Adulto	Inactivo	64	CSCA	Bosque
ASCJ1	<i>Columbina inca</i>	H	Adulto	Inactivo	52	CSCB	Establo 1
ASCJ2	<i>Turdus grayi</i>	M	Adulto	Inactivo	68	CSCB	Establo
ASCJ3	<i>Columbina inca</i>	H	Adulto	Inactivo	37.5	CSCB	Establo
ASCK1	<i>Pitangus sulphuratus</i>	H	Adulto	Inactivo	75	CSCC	Red 1
ASCK2	<i>Quiscalus mexicanus</i>	H	Adulto	Inactivo	115	CSCC	Red 3
ASCK3	<i>Amazilia rutila</i>	M	Adulto	Inactivo	5	CSCC	Red 2
ASCK4	<i>Quiscalus mexicanus</i>	M	Adulto	Inactivo	115	CSCC	Red 2
ASCK5	<i>Campylorhynchus rufinucha</i>	M	Adulto	Inactivo	29	CSCC	Red 2
ASCL1	<i>Campylorhynchus rufinucha</i>	H	Adulto	Inactivo	29	CSCD	Red Loma
ASCL2	<i>Columbina inca</i>	M	Adulto	Inactivo	50	CSCD	Peridomiciliar
ASCL3	<i>Columbina inca</i>	NA	Adulto	Inactivo	60	CSCD	Peridomiciliar
ASCM1	<i>Columbina inca</i>	H	Adulto	Inactivo	61	CSCE	Peridomiciliar
ASCM2	<i>Columbina inca</i>	M	Adulto	Inactivo	49	CSCE	Loma
ASCM3	<i>Columbina inca</i>	M	Adulto	Inactivo	53	CSCE	Bosque
ASCM4	<i>Columbina inca</i>	H	Adulto	Inactivo	52	CSCE	Loma
ASCM5	<i>Icterus pustulatus</i>	M	Adulto	Inactivo	45	CSCE	Loma
ASCM6	<i>Icterus pustulatus</i>	M	Adulto	Inactivo	40	CSCE	Loma
ASCM7	<i>Vireo flavoviridis</i>	M	Adulto	Inactivo	16	CSCE	Loma
ASCM8	<i>Icterus pustulatus</i>	M	Adulto	Inactivo	45	CSCE	Loma
ASCM9	<i>Campylorhynchus rufinucha</i>	H	Adulto	Inactivo	33.5	CSCE	Loma
ASCM10	<i>Vireo flavoviridis</i>	H	Adulto	Inactivo	26	CSCE	Loma

ID del individuo	Especie	Sexo	Edad	Estado Reproductivo	Peso (gr)	ID de la casa	Ubicación de la red de niebla
ASCM11	No identificado	M	Adulto	Inactivo	51	CSCE	Loma
ASCM12	<i>Geothlypis philadelphia</i>	M	Adulto	Inactivo	8	CSCE	Bosque
ASCN1	<i>Amazilia rutila</i>	M	Adulto	Inactivo	4.5	CSCF	Bosque
ASCN2	<i>Tolmomyias sulphurescens</i>	H	Adulto	Inactivo	14.5	CSCF	Bosque
ASCN3	<i>Tolmomyias sulphurescens</i>	H	Adulto	Inactivo	16	CSCF	Bosque
ASCN4	<i>Campylorhynchus rufinucha</i>	M	Adulto	Inactivo	35	CSCF	Bosque
ASCN5	<i>Tolmomyias sulphurescens</i>	M	Adulto	Inactivo	19	CSCF	Bosque
ASCN6	<i>Thryophilus pleurostictus</i>	M	Adulto	Inactivo	16.5	CSCF	Bosque
ATAA1	<i>Amazilia tzacatl</i>	H	Adulto	Inactivo	6	CTAA	Peridomiciliar
ATAA2	<i>Sporophila moreletti</i>	M	Adulto	Inactivo	13	CTAA	Establo
ATAA3	<i>Sporophila moreletti</i>	M	Adulto	Inactivo	11	CTAA	Bosque
ATAA4	<i>Pitangus sulphuratus</i>	M	Adulto	Inactivo	64	CTAA	Bosque
ATAA5	<i>Pitangus sulphuratus</i>	M	Adulto	Inactivo	60	CTAA	Bosque
ATAA6	<i>Sporophila moreletti</i>	M	Adulto	Inactivo	11	CTAA	Establo
ATAA7	<i>Amazilia tzacatl</i>	H	Adulto	Inactivo	5	CTAA	Establo
ATAA8	<i>Crotophaga sulcirostris</i>	M	Adulto	Inactivo	77	CTAA	Bosque
ATAA9	<i>Ramphocelus passerinii</i>	M	Adulto	Inactivo	20	CTAA	Bosque
ATAA10	<i>Sporophila moreletti</i>	H	Adulto	Inactivo	10	CTAA	Bosque
ATAA11	<i>Sporophila moreletti</i>	M	Adulto	Inactivo	10	CTAA	Bosque
ATAA12	<i>Tyrannus melancholicus</i>	M	Adulto	Inactivo	25	CTAA	Bosque
ATAA13	<i>Sporophila moreletti</i>	M	Adulto	Inactivo	11.5	CTAA	Bosque
ATAA14	<i>Sporophila moreletti</i>	M	Adulto	Inactivo	10	CTAA	Bosque
ATAA15	<i>Sporophila moreletti</i>	M	Adulto	Inactivo	10	CTAA	Bosque
ATAA16	<i>Sporophila moreletti</i>	H	Adulto	Inactivo	10.5	CTAA	Bosque

ID del individuo	Especie	Sexo	Edad	Estado Reproductivo	Peso (gr)	ID de la casa	Ubicación de la red de niebla
ATAA17	<i>Sporophila morelleti</i>	M	Adulto	Inactivo	10	CTAA	Bosque
ATAA18	<i>Sporophila morelleti</i>	M	Adulto	Inactivo	10	CTAA	Bosque
ATAA19	<i>Turdus grayi</i>	H	Adulto	Inactivo	70	CTAA	Bosque
ATAA20	<i>Nyctidromus albicollis</i>	H	Adulto	Inactivo	56	CTAA	Bosque
ATAA21	<i>Tyrannus melancholicus</i>	M	Adulto	Inactivo	38	CTAA	Bosque
ATAA22	<i>Ramphocelus passerinii</i>	M	Adulto	Inactivo	28	CTAA	Bosque
ATAB1	<i>Amazilia tzacatl</i>	M	Adulto	Inactivo	5	CTAB	Bosque
ATAB2	<i>Glaucis aeneus</i>	H	Adulto	Inactivo	6	CTAB	Bosque
ATAB3	<i>Turdus grayi</i>	M	Adulto	Inactivo	70	CTAB	Bosque
ATAC1	<i>Amazilia tzacatl</i>	H	Adulto	Inactivo	7	CTAC	Bosque 1
ATAC2	<i>Habia fuscicauda</i>	M	Adulto	Inactivo	47	CTAC	Bosque 2
ATAC3	<i>Phaethornis striigularis</i>	M	Adulto	Inactivo	2.5	CTAC	Peridomiciliar
ATAC4	<i>Habia fuscicauda</i>	H	Adulto	Inactivo	28	CTAC	Peridomiciliar
ATAC5	<i>Habia fuscicauda</i>	H	Adulto	Inactivo	39.5	CTAC	Bosque 2
ATAC6	<i>Chloroceryle amazona</i>	M	Adulto	Inactivo	32	CTAC	Bosque 2
ATAC7	<i>Amazilia tzacatl</i>	H	Adulto	Inactivo	4.5	CTAC	Bosque 2
ATAC8	<i>Xiphorhynchus erythropygius</i>	H	Adulto	Inactivo	43	CTAC	Bosque 2
ATAD1	<i>Glaucis aeneus</i>	M	Adulto	Inactivo	7	CTAD	Peridomiciliar
ATAD2	<i>Glaucis aeneus</i>	M	Adulto	Inactivo	7	CTAD	Peridomiciliar
ATAD3	<i>Amazilia tzacatl</i>	M	Adulto	Inactivo	5	CTAD	Peridomiciliar
ATAE1	<i>Phaethornis longirostris</i>	M	Adulto	Inactivo	6	CTAE	Bosque
ATAE2	<i>Troglodytes aedon</i>	M	Adulto	Inactivo	10	CTAE	Potrero
ATAE3	<i>Glaucis aeneus</i>	M	Adulto	Inactivo	5	CTAE	Bosque

ID del individuo	Especie	Sexo	Edad	Estado Reproductivo	Peso (gr)	ID de la casa	Ubicación de la red de niebla
ATAE4	<i>Sporophila morelleti</i>	H	Adulto	Inactivo	10	CTAE	Potrero
ATAE5	<i>Sporophila funérea</i>	H	Adulto	Inactivo	12	CTAE	Potrero
ATAE6	<i>Sporophila morelleti</i>	H	Adulto	Inactivo	10	CTAE	Potrero
ATAE7	<i>Todirostrum cinereum</i>	M	Adulto	Inactivo	5.5	CTAE	Potrero
ATAE8	<i>Sporophila morelleti</i>	M	Adulto	Inactivo	9.5	CTAE	Potrero
ATAE9	<i>Sporophila morelleti</i>	M	Adulto	Inactivo	10.5	CTAE	Potrero
ATAE10	<i>Dendrocincla fuliginosa</i>	M	Adulto	Inactivo	37	CTAE	Bosque
ATAE11	<i>Sporophila morelleti</i>	H	Adulto	Inactivo	10	CTAE	Bosque
ATAE12	<i>Sporophila morelleti</i>	H	Adulto	Inactivo	9.5	CTAE	Bosque
ATAE13	<i>Mionectes oleagineus</i>	M	Adulto	Inactivo	10.5	CTAE	Bosque
ATAF1	<i>Myiozetetes similis</i>	H	Adulto	Inactivo	20.5	CTAF	Peridomiciliar
ATAF2	<i>Euphonia luteicapilla</i>	M	Adulto	Inactivo	10.5	CTAF	Bosque
ATAF3	<i>Phaethornis longirostris</i>	M	Adulto	Inactivo	6	CTAF	Peridomiciliar
ATAF4	<i>Crotophaga sulcirostris</i>	M	Adulto	Inactivo	83	CTAF	Bosque
ATAF5	<i>Troglodytes aedon</i>	H	Adulto	Inactivo	11	CTAF	Peridomiciliar
ATAH1	<i>Myiozetetes similis</i>	M	Adulto	Inactivo	26	CTAH	Bosque
ATAH2	<i>Myiozetetes similis</i>	M	Adulto	Inactivo	27	CTAH	Bosque
ATAH3	<i>Myiozetetes similis</i>	M	Adulto	Inactivo	29	CTAH	Bosque
ATAH4	<i>Myiozetetes similis</i>	M	Adulto	Inactivo	29	CTAH	Bosque
ATAH5	<i>Myiozetetes similis</i>	M	Adulto	Inactivo	25	CTAH	Bosque
ATAH6	<i>Troglodytes aedon</i>	M	Adulto	Inactivo	13	CTAH	Bosque
ATAI1	<i>Patagioenas flavirostris</i>	M	Adulto	Inactivo	260	CTAA	Bosque
ATAI2	<i>Sporophila morelleti</i>	M	Adulto	Inactivo	11.5	CTAA	Bosque
ATAI3	<i>Sporophila morelleti</i>	M	Adulto	Inactivo	9.5	CTAA	Bosque

ID del individuo	Especie	Sexo	Edad	Estado Reproductivo	Peso (gr)	ID de la casa	Ubicación de la red de niebla
ATAI4	<i>Sporophila morelleti</i>	H	Adulto	Inactivo	10.5	CTAA	Bosque
ATAI5	<i>Sporophila morelleti</i>	M	Adulto	Inactivo	11	CTAA	Bosque
ATAI6	<i>Pitangus sulphuratus</i>	H	Adulto	Inactivo	60	CTAA	Peridomiciliar
ATAI7	<i>Pitangus sulphuratus</i>	H	Adulto	Inactivo	63	CTAA	Peridomiciliar
ATAI8	<i>Sporophila morelleti</i>	NI	Adulto	Inactivo	10	CTAA	Bosque
ATAJ1	<i>Empidonax virescens</i>	M	Adulto	Inactivo	14.5	CTAB	Peridomiciliar
ATAJ2	<i>Catharus ustulatus</i>	M	Adulto	Inactivo	27	CTAB	Bosque
ATAJ3	<i>Empidonax virescens</i>	M	Adulto	Inactivo	12	CTAB	Bosque
ATAJ4	<i>Xiphorhynchus susurrans</i>	H	Adulto	Inactivo	46.5	CTAB	Bosque
ATAK1	<i>Phaethornis striigularis</i>	H	Adulto	Inactivo	2.5	CTAD	Bosque
ATAL1	<i>Turdus grayi</i>	H	Adulto	Inactivo	79	CTAC	Peridomiciliar
ATAL2	<i>Parkesia noveboracensis</i>	M	Adulto	Inactivo	14	CTAC	Peridomiciliar
ATAL3	<i>Empidonax alnorum</i>	M	Adulto	Inactivo	12.5	CTAC	Peridomiciliar
ATAL4	<i>Piranga rubra</i>	M	Adulto	Inactivo	32	CTAC	Bosque
ATAL5	<i>Empidonax virescens</i>	M	Adulto	Inactivo	10	CTAC	Bosque
ATAM1	<i>Empidonax virescens</i>	M	Adulto	Inactivo	13.5	CTAF	Peridomiciliar
ATAN1	<i>Amazilia tzacatl</i>	M	Adulto	Inactivo	5	CTAE	Bosque
ATAN2	<i>Crotophaga sulcirostris</i>	H	Adulto	Inactivo	73	CTAE	Peridomiciliar
ATAN3	<i>Crotophaga sulcirostris</i>	M	Adulto	Inactivo	81	CTAE	Peridomiciliar
ATAN4	<i>Dendrocincla fuliginosa</i>	M	Adulto	Inactivo	46	CTAE	Peridomiciliar
ATA01	<i>Vireo flavifrons</i>	M	Adulto	Inactivo	16	CTAH	Bosque
ATA02	<i>Amazilia tzacatl</i>	M	Adulto	Inactivo	6	CTAH	Peridomiciliar
ATA03	<i>Sporophila morelleti</i>	M	Adulto	Inactivo	11	CTAH	Bosque
ATA04	<i>Myiozetetes similis</i>	M	Adulto	Inactivo	27	CTAH	Bosque

ID del individuo	Especie	Sexo	Edad	Estado Reproductivo	Peso (gr)	ID de la casa	Ubicación de la red de niebla
ATA05	<i>Parkesia noveboracensis</i>	M	Adulto	Inactivo	14.5	CTAH	Bosque

Anexo 8. Murciélagos positivos mediante PRNT dilución 1:10 contra *Flavivirus* (DENV-1,2,3,4, ZIKV, YFV, WNV, SLEV) y *Alfavirus* (EEEV, VEEV).

ID Individuo	Especie	Sexo	Peso gramos	Resultado PRNT 1:10
MSCA6	<i>Glossophaga soricina</i>	Hembra	9	DENV-2
MSCF3	<i>Desmodus rotundus</i>	Hembra	43	DENV-4
MSCC1	<i>Uroderma convexum</i>	Macho	9	DENV-1
MSCD4	<i>Glossophaga soricina</i>	Hembra	9	DENV-1 DENV-3
MSCF4	<i>Artibeus phaeotis</i>	Macho	11	DENV-1
MSCF5	<i>Desmodus rotundus</i>	Hembra	53	DENV-1
MSCG9	<i>Sturnira parvidens</i>	Hembra	13	DENV-1
MSCG14	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Hembra	28	DENV-1 DENV-2
MSCH1	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Macho	41	DENV-1
MSCI2	<i>Artibeus phaeotis</i>	Hembra	12	DENV-1 DENV-2 DENV-4
MSCI3	<i>Chiroderma salvini</i>	Macho	16	DENV-1
MSCI4	<i>Artibeus phaeotis</i>	Hembra	12	DENV-3
MSCJ1	<i>Ptenorotus mesoamericanus</i>	Hembra preñada	18.5	DENV-1
MSCL3	<i>Carollia perspicillata</i>	Macho	18.5	VEEV
MSCL7	<i>Carollia perspicillata</i>	Hembra	15	DENV-1
MSCL9	<i>Artibeus phaeotis</i>	Hembra	32	DENV-1 DENV-2 DENV-4

ID Individuo	Especie	Sexo	Peso gramos	Resultado PRNT 1:10
MSCM3	<i>Phyllostomus discolor</i>	Macho	41	DENV-1 EEEV
MSCM4	<i>Phyllostomus discolor</i>	Macho	43	EEEV
MSCM6	<i>Phyllostomus discolor</i>	Macho	41	EEEV
MSCM7	<i>Phyllostomus discolor</i>	Hembra	37.5	DENV-1 DENV-2 DENV-3 EEEV
MSCN3	<i>Noctilio albiventris</i>	Macho	36	DENV-1 EEEV
MSCN4	<i>Artibeus lituratus</i>	Hembra preñada	62	DENV-1 DENV-2 DENV-3
MSCO1	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Macho	41	DENV-1 DENV-2 EEEV
MSCO4	<i>Artibeus phaeotis</i>	Macho	10	DENV-1 DENV-2 WNV SLEV
MSCO6	<i>Carollia perspicillata</i>	Macho	17.5	DENV-1 DENV-2
MSCO7	<i>Artibeus lituratus</i>	Macho	61	DENV-2
MTAA1	<i>Uroderma convexum</i>	Macho	15	DENV-1
MTAB2	<i>Artibeus watsoni</i>	Macho	10.5	DENV-1 DENV-2 DENV-3 DENV-4
MTAB4	<i>Artibeus watsoni</i>	Macho	10.5	DENV-2
MTAB7	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Hembra preñada	57	DENV-1 SLEV
MTAB8	<i>Carollia perspicillata</i>	Macho	18	DENV-1 DENV-2
MTAC2	<i>Glossophaga soricina</i>	Macho	9.5	DENV-2
MTAC3	<i>Glossophaga soricina</i>	Macho	9	DENV-1
MTAC4	<i>Glossophaga soricina</i>	Hembra	12	DENV-1 DENV-2 DENV-3 DENV-4
MTAD3	<i>Lonchophylla robusta</i>	Hembra	14	DENV-1

ID Individuo	Especie	Sexo	Peso gramos	Resultado PRNT 1:10
MTAE1	<i>Carollia perspicillata</i>	Hembra	16	EEEV
MTAG5	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Hembra	42	DENV-1 DENV-2 YFV WNV
MTAG7	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Hembra	45	SLEV, EEEV
MTAH2	<i>Uroderma convexum</i>	Hembra	16	DENV-1 DENV-2 DENV-3 SLEV
MTAH4	<i>Uroderma convexum</i>	Hembra	22	DENV-1 DENV-2 SLEV
MTAJ3	<i>Myotis nigricans</i>	Hembra	5.5	DENV-1
MTAJ5	<i>Carollia perspicillata</i>	Hembra	20	DENV-1 DENV-2
MTAJ6	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Macho	52	DENV-1 DENV-2
MTAJ7	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Macho	46	EEEV
MTAJ10	<i>Phyllostomus discolor</i>	Macho	44	DENV-1
MTAK5	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Macho	52	DENV-1 DENV-4 SLEV
MTAK9	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Macho	45	DENV-1
MTAL3	<i>Glossophaga soricina</i>	Macho	10.5	DENV-1
MTAM1	<i>Carollia perspicillata</i>	Hembra	20	DENV-1
MTAM5	<i>Carollia perspicillata</i>	Macho	20	DENV-1
MTAM7	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Hembra	39	DENV-1
MTAN5	<i>Uroderma convexum</i>	Macho	18	DENV-1
MTAN7	<i>Carollia castanea</i>	Hembra	12.5	WNV
MTAN9	<i>Carollia castanea</i>	Hembra	13	DENV-1

ID Individuo	Especie	Sexo	Peso gramos	Resultado PRNT 1:10
MTAO1	<i>Rhogeessa io</i>	Hembra	4.5	DENV-1
MTAO7	<i>Uroderma convexum</i>	Macho	17.5	DENV-1

Anexo 9. Principales hallazgos histopatológicos y diagnósticos morfológicos presentes en murciélagos positivos por medio de PRNT y RT-PCR, capturados en el cantón de Santa Cruz y Talamanca.

ID de la muestra Especie Sexo	Hallazgos histopatológicos	Diagnóstico morfológico
MSCA6 <i>Glossophaga soricina</i> Hembra	<p>Hígado: Degeneración vacuolar marcada y difusa (lipídica). Presencia de pigmento intracitoplasmático granular café (hemosiderina/lipofuscina).</p> <p>Páncreas: Hiperplasia folicular del ganglio linfático pancreático.</p> <p>Intestino delgado: Presencia de un leve infiltrado de linfocitos y células plasmáticas en lamina propia con escasos eosinófilos.</p> <p>Intestino grueso: Hemorragias difusas en lamina propia de la mucosa. Infiltrado inflamatorio focal compuesto por neutrófilos. Contenido hemorrágico en el lumen intestinal.</p>	<p>Leve degeneración vacuolar hepática con presencia de hemosiderina.</p> <p>Hiperplasia folicular del ganglio linfático.</p> <p>Enteritis hemorrágica, necrotizante, neutrofílica, aguda severa.</p>
MSCB3 <i>Noctilio leporinus</i> Macho	<p>Pulmón: Engrosamiento de los septos alveolares, infiltrado mononuclear difuso, linfo-histiocítico y atelectasia.</p> <p>Bazo: Hiperplasia de los folículos linfoides.</p> <p>Intestino delgado: Leve infiltrado de eosinófilos en lamina propia de la mucosa (0-3 células por campo de alto poder ((400X)).</p> <p>Intestino grueso: Necrosis focal de la mucosa, con presencia de un infiltrado inflamatorio compuesto por eosinófilos y neutrófilos en lamina propia. Los eosinófilos se extienden hacia la capa submucosa.</p>	<p>Atelectasia pulmonar.</p> <p>Hiperplasia folicular esplénica.</p> <p>Enteritis neutrofílica y eosinofílica necrotizante transmural aguda moderada.</p>

ID de la muestra Especie Sexo	Hallazgos histopatológicos	Diagnóstico morfológico
MSCB2 <i>Carollia perspicillata</i> No determinado	<p>Hígado: Leve degeneración vacuolar (hidrópica).</p> <p>Pulmón: Infiltrado focal de células inflamatorias, compuesto por eosinófilos en el intersticio alveolar.</p> <p>Estómago: Leve infiltrado de eosinófilos en lamina propria (<2 células por campo de alto poder ((400X)).</p> <p>Intestino grueso: Leve infiltrado de eosinófilos en lamina propria (0-2 células por campo de alto poder (400X)).</p>	<p>Degeneración vacuolar hepática leve.</p> <p>Gastritis eosinofílica aguda leve.</p> <p>Enteritis eosinofílica aguda leve.</p>
MSCC4 <i>Phyllostomus discolor</i> Macho	<p>Hígado: Leve infiltrado inflamatorio multifocal en la zona periportal (zona 1), compuesto por linfocitos, células plasmáticas y escasos eosinófilos.</p> <p>Pulmón: Marcada hipertrofia e hiperplasia de la túnica media de las arteriolas pulmonares. Multifocalmente hay in infiltrado inflamatorio compuesto por eosinófilos en la túnica íntima que se extiende hacia la túnica media y adventicia.</p> <p>Bazo: Hiperplasia de los folículos linfoides.</p> <p>Riñón: Presencia de agregados de linfocitos en el espacio intersticial de la médula renal.</p> <p>Esófago: Leve infiltrado compuesto por eosinófilos en submucosa.</p> <p>Intestino delgado: Leve infiltrado de eosinófilos en lamina propria de la mucosa (0-3 células por campo de alto poder ((400X)).</p> <p>Intestino grueso: Moderado infiltrado de eosinófilos en lamina propria de la mucosa, 5-10 células por campo de alto poder (400X).</p>	<p>Hepatitis periportal linfoplasmocitaria con eosinófilos crónico activa leve.</p> <p>Pulmón: Arteritis eosinofílica multifocal con hipertrofia miointimal.</p> <p>Hiperplasia folicular esplénica.</p> <p>Esofagitis eosinofílica aguda leve.</p> <p>Enteritis eosinofílica aguda leve.</p>
ID de la muestra	Hallazgos histopatológicos	Diagnóstico morfológico

Especie Sexo		
MSCF3 <i>Desmodus rotundus</i> Hembra	Pulmón: Colapso de los alvéolos pulmonares. Bazo: Hiperplasia de folículos linfoides, presencia de pigmento de hemosiderina y megacariocitos en la pulpa roja (hematopoyesis extramedular). Riñón: Agregado de células linfoides en la pelvis renal. Intestino grueso: Hiperplasia marcada del tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT). Ganglio linfático: Presencia de gran cantidad de células mononucleares en el seno medular del ganglio linfático renal.	Atelectasia pulmonar. Hiperplasia folicular esplénica. Histiocitosis sinusal.
MSCG7 <i>Artibeus jamaicensis</i> Macho	Hígado: Presencia multifocal de focos de necrosis del parénquima hepático con formación de agregados de células inflamatorias, macrófagos, linfocitos y eosinófilos. La distribución de las lesiones es aleatoria. No se observan agentes etiológicos. Pulmón: Colapso de espacios alveolares. Intestino delgado: Abundantes linfocitos intraepiteliales, (20-30 células por campo de alto poder ((400X)). Piel: Proliferación benigna del epitelio plano estratificado con queratina.	Hepatitis necrotizante multifocal linfo-histiocitaria con eosinófilos crónico activa moderada. Atelectasia pulmonar. Papiloma escamoso.
MSCD4 <i>Glossophaga soricina</i> Hembra	Hígado: Dilatación de sinusoides hepáticos. Reproductor: En el lumen del tracto reproductivo(cérvix), hay presencia de células epiteliales descamadas, detrito celular y neutrófilos degenerados.	Congestión hepática. Cervicitis supurativa aguda severa.
MSCF4 <i>Artibeus phaeotis</i> Macho	Hígado: Leve degeneración lipídica macrovesicular.	Leve lipidosis hepática.
ID de la muestra	Hallazgos histopatológicos	Diagnóstico morfológico

Especie Sexo		
MSCF5 <i>Desmodus rotundus</i> Hembra	Corazón: Leve infiltración grasa en el ventrículo derecho. Pulmón: Hiperplasia del tejido linfoide asociado a los bronquios. Intestino delgado: Presencia de múltiples ooquistes esporulados en el epitelio intestinal microgametos (microgamontes) en el interior, morfológicamente compatibles con coccidiosis intestinal.	Infiltración grasa en miocardio. Coccidiosis intestinal.
MSCG14 <i>Artibeus jamaicensis</i> Hembra	Hígado: Hay múltiples focos de necrosis del parénquima hepático con un infiltrado inflamatorio compuesto por macrófagos, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos y presencia intralesional de nemátodos. Intestino delgado: Presencia de un leve infiltrado eosinofílico en lamina propria de la mucosa, 0-5 células por campo de alto poder (400X).	Hepatitis necrotizante piogranulomatosa secundaria a la presencia de nemátodos. Enteritis eosinofílica aguda leve.
MSCH1 <i>Artibeus jamaicensis</i> Macho	Hígado: Múltiples lipogranulomas con distribución aleatoria. Los macrófagos contienen un material intracelular, lamelar eosinofílico refringente (cristales). Hay necrosis y saponificación de la grasa. Riñones: Los riñones contienen múltiples túbulos renales dilatados con atrofia del epitelio cuboidal y presencia de un material extracelular amorfo lamelar refringente y basofílico (cristales).	Lipogranulomas hepáticos. Urolitiasis renal.
MSCI3 <i>Chiroderma salvini</i> Macho	Bazo: Células mesoteliales reactivas. Depleción de los folículos linfoides, hay presencia de un infiltrado moderado de eosinófilos en la pulpa roja. Sistema nervioso central: Infiltrado inflamatorio focal periventricular compuesto por células mononucleares, macrófagos y linfocitos y escasos eosinófilos. Pulmón: Infiltrado de neutrófilos en el intersticio alveolar con dilatación de los capilares alveolares.	Esplenitis eosinofílica aguda moderada. Meningitis linfo-histiocitaria focal con eosinófilos. Neumonía neutrofílica intersticial aguda moderada.
ID de la muestra	Hallazgos histopatológicos	Diagnóstico morfológico

Especie Sexo		
MSCJ1 <i>Ptenorotus mesoamericanus</i> Hembra preñada	Pulmón: Formación de un agregado focal de células gigantes y macrófagos con presencia de un pigmento finamente granular de color negro en el citoplasma (antracosis). Riñón: Presencia de agregados de linfocitos y células plasmáticas de forma multifocal en la pelvis renal. Hay presencia de células plasmáticas tipo Mott, con cuerpos de Russell en el interior. Intestino delgado: En lamina propria hay un moderado infiltrado compuesto por eosinófilos (10-20 células por campo de alto poder ((400X)).	Neumonía granulomatosa focal con antracosis. Tejido linfoide en pelvis renal. Enteritis eosinofílica aguda moderada.
MSCL3 <i>Carollia perspicillata</i> Macho	Hígado: Presencia multifocal de vacuolas con un material fibrilar eosinofílico o basofílico irregular y refringente (cristales o depósitos de calcio), rodeados de macrófagos. Pulmón: Hiperplasia del tejido linfoide peri bronquial. Intestino delgado: Tremátodos en el lumen intestinal.	Lipogranulomas hepáticos. Parasitosis intestinal (tremátodos).
MSCL7 <i>Carollia perspicillata</i> Hembra	Riñón: Presencia de agregados inflamatorios, compuestos por linfocitos, histiocitos y células plasmáticas de forma focal en la pelvis renal. Hay escasos eosinófilos embebidos en los agregados mononucleares.	Tejido linfoide asociado a la pelvis renal.
MSCL9 <i>Desmodus rotundus</i> Hembra	Riñón: Presencia de un agregado focal de linfocitos y células plasmáticas en la pelvis renal. Ganglios linfáticos: Histiocitosis sinusal marcada de los ganglios linfáticos mesentéricos.	Tejido linfoide asociado a la pelvis renal. Histiocitosis sinusal.
ID de la muestra Especie	Hallazgos histopatológicos	Diagnóstico morfológico

Sexo		
MSCM3 <i>Phyllostomus discolor</i> Macho	<p>Hígado: Marcada dilatación de sinusoides hepáticos. Multifocalmente hay una presencia de escasos linfocitos y células plasmáticas en el espacio periportal (zona 1 del lobulillo hepático).</p> <p>Riñón: Presencia de agregados multifocales en el espacio intersticial compuestos por linfocitos y células plasmáticas, en uno de los cortes se observa la presencia de los agregados linfoides en la pelvis renal.</p> <p>Estómago: Hay formación de agregados linfoides en lamina propria de la mucosa (gastritis folicular).</p> <p>Intestino delgado: Hay presencia de un infiltrado de eosinófilos, moderado a severo (20-30 células por campo de 400X) en lamina propria de la mucosa. Presencia de un corte transversal de un protozooario.</p>	<p>Hepatitis periportal linfoplasmocitaria leve crónica.</p> <p>Nefritis linfoplasmocitaria intersticial multifocal crónica leve.</p> <p>Gastritis folicular.</p> <p>Enteritis eosinofílica aguda moderada con presencia de protozoarios en el lumen.</p>
MSCM4 <i>Phyllostomus discolor</i> Macho	<p>Corazón: Leve infiltración grasa en el ventrículo derecho.</p> <p>Hígado: Presencia multifocal de lipogranulomas.</p> <p>Riñón: Presencia de agregados de células linfoides en la pelvis renal.</p> <p>Estómago: Hay un leve infiltrado de eosinófilos en lamina propria de la mucosa (0-5 células por campo de alto poder ((400X)).</p> <p>Intestino delgado: Presencia de un cestodo en el lumen intestinal. Hay un moderado infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos y células plasmáticas de la mucosa.</p> <p>Próstata: Focalmente hay necrosis de las glándulas prostáticas, con presencia de células inflamatorias, macrófagos y espermatozoides (granuloma espermático) y dilatación del conducto espermático.</p>	<p>Infiltración grasa cardíaca leve.</p> <p>Lipogranulomas hepáticos.</p> <p>Gastritis eosinofílica aguda leve.</p> <p>Enteritis linfoplasmocitaria con presencia de cestodos en el lumen intestinal.</p> <p>Prostatitis necrotizante supurativa con espermatocele y granuloma espermático.</p>
ID de la muestra	Hallazgos histopatológicos	Diagnóstico morfológico

Especie Sexo		
<p>MSCM6 <i>Phyllostomus discolor</i> Macho</p>	<p>Hígado: Leve infiltrado inflamatorio periportal compuesto por linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos. Vesícula biliar: Severo infiltrado de eosinófilos en lamina propria de la mucosa de la vesícula biliar (15-20 células por campo de alto poder ((400X)). Pulmón: Hipertrofia de la túnica íntima y media de las arteriolas pulmonares. Presencia de eosinófilos en el lumen arterial y agregados de linfocitos y células plasmáticas en la adventicia y túnica media. Riñón: Presencia de agregados linfo-plasmocíticos en la pelvis renal. Estómago: Hay presencia de un leve infiltrado de eosinófilos en lamina propria de la mucosa (0-5 células por campo de alto poder ((400X)). Intestino delgado: Leve infiltrado de eosinófilos (0-5 células por campo de alto poder ((400X)) en lamina propria de la mucosa.</p>	<p>Hepatitis periportal linfo-plasmocitaria con eosinófilos crónico activa leve. Colecistitis eosinofílica aguda severa. Arteritis linfo-plasmocitaria con hipertrofia miointimal. Gastroenteritis eosinofílica aguda leve.</p>
<p>MSCM7 <i>Phyllostomus discolor</i> Hembra</p>	<p>Corazón: Leve infiltración grasa en el ventrículo derecho. Hígado: Presencia de un leve infiltrado de eosinófilos linfocitos y células plasmáticas en el espacio periportal. Intestino delgado: Hay un engrosamiento de las vellosidades intestinales, con presencia de un moderado infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos, macrófagos, células plasmáticas y escasos eosinófilos. Multifocalmente en el lumen intestinal hay presencia de nemátodos.</p>	<p>Infiltración grasa cardíaca leve. Hepatitis periportal linfo-plasmocitaria crónica leve. Enteritis linfo-histio-plasmocítica con eosinófilos crónico activa moderada con presencia de nemátodos.</p>
ID de la muestra	Hallazgos histopatológicos	Diagnóstico morfológico

Especie Sexo		
MSCN3 <i>Noctilio albiventris</i> Macho	Bazo: Dilatación de los senos venosos de la pulpa roja. Riñón: Presencia de un agregado de linfocitos y células plasmáticas en la pelvis renal. Esófago: Presencia de nemátodos embebidos en el epitelio plano estratificado queratinizado. Hiperplasia del estrato espinoso. Estómago: Presencia de agregados linfoides en la mucosa estomacal (hiperplasia linfocitaria). Nemátodos en la porción abdominal del esófago, cerca del esfínter del cardias. Intestino delgado: Presencia de nemátodos en la mucosa intestinal.	Congestión esplénica. Nemátodos en el esófago y cardias. Nemátodos en el lumen intestinal.
MSCO6 <i>Carollia perspicillata</i> Macho	Hígado: Presencia de agregados de células mononucleares (linfocitos, histiocitos y células plasmáticas) alrededor de las venas centrales.	Hepatitis linfo-histio-plasmocítica paracentral multifocal leve crónica.
MSCO7 <i>Artibeus lituratus</i> Macho	Pulmón: Focalmente hay presencia de un infiltrado inflamatorio compuesto por macrófagos epitelioides y neutrófilos. En el centro de la lesión hay un material eosinofílico (detrito celular y necrosis de coagulación). Tráquea: Formación de un infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos y células plasmáticas en la capa submucosa.	Neumonía piogranulomatosa necrotizante focal. Traqueítis linfo-plasmocitaria crónica moderada.
MTAA1 <i>Uroderma convexum</i> Macho	Corazón: Presencia de un infiltrado inflamatorio focal mononuclear compuesto por linfocitos e histiocitos en el ventrículo izquierdo.	Miocarditis focal linfo-histiocitaria crónica leve.
ID de la muestra Especie	Hallazgos histopatológicos	Diagnóstico morfológico

Sexo		
MTAB2 <i>Artibeus watsoni</i> Macho	Hígado: Leve infiltrado inflamatorio paracentral y periportal compuesto por linfocitos, histiocitos y eosinófilos. Pulmón: Presencia de múltiples agregados inflamatorios peri bronquiales compuestos por macrófagos y eosinófilos.	Hepatitis periportal y paracentral linfo-histiocítico con eosinófilos crónico activa leve. Neumonía granulomatosa y eosinofílica crónico activa moderada.
MTAB4 <i>Artibeus watsoni</i> Macho	Hígado: Leve infiltrado inflamatorio periportal compuesto por eosinófilos, linfocitos e histiocitos.	Hepatitis periportal linfo-histiocitaria con eosinófilos crónica activa leve.
MTAB7 <i>Artibeus jamaicensis</i> Hembra preñada	Hígado: Focos inflamatorios aleatorios en el parénquima hepático, la inflamación es leve y se compone de células mononucleares (linfocitos e histiocitos). Intestino delgado: Presencia de un tremátodo en el lumen intestinal.	Hepatitis linfo-histiocítica multifocal leve crónica. Tremátodos en intestino.
MTAB8 <i>Carollia perspicillata</i> Macho	Pulmón: Hiperplasia del tejido linfoide peri bronquial. Estómago: Presencia de agregados linfoides en la mucosa estomacal (hiperplasia linfocelular).	Gastritis folicular.
MTAB10 <i>Artibeus jamaicensis</i> Macho	Hígado: Presencia multifocal de leves infiltrados inflamatorios en el espacio periportal (Zona 1) del lobulillo hepático y la zona de transición (Zona 2) del lobulillo hepático. Los agregados inflamatorios están compuestos por linfocitos, células plasmáticas e histiocitos. Bazo: Hiperplasia linfoide. Intestino delgado: Hay leve a moderado infiltrado de eosinófilos en lamina propria de la mucosa (5-15 células por campo de alto poder ((400X)).	Hepatitis linfo-histio-plasmocítica crónica leve. Hiperplasia folicular esplénica. Enteritis eosinofílica aguda moderada.
ID de la muestra Especie	Hallazgos histopatológicos	Diagnóstico morfológico

Sexo		
MTAC2 <i>Glossophaga soricina</i> Macho	Hígado: Presencia de múltiples lipogranulomas distribuidos de forma aleatoria en el parénquima hepático, contienen un material refringente, linear basofílico (mineralización).	Lipogranulomas hepáticos.
MTAC4 <i>Glossophaga soricina</i> Hembra	Intestino delgado: Presencia de un moderado infiltrado de eosinófilos en lamina propria de la mucosa (10-15 células por campo de alto poder ((400X)).	Enteritis eosinofílica aguda moderada.
MTAD3 <i>Lonchophylla robusta</i> Hembra	Vesícula biliar: Presencia de trematodos en el lumen de la vesícula biliar sin inflamación asociada. Riñón: Presencia de un infiltrado focal linfo-plasmacítico en la pelvis renal. Intestino delgado: Presencia de abundantes trematodos anclados en las vellosidades de la mucosa. En lamina propria hay un moderado infiltrado de eosinófilos (10-15 células por campo de alto poder ((400X)). Útero: Presencia de neutrófilos degenerados y detrito celular en el lumen del útero.	Tremátodos en vesícula biliar e intestino delgado, enteritis eosinofílica aguda moderada. Secreción uterina supurativa.
MTAE1 <i>Carollia perspicillata</i> Hembra	Pulmón: Hiperplasia del tejido linfoide peri bronquial. Bazo: Hiperplasia de folículos linfoides, presencia de pigmento de hemosiderina y megacariocitos en la pulpa roja (hematopoyesis extramedular).	Hiperplasia folicular esplénica y hematopoyesis extramedular.
MTAG1 <i>Rhogeessa io</i> Macho	Intestino grueso: Tremátodo en el lumen intestinal.	Tremátodos intestinales.
MTAG5 <i>Artibeus jamaicensis</i> Hembra	Hígado: Leve infiltrado inflamatorio linfo-histiocítico en el espacio periportal. Intestino delgado: Moderado infiltrado de eosinófilos en lámina propia de la mucosa (5-10 células por campo de alto poder (400X)).	Hepatitis linfo-histiocitaria periportal crónica leve. Enteritis eosinofílica aguda moderada.
ID de la muestra	Hallazgos histopatológicos	Diagnóstico morfológico

Especie Sexo		
MTAG7 <i>Artibeus jamaicensis</i> Hembra	Intestino delgado: Leve infiltrado linfo-plasmacítico en lámina propia. Presencia de linfocitos intraepiteliales (5-15 células por campo de alto poder ((400X)).	Enteritis linfo-plasmocitaria crónica leve.
MTAH2 <i>Uroderma convexum</i> Hembra	Intestino delgado: Presencia de céstodos en el lumen intestinal.	Céstodos en el intestino (parasitosis intestinal).
MTAH4 <i>Uroderma convexum</i> Hembra	Placenta: Infiltrado de células gigantes en el epitelio trofoblástico de la placenta con focos de mineralización distrófica.	Mineralización distrófica en la placenta.
MTAJ3 <i>Myotis nigricans</i> Hembra	Estómago: Presencia de céstodo en el lumen del estómago.	Céstodo en el estómago.
MTAJ5 <i>Carollia perspicillata</i> Hembra	Hígado: Focos de necrosis de los hepatocitos. Intestino delgado: Tremátodos en el lumen intestinal.	Necrosis hepática multifocal aguda leve. Tremátodos en intestino.
MTAJ7 <i>Artibeus jamaicensis</i> Macho	Hígado: Presencia multifocal de lipogranulomas.	Lipogranulomas hepáticos.
MTAJ10 <i>Phyllostomus discolor</i> Macho	Hígado: Leve infiltrado inflamatorio periportal compuesto por linfocitos, histiocitos y eosinófilos. Bazo: Células mesoteliales reactivas. Hiperplasia de los folículos linfoides, hay presencia de un infiltrado moderado de eosinófilos en la pulpa roja. Riñón: Presencia de un agregado de linfocitos y células plasmáticas en el espacio intersticial. Intestino delgado: Hay presencia de un leve a moderado infiltrado inflamatorio en lamina propia de la mucosa compuesto por linfocitos, células plasmáticas, histiocitos y escasos eosinófilos.	Hepatitis periportal linfo-histiocitaria con eosinófilos crónico activa leve. Hiperplasia folicular esplénica. Nefritis intersticial linfo-plasmocitaria focal crónica leve. Enteritis linfo-histio-plasmocitaria con eosinófilos crónico activa leve.
ID de la muestra	Hallazgos histopatológicos	Diagnóstico morfológico

Especie Sexo		
MTAK5 <i>Artibeus jamaicensis</i> Macho	Hígado: Presencia de múltiples focos de mineralización irregular distribuidos de forma aleatoria.	Mineralización multifocal hepática.
MTAK9 <i>Artibeus jamaicensis</i> Macho	Hígado: Focalmente hay un agregado de células inflamatorias en el espacio periportal, compuesto por linfocitos, histiocitos, células plasmáticas y eosinófilos. Intestino delgado: Presencia de un moderado infiltrado inflamatorio compuesto por eosinófilos (15-20 células por campo de alto poder ((400X)).	Hepatitis focal periportal linfocito-histio-plasmocitaria con eosinófilos crónico activa leve. Enteritis eosinofílica aguda moderada.
MTAL3 <i>Glossophaga soricina</i> Macho	Pulmón: Colapso de los espacios alveolares. Intestino delgado: Céstodo en el lumen intestinal.	Atelectasia pulmonar. Tremátodos en el intestino delgado.
MTAM1 <i>Carollia perspicillata</i> Hembra	Intestino delgado: Presencia de tremátodos en el lumen intestinal.	Tremátodos en el intestino delgado.
MTAM7 <i>Artibeus jamaicensis</i> Hembra	Intestino delgado: Céstodo en el lumen intestinal. Intestino grueso: Presencia de céstodos en el lumen intestinal. Hay un moderado infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos, células plasmáticas, histiocitos y eosinófilos.	Céstodos en el intestino delgado y grueso, enteritis linfocito-histio-plasmocitaria con eosinófilos crónico activa moderada.
MTAN5 <i>Uroderma convexum</i> Macho	Pulmonar: Colapso del espacio alveolar. Bazo: Hiperplasia de los folículos linfoides. Esófago: Presencia de un agregado focal de linfocitos y células plasmáticas en la capa submucosa.	Atelectasia pulmonar. Hiperplasia folicular esplénica. Esofagitis linfocito-histio-plasmocitaria focal leve crónica.
ID de la muestra	Hallazgos histopatológicos	Diagnóstico morfológico

Especie Sexo		
MTAN7 <i>Carollia castanea</i> Hembra	Hígado: Presencia de escasos lipogranulomas con una distribución aleatoria. Intestino delgado: Presencia de tremátodos en el lumen intestinal.	Lipogranulomas hepáticos. Tremátodos en intestino delgado.
MTAN9 <i>Carollia castanea</i> Hembra	Riñón: Múltiples túbulos renales con dilatación quística y acúmulo de material amorfo anfofílico en el interior. Presencia de un material basofílico irregular en el lumen de los túbulos renales (microlitos). Intestino delgado: Nemátodos en el lumen intestinal.	Urolitiasis renal y dilatación tubular, cilindros hialinos. Nemátodos en el intestino delgado.
MTAO1 <i>Rhogeessa io</i> Hembra	Hígado: Leve degeneración vacuolar.	Leve degeneración vacuolar hepática.
MTAO7 <i>Uroderma convexum</i> Macho	Intestino delgado y grueso: Céstodos en el lumen intestinal.	Céstodos en el lumen intestinal.

Anexo 10. Principales hallazgos histopatológicos y diagnósticos morfológicos presentes en aves positivas por PRNT capturados en el cantón de Santa Cruz y Talamanca.

ID de la muestra Especia Sexo	Hallazgos histopatológicos	Diagnóstico morfológico
ASCD1 <i>Turdus grayi</i> Macho	<p>Hígado: Presencia de un severo infiltrado inflamatorio en el hilio hepático, alrededor de la vesícula biliar y los vasos sanguíneos con proliferación de tejido conectivo. El infiltrado inflamatorio se compone de abundantes linfocitos, células plasmáticas y heterófilos. Multifocalmente en el parénquima hepático hay agregados de células linfoides con distribución aleatoria.</p> <p>Pulmón: Presencia de agregados de células linfoides grandes (>15 micrómetros de diámetro, células plasmáticas y escasos heterófilos alrededor de los vasos sanguíneos (arteriolas)) y en el espacio pleural.</p> <p>Riñón: Presencia de un agregado focal de células linfoides en el espacio intersticial.</p> <p>Duodeno: En lamina propria hay presencia de escasos heterófilos (3-6 células por campo de alto poder ((400X)).</p> <p>Cloaca: Hiperplasia linfoide en la mucosa del proctodeo. En el músculo esquelético se observa focalmente una estructura parasitaria en el interior de una célula muscular estriada. El quiste es morfológicamente compatible con <i>Sarcocystis</i> spp. posee una pared delgada y contienen abundantes estructuras en forma de banana (bradizoitos). No hay reacción inflamatoria asociada con la presencia del quiste.</p>	<p>Hepatitis hiliar linfo-plasmocitaria con heterófilos (celomitis heterofílica).</p> <p>Neumonía linfo-plasmocitaria con heterófilos perivascular e intersticial crónico activa moderada.</p> <p>Nefritis intersticial linfocitaria crónica leve.</p> <p>Duodenitis heterofílica aguda leve.</p> <p><i>Sarcocystis</i> spp. en músculo esquelético de la cloaca.</p>

ID de la muestra Especia Sexo	Hallazgos histopatológicos	Diagnóstico morfológico
ASCD2 <i>Turdus grayi</i> Macho	<p>Corazón: Presencia de un único agregado de células mononucleares en el miocardio, son células linfoides grandes (>15 micrómetros de diámetro).</p> <p>Hígado: Presencia multifocal de agregados de células mononucleares, células linfoides grandes en el parénquima hepático con distribución aleatoria. Degeneración vacuolar difusa. Zonas de necrosis de los hepatocitos, localmente extensivas.</p> <p>Pulmón: Presencia multifocal de agregados de células mononucleares en el intersticio alveolar y cerca de la pleura pulmonar. Hiperplasia del tejido linfoide peribronquial.</p> <p>Bazo: Hay un infiltrado difuso de célula histiocíticas grandes (> 15 micrómetros de diámetro) que reemplazan el parénquima esplénico, con una actividad mitótica marcada (3-5 mitosis por campo de 400X). Hay una severa depleción de los folículos linfoides.</p> <p>Intestino grueso: Moderado infiltrado de células mononucleares en lámina propia (linfocitos e histiocitos), con escasos heterófilos.</p>	<p>Miocarditis, neumonía, hepatitis y esplenitis histiocítica multifocal crónica moderada.</p> <p>Colitis linfo-plasmocitaria con heterófilos crónico activa leve.</p>
ASCI6 <i>Pitangus sulphuratus</i> Hembra	<p>Corazón: Presencia de microfilarias en el ventrículo izquierdo y derecho.</p> <p>Hígado: Presencia de nemátodos en el lumen de la arteria hepática. Presencia de un infiltrado inflamatorio focal compuesto por linfocitos, e histiocitos.</p> <p>Pulmón: Presencia de microfilarias en las venas pulmonares.</p> <p>Cloaca: En el músculo esquelético se observa focalmente una estructura parasitaria en el interior de una célula muscular estriada. El quiste es morfológicamente compatible con <i>Sarcocystis</i> spp. posee una pared delgada y contienen abundantes estructuras en forma de banana (bradizoitos). No hay reacción inflamatoria asociada con la presencia del quiste.</p>	<p>Microfilariasis sistémica.</p> <p><i>Sarcocystis</i> spp. en músculo esquelético.</p>

ID de la muestra Especia Sexo	Hallazgos histopatológicos	Diagnóstico morfológico
ASCK2 <i>Quiscalus mexicanus</i> Hembra	<p>Hígado: Presencia de agregados de células mononucleares (linfocitos, histiocitos y células plasmáticas) en el espacio paracentral (zona 3) y periportal (zona 1). Presencia de vacuolas con restos de material fibrilar eosinofílico en el interior (saponificación de la grasa).</p> <p>Pulmón: Presencia de macrófagos alrededor de los vasos sanguíneos. Los macrófagos presentan un pigmento granular negro en el citoplasma (antracosis). Multifocalmente hay escasos focos de agregados de células mononucleares, compuestos por linfocitos, macrófagos y células plasmáticas.</p> <p>Riñón: Presencia de múltiples agregados de células mononucleares (linfocitos, histiocitos y células plasmáticas) en el espacio intersticial.</p> <p>Duodeno: Hay necrosis apical de las vellosidades intestinales, las criptas se encuentran dilatadas con acúmulo de células epiteliales descamadas y necróticas en el interior y presencia intralesional de múltiples estructuras morfológicamente compatibles con protozoarios.</p>	<p>Focos de mineralización secundaria a necrosis de la grasa.</p> <p>Antracosis pulmonar.</p> <p>Nefritis intersticial mononuclear (linfo-histio-plasmocitaria) crónica moderada.</p> <p>Duodenitis necrotizante aguda severa con presencia de protozoarios.</p>
ID de la muestra	Hallazgos histopatológicos	Diagnóstico morfológico

Especia Sexo		
ASCM6 <i>Icterus pustulatus</i> Macho	<p>Corazón: Presencia multifocal de agregados de células inflamatorias en el miocardio y en el endocardio. La población inflamatoria se compone de linfocitos, células plasmáticas e histiocitos. Intralesionalmente en asociación con los infiltrados inflamatorios hay presencia de quistes parasitarios (protozoarios) de 50 micrómetros de diámetro, un halo translúcido y una delgada cápsula.</p> <p>Pulmón: Histopatológicamente en el parénquima pulmonar se observan múltiples quistes parasitarios en asociación con focos de inflamación mononuclear (linfocitos, células plasmáticas e histiocitos). Los quistes miden aproximadamente 50 micrómetros de diámetro y son encapsulados.</p> <p>Tráquea: Presencia de artrópodos en el lumen traqueal, con la cutícula café y refráctil, y bandas estriadas de músculos en la cavidad corporal. Presencia de fibrina, detrito celular en el lumen de la tráquea. Yeyuno: Presencia de múltiples protozoarios en la mucosa intestinal.</p>	<p>Miocarditis y neumonía linfo-histio-plasmocitaria asociada a la presencia intralesional de protozoarios.</p> <p>Traqueítis fibrino supurativa asociada a <i>Sternostoma tracheacolum</i>.</p> <p>Protozoarios en el intestino.</p>
ASCM8 <i>Icterus pustulatus</i> Macho	<p>Corazón: Presencia de múltiples focos inflamatorios compuestos por linfocitos, histiocitos y células plasmáticas en el miocardio y cerca del endocardio con presencia intralesional de protozoarios.</p> <p>Hígado: Presencia de múltiples vacuolas con depósitos de material eosinofílico fibrilar (lipogranulomas con saponificación de la grasa), y deposición de cristales en el citoplasma de las células de Kupffer. Leve degeneración vacuolar.</p> <p>Pulmón: Presencia focal de un agregado inflamatorio intersticial compuesto por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos con presencia intralesional de protozoarios.</p> <p>Duodeno: Presencia de protozoarios en la mucosa intestinal.</p>	<p>Miocarditis y endocarditis linfo-histio-plasmocitaria crónica moderada con presencia de protozoarios. Focos de mineralización hepática asociados a la necrosis de la grasa. Neumonía intersticial focal linfo-histio-plasmocitaria, con presencia de células gigantes y protozoarios. Protozoarios en la mucosa intestinal.</p>
ID de la muestra	Hallazgos histopatológicos	Diagnóstico morfológico

Especia Sexo		
ASCM9 <i>Campylorhynchus rufinucha</i> Hembra	Bazo: Presencia multifocal de macrófagos con pigmento de hemosiderina.	Hemosiderosis esplénica.
ATAA4 <i>Pitangus sulphuratus</i> Macho	<p>Hígado: Presencia de múltiples vacuolas con depósitos de material eosinofílico fibrilar (lipogranulomas con saponificación de la grasa), y deposición de cristales en el citoplasma de las células de Kupffer. Leve degeneración vacuolar.</p> <p>Pulmón: Focalmente hay agregados de células inflamatorias, macrófagos de tipo epitelioides con presencia intracitoplasmática de un pigmento granular negro en el interior (antracosis).</p>	<p>Focos de mineralización hepática secundarios a la necrosis de la grasa.</p> <p>Antracosis pulmonar.</p>
ATAA8 <i>Crotophaga sulcirostris</i> Macho	<p>Hígado: Multifocalmente en el espacio periportal y paracentral (zona 1 y 3) hay agregados inflamatorios compuestos por linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y células gigantes (6-17 núcleos) de tipo Langhans con presencia intralesional de filarias.</p> <p>Riñón: Presencia multifocal de agregados de células mononucleares (linfocitos-plasmocíticos) en el intersticio renal.</p> <p>Intestino delgado: Nemátodos en el intestino delgado.</p>	<p>Hepatitis granulomatosa y necrotizante con presencia intralesional de filarias.</p> <p>Nefritis intersticial mononuclear crónico leve.</p> <p>Nemátodos en lumen intestinal.</p>
ID de la muestra	Hallazgos histopatológicos	Diagnóstico morfológico

Especia Sexo		
ATAH5 <i>Myozetetes similis</i> Macho	Hígado: Leve degeneración vacuolar difusa. Duodeno: Presencia de céstodos en el lumen intestinal.	Degeneración vacuolar hepática. Céstodos en el duodeno.
ATAJ1 <i>Empidonax virescens</i> Macho	Hígado: Degeneración vacuolar macrovesicular moderada (lipídica). Duodeno: Presencia de céstodos en el lumen intestinal.	Leve lipidosis hepática. Céstodos en el duodeno.