











ARTÍCULO ORIGINAL

Detección de flavivirus en el murciélago casero (*Molossus milleri*) en un municipio de la Habana, Cuba

*Flavivirus detection in the domestic bat (*Molossus milleri*) in a municipality of Havana, Cuba*

Maritza Pupo Antúnez¹ , Greilis Morejón García¹ , Juan Carlos Guerra Pérez¹ , Camilo Hernández Bertot² , Héctor M. Díaz Perdomo³ , Luis A. Piedra⁴ , Brian Mondeja Rodríguez² , Carlos Mancina González³ 

RESUMEN

1 Laboratorio de Virología, Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana.

2 Centro de Estudios Avanzados.

3 Instituto de Ecología y Sistemática

4 Control de Vectores. Departamento de Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"

*Autor para correspondencia:
mpupo@fbio.uh.cu

En Cuba, está comprobada la circulación de varios flavivirus como el Dengue, la encefalitis de San Luis, el Nilo Occidental, Zika, entre otros. Los virus de la familia Flaviviridae son causantes de enfermedades en aves y mamíferos, incluidos el hombre. Los murciélagos podrían ser importantes reservorios de estos virus; varios flavivirus han sido aislados de murciélagos infectados, entre ellos, el virus de la encefalitis de San Luis y la encefalitis Japonesa. Además, en la isla habitan 26 especies de murciélagos, de las cuales 10 pueden utilizar, como refugios diurnos, estructuras arquitectónicas, por lo que sus colonias podrían estar en estrecho contacto con los humanos. Sin embargo, hasta la fecha se han realizado pocos estudios relacionados con la búsqueda de virus zoonóticos en estos mamíferos o en sus ectoparásitos. El objetivo de este estudio fue la búsqueda preliminar de flavivirus en quirópteros, en una zona periurbana de la provincia Habana. Se capturaron 50 murciélagos, 40 clasificados como *Artibeus jamaicensis* (familia Phyllostomidae) y 10 como *Molossus milleri* (familia Molossidae). Las muestras tomadas de cada individuo se estudiaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) y anidada (RT-nested PCR). Se determinó la presencia de flavivirus en uno de los individuos capturados perteneciente a la especie *Molossus milleri*. Este hallazgo, se reporta por primera vez en Cuba y es de gran importancia epidemiológica dado que este quiróptero es una especie sinantrópica y por tanto tiene un contacto directo con los humanos. La identificación de las especies de murciélagos reservorios podría ser un avance importante para lograr un programa eficaz en el control y reducción de riesgos de enfermedades arbovirales

Recibido: 2023-06-25

Aceptado: 2023-09-07

Palabras clave: zoonosis virales, reservorios, arbovirus, murciélagos, Cuba

ABSTRACT

In Cuba is verified the circulation of several flaviviruses such as Dengue, St. Louis encephalitis, West Nile, Zika, among others. Viruses of the Flaviviridae family are the cause of diseases in birds and mammals, including humans. Bats could be important reservoirs of these viruses; several flaviviruses have been isolated from infected bats, including St. Louis encephalitis virus and Japanese encephalitis. In addition, 26 species of bats inhabit the island, of which 10 can use architectural structures as daytime shelters, so their colonies could be in close contact with humans. However, until date, few studies have carried out related to the search for zoonotic viruses in these mammals or their ectoparasites. The objective of this study was the search for flaviviruses in bats in a peri-urban area of the Havana province. Fifty bats were captured, 40 classified as *Artibeus jamaicensis* (family Phyllostomidae) and 10 as *Molossus milleri* (family Molossidae). Samples taken from each individual were studied by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and nested (RT-nested PCR). The presence of flavivirus was determined in one of the captured individuals belonging to the species *Molossus milleri*. This finding reported for the first time in Cuba, is of great epidemiological importance since this bat is a synanthropic species, and therefore has direct contact with humans. The identification of the reservoir bat species could be an important advance to achieve an effective program in the control and risk reduction of arboviral diseases.

Keywords: viral zoonosis, reservoirs, arbovirus, bats, Cuba

INTRODUCCIÓN

El incremento de la emergencia de nuevos patógenos, surgidos de reservorios naturales y diseminados dentro de las poblaciones humanas, ha causado brotes, epidemias e incluso pandemias. Dentro de estos patógenos, los virus han sido los protagonistas fundamentales, en mayor grado los zoonóticos o los transmitidos por vectores (Choi, 2021).

Los arbovirus (del inglés *arthropod-borne viruses*) son virus transmitidos por artrópodos hematófagos como algunas especies de dípteros y garrapatas, a una amplia gama de hospederos mamíferos, que pueden actuar como potenciales reservorios y amplificadores (García-Romero *et al.*, 2023). La mayoría de los arbovirus causan enfermedades zoonóticas y pertenecen a las cuatro familias más importantes, *Togaviridae* (género *Alphavirus*), *Flaviviridae* (género *Flavivirus*), *Bunyaviridae* (géneros *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* y *Nairovirus*), y *Reoviridae* (géneros *Coltivirus* y *Orbivirus*) (Young, 2018; Pupo-Antúnez, 2020). Actualmente se registran 537 arbovirus de los cuales 130 son reconocidos como patógenos causantes de enfermedades en humanos (Ali *et al.*, 2023). Entre estos se encuentran los virus de la familia *Flaviviridae* que incluyen tres géneros: *Pestivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* y *Flavivirus* (Simmonds, *et al.*, 2017) y que son causantes de enfermedades en aves y mamíferos, incluidos el hombre (Pandit *et al.*, 2018).

Los flavivirus transmitidos por mosquitos de mayor importancia médica son la Fiebre Amarilla, Encefalitis Japonesa, el virus del Nilo Occidental, el Dengue, el virus de la encefalitis de San Luis y el virus Zika (Roehrig and Barrett., 2013; Latanova *et al.*, 2022). Dentro de los vertebrados hospederos, algunos grupos de mamíferos son considerados buenos hospederos reservorios y/o amplificadores principalmente los de los órdenes Rodentia y Chiroptera (García-Romero, *et al.*, 2023). Se reconocen más de 4100 virus, provenientes de 23 familias virales, detectados en más de 200 especies de quirópteros (Weinberg and Yovel, 2022) y se ha demostrado la transmisión de virus altamente patógenos de estos a humanos (Calisher *et al.*, 2006; Dakroub *et al.*, 2022). Los murciélagos son también importantes reservorios de flavivirus. Algunos de ellos han sido aislados de murciélagos infectados (Kading y Schountz, 2016), como son el virus de la encefalitis de San Luis y la encefalitis Japonesa (Barrantes *et al.*, 2022; Roehrig y Barrett, 2013; Latanova *et al.*, 2022).

La región del Caribe es considerada una “zona caliente” al estar exacerbados en ella factores que alteran la ecología y que favorecen la abundancia del vector (Mittermeier *et al.*, 2011); recibiendo también el apodo de “zona caliente de arbovirosis” (Ali *et al.*, 2023). Cuba se considera la isla más diversa del Caribe insular, con gran biodiversidad y calificada también como una de las más importantes del planeta

producto de la elevada concentración de especies y endemismos (Mancina y Cruz, 2017). En ella convergen los principales mosquitos vectores y la mayoría de estas arbovirosis (Marquetti *et al.*, 2021). Además, en Cuba habitan 26, de las más de las 60 especies de murciélagos que existen en el Caribe (Mancina y Cruz, 2017). Entre ellas, existen 10 especies que utilizan estructuras arquitectónicas como refugios diurnos, por lo que sus colonias están en estrecho contacto con los humanos. Todos estos factores hacen de Cuba un territorio atractivo para la determinación de virus zoonóticos en murciélagos reservorios, específicamente flavivirus. Sin embargo, hasta la fecha existen escasos estudios relacionados con la búsqueda de virus zoonóticos en estos mamíferos o en sus ectoparásitos (Fernández, 1981; Málková, *et al.*, 1985; López *et al.*, 2013). Conocer la presencia de virus zoonóticos, así como la identificación de sus potenciales reservorios es fundamental para entender la transmisión y circulación de estos virus. Con esta perspectiva se comenzó el muestreo de virus en murciélagos de diferentes zonas de La Habana. El objetivo de esta comunicación es dar a conocer la detección molecular de un flavivirus en una población del murciélago casero (*Molossus milleri*).

MATERIALES Y MÉTODOS

La búsqueda de flavivirus en quirópteros se realizó en áreas del Instituto de Ecología y Sistemática (IES) y el Jardín Zoológico Nacional (JZN), ambas localidades en el municipio de Boyeros, La Habana durante el año 2022. El muestreo se llevó a cabo durante tres noches consecutivas utilizando redes de mano. Después de la captura los ejemplares fueron identificados

empleando claves dicotómicas para caracteres externos (Mancina y Cruz, 2017).

A cada murciélago se le practicó un exudado orofaríngeo, teniendo en cuenta las medidas de asepsia y bioseguridad y para el buen manejo de animales (Téllez y Vanda, 2021). Las muestras colectadas e identificadas fueron colocadas en un frasco estéril con medio de transporte viral BTV (BioCen, Cuba). Para la extracción y purificación del ARN viral se utilizó el sistema de separación por perlas magnética de alto rendimiento CEA-NANO+ RNA 3.0 siguiendo las indicaciones del fabricante (CEA-NANO Rev.03-08/2021).

La detección de flavivirus se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) con oligonucleótidos específicos para la detección de 1325pb del gen NS5 de flavivirus y posteriormente el producto de esta reacción es utilizado en una segunda PCR (anidada) dirigida a un fragmento del de 143 pb del mismo gen según Sánchez-Seco *et al.* (2005). Se utilizó ARN de los cuatro serotipos del virus Dengue como control positivo y agua libre de nucleasas como control negativo y un marcador de peso molecular de 100 pb.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el monitoreo fueron capturados 50 murciélagos: 40 clasificados como *Artibeus jamaicensis* (familia *Phyllostomidae*) y 10 como *Molossus milleri* (familia *Molossidae*). El análisis de la RT-PCR anidada detectó una muestra positiva a flavivirus (Fig. 1) en una hembra de murciélago casero (*Molossus milleri*, familia *Molossidae*). Desde el punto de vista taxonómico las poblaciones cubanas de esta especie

Tabla 1. Cebadores utilizados para la detección de flavivirus .

Table 1. Primers used for flavivirus detection.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Concentración (µM)
Flavi 1 sentido	GAYYTIGGITGYGGIIGGIRGITGG	10
Flavi 1 anti-sentido	TCCAICCGICIRTRCRTCIGC	10
Flavi 2 sentido	YGRTIYAYAWCAYSATGGG	10
Flavi 2 anti-sentido	CCARTGITCYKRTTIAIRAAICC	10

eran tratadas como *M. molossus tropidorhynchus*; sin embargo, datos genéticos hallaron que las poblaciones de Islas Caimán, Jamaica y Cuba constituyen un linaje diferente al de *M. molossus*, el cual se distribuye en Puerto Rico e islas de las Antillas Menores (Loureiro et al., 2021). La relevancia de este hallazgo es la detección por primera vez en Cuba de una especie de murciélago como reservorio de un flavivirus. No obstante, en otras regiones de África y Latinoamérica se han aislado flavivirus de murciélagos infectados en al menos 20 especies; entre estas se destacan algunas que son comunes en Cuba como: *Tadarida brasiliensis* (familia Molossidae), *Eptesicus fuscus* (Vespertilionidae) y *Pteronotus parnellii* (Mormoopidae) (Kading y Schountz, 2016).

En Latinoamérica, se reporta el aislamiento o la presencia del genoma de los virus: dengue, en especies de murciélagos de la familia *Vespertilionidae* (*Artibeus jamaicensis* y *Eptesicus fuscus*) y *Molossidae* (*Molossus sinaloe* y *Molossus rufus*) provenientes de Jamaica y Costa Rica (Vicente-Santos, et al., 2017; Fabre y Kading, 2019). Mientras que los virus Rio Bravo y encefalitis de San Luis se han aislado en *Tadarida brasiliensis mexicana* y *Eptesicus fuscus* en México (Machain-Williams, et al., 2013). Evidencias serológicas informan también de la presencia de anticuerpos a estos y otros flavivirus como el virus del Nilo Occidental, fiebre amarilla, (Barrantes-Murillo, et al., 2022) Ilheus, encefalitis japonesa en estas especies de murciélagos y otras de estas familias (Fagre y Kading, 2019).

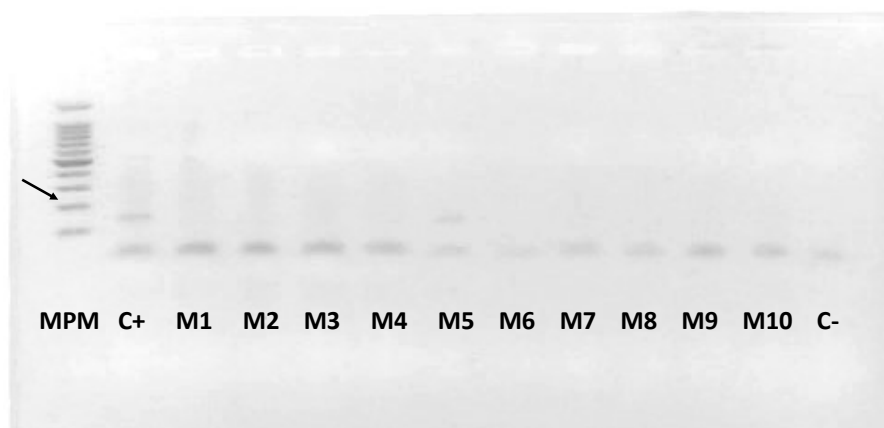


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos amplificados por RT-nested PCR para detección de flavivirus. MPM, marcador de peso molecular; C+, control positivo; C-, control negativo; M1-M4 y M6-M10, muestras negativas; M5, muestra positiva .

Figure 1. 2% agarose gel electrophoresis of the products amplified by RT-nested PCR for flavivirus detection. MWM, molecular weight marker; C+, positive control; C-, negative control; M1-M4 y M6-M10, negative samples; M5, positive sample.

En Cuba, hasta la fecha, la mayoría de los informes de murciélagos hospederos han estado asociados a la infección por virus rábicos (género *Lyssavirus*), entre las especies identificadas se encuentran *Nycticeius cubanus* (*Vespertilionidae*), *Artibeus jamaicensis* (*Phyllostomidae*), *Eumops ferox* = *Eumops glaucinus ferox* (*Molossidae*) y *Molossus milleri* = *M. molossus* de la familia *Molossidae* (Silva Taboada, 1979; Nadin-Davis et al., 2006; López-Santa Cruz et al., 2013). La prevalencia de infección por virus rábico en murciélagos no hematófagos en Cuba, al menos en el

periodo de 2012-2013, fue de un 8,77%, considerándose baja (López et al., 2013). Se ha reportado el aislamiento viral en ectoparásitos (garrapatas) de murciélagos (Málková et al., 1985).

Aunque en la actualidad no se ha determinado la identidad taxonómica de este flavivirus y su potencial efecto en humanos, el hallazgo de un individuo positivo de *Molossus milleri* tiene interés epidemiológico dado que es una especie sinantrópica. El murciélago casero es común en toda la isla de Cuba e Isla de la Juventud y como su nombre común refiere,

muestra preferencia por utilizar como refugio diurno, diversos tipos de estructuras antropogénicas (e.g. bajo tejas, falsos techos y grietas en edificios), donde el tamaño de las colonias puede variar entre unos pocos individuos hasta varios miles (Silva Taboada, 1979; García-Rivera y Mancina, 2011). Debido a sus hábitos, esta especie es una de las que mayor frecuencia entra en contacto directo con los humanos. Este hallazgo sugiere la necesidad de continuar e incrementar los muestreos de virus en murciélagos en Cuba. La identificación de las especies de murciélagos reservorios podría ser un paso crítico para lograr un exitoso programa para el control y la reducción de riesgos de enfermedades arbovirales. Desde el punto de vista metodológico, esta es la primera vez que se utiliza en estudios de campo el estuche comercial CEA-NANO+ RNA 3.0 en la purificación del ARN. Similar a lo obtenido para el diagnóstico del SARS-CoV 2 durante la epidemia de Covid-19, su aplicación en la toma de muestras de murciélagos fue positivo; este sistema es un producto nacional económicamente factible, rápido y eficiente.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por los Fondos de Solidaridad por Proyectos Innovadores (FSPI) Vectocaribe del Ministerio de Asuntos Exteriores Francés, con el objetivo de desarrollar capacidades de vigilancia y gestión integrada de enfermedades emergentes bajo el enfoque de Una Salud.

LITERATURA CITADA

- Choi, Y. K. (2021). Emerging and re-emerging fatal viral diseases. *Exp Mol Med* 53:711–712 <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00608-9>
- García-Romero, C., Carrillo Bilbao, G. A., Navarro, J. C., et al. (2023). Arboviruses in Mammals in the Neotropics: A Systematic Review to Strengthen Epidemiological Monitoring Strategies and Conservation Medicine. *Viruses*, 15:417. <https://doi.org/10.3390/v15020417>
- Young PR. (2018). Arboviruses: A Family on the Move. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1062:1-10. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1_1
- Pupo-Antúnez M. (2020). La Ecología Viral y su importancia en las enfermedades virales Emergentes y Re-emergentes. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 8(1): 1–13. <http://www.rccb.uh.cu>
- Simmonds, P. B., Bukh, J., Gould, E. A. (2017). ICTV VIRUS TAXONOMY PROFILES. *Journal of General Virology*, 98:2–3. DOI 10.1099/jgv.0.000672
- Pandit, P. S., Doyle, M. M., Smart, K. M., Young C. C. M., et al., (2018). Predicting wildlife reservoirs and global vulnerability to zoonotic Flaviviruses. *Nature Communications*, 9:5425 <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07896-2>
- Roehrig, J. T., y Barrett, A. D. T. (2013) Flavivirus Infections in Humans. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.1-19.DOI: 10.1002/9780470015902.a0002233.pub3
- Latanova, A., Starodubova, E., Karpov, V. (2022). Flaviviridae Nonstructural Proteins: The Role in Molecular Mechanisms of Triggering Inflammation. *Viruses*, 14, 1808. <https://doi.org/10.3390/v14081808>.
- Weinberg, M. and Yovel, Y. (2022). Revising the paradigm: Are bats really pathogen reservoirs or do they possess an efficient immune system?. *iScience*, 25(8):104782 <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104782>
- Calisher C. H., Childs J.E., Field H. E., et al. (2006). Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. *Clinical Microbiology Review*, 19(3):531–545 doi:10.1128/CMR.00017-06
- Dakroub, H., Russo, D., Cistrone, L. et al. (2022). First Assessment of SARS-CoV-2 Circulation in Bats of Central-Southern Italy. *Pathogens*, 11: 742. <https://doi.org/10.3390/pathogens11070742>
- Kading, R. C. y Schountz, T. (2016): Flavivirus Infections of Bats: Potential Role in Zika Virus Ecology. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95:993-996.
- Vicente-Santos, A., Moreira-Soto, A., Soto-Garita, C., Chaverri, L. G., Chaves, A. et al. (2017) Neotropical bats that co-habit with humans function as dead-end hosts for dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis* 11(5): e0005537. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005537>).
- Fagre, A. C. y Kading, R. C. (2019): Can Bats Serve as Reservoirs for Arboviruses? *Viruses*. 11:215. doi:10.3390/v11030215
- (Machain-Williams C., López-Urbe, M., Talavera-Aguilar, L., Carrillo-Navarrete, J., Vera-Escalante, L., Puerto-Manzano, F., et al. Serologic Evidence of Flavivirus Infection in Bats in the Yucatan Peninsula of Mexico. *J Wildl Dis*. 2013 July; 49(3):doi:10.7589/2012-12-318
- Barrantes Murillo, D.F., Piche-Ovares, M., Gamboa-Solano, J. C., Romero, L. M. et al. (2022). Serological Positivity against Selected Flaviviruses and Alphaviruses in Free-Ranging Bats and Birds from Costa Rica Evidence Exposure to Arboviruses Seldom Reported Locally in Humans. *Viruses*, 14:93. <https://doi.org/10.3390/v14010093>
- Silva Taboada, G. (1979). Los Murciélagos de Cuba. Editorial Academia, La Habana, 423 pp.
- Nadin-Davis, S. A., Torres, G., Ribas M. A., Guzmán, M. G., et al., (2006). A molecular epidemiological study of rabies in Cuba. *Epidemiol. Infect.*, 134:1313–1324. doi:10.1017/S0950268806006297
- López Santa Cruz, D.I., González Arrebato, J., Morales Leslie, M. (2013). Diagnóstico del virus rábico en quirópteros. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 65:119-24
- Málková, D., Holubová, J.; Cerný, V.; Daniel, M.; Fernández, A. et al. (1985). Estero real virus: A new virus isolated from argasid ticks *Ornithodoros tadaridae* in Cuba. *Acta Virol.*, 29:247–250.
- García-Rivera, L. y Mancina, C. A. (2011). Murciélagos insectívoros. *Mamíferos en Cuba* (Eds. R. Borroto y C. A., Mancina), pp. 149-165. UPC Print. Vasa, Finlandia.