



Instituto Politécnico Nacional
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

**“Monitoreo del virus de la rabia en
animales de vida silvestre de la República
Mexicana”**

T E S I S

**QUE COMO UNO DE LOS RESQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A :

JIMÉNEZ SÁNCHEZ NAYELLY GABRIELA

DIRECTORES DE TESIS:

Dra. LORENA RODRÍGUEZ P. Dr. LEOPOLDO AGUILAR F.



“LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA”

MÉXICO, D.F. ENERO 2009.

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE MEDICINA DE CONSERVACIÓN DE LA ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA Y EN EL LABORATORIO DE ENZIMOLOGÍA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, AMBAS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, CON EL APOYO DEL PROYECTO SIP “20070788” Y “20082590” DENTRO DEL PROYECTO DE MONITOREO Y CONTROL DEL VIRUS DE LA RABIA EN ANIMALES DE VIDA SILVESTRE A CARGO DE LA SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN (SAGARPA) Y EL SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA Y CON LA COLABORACIÓN DE UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE-ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE (USDA-APHIS) Y EL CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL-IPN (CIIDIR-IPN), UNIDAD SINALOA. BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. LORENA I. RODRÍGUEZ PÁEZ Y EL DR. JOSÉ LEOPOLDO AGUILAR FAISAL

TABLA DE CONTENIDO

	Página
I. Introducción	1
Historia de la rabia	1
Definición de la enfermedad	3
Diseminación del virus a través del organismo	3
Signos y síntomas	4
Mecanismos de transmisión	5
Ciclos epidemiológicos	6
Epidemiología	9
Características del agente causal	13
Biología molecular del virus	16
Ciclo de la infección y replicación	18
Diagnóstico	20
Estrategias de control	22
Estrategias de control en vida silvestre	24
Justificación	26
Objetivos	27
General	
Particulares	
II. Materiales y Métodos	28
III. Resultados	37
IV. Discusión y Conclusiones	50
V. Bibliografía	58

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema de la estructura del virus de la rabia.	16
Figura 2. Esquema del genoma del virus de la rabia.	17
Figura 3. Esquema del Ciclo de infección y replicación del virus de la rabia	19
Figura 4. Captura de los murciélagos en las zonas de monitoreo.	29
Figura 5. Muestras testigos de Inmunofluorescencia directa.	39
Figura 6. Inmunofluorescencia positiva y presencia de inmunofluorescencia inespecífica en muestras de cerebros de murciélagos no hematófagos	40
Figura 7. Inmunofluorescencia positiva en muestras de cerebros de murciélagos no hematófagos (<i>Artibeus sp</i> y <i>Natalus sp</i>)	41
Figura 8. Inmunofluorescencia positiva en muestras de cerebros de murciélagos hematófagos (<i>Desmodus rotundus</i>)	42
Figura 9. Inmunofluorescencia positiva en muestra de cerebro de murciélago no hematófago (<i>Pteronotus davyi</i>)	42
Figura 10. Células BHK21 infectadas con el virus de la rabia	45
Figura 11. Células BHK21 infectadas con IFD positiva a rabia	46
Figura 12. Fotografía de un gel de agarosa para la detección de un fragmento de 760pb del gen N del virus de la rabia	47
Figura 13. Fotografía de un gel de agarosa al 1.8% para la detección de un fragmento de 727pb del exodominio del gen G del virus de la rabia	48
Figura 14. Fotografía de un gel de agarosa al 1.8% para la detección de un fragmento de 285pb del exodominio del gen G del virus de la rabia	48
Figura 15. Prueba de RT-PCR para el gen N para la muestra del ejemplar <i>Pteronotus davyi</i>	49
Figura 16. Prueba de RT-PCR para el gen N y G para la muestra del ejemplar <i>Pteronotus davyi</i>	49

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de los <i>Lyssavirus</i>	15
Tabla 2. Condiciones de RT-PCR para la detección de un fragmento de 760pb del gen N del virus de la rabia	32
Tabla 3. Combinación de iniciadores para amplificar la región del exodominio de la proteína G	35
Tabla 4. Condiciones de RT-PCR para la detección de un fragmento de 727pb correspondiente a la región del exodominio de la proteína G	35
Tabla 5. Combinación de iniciadores para amplificar una región interna del exodominio de la proteína G	35
Tabla 6. Condiciones de RT-PCR para amplificar un fragmento de 285pb correspondiente a una región interna del exodominio de la proteína G	36
Tabla 7. Sitios de monitoreo de murciélagos hematófagos y no hematófagos en la región de la Huasteca Potosina, México. En octubre del 2005	37
Tabla 8. Sitios de monitoreo de murciélagos no hematófagos en el estado de Sinaloa, México. En enero de 2007	38
Tabla 9. Municipios con murciélagos positivos a IFD	43
Tabla 10. Especies de murciélagos positivos a IFD	53

RESUMEN

La rabia es una encefalomiелitis viral aguda fatal en los mamíferos, causada por un virus neurótrofo, transmitida a menudo a través de la mordedura de un animal rabioso. Se distinguen dos ciclos de rabia, el urbano y de vida silvestre (terrestre y aéreo).

En Latinoamérica los casos de rabia relacionados con murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) han sido documentados desde 1930. Sin embargo, se conoce poco acerca de la relación epidemiológica de la rabia en murciélagos hematófagos y otras especies de murciélagos.

En este trabajo se documenta el análisis del monitoreo de murciélagos en 8 municipios de la región de la Huasteca Potosina y 1 municipio del estado de Sinaloa, en donde se obtuvieron un total de 255 muestras de cerebro de murciélagos. De las cuales 222 fueron del Estado de San Luis Potosí, 113 hematófagos y 109 no hematófagos. Del municipio en Sinaloa fueron 33 muestras de murciélagos no hematófagos.

Los resultados por inmunofluorescencia demostraron que el 4% de las muestras fueron positivas a rabia, 1.8% murciélagos hematófagos (dos) y 5.7% no hematófagos (ocho) y una prevalencia de 0.028 y 0.057 respectivamente, es decir, los murciélagos no hematófagos presentaron una prevalencia tres veces mayor que los hematófagos.

Las 10 muestras positivas pertenecen a 6 especies de las 12 capturadas. De las cuales 2 corresponden a murciélagos hematófagos de la especie *Desmodus rotundus*, 2 a murciélagos insectívoros (*Natalus sp* y *Pteronotus davyi*), 2 a frugívoros (*Artibeus sp* y *Enchisthenes sp*) y 1 a polinívoro (*Leptonycteris*).

La especie Leptonycteris davyi es la primera vez que se reporta como positivo a virus de rabia en México

Se realizó la prueba de IFD en cultivo de células. Se estandarizó la prueba de RT-PCR para la detección de un fragmento de 760pb del gen N del virus de la rabia. Se diseñaron iniciadores para la detección de un fragmento de 727pb y otro para un fragmento de 285pb (para la realización de un PCR anidado) del exodominio de la proteína G. En la muestra de la especie *Leptonycteris davyi* se detectó el gen N y el gen G.

ABSTRACT

Rabies, a viral neurological disease normally transmitted via the bite of a rabid animal. Two cycles of rabies are distinguished, the urban and of wildlife (terrestrial and air). In Latin America, rabies cases related to vampire bats (*Desmodus rotundus*) have been reported since 1930. However, little is known about epidemiological relationships of rabies between vampire bat and another species of them.

In this study, we reported the analysis of bats monitoring in 8 regions of the Huasteca Potosina and 1 region of Sinaloa state, where we obtained 255 bats brain samples, 222 San Luis Potosi region samples, 113 vampire bats and 109 non-haematophagous bats. 33 non-haematophagous samples bats to Sinaloa region.

The immunofluorescence analysis showed 4% rabies positive samples, 1.8% (two) vampire bats and 5.7% (eigth) non-haematophagous bats and a prevalence of 0.028 and 0.057 respectively, which the vampire bats was highly prevalence, three greater times; 2 vampire bats (*Desmodus rotundus*), 2 insectivorous bats (*Natalus sp y Pteronotus davyi*), 2 frugivorous bats (*Artibeus sp y Enchistenes sp*) and a polinivorous bat (*Leptonycteris*). In this reported, the first rabies virus were isolated from *Leptonycteris davyi* in Mexico.

Direct Fluorescent antibody test (DFA) in a cell culture was standardized. A reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was **standardized** to amplify a portion of the N and G gen of rabies virus in bats, as well as, nested-PCR to amplify a portion of 285bp to cytoplasmatic domain of the G gen.

Cerro Cabezón locality in Guasave municipality, we identified a polinivorous bat (*Leptonycteris davyi*) positive to DFA and RT-PCR of the N gen.

I. INTRODUCCION

A) HISTORIA DE LA RABIA

La rabia es considerada una enfermedad de las más antiguas, quizás tan vieja como humanidad misma. Tres mil años antes de Jesucristo se encuentra ya el origen de la palabra "rabia" en la lengua sánscrita, donde "*Rabhas*" significa agredir. La primera descripción se remonta al siglo XXIII antes de Jesucristo, y desde la antigüedad existía ya una relación entre la rabia en humanos y la rabia transmitida por las mordeduras de los animales, con especial atención a la transmitida por perros.

Demócrito, filósofo griego, describió a la rabia como una enfermedad terrible que se presentaba en perros y otros animales domésticos. Hacia el año 550 A.C., Aristóteles habla en sus escritos de la rabia y de la forma de como se transmite (por la mordedura de animales rabiosos).

La primera descripción de la enfermedad se remonta al siglo XXIII antes de Jesucristo, en el Código Eshuma en Babilonia. Desde la antigüedad ya se había establecido la relación entre la rabia humana y la rabia debida a mordeduras de los animales (especialmente perros). En las civilizaciones como la egipcia, que se desarrollaron en las márgenes del Río Nilo, la rabia, "castigo de los dioses", ocasionó innumerables muertes. También en Asia Oriental y en las poblaciones que se asentaron en las orillas del Río Indo; en Italia la rabia se presentó frecuentemente, lo que declinaba a la población de muchas aldeas.

La lucha contra esta enfermedad presenta muchos siglos de antigüedad, a lo largo de los cuales han sido numerosos los métodos empleados para combatirla (Steele y Fernández, 1991).

En el continente americano, el problema comenzó cuando los conquistadores españoles e ingleses pisaron las costas del nuevo mundo, pues ellos trajeron animales infectados, particularmente perros.

Sin embargo, datos históricos señalan que la rabia en América ya existía y que los vampiros, cuya presencia se detectó en zonas del nuevo continente, eran la causa de transmisión del mal a los humanos, según relatos de las crónicas de los conquistadores, en 1514 y 1527, principalmente en tierras mexicanas.

Es conocido que el 7 de julio de 1885, se presentó a las puertas del laboratorio de Luis Pasteur el pequeño de nueve años Joseph Meister, que un día anterior había sido mordido en manos, piernas y muslos por un perro rabioso. Desde 1880 era público y notorio que Pasteur estaba en la búsqueda de una vacuna antirrábica, pero hasta entonces todos los experimentos se habían realizado en animales. La naturaleza de las heridas y la convicción de que el pequeño Meister acabaría contrayendo la rabia precipitaron la experimentación de la vacuna en humanos. Durante nueve días se inocularon cantidades crecientes de virus. Pasteur se enfrentó a diferentes problemas. En las investigaciones realizadas por Pasteur con el virus de la rabia, mediante pases seriados de éste a cerebros de animales, se conoció el período de incubación del mismo, perdiendo la capacidad de fijación al aplicarle subcutáneamente dicho virus vacunal, lo que en la actualidad ha seguido siendo la cepa madre de todas las vacunas antirrábicas.

En 1903, Aldeshchi Negri describió cuerpos de inclusión con características de tinción específicas en el citoplasma de las neuronas de perros, gatos y conejos infectados experimentalmente con el virus de la rabia. Los hallazgos de Negri fueron la base para el desarrollo de la técnica de diagnóstico para este virus.

B) DEFINICIÓN DE LA ENFERMEDAD

El término “rabia” deriva del latín “*rabies*”, que significa furia y prácticamente en todas las lenguas antiguas, como el hebreo pero algunos autores refieren que la palabra rabia tiene su origen del término griego “*lyssa*” que viene de la raíz “*lud*” que significa “violento”, también existen términos equivalentes que describen el comportamiento agresivo en animales y personas. Se trata de una enfermedad infecciosa, transmisible, de curso agudo y mortal, único por su capacidad para afectar a todos los mamíferos y con una letalidad de 100%.

C) DISEMINACIÓN DEL VIRUS TRAVÉS DEL ORGANISMO

La enfermedad se inicia a partir del momento en el que el vector del virus rábico inocula por mordida al hospedero susceptible y los mecanismos de defensa inespecíficos no son capaces de neutralizar y anular al virus, continuando de esta manera su evolución hasta producir la muerte. Una vez infectado el tejido subyacente el primer paso es la introducción del virus a través de la piel o mucosas, el virus rábico sufre una primera replicación en el sitio de la herida (periodo de eclipse, en la cual el virus no es fácilmente detectable) en específico en músculo estriado durante las primeras horas y después de semanas o meses avanza por los nervios periféricos (que inerva los músculos), la infección se da a nivel de la unión del nervio con el músculo o el nervio con el tendón y de ahí se disemina al Sistema Nervioso Central (SNC) (Steele et al. 1991). Al llegar al SNC, después de que los signos clínicos se desarrollan y las neuronas están infectadas, el virus se dispersa a través de los nervios periféricos a los demás órganos. La mayor concentración viral se localiza principalmente en el tejido nervioso, glándulas salivales, líquido cefalorraquídeo, pero también el virus se puede detectar en órganos como riñón, pulmón, hígado, músculo esquelético, corazón, lengua, etc. (Fenner et al., 1987).

D) SIGNOS Y SÍNTOMAS

Los signos y síntomas más frecuentes durante el desarrollo en el proceso de la rabia son:

- Fase prodrómica (inicio de la sintomatología) suele durar de uno a cuatro días presentando fiebre, cefalea, malestar, mialgias o dolor muscular, cansancio creciente, anorexia o falta de apetito, náuseas, vómitos, dolor faríngeo, tos, parestesias o calambres es el síntoma más indicativo de rabia, fasciculaciones o contracciones de grupos musculares.
- Fase encefalítica se presenta actividad motora excesiva, excitación, agitación, confusión, alucinaciones, agresividad, delirio, espasmos musculares, meningismo, convulsiones, parálisis focales. A medida que empeora el cuadro, los periodos de lucidez disminuyen. Es muy frecuente los calambres exagerados, gran sensibilidad a la luz y ruidos, e incluso a las corrientes de aire, así mismo en la exploración física podemos hallar fiebre (superior a 40° C), pupilas irregulares y dilatadas, lagrimeo y salivación excesiva (CDC,2000)
- La muerte se presenta entre el segundo y cuarto día después de que el virus afectó la región del cuello y la cabeza y la parálisis se generaliza en todo el cuerpo. Si la muerte no se puede presentar en algún ataque convulsivo, se presente la etapa paralítica, durante esta etapa progresa la incoordinación muscular y la parálisis generalizada aunque particularmente ocurre en los músculos intercostales, por lo que se da el coma y el deceso.

E) MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

El mecanismo de transmisión “universalmente aceptado” y con mucho el más frecuente es la inoculación del virus rábico a través de la mordedura de un animal infectado. En perros la excreción del virus en la saliva ocurre frecuentemente desde varios días antes del comienzo de la enfermedad clínica, pero como los signos prodrómicos son tan difíciles de apreciar, pueden pasar desapercibidos algunos días entre el aislamiento del virus en las muestras y la aparición de los signos clásicos francos de la enfermedad.

Se ha aislado virus de muestras de saliva desde cinco días antes de la aparición de signos clínicos en las mofetas, tres días en los perros y un día en gatos (Baer, 1991).

Para que se dé una transmisión efectiva del virus rábico se debe presentar el contacto directo entre el virus intacto y el huésped susceptible, además de que el virus debe alcanzar las terminales nerviosas del huésped y penetrar el axón. Por lo tanto el virus debe penetrar la piel y ponerse en contacto con el tejido subcutáneo o terminaciones nerviosas o bien ser depositado en membranas mucosas permeables, las cuales están altamente inervadas. Un contacto eficiente para que ocurra la transmisión se da solamente cuando el huésped es mordido por el animal rabioso, un animal en periodo de incubación, o depositado en una mucosa o en piel con abrasiones, (Mattos *et al.*, 2001). Una herida por mordedura puede ser de riesgo aún cuando el animal agresor no esté manifestando síntomas de rabia en el momento de la mordedura. Su saliva puede contener el virus varios días antes del inicio de los síntomas apreciable. El periodo máximo observado entre la aparición del virus en saliva y el inicio de los síntomas de la rabia es de 14 días en perros. Esta es la razón por la cual el animal, se debe de dejar 10 días de observación antes de sacrificarlo.

La transmisión de la enfermedad entre humanos es excepcional, sin embargo se han observado varios casos posteriores a injertos o trasplantes de córnea procedentes de individuos infectados (CDC, año2004).

La transmisión por inhalación se considera como inusual y en la práctica se acepta que puede ocurrir en los laboratorios o en cuevas habitadas por

murciélagos. Así también se tiene considerada la transmisión por contacto con cadáveres de animales rabiosos en el momento de realizar necropsias sin los cuidados necesarios (King, 1998).

F) CICLOS EPIDEMIOLÓGICOS

1. Ciclo Urbano

En el ciclo urbano el perro es el principal huésped. Este ciclo es común en regiones pobres como África, Asia y Latinoamérica en donde existe la problemática de poblaciones de perro de la calle que no están vacunados (Meltzer y Rupprecht, 1998).

2. Ciclo Silvestre

El ciclo silvestre se dice que se presenta predominantemente en Europa y América del norte, aunque también se dan casos simultáneos con el ciclo urbano en muchas partes del mundo. La epidemiología de este ciclo es compleja ya que existen factores que incluyen las diferentes variantes del virus, especies tanto transmisoras como huéspedes, ecología y factores ambientales. En un ecosistema, solo una u ocasionalmente tres especies silvestres son responsables de perpetuar la rabia (Arellano-Sota, 1998). El patrón de la enfermedad en la fauna silvestre es relativamente estable u ocurre casi sin movimiento endémico. Algunos ejemplos epidémicos incluyen el caso de los zorros en el cual se ha observado un ligero movimiento hacia el oeste de Europa, o también el caso de los mapaches que se mueven al norte por la costa este de E.U. (CDC 2006).

3. Ciclo Silvestre: Rabia transmitida por murciélagos

El aislamiento del virus de la rabia en murciélagos se ha dado en diversos países del mundo. En Latinoamérica se han identificado unas 300 especies de quirópteros de un total de aproximado de 1000 especies reconocidas en el mundo. Estas 300 especies pertenecen a 17 familias del suborden microquiróptera (Taddei, 2001). Dadas las características ecológicas y sociales de las áreas tropicales y subtropicales de Latinoamérica, la rabia transmitida por murciélagos hematófagos (vampiros) adquiere una particular gravedad para la salud pública.

En México y en el resto de Latinoamérica el principal murciélago hematófago es el *Desmodus rotundus*, éste transmite la rabia paralítica bovina (Jiménez, 2003).. Otra especie hematófago presentes en nuestro país es *Diphylla ecaudata* que no había sido considerado importante en el mantenimiento del ciclo silvestre del virus de la rabia (Brass, 1994).

En ecosistemas de alta densidad ganadera los vampiros se alimentan exclusivamente de ganado y atacan a las personas sólo esporádicamente. Por el contrario en los sistemas de baja densidad ganadera las poblaciones de vampiros son más pequeñas, se alimentan de varias especies animales y atacan a los humanos más frecuentemente (Delpietro y Russo, 2001). Smith y Baer propusieron que el paso de la enfermedad puede darse de los murciélagos a algunos de los mamíferos terrestres más frecuentemente de lo que se pensaba, aunque esto no significa que el virus de murciélago cause el ciclo de la enfermedad en animales terrestres (Gardner y King, 1991).

En general, se ha encontrado que la frecuencia de agresiones de los vampiros al hombre se ve influenciada por ciertas intervenciones, las más comunes son el retiro de animales de una zona densamente poblada; el inicio de las actividades de desmonte y la exploración de minas (Schneider *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 2001).

Los casos de brotes de rabia en humanos transmitida por vampiros ha presentado una tendencia cíclica y recurrente destacándose un incremento inusual en 2004 en que se presentaron brotes en Brasil, Colombia, Perú y Venezuela sin aparente asociación causal entre si (OPS, 2004).

Además, la rabia transmitida por murciélagos no hematófagos es un problema que afecta también a poblaciones urbanas y de áreas desarrolladas económicamente. El primer caso notificado en USA fue en el Estado de Florida, en 1953, en donde un murciélago insectívoro de la especie *Lasiurus intermedius* fue el transmisor, en este país la rabia en murciélagos insectívoros

representa el 15% de los casos. En 1991 se identificó en México el virus de la rabia en un murciélago no hematófago del género *Artibeus* sp. (Baer, 1991).

Así se ha encontrado mediante inmunofluorescencia el virus rábico en diversas especies de murciélagos, tales como *Mineopterus schreibersi*, *Taphozous melanopogon*, *Philetor brachypterus*, *Scotophilus kuhli*, *Pteropus hypomelanus*, y *Rousettus amplexicaudatus* (Arai et al., 2003).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) en Latinoamérica informó 18 casos de rabia en humanos durante el 2006, de los cuales uno de ellos se debió a la transmisión por un murciélago hematófago, mientras que hubo 1114 casos reportados de rabia canina (Thiravat et al. 2003)

Es importante resaltar que en la página web de la OPS no se incluye un reporte de casos de rabia en animales de vida silvestre. Lo cual confirma el hecho de que no existe un programa de vigilancia epidemiológica en estos animales aunque funcionan como reservorios del virus de la rabia y que en algún momento pudiera transmitir la rabia a animales domésticos o al humano, como fue el caso en Brasil, en donde se documentó un caso humano de rabia transmitida por un murciélago hematófago.

El riesgo se debe a la transmisión directa del murciélago al hombre o del murciélago a otras especies domésticas que pueden actuar como transmisores incidentales. Dicho riesgo no obedece a patrones epidemiológicos definidos y, en varios casos registrados, la agresión ha pasado desapercibida por el paciente, llegándose al diagnóstico pos-mortem de rabia producida por murciélago. En estos casos, la atención médica no es posible lo que implica una dificultad particular adicional destacándose la importancia de la vigilancia (Hanlon y Rupprecht, 1998).

Hay evidencias que sugieren que todas las variantes del virus de la rabia que afectan a carnívoros terrestres se originaron de la transmisión cruzada entre especies de las variantes asociadas a murciélagos (Badrane, 2001). Un modelo molecular cronológico basado en la divergencia genética de las variantes del virus de la rabia en los murciélagos de diversas especies, sugiere que en Norteamérica los virus asociados a murciélagos están relacionados a un ancestro común que se remonta a 1651 a 1660 D.C. Las variantes del virus de la rabia en murciélagos encontradas en Latinoamérica, en las especies *Desmodus rotundus* y del género *Tadarida*, está muy cercanas a un ancestro común. La adaptación de las variantes del virus de la rabia ocurrió más rápidamente en murciélagos de los géneros que forman colonias por ejemplo los géneros *Eptesicus* y *Myotis*) que en los géneros más “solitarios” del (género *Lasiurus*, *Pipistrellus*, y *Lasiurus*) (Hughes, 2005).

Análisis filogenéticos sugieren que la rabia en *Desmodus rotundus* y en *Tadarida brasiliensis* de Sudamérica parecen tener un ancestro común el cuál dio lugar al virus que ahora está circulando en los murciélagos hematófagos a través de Latinoamérica y en la especie *Tadarida brasiliensis* en Sudamérica (Velasco-Villa, 2006).

G) EPIDEMIOLOGÍA

La rabia es una zoonosis de distribución mundial, con excepción de la mayor parte de Oceanía, en la que el ser humano es afectado en forma accidental y que ha llegado a ser un problema serio de salud pública en algunos países. Las infecciones y muertes humanas han sido consecuencias desafortunadas del proceso biológico del virus y del papel que juega el ser humano. En el hombre es mortal a corto plazo pues solamente sobreviven quienes reciben profilaxis antirrábica adecuada y desde una perspectiva de salud pública se estima que entre 45,000 y 60,000 personas mueren de rabia cada año en el mundo (Schneider et al, 2005).

Desde el punto de vista epidemiológico hay dos formas de presentación de rabia: la urbana que se propaga sobre todo entre los perros, y la silvestre que se asienta en diferentes especies vectoras de la enfermedad dependiendo de la zona geográfica involucrada. De esta manera, por ejemplo, encontramos a los zorros rojos como únicos vectores en Europa Occidental; a los zorros plateados, zorrillos, mapaches y coyotes en América del Norte; las mangostas en algunas islas del Caribe; los chacales en África del Norte, etc. (Ramírez, 1987).

En los países industrializados la rabia de tipo urbano transmitida al humano por perros está prácticamente eliminada, predominando la rabia de tipo silvestre (Vargas, 1996). Por otro lado, en las regiones tropicales de Latinoamérica el vector silvestre es el murciélago hematófago que plantea problemas importantes. Los vampiros mueren a consecuencia de la rabia aunque la pueden transmitir por períodos largos de tiempo sin que se observen manifestaciones clínicas (Ramírez, 1987). Estos quirópteros se alimentan exclusivamente de sangre y principalmente se encuentran en las regiones tropicales donde hay cría de ganado vacuno, en quienes encuentran su alimento con facilidad, causando graves pérdidas económicas (Flores, 1990).

En México las poblaciones de este murciélago se presentan a lo largo de la Costa Occidental desde Sonora hasta Chiapas y en la Oriental desde el Sur de Tamaulipas hasta Quintana Roo (Martínez-Burnes *et al.*, 1997).

La rabia canina es importante aún en muchos países en vías de desarrollo del mundo, donde los perros infectados representan la mayoría de los casos humanos que ocurren cada año (Fenner *et al.*, 1987). La diseminación natural de la rabia canina depende en gran medida de la tradición en la relación hombre-perro. Se sabe que el perro se convierte fácilmente en vagabundo debido a factores socioeconómicos y a la irresponsabilidad de sus dueños. Los perros callejeros juegan un papel muy importante en la propagación de la enfermedad ya que encuentran condiciones ideales en las áreas urbanas, principalmente las marginales, debido a que su estructura y densidad se ve

favorecida por el correlativo incremento de los asentamientos humanos (Wandeler, *et al* 1988; World Health Organization, 1984).

La mayoría de los casos de rabia humana en los Estados Unidos son causados por variantes del virus asociados a murciélagos, en promedio de 1 ó 2 casos por año en las últimas 2 décadas indica la rareza de estos acontecimientos (Messenger, 2003). En los Estados Unidos, la mayoría de las víctimas de la rabia no recuerdan haber sido mordidos por un murciélago, lo que puede ser debido al tamaño pequeño del animal o a las circunstancias inusuales que conducen a la mordedura (Rupprecht, 2004).

Como sucede en otros países en varias regiones de la República Mexicana es difícil saber si un bovino o un ser humano ha sido contagiado por un perro o por un murciélago hematófago, pues estas regiones son compartidas por perros y vampiros con rabia y en ocasiones, también por otros vectores como los mapaches, zorrillos y coyotes. Las estrategias del control de la enfermedad en esas regiones dependerán del vector involucrado (Clark y Fritzell, 2001).

En diversos países se ha logrado controlar el ciclo urbano de la rabia, pero el número de casos de rabia transmitidos por fauna silvestre se está incrementando. En México se tienen evidencias de la presencia de ambos ciclos a través del diagnóstico por laboratorio en algunas de estas especies (OIE, 2004).

En México en el año de 1709, se registró la primera epizootia de rabia en los perros callejeros de la Ciudad de México y otras ciudades vecinas como Puebla, en esta epizootia también se vieron afectados el ganado y los humanos. El perro callejero representaba ya un problema de Salud Pública. A partir de estas fechas el número excesivo de perros aumentó el riesgo potencial de transmisión de la rabia (Baer, 1975).

Desde entonces todos los programas de control de esta zoonosis han sido enfocados principalmente a los perros, seguido por los gatos. Por otra parte, la rabia transmitida al humano por murciélagos y otros animales silvestres, representó también un problema de salud pública en el período 1970-1989. En este lapso se presentaron un total de 118 personas fallecidas, de las cuales 103 corresponden a agresión por murciélago, 9 por zorrillo, 3 por gato montés, 2 por coyote y 1 por zorra. Estos casos se presentaron en 14 estados de la Republica Mexicana, cuya ubicación por regiones fue la siguiente: en la región del Golfo de México en Veracruz; en el Pacífico en Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca; en el área norte en Chihuahua y la porción central en Querétaro, México, Morelos y Puebla. Los casos se registraron en poblaciones rurales, carentes de los servicios mínimos, lo que facilitó el contacto de agresión (Sistema Nacional de Salud e Instituto Pasteur: Simposium Internacional sobre Rabia: Vigilancia epidemiológica y prevención; México, 1990).

En México aproximadamente 3600 casos humanos se documentaron entre 1939 y 2003, en donde el 90% se asoció con la transmisión por perro. Con métodos de caracterización antigénica viral se han identificado más del 30% del total de los casos reportados en los últimos 7 años como virus asociados a murciélagos (Belotto, 2005). Recientemente se ha documentado una probable variante del virus de la rabia identificado post-mortem en un individuo inmigrante del estado de Oaxaca, México en donde los estudios moleculares sugieren que se trató de un virus de un murciélago insectívoro (Velasco Villa *et al* 2008).

H) CARACTERÍSTICAS DEL AGENTE CAUSAL

El virus de la rabia pertenece a la Orden de *Mononegavirales*, los cuales presentan un genoma constituido de una cadena de RNA de polaridad negativa (Tordo et al. 1986). Este orden comprende tres familias:

- Familia de *Paramyxoviridae*
- Familia de *Filoviridae*
- Familia de *Rhabdoviridae*

La familia *Rhabdoviridae* es considerada como una de las más distribuidas mundialmente dentro de la naturaleza, dentro de ésta familia se encuentran los géneros *Vesiculovirus* y *Lyssavirus*, lo cuales se han identificado como virus que infectan a los mamíferos. El virus rábico, que pertenece a esta familia, contempla una centena de virus de mamíferos, peces, crustáceos, reptiles y plantas (King, 1998).

Los *Rhabdovirus* que infectan a mamíferos pertenecen a tres géneros:

- *Vesiculovirus* (virus de la estomatitis vesiculosa, VSV)
- *Lyssavirus*
- *Ephemerovirus* (virus de la fiebre efímera bovina)

El virus de la rabia pertenece al género *Lyssavirus*. Se han caracterizado 5 serotipos por medio del uso de anticuerpos monoclonales (Tabla 1), los más importantes para el humano se encuentran dentro de los serotipos 1 y 4 y mediante análisis moleculares se han clasificado 7 genotipos (Arai y cols., 2003). El serotipo 1 comprende todas las cepas de virus rábico: rabia salvaje, rabia urbana y las cepas vacunales (Smith 1996; Smith y King 1996; Garmendia 1999). Todos los genotipos se han relacionado con casos de rabia en humanos (Jackson, 2002). Los demás serotipos son considerados como virus emparentados con la rabia. En la tabla 1 se muestra la clasificación de los *Lyssavirus*.

Dentro de cada genotipo existen variantes que circulan en regiones geográficas y hospederos específicos como los genotipos del 2 al 4 tienen una amplia distribución en África, mientras los genotipos 5 y 6 están distribuidos en Europa del oeste y del este respectivamente (Heaton y cols., 1999).

Los diferentes genotipos han sido agrupados en dos filogrupos, el I está constituido por los genotipos 1, 4, 5 6 y 7 y en el II se encuentran los genotipos 2 y 3. Estos filogrupos difieren en características biológicas como patogenicidad, inducción a la apoptosis, reconocimiento al receptor celular, etc. Esta clasificación pudiera reforzarse particularmente en la vigilancia de los *Lyssavirus* de murciélagos, ya que en el año 2002 se aislaron cuatro *Lyssavirus* (Asia central (Aravan virus (ARAV), Khujand (KHUV), Siberia del este (Irkut virus (IRKV) y en la región Caucásica (West Caucasian bat virus (WCBV) que fueron caracterizados como nuevos genotipos (WHO, 2002).

Tabla 1. Clasificación de los *Lyssavirus* (Smith, 1996)

Genotipo	Serotipo	Cepa prototipo	Distribución Geográfica	Especies afectadas
1	1	Cepas de la calle o virus salvaje	El mundo entero, excepto Australia, Inglaterra, Irlanda, Nva. Zelanda, Japon	Humanos, ganado, murciélagos, otros mamíferos
2	2	Lagos bat (LB)	Nigeria, Senegal, Rep. Centroafricana, Sudáfrica, Zimbawe	Murciélagos frugívoros, gatos. no ha sido aislado en seres humanos
3	3	Mokola (MOK)	Nigeria, Camerún, Zimbawe, Rep. Centroafricana	Humano, musaraña, gato, perro, roedores
ND	Comparten algunos determinantes antigénicos con Mokola	Obodhiang (OBD)	Sudán	Equinos, bovinos, mosquitos, aislado de la especie <i>Monsonia uniformis</i>
ND	Comparten algunos determinantes antigénicos con Mokola	Kotonkan (KON)	Nigeria	Aislado de la especie <i>Culicoides sp.</i>
4	4	Duvenhage (DUV)	Sudáfrica, Zimbawe	Humano, murciélagos insectívoros
5	5	EBL subtipo 1 (EBL-1) (european bat <i>lyssavirus</i>)	Francia, Polonia, Dinamarca Alemania	Humano, murciélagos insectívoros de los géneros <i>Eptesicus</i> y <i>Pipistrellus</i>
6	5	EBL subtipo 2 (EBL-2) (european bat <i>lyssavirus</i>)	Francia, España, Dinamarca Alemania	Humano, murciélagos insectívoros del género <i>Myotis sp.</i>
7	7	PLVs (pteropid <i>lyssaviruses</i>)	Australia	Murciélagos frugívoros como las zorras voladoras del género <i>Pteropus spp</i> y otros murciélagos de la especie <i>Saccolaimus flaviventrus</i>

I) BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS

El virus de la rabia es un virus envuelto de aproximadamente 180 nm de largo por 75 nm de ancho, presenta una forma característica de “bala” y posee proyecciones en forma de espículas de 10 nm aproximadamente (de Mattos *et al.*, 2001) como se muestra en la figura 1.

Todos los *rhabdovirus* poseen más de dos componentes estructurales principales, además de una riboproteína helicoidal (RNP) y una cápside de envoltura. En la riboproteína helicoidal, el ácido ribonucleico del genoma está fuertemente encapsulado y protegido por la nucleoproteína. La ribonucleoproteína (RNP) está constituida por el RNA, la fosfoproteína y la proteína N, como se puede observar en la figura 1A. Si se observa al virión en un corte transversal (Figura 1B) se observa la bicapa membranal y la proteína M que a su vez contiene a la ribonucleoproteína, esta proteína tiene una composición semejante a la membrana neuronal (Nadin-Davis *et al.*, 1993).

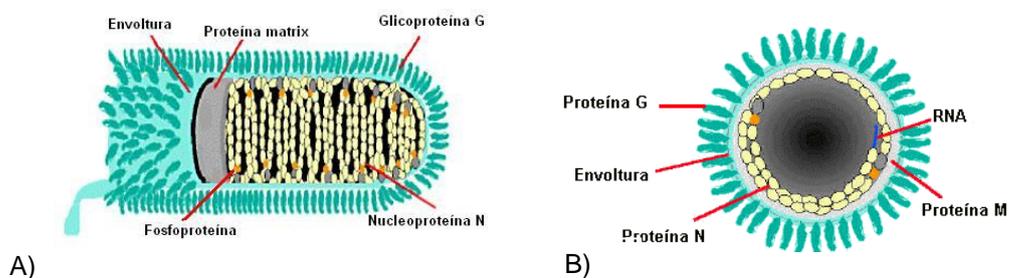


Figura 1. **Esquema de la estructura del virus de la rabia.** A. Vista longitudinal del virus. B. Vista transversal. Se muestra las proteínas que constituyen al virión (CDC).

El genoma del virus de la rabia es una cadena simple de RNA no segmentada, de aproximadamente 12,000 pares de bases. Contiene una secuencia líder (leader) de aproximadamente 50 nucleótidos, seguida por los genes N, P, M, G y L, que codifican cinco proteínas: la nucleoproteína (N), La fosfoproteína (P), una proteína de matriz (M), la glicoproteína (G) y la polimerasa (L), (Brock & Madigan, 1991). El orden de los genes nombrados de 3' a 5' (3'-N-P-M-G-L-5') son altamente conservados (Finke & Conzelmann,

2005) como se observa en la figura 2. Cada gen está integrado por una región codificante y están flanqueados por regiones intergénicas no codificantes (NC). Los extremos son generalmente cortos, menos de 5 nucleótidos, y están delimitados por señales consenso de comienzo y termino de nueve nucleótidos, que regulan el proceso de transcripción. La región intergénica entre el gen G y L (450 nucleótidos) se le ha considerado como un pseudogene (King, 1998).

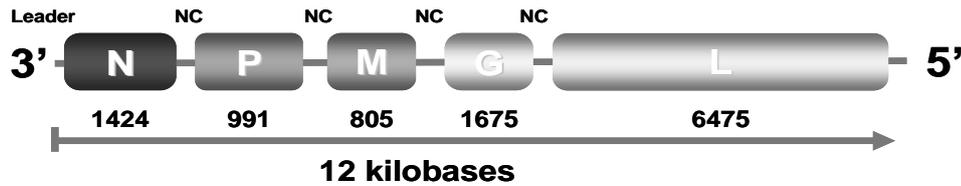


Figura 2. **Esquema del genoma del virus de la rabia.** En donde se muestran los genes que codifican para cada proteína y los pares de bases que los componen. (CDC)

La nucleoproteína (N), comparada con las otras proteínas, presenta un elevado nivel de conservación en la secuencia de aminoácidos, por lo que se ha empleado para realizar estudios de la evolución de los serotipos y para establecer su correlación con una amplia variedad de aislamientos e identificación mediante anticuerpos monoclonales específicos para esta proteína (*Bourh y cols., 1993*). La prueba diagnóstica de Inmunofluorescencia directa (IFD) identifica a esta proteína como aglomerados intracelulares a lo que se le han denominado “cuerpos o corpúsculos de Negri” (Smith, 1996). La proteína N al estar fosforilada en la posición 389 modula la transcripción, mientras que su desfosforilación favorece la replicación del genoma viral (Yang *et al* 1999).

La proteína P o fosfoproteína, es un cofactor de la L polimerasa y se requiere para el proceso de encapsulación del RNA. Estas proteínas están asociadas a la ribonucleoproteína (RNP) para llevar a cabo los procesos de transcripción y replicación del RNA viral (Wunner *et al.*, 1991).

Durante el procesamiento del virus, la RNP es cubierta por una envoltura constituida por la proteína M y la proteína G, las cuales son las responsables de estimular la producción de anticuerpos neutralizantes y protectores. La proteína M tiene además una función reguladora dentro del proceso de

transcripción, así como para el ensamble de las partículas virales y las uniones de la nucleocápside y la membrana (Hiramatsu *et al.*, 1992).

La proteína G o glicoproteína, forma espículas transmembranales que le permiten al virus la penetración a la célula por medio de la interacción entre los receptores celulares y la porción extramembranal de esta proteína, además de facilitar la fusión entre las membranas para que se dé el desnudamiento del virus (Morimoto *et al.*, 1996; Finke y Conzelmann, 2005). Se sabe que el aminoácido Arginina (R) o Lisina (K) en la posición 333 en la glicoproteína del virus de la rabia es considerado necesario para que el virus presente virulencia en ratones adultos. Sin embargo existen excepciones, ya que en recientes publicaciones mencionan que la sustitución en esta posición causa la expresión de un fenotipo que es menos patógeno o menos virulento (Milosz *et al.* 2005).

Además, existen estudios en donde se han encontrado sustituciones en esta misma posición de histidina, asparagina y glutamina, en cepas de virus rábico de la calle, que han sido aisladas de murciélagos no hematófagos en Brasil. Estas cepas mostraron patogenicidad y letalidad cuando fueron inoculados intracerebralmente en ratón; estos cerebros fueron analizados y confirmados como positivos por inmunofluorescencia. Por lo que estos hallazgos indican que el virus que circula por las calles pueden presentar estas sustituciones lo cual es resultado de los diferentes ciclos de infección (Sato *et al.*, 2008).

J) CICLO DE INFECCIÓN Y REPLICACIÓN (EN HUMANOS)

De manera general en la familia *Rhabdoviridae* el proceso de replicación y ensamble viral se divide en diferentes estadios, algunos de ellos ocurren de manera simultánea dentro de la célula infectada pero han sido considerados como una serie de pasos consecutivos siguiendo este orden: adsorción, penetración, desnudamiento, transcripción, traducción, procesamiento, replicación, ensamble y liberación (Rose & Whitt, 2001). El proceso se ilustra en la figura 3.

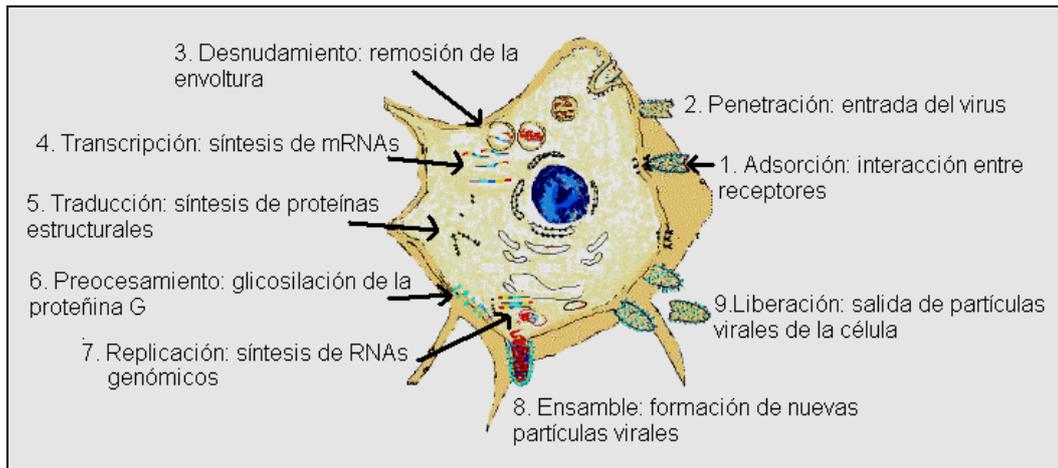


Figura 3. Esquema del **Ciclo de infección y replicación del virus de la rabia (CDC)**. Se muestran los diferentes procesos que lleva a cabo el virus de la rabia al infectar una célula.

La infección inicia por la interacción de receptores de superficie celular y el virus, hay evidencias que mencionan diferentes receptores que pueden interactuar después de la adsorción. Se sabe que las partículas virales son endocitadas a través de la vía dependiente de clatrina. La fusión entre la membrana endocítica y la membrana endosomal es catalizada por la proteína G y da como resultado la liberación al citoplasma celular de la RNP. Inmediatamente después la proteína M se disocia de la RNP. La combinación de estos dos procesos constituye el desnudamiento o remoción de la envoltura. El primer evento de síntesis realizado por la célula es la transcripción del mRNA viral del complejo L-P polimerasa (Wunner et al, 1988). Ocurre una transcripción primaria en ausencia de síntesis de proteínas, diferente a la replicación, la cual requiere de las proteínas N y P recién sintetizadas y después dar lugar a la traducción. Durante la transcripción, la polimerasa responde a las señales que resultan en síntesis del RNA líder y de los RNAs mensajeros. En contraste, en la replicación la polimerasa ignora estas señales y lleva a cabo la síntesis del RNA con polaridad positiva. Este RNA se replica posteriormente como una cadena de RNA con polaridad negativa (CDC 2003).

La encapsidación del genoma viral por parte de la proteína N está íntimamente ligado con el proceso de la replicación del virus y ocurre mientras del RNA genómico es sintetizado, en lugar de que sea después de que la síntesis sea completada. Este proceso de encapsulación está regulado por el

estado de fosforilación de la proteína N. El primer paso de este estadio ocurre en el citoplasma y se da cuando se asocia el RNA genómico con las proteínas N, P y L recién sintetizadas para formar el complejo RNP (Delahneau et al, 1981).

El estadio de ensamble se divide en tres fases diferentes: a) encapsidación por la proteína N del RNA recién sintetizado, b) condensación simultánea, dada por la proteína M, de la ribonucleocápside y la asociación con la membrana plasmática, y c) partículas virales maduras y liberadas. Estos son a menudo referidos como nucleocápsides o RNP centrales. Después de la encapsidación, el complejo RNP se asocia con la membrana plasmática y se condensa en una estructura fuertemente enrollada llamada “esqueleto”, antes de liberarse de la célula (Delahneau et al, 1981).

K) DIAGNÓSTICO

El diagnóstico *ante mortem* y *post mortem* se basan en la detección del antígeno mediante el aislamiento del virus o por métodos serológicos mediante las técnicas de RT-PCR y la inmunofluorescencia. Las técnicas de serológicas incluyen la inmunofluorescencia directa y neutralización viral (CDC 2005).

La técnica de inmunofluorescencia demuestra la presencia del antígeno viral (Cuerpos de Negri) en improntas de cerebro, improntas córneas o incluso en biopsias de piel de cara o cuello (Dean et al, 1996). Aunque esta prueba es ampliamente aceptada, los resultados son en parte subjetivos y dependientes de la habilidad del técnico para discriminar entre puntos de fluorescencia inespecíficos y aquellos debidos a la presencia del virus. Además con estas pruebas no se puede determinar el linaje al cual pertenece el virus, lo cual dificulta establecer su origen.

Recientemente se ha desarrollado una serie de anticuerpos monoclonales que permiten descifrar el linaje del virus de la rabia; esta determinación también se basa en la inmunofluorescencia directa, que se obtiene de aplicar todo el panel de monoclonales a una misma muestra; la positividad se establece a través de la intensidad de la fluorescencia obtenida

con cada anticuerpo monoclonal apreciada visualmente por el técnico (De Mattos et al, 1999).

El virus se puede aislar de muestras de saliva en cultivos celulares cuando el virus se encuentra en muy pequeñas cantidades o por la inoculación intracerebral en ratones (Krauss, 2003). El aislamiento del virus puede ser necesario para confirmar los resultados de las pruebas de detección de antígenos y para caracterizar mejor el virus aislado. Las células de neuroblastoma murino (NA C1300) son más susceptibles a la infección del virus de campo que cualquiera otras líneas celulares ensayadas como las BHK-21 (Rudd y Trimarchi, 1987).

El aislamiento del virus en cultivos celulares (con células de neuroblastoma) es tan eficaz como la inoculación del ratón para demostrar la existencia de pequeñas cantidades de virus rábico. Además, reduce el tiempo necesario para el diagnóstico de 10 a 15 días a 2 días y elimina la necesidad de contar con animales experimentales y es menos costoso. No obstante, esta técnica no puede efectuarse en cualquier laboratorio y la inoculación intracefálica del ratón sigue siendo una prueba útil en el diagnóstico de laboratorio de la rabia. El período de observación puede acortarse mediante el examen por FA del cerebro de ratones inoculados que fueron sacrificados 3 a 4 días (o más) después de la inoculación.

También se ha desarrollado la técnica de Inmunohistoquímica directa (DRIT), y aunque todavía no esta reconocida para el diagnóstico en humanos, se ha utilizado en la vigilancia en animales de vida silvestre en los Estados Unidos de Norteamérica (CDC, 2005).

Se han desarrollado diversos métodos de RT-PCR para la detección del virus de la rabia, incluso se han desarrollado técnicas de RT-PCR en tiempo real que permiten distinguir entre el virus de rabia clásico y los lyssavirus de murciélagos europeos. Estas técnicas tienen una gran sensibilidad, son rápidos, específicos por los que ahora están siendo las técnicas de uso a nivel mundial (Wakeley *et al.*, 2006)

L) ESTRATEGIAS DE CONTROL

Desde 1885, cuando Pasteur introdujo la vacunación contra la rabia, se presentaron infinidad de casos de este padecimiento tanto en humanos como en otras especies domésticas y silvestres (Wilkinson, 1988), desde entonces se ha tratado de controlar esta zoonosis.

El plan vigente desde 1983, "Plan de Acción para la Eliminación de la Rabia Urbana de las Principales Ciudades de Latinoamérica", fue resultado de la 3ª RIMSA y del XXXI Consejo Directivo de la OPS y sus objetivos se ampliaron en la IV Reunión de Directores De los Programas Nacionales de Control de Rabia en Latinoamérica (REDIPRA-OPS/OMS, 2006) a la eliminación de la rabia transmitida por el perro en áreas rurales y se enfatizó la importancia de la rabia silvestre.

Desde ese año la ocurrencia de casos de rabia humana transmitida por el perro ha disminuido en forma sostenida: se registró una reducción de aproximadamente el 90% de casos humanos y caninos, en tanto que los casos de rabia transmitida por especies de vida silvestre presentaron un comportamiento cíclico y recurrente, destacándose la persistencia de factores de riesgo de rabia transmitida por vampiros no mitigados en áreas tropicales y subtropicales (Heinemann et al, 2002). Habiendo una buena perspectiva para completar la eliminación de la rabia transmitida por el perro y prevenir los casos de rabia transmitida por otras especies, algunas determinantes identificadas tornan probables escenarios desfavorables, de no adoptarse medidas oportunas. Entre éstas se han identificado como preocupantes la escasez de biológicos, el aumento de áreas con transmisión de rabia canina, la presencia de brotes de rabia transmitida por vampiros en comunidades de localidades alejadas de los centros de atención de salud y, en casos puntuales, falta de capacidad de acción en el nivel local (Rico 2001).

En México se menciona que se han realizado campañas continuas para el control de la rabia canina, y se calcula que se aplicaron 10 y 15 millones de vacunas en 1995 y 2005 respectivamente y campañas exhaustivas han dado

como resultado una disminución de los casos de rabia humana transmitida por los perros (Lucas *et al.*, 2008), es por eso es que la República Mexicana está cerca de ser certificada por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) como un país libre de rabia (Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (Cenavece).

De manera general la prevención se basa en la vacunación de las mascotas para prever la exposición y subsecuente transmisión al humano, así como la prevención por mordidas de animales domésticos (Jiménez, 2003). De igual manera la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) mantiene una campaña a nivel nacional de vacunación para el ganado vacuno principalmente contra la rabia parálitica bovina (R.P.B). La vacunación es una de las formas más eficientes para prevenir la presentación de la R.P.B. Mediante la utilización de vacunas de virus vivo modificado las cuales deben emplearse en aquellas zonas o regiones donde se tienen plenamente identificada la presencia de la R.P.B. (Áreas enzóticas). También existen comercialmente vacunas a base de virus muerto o inactivado, mismas que pueden usarse para zonas donde no se tienen registrados casos de esta enfermedad (Áreas Libres). La vacunación debe de realizarse en todos los hatos bovinos, del estado, a partir de los 3 meses de edad, considerando la amplia distribución de la R.P.B. y su estrecha relación con los murciélagos hematófagos (Jiménez, 2006).

Antes del advenimiento de los anticuerpos monoclonales en la década de los ochentas, era difícil poder distinguir entre sí a los diferentes aislamientos del virus de la rabia. Los anticuerpos permitieron demostrar en forma categórica el antiguo mito de la unidad antigénica del virus de la rabia, encontrándose variaciones entre diferentes aislamientos y cepas vacunales. Sin embargo, el análisis del genoma de estos virus ha sido la herramienta más poderosa para su clasificación taxonómica y para la realización de una epidemiología molecular (Velasco-Villa, et al 2002).

El análisis del genoma de diferentes aislados del virus de la rabia ha permitido actualmente encontrar marcadores para identificar al virus proveniente de distintos vectores y virus proveniente de zonas geográficas

divergentes. Estos avances han permitido en varias partes del mundo un conocimiento más detallado sobre la epidemiología de la enfermedad y las cepas involucradas en los diferentes brotes, más aún, el análisis del genoma de estos agentes nos permite saber por comparación, que tan adecuada es la utilización de una vacuna determinada para proteger contra el virus involucrado en un brote (Velasco-Villa, et al 2002).

M) ESTRATEGIAS DE CONTROL EN VIDA SILVESTRE

A través de años de esfuerzo en los Estados Unidos de Norte América se ha buscado erradicar el virus de la rabia en animales de vida silvestre a través de programas de vacunación oral empleando cebos con antígeno vacunal los cuales se distribuyen en las zonas de interés por vía aérea; aunque esta estrategia ha dado resultados, estos han sido insuficientes, por lo que se deberán establecer nuevas estrategias de control en la diseminación del virus de la rabia en animales de vida silvestre (United States Department of Agriculture, 2005).

Control de los Vectores (Murciélagos hematófagos)

Estas actividades se enfocan a la captura de murciélagos hematófagos en corrales y refugios con la respectiva utilización de productos vampiricidas (warfarina) con la cual las poblaciones de murciélagos hematófagos se mantienen bajo control y las mordeduras en el ganado pueden disminuir hasta en un 90% en un hato afectado, lo cual indica que merman significativamente los riesgos de transmisión de la RPB. Tanto para los animales como para el humano (Jiménez y De la Torre, 2006).

Las actividades de captura de murciélago en corrales (bovinos encerrados), requieren de realizarse durante la noche, aprovechando las horas de mayor oscuridad (calendario Lunar), utilizando redes especiales, guantes de carnaza, lámparas de cacería, jaulas metálicas, etc. Esta técnica ofrece excelentes resultados debido a que es posible atrapar murciélagos hematófagos de diferentes colonias, las cuales al ser tratados y liberados con

la pomada vampiricida, regresan a sus refugios distribuyendo el veneno entre sus compañeros, logrando con esto eliminar aproximadamente 20 quirópteros más por cada murciélago tratado.

La captura de murciélagos en refugio se realiza durante el día en el interior del refugio, o bien en el exterior del mismo, copando la entrada principal con las redes y esperando a que inicie la noche para que los murciélagos salgan en busca de su alimento. De esta forma los quirópteros atrapados reciben el tratamiento y se liberan al interior del refugio. Con esta técnica únicamente se eliminan los murciélagos hematófagos que allí habitan (Jiménez, 2004.)

El uso del vampiricida para tratamiento de las mordeduras en los animales, es también una técnica de muy buenos resultados que permite eliminar únicamente al murciélago que diariamente se alimenta de esa herida. Dicha actividad la deben realizar los productores inspeccionando periódicamente a sus animales para detectar y tratar las mordeduras.

El control de las poblaciones de murciélagos mantiene estrecha relación con las estrategias de vacunación (Flores, 1996).

Existen datos recientes datos experimentales con murciélagos *Desmodus rotundus* en cautiverio que se han inmunizado con vacunas orales, en donde se demuestra la inmunogenicidad de una vacuna (Almeida *et al.*, 2008)

JUSTIFICACIÓN

El virus de la rabia es uno de los virus más antiguos de la humanidad, que ocasiona cientos de casos de rabia canina en Latinoamérica; en México se presentan anualmente algunos casos de rabia humana, varios casos de rabia paralítica bovina que ocasiona pérdidas en la industria ganadera, varios casos de rabia canina; así que la rabia sigue siendo un problema de salud pública en México. Ya que no se ha podido resolver este problema a pesar de las investigaciones que se han realizado al respecto, en este trabajo se pretende hacer una contribución al conocimiento de la distribución del virus de la rabia en animales de vida silvestre como los murciélagos hematófagos y no hematófagos.

En México se cuenta con programas de control y vigilancia del virus de la rabia en humanos y animales domésticos, así como para el murciélago hematófago; sin embargo, faltaría incluir en estos programas a los animales de vida silvestre como los murciélagos no hematófagos y otros animales que podrían estar involucrados en los ciclos de transmisión del virus, los cuales pueden desempeñar un papel importante no solo en la diseminación del virus entre especies, sino que resultan un riesgo potencial de transmisión incidental al hombre y no menos importante es el impacto económico en animales de producción.

Otro aspecto importante en los programas de control y vigilancia de la rabia son los métodos de diagnóstico por inmunofluorescencia para detectar el virus y sus variantes; los cuales pueden tener falsos negativos o positivos ya que dependen de la habilidad del analista para discriminar entre fluorescencia específica e inespecífica; por lo cual es importante desarrollar métodos más eficaces y específicos basados en herramientas de biología molecular.

Por lo anteriormente expuesto, nuestro grupo trabaja en la caracterización molecular de las variantes del virus que circulan en los animales de vida silvestre., para establecer un patrón de diseminación del virus interespecies.

OBJETIVOS

A) Objetivo General

Determinar la prevalencia del virus de la rabia en diferentes especies de murciélagos hematófagos y no hematófagos de la región de la Huasteca Potosina y del Estado de Sinaloa, México

B) Objetivos Particulares

- Realizar monitoreos para la obtención de muestras de diferentes especies de murciélagos en diferentes regiones de la huasteca Potosina y Sinaloa, México.
- Obtener los cerebros de los animales capturados, para el diagnóstico por inmunofluorescencia directa.
- Realizar el aislamiento viral en cultivos de células de las muestras positivas por inmunofluorescencia.
- Realizar la técnica de RT-PCR para la detección del virus de la rabia identificando el gen N y el gen G.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A) Obtención de las muestras

Se realizaron capturas de murciélagos tanto hematófagos como no hematófagos, en ocho regiones de la Huasteca Potosina durante el 2005. Estos sitios fueron elegidos debido a las frecuentes notificaciones, por parte de los dueños de los ranchos al Comité de Desarrollo y Protección Pecuaría del Estado de San Luis Potosí, de lesiones ocasionadas aparentemente por murciélagos en el ganado . Así también se monitorearon algunas cuevas en donde se había observado la presencia de murciélagos en esta región de la Huasteca Potosina en 2006 y en Sinaloa en el 2007.

Con base al calendario lunar se programaron capturas nocturnas de murciélagos. Se colocaron redes de niebla alrededor de los corrales en donde usualmente se encontraba el ganado mordido (Figura 4a), en el caso de las cuevas, las redes se colocaron a la entrada de estas.

Una vez colocadas las redes se procedió a esperar la salida de los quirópteros en busca de su alimento, para que de esta manera quedaran atrapados en la red al momento que los murciélagos intentaran llegar al ganado.

Las redes fueron revisadas cada 15 minutos para verificar si había caído en la red algún murciélago (Figura 4b), en cuyo caso se retiraba cuidadosamente al espécimen.

Una vez retirados de la red, el grupo de biólogos identificaba a los ejemplares a nivel de género y en algunos casos también la especie, con base a sus características morfológicas y hábitos alimenticios (tamaño, forma del hocico, hematófago o no hematófago) y con el apoyo de claves dicotómicas; así como también se registro su estado físico,.

Una vez identificados, se llevo a cabo la eutanasia de los ejemplares colectados, posteriormente se conservaron a 4°C y fueron transportados al Laboratorio de Medicina de Conservación del Instituto Politécnico Nacional para el diagnóstico de las muestras.

Con la ayuda de un geoposicionador satelital se obtuvieron los puntos en donde se colectaron de los sitios monitoreados.



Figura 4. **Captura de los murciélagos en las zonas de monitoreo.** Se muestra en a) Colocación de redes alrededor de los corrales del ganado o en cuevas unas horas antes de anochecer. b) murciélago capturado, los ejemplares quedan atrapados en una bolsa de la red, lo que limita sus movimientos.

B) Procesamiento de las muestras

El manejo de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Medicina de Conservación en una zona designada exclusivamente para el manejo muestras sospechosas al virus de la rabia.

1. *Obtención de las muestras de cerebro:*

El murciélago se colocó en posición ventral dentro de una charola, se sanitizó de la región craneal con una solución de yodo al 5%. Se disectó el cráneo, haciendo un corte en forma de cruz, para así exponer el cerebro, el cuál se extrajo y se colocó en un criovial y se identificó con el código correspondiente.

2. Inmunofluorescencia directa (IFD)

Se realizaron impronta de la siguiente manera, se tomo un fragmento del cerebro y se colocó en el extremo de un abatelenguas posteriormente se colocó un portaobjetos y se realizó una impresión del tejido cerebral; se retiró el exceso de tejido sobre una hoja de papel absorbente y se dejó secar al aire, se procedió a fijar con acetona a -28°C durante 4h, delimitando el área de la impronta. Las improntas fueron realizadas por duplicado.

Se agregaron $50\mu\text{L}$ de una dilución 1:20 del anticuerpo monoclonal anti-rabia conjugado a isotiocianato de fluoresceína (Laboratorio Baer S.A. de C.V.), posteriormente se incubó durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizaron 10 lavados con PBS 1X y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente se agregó una gota de glicerol al 90%, se cubrió con un cubreobjetos, se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Mca. Nikon) a 100X. (Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de enfermedades).

C) Aislamiento viral en cultivos celulares

Utilizando un control positivo (cepa LP2061) se realizó la estandarización de la infección de un cultivo de células BHK21 (células de riñón de hámster joven) .

Se utilizó una microplaca de 24 pozos con una confluencia celular del 80% . Se les retiró el medio de mantenimiento a los pozos de la microplaca y se procedió a con $100\mu\text{L}$ del control positivo en cada pozo, se incubó durante 30 minutos a 37°C . Posteriormente se adicionaron $900\mu\text{L}$ de medio de mantenimiento M199 y se incubó nuevamente a 37°C en una atmósfera de CO_2 del 5%.

Las células se observaron a diario hasta que se observó efecto citopático.

Con las muestras positivas a inmunofluorescencia se realizó la infección del cultivo de células BHK-21 se la siguiente manera, se tomó 0.5cm^2 de cerebro y se colocó en un tubo eppendorff con $500\mu\text{L}$ de PBS estéril, se disgregó en vortex hasta tener un suspensión homogénea, se centrifugó a 8000xg durante 10 minutos y el sobrenadante se filtró a través de una

membrana de 0.22µm, con la finalidad de eliminar la presencia de bacterias que pudieran interferir en los resultados. El sobrenadante se recuperó en un tubo eppendorff estéril, se identificaron y se almacenaron a -30°C. Finalmente se colocó 100µL del inoculó en una microplaca con una confluencia celular del 80% y se le adicionó 900µL de medio de mantenimiento. Se realizó una observación diariamente por 96 h.

A las 96 h se realizó la cosecha del virus mediante la congelación a -70°C y descongelación de la monocapa celular. Se cosechó y se recolectó el medio en tubos eppendorff estériles, se centrifugaron y con el sobrenadante se realizó una segunda infección celular. Igualmente se realizó el seguimiento y la cosecha, bajo las mismas condiciones antes señaladas.

A los sobrenadantes se les realizó extracción de RNA y RT-PCR para la detección de un fragmento de 760pb correspondiente al gen N, con el fin de corroborar la presencia del virus.

Al cultivo de células con efecto citopático se le realizó la técnica de IFD, de la siguiente manera: se colocó un cubreobjetos estéril dentro de 4 pozos de una microplaca, se colocaron las células en suspensión, se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ del 5%. A las 24 h se les eliminó el medio de mantenimiento y se infectaron con 100µL del testigo positivo, se incubó 30 minutos a 37°C y posteriormente se adicionó 900µL de medio de mantenimiento. Después de 48h de haber realizado la infección se colectó el sobrenadante en un tubo eppendorff y se sacaron los cubreobjetos de los pozos. A las células adheridas al cubreobjetos se le realizó la técnica de IFD, bajo las condiciones antes mencionadas, se observaron al microscopio de epifluorescencia (Mca. Nikon) y se fotografiaron.

D) Análisis de las muestras por técnicas de Biología Molecular.

1. Extracción de RNA

Para la extracción de RNA total de las muestras de cerebros se utilizó el kit RNeasy Quiagen siguiendo el siguiente protocolo, en un tubo eppendorff se colocó 30mg de tejido y se adicionó 500 µL del regulados RLT (regulador de lisis), se agitó en vortex durante 15 segundo o hasta disgregar completamente

el tejido, se adicionó 500 µL de etanol al 70% y se agitó en vortex 15 segundos, se centrifugó a 8000xg por 5 minutos, el volumen se transfirió a una columna y se centrifugó a 8000xg por 15 segundos, se eliminó el filtrado y se le adicionó 700 µL de regulador RW1, se centrifugó a 8000xg por 15 segundos, se desechó el filtrado y se agregó 500µL del regulador RPE, nuevamente se centrifugó y se eliminó el filtrado, este paso se realizó por duplicado, después se centrifugó a velocidad máxima durante 2 min para eliminar el exceso de etanol. Finalmente la columna se colocó dentro de un tubo colector libre de RNAsas y se adicionó 50 µL de agua libre de RNAsas, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y el RNA se eluyó centrifugando a 8000xg por 1 min. El RNA obtenido se almacenó a -70°C.

2. Técnica de RT-PCR

Se realizó la estandarización de la técnica de RT-PCR para la detección del fragmento de 760 pares de bases (nucleótido 66 al 826 correspondiente al gen N) del virus de la rabia, basado en el protocolo de Loza-Rubio, 2005. Las condiciones se describen en la Tabla 2. Para realizarlo se utilizó el testigo positivo (cepa LP2061).

Tabla 2. Condiciones de RT-PCR para la detección de un fragmento de 760pb del gen N del virus de la rabia

50°C	30 min	Para la síntesis de la cadena de cDNA
95°C	15 min	Inactivar la transcriptasa reversa y activar la DNA taq polimerasa
30 ciclos de:		
95°C	45 seg	
50°C	30 seg	
70°C	30 seg	
72°C	10 min	Para el alargamiento final
Mantener a 4°C		Durante tiempo indefinido

Los iniciadores utilizados para la reacción de RT-PCR fueron (Loza-Rubio, 2005):

SuEli+ 5' CGT GGA CCA ATA TGA GTA CA 3'

SuEli- 5'CAG GCT CGA ACA TTC TTC TTA 3'

Se tomaron 10µL del producto de reacción y se colocaron en un gel de agarosa al 1.8% utilizando TEB 1X como regulador de corrimiento. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0.5µg/mL.

Se analizó una muestra de murciélago hematófago positiva IFD, esta muestra fue proporcionada por la SAGARPA.

Se realizó la extracción de RNA total y la prueba de RT-PCR para la detección del gen N a las muestras de cerebros obtenidas y a los sobrenadantes colectados del cultivo de células infectadas con las muestras positivas a IFD, todo ello bajo las mismas condiciones anteriormente señaladas.

E) Diseño de iniciadores para la amplificación por RT-PCR de la región del exodominio de la proteína G

Se diseñaron iniciadores degenerados dirigidos a la región del exodominio de la proteína G (glicoproteína) con la finalidad aumentar el espectro de detección de las posibles cepas. Se realizó la búsqueda en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de las secuencias reportadas de la proteína G del virus de la rabia y solo se seleccionaron las que se registraron en el continente Americano. Con las secuencias de aminoácidos se realizó la predicción de la región del exodominio de la proteína mediante el programa Anteprot. Por otro lado con las secuencias de bases se localizaron los marcos de lectura abierta con el programa ORF finder. Se obtuvieron los marcos de lectura abierta con los correspondientes aminoácidos y por otra parte se buscaron las secuencias de nucleótidos que codifican a esas secuencias de aminoácidos que habíamos obtenido de la predicción. Y ubicamos la secuencia de bases que codifica esos aminoácidos

(que corresponden a la región del exodominio) con la finalidad de verificar que eran correspondientes. Se ubicó el alineamiento múltiple de secuencias de bases utilizando el programa Clustal W del European Bioinformatics Institute (EBI). Con el programa Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) se seleccionaron las porciones con mayor similitud entre las secuencias. Se calculó la T_m, la formación de dímeros o heterodímeros para incrementar la especificidad del RT-PCR, empleando las funciones para este fin de la página IDT-DNA. El fragmento esperado para los iniciadores diseñados es de 727pb.

Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa.

Se utilizaron los reactivos del kit One-step RT-PCR, se preparó la mezcla de reacción en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, cada 50 µl de mezcla de reacción contiene:

Reactivo	Dilución de trabajo	Volumen	Concentración final
Regulador de reacción	5X	10 µL	1X
Mezcla de dNTP's	10 mM c/u	2 µL	0.4 mM
Iniciador RvG523 ó RvG1230	15 µM	1.5 µL	0.45 µM
Iniciador RvG859 ó RvG1125	15 µM	1.5 µL	0.45 µM
Mezcla de enzimas	--	2 µL	2 U
Inhibidor de RNA asasa	--	0.8 µL	0.5 U
H ₂ O libre de RNAasasa	--	26.8 µL	--
RNA molde	--	5 µL	0.1
Total		50 µL	

U: unidades

Se prepararon alícuotas de 45 µL de la mezcla de reacción en cada tubo para PCR con 5 µL del RNA molde.

Se realizó la estandarización de la técnica de RT-PCR para la detección del fragmento de 727 pares de bases (nucleótido 523 al 1250 correspondiente al exodominio del gen G) del virus de la rabia, basado en el diseño de iniciadores antes mencionado. El par de iniciadores se muestran en la tabla 3 y las condiciones de RT-PCR se describen en la Tabla 4. Para realizarlo se utilizó el testigo positivo (cepa LP2061).

Tabla 3. Combinación de iniciadores para amplificar la región del exodominio de la proteína G.

Combinación 1 *				
Nombre	Secuencia 5'--3'	Tm (°C)	Posición en el gen	Tamaño esperado del amplificado (pb)
RvG523	ACYAACCAYGATTACACCATYTGG	56.2	523-537	727
RvG1230	AAARTCYTCHGCTCRTCMCC	56.9	1230-1250	

Tabla 4. Condiciones de RT-PCR para la detección de un fragmento de 727pb correspondiente a la región del exodominio de la proteína G.

Temperatura	Tiempo	Proceso
50 °C	30 min	Síntesis de la cadena de cDNA
99 °C	15 min	Activar la taq DNA polimerasa.
40 ciclos		
94 °C	30 seg	
56.5 °C	30 seg	
72 °C	1min 20seg	Amplificación
72 °C	7 min	Extensión final
4 °C	Indefinidamente	Conservación después de la amplificación

También realizó la estandarización de la técnica de RT-PCR anidado para la detección del fragmento de 285 pares de bases (nucleótido 859 al 1144 correspondiente al exodominio del gen G) del virus de la rabia, basado en el diseño de iniciadores antes mencionados. El par de iniciadores se muestra en la tabla 5 y las condiciones de RT-PCR se describen en la Tabla 6. En la técnica se utilizó la cepa LP2061 como testigo positivo.

Tabla 5. Combinación de iniciadores para amplificar una región interna del exodominio de la proteína G.

Combinación 2 ★				
Nombre	Secuencia 5'--3'	Tm (°C)	Posición en el gen	Tamaño del amplificado esperado (pb)
RvG859	CAYTRGAGTCCATCATGACHACC	55.7	859-882	285
RvG1125	AGRGAYGAYTGCATCTCHGG	56.2	1125-1144	

Tabla 6. Condiciones de RT-PCR para amplificar un fragmento de 285pb correspondiente a una región interna del exodominio de la proteína G.

Temperatura	Tiempo	Proceso
50 °C	30 min	Síntesis de la cadena de cDNA
99 °C	15 min	Activar la taq DNA polimerasa.
40 ciclos		
94 °C	30 seg	
55.9 °C	30 seg	
72 °C	60 seg	Amplificación
72 °C	7 minutos	Extensión final
4 °C	Indefinidamente	Conservación después de la amplificación

III. RESULTADOS

A) Obtención de las muestras

Se realizó la captura de murciélagos de 222 murciélagos, de los cuales 113 fueron hematófagos y 109 no hematófagos en 8 sitios de la región Huasteca Potosina México. Debido a que es un monitoreo condicionado el número de animales, según su especie, en cada región de muestreo fue diferente; en la tabla 7 se enlistan las regiones monitoreadas, el número de muestras obtenidas y las especies capturadas en cada una de ellas.

Tabla 7. Sitios de monitoreo de murciélagos hematófagos y no hematófagos en la región de la Huasteca Potosina, México. En octubre del 2005.

MUNICIPIO	NÚMERO DE EJEMPLARES CAPTURADOS	ESPECIES CAPTURADAS
Talnajas	25	<i>Desmodus rotundus</i> (hematófago)
	3	<i>Diphylla ecaudata</i> (hematófago)
	2	<i>Mormoops sp</i> (insectívoro)
	8	<i>Anoura sp</i> (polinívoro)
	1	<i>Enchistenes sp</i> (frugívoro)
	2	<i>Pteronotus sp</i> (insectívoro)
	9	<i>Leptonycteris sp</i> (polinívoro)
	37	<i>Artibeus sp</i> (frugívoro)
Guadalcazar	9	<i>Desmodus rotundus</i> (hematófago)
	34	<i>Mormoops sp</i> (insectívoro)
San Ciro de Acosta	1	<i>Desmodus rotundus</i> (hematófago)
	8	<i>Natalus sp</i> (insectívoro)
	4	<i>Anoura sp</i> (polinívoro)
Tanquintían	4	<i>Promops sp</i> (frugívoro)
Río Verde	2	<i>Desmodus rotundus</i> (hematófago)
Ejido Alvaro Obregón	10	<i>Desmodus rotundus</i> (hematófago)
Aquismón Rancho "El Cafetal" Rancho "La joya del Sabino"	42	<i>Desmodus rotundus</i> (hematófago)
	21	
Total : 8 sitios	222 muestras	10 especies

También se colectaron 33 muestras en una cueva localizada en el sitio llamado Arroyo Pelón, Municipio de Guasave (Tabla 8); Localidad Cerro cabezón Edo. Sinaloa, como se observa en la tabla 8. Los datos de geoposicionamiento (GPS) del sitio mencionado son: N: 25°,33', 57.5'' W: 108°, 50', 58.1; Altitud: 38msnm.

Tabla 8. Sitios de monitoreo de murciélagos no hematófagos en el estado de Sinaloa, México. En enero de 2007

MUNICIPIO	NÚMERO DE EJEMPLARES CAPTURADOS	ESPECIES CAPTURADAS
Cueva 1		
Arroyo pelón, Municipio de	32	<i>Balantiopteryx alicata</i> (insectívoro)
Guasave		
Localidad Cerro cabezón	1	<i>Pteronotus davyi</i> (insectívoro)
Edo. Sinaloa		
Total : 2 sitios	33 muestras	2 especies

B) Procesamiento de las muestras por IFD

Se realizó la prueba de inmunofluorescencia directa a las 113 muestras de cerebro de murciélagos hematófagos y a las 142 no hematófagos. Se realizó la observación de la fluorescencia en un microscopio de epifluorescencia (Mca. Mca. Nikon).. Además se hizo el registro fotográfico de las muestras positivas. Se utilizó como testigo positivo la cepa LP2061 inoculada en cerebro de ratón (Figura 5).

La presencia del virus de la rabia se pone en evidencia por la una fluorescencia verde manzana, como se muestra en las fotografías. Todas las muestras se observaron en contraste de fases para descartar la presencia de cristales, que pudieran dar fluorescencia inespecífica (Figuras 6, 7, 8 y 9).

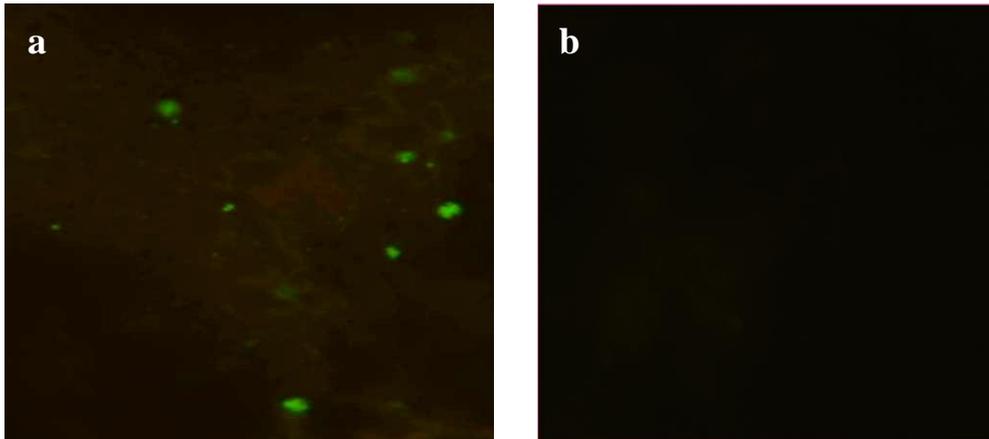


Figura 5. **Muestras testigos de Inmunofluorescencia directa.** a) fotografía de la inmunofluorescencia de una muestra de cerebro de ratón positiva a virus de rabia. b) fotografía de la inmunofluorescencia de una muestra de cerebro de ratón negativa al virus de la rabia

Los resultados mostraron que el 4% de las muestras fueron positivas al virus de la rabia. De los murciélagos hematófagos el 1.8% (2) fueron positivas y ocho de los de no hematófagos el 5.7% (Tabla 9).

Las 10 muestras positivas pertenecen a 6 especies de las 12 capturadas, como se puede observar en la tabla 9.

La especie de murciélago no hematófago que resultó con un mayor prevalencia fue *Artibeus sp*, 3 datos positivos, seguida de *Leptoniscteris sp* con 2 y finalmente *Enchistenes sp*, *Natalus sp* y *Pteronotus davyi* con 1 muestra positiva cada especie. En contraste solo dos muestras de las especies hematófagas resultaron positivas.

De manera general, de los murciélagos no hematófagos positivos 2 fueron insectívoros (*Natalus sp* y *Pteronotus davyi*), 2 frugívoros (*Artibeus sp* y *Enchistenes sp*) y 1 polinívoro (*Leptonyscteris*). Con la finalidad de descartar la inmunofluorescencia inespecífica las improntas se observaron, además de epifluorescencia con contraste de fases, ya que puede haber presencia de cristales o precipitados que pueden dar falsos positivos.

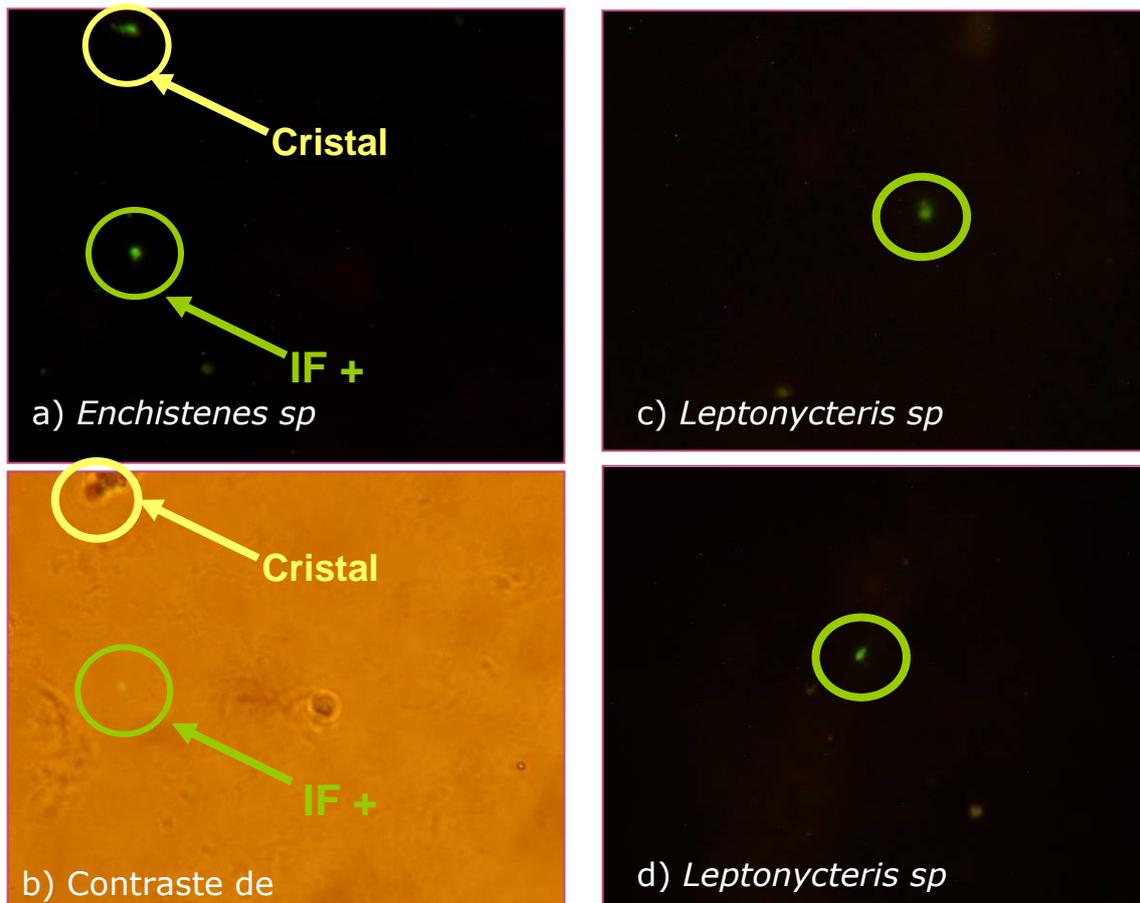


Figura 6. **Inmunofluorescencia positiva y presencia de inmunofluorescencia inespecífica en muestras de cerebros de murciélagos no hematófagos.** a) Impronta de cerebro en donde se observa la inmunofluorescencia positiva marcada en color verde (visto en epifluorescencia) y la presencia de un cristal. En b) microfotografía en contraste de fases, donde se muestra el cristal que da una inmunofluorescencia inespecífica. En (c, d) Otras muestras de murciélagos positivas. 100X

En la figura 6a se puede observar la diferencia entre la inmunofluorescencia debida a la presencia del virus y la inespecífica que pueden o no emitir los cristales, de igual manera en la imagen de contraste de fases 6b se observan evidentes diferencias de forma, tamaño, área, disposición en la laminilla y dimensión espacial entre un cristal y un corpúsculo de Negri, el cual nos indica la presencia del virus.

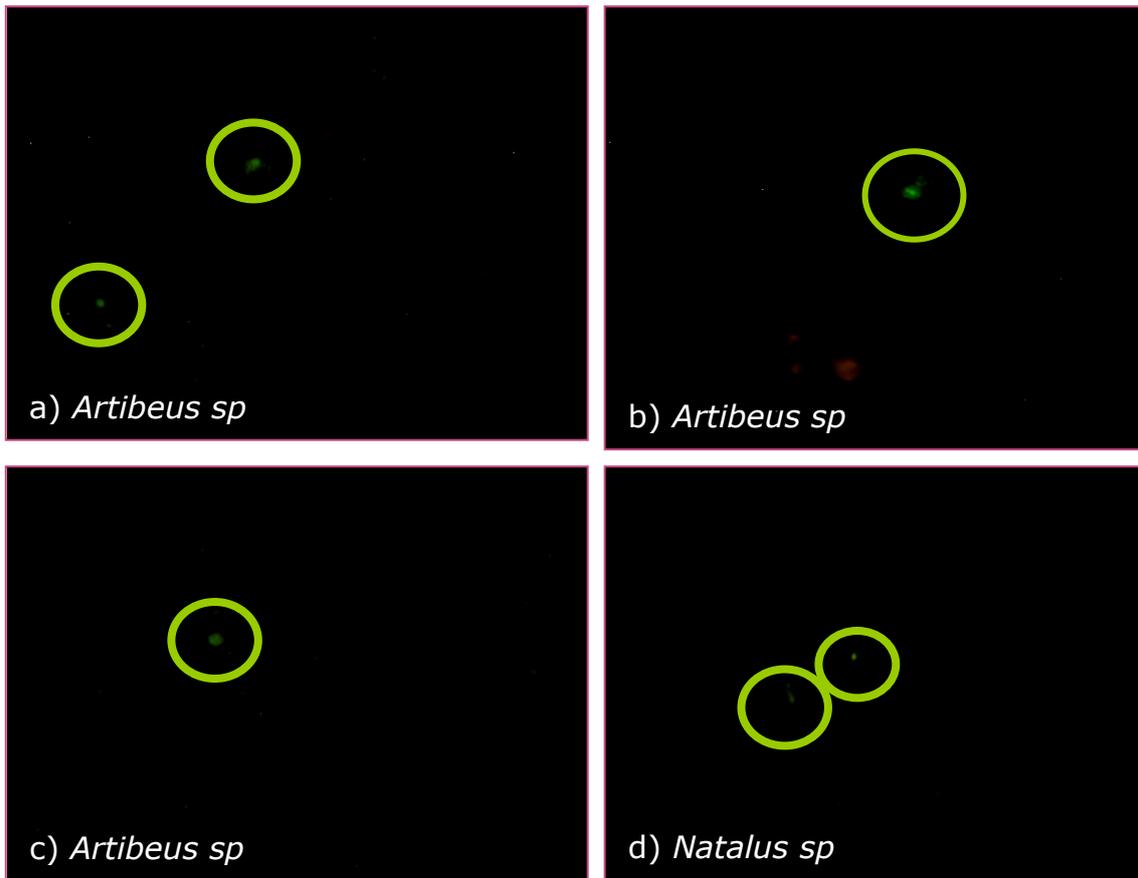


Figura 7. Inmunofluorescencia positiva en muestras de cerebros de murciélagos no hematófagos (*Artibeus sp* y *Natalus sp.*). En todas las fotografías se observa delimitada por un círculo, la inmunofluorescencia positiva marcada en color verde (visto en epifluorescencia) a 100X.

En las improntas de los cerebros de murciélagos no hematófagos *Artibeus sp*, *Natalus sp* y *Leptonycteris sp*, se pudo observar la presencia de corpúsculos con una intensidad menor en comparación a la muestra de *Pteronotus davyi* en donde la fluorescencia era muy evidente (compare Figuras 6,7 y 8 con la 9).

La identificación de virus rabia en el estado de Sinaloa resultó ser importante porque en este estado de la República prácticamente no existen estudios de epidemiológicos de rabia.

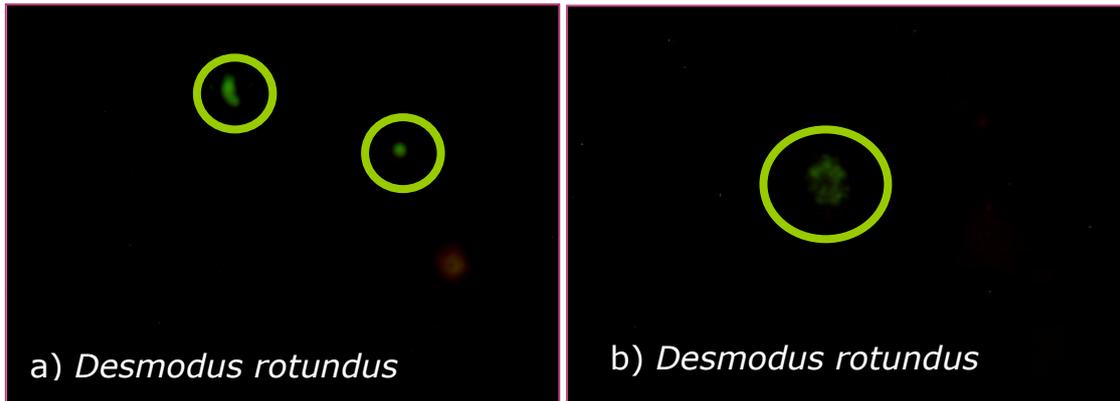


Figura 8. **Inmunofluorescencia positiva en muestras de cerebros de murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*)**. Fotografías de las improntas en donde se observa delimitada por un círculo, la inmunofluorescencia positiva marcada en color verde (visto en epifluorescencia) a 100X.

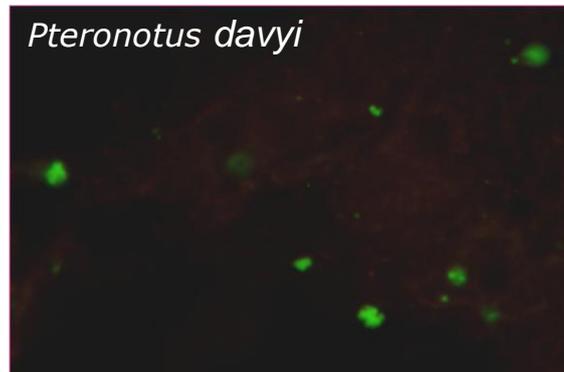


Figura 9. **Inmunofluorescencia positiva en muestra de cerebro de murciélago no hematófago (*Pteronotus davyi*)**. Fotografía de la impronta en donde se observa la inmunofluorescencia positiva marcada en color verde (visto en epifluorescencia) a 100X. Muestra procedente del municipio de Guasave, Sinaloa.

Los resultados de todos los análisis por inmunofluorescencia indirecta mostraron que sólo dos murciélagos hematófagos de 113 resultó positivo al virus rabia (Tabla 9), lo que corresponde a una prevalencia de 0.028; mientras que en el caso de murciélagos no hematófagos se encontraron ocho de 142 muestras analizadas, en este caso la prevalencia fue de 0.057, es decir, fue tres veces mayor que en el caso de los hematófagos; lo cual sugeriría la participación de los murciélagos no hematófagos en el mantenimiento de los ciclos de transmisión del virus de rabia.

Tabla 9. Municipios con murciélagos positivos a IFD

MUNICIPIO	ESPECIE				PREVALENCIA	
	Hematófago	IF +	No Hematófago	IF +	Hemató-fago	No Hematófago
Cueva el Nacimiento Municipio Las Tanajas	(25) <i>Desmodus rotundus</i>	1	(2) <i>Mormoops sp</i>	0	1/28	6/59
			(8) <i>Anoura sp</i>	0		
			(1) <i>Enchistenes sp</i>	1		
	(3) <i>Diphylla ecaudata</i>	0	(2) <i>Pteronotus sp</i>	0		
			(9) <i>Leptonycteris sp</i>	2		
			(37) <i>Artibeus sp</i>	3		
Túnel Ejido: El fraile (colinda con los Edos. Tamaulipas y vo. León) Municipio: Guadalcázar	(9) <i>Desmodus rotundus</i>	1	(34) <i>Mormoops sp</i>	0	1/9	0/34
Ejido Rancho Nuevo Municipio Sn. Ciro de Acosta	(1) <i>Desmodus rotundus</i>	0	(8) <i>Natalus sp</i>	1	0/1	1/12
			(4) <i>Anoura sp</i>	0		
Tanquintíán			(4) <i>Promops sp</i>	0		0/4
Río Verde	(2) <i>Desmodus rotundus</i>	0			0/2	
Álvaro Obregón	(10) <i>Desmodus rotundus</i>	0			0/10	
Aquismón "El cafetal" "La joya"	(42) <i>Desmodus rotundus</i> (21) <i>Desmodus rotundus</i>				0/42	
					0/21	
Cueva 1 Arroyo pelón, Municipio de Guasave Localidad Cerro cabezón Edo. Sinaloa			(32) <i>Balantiopteryx alicata</i>	0		1/33
			(1) <i>Pteronotus davyi</i>	1		
			Prevalencia total Porcentaje		0.018 1.8%	0.057 5.7%

C) Aislamiento viral en cultivos celulares.

Se realizó la estandarización de la infección de un cultivo de células BHK-21 con un control positivo al virus de la rabia (cepa LP2061) proporcionado por la colaboración con SENASICA-SAGARPA. Este experimento se realizó con la finalidad de obtener el virus en mayor cantidad para los estudios posteriores.

Al realizar el seguimiento del efecto citopático en las células, se observó el cambio de la morfología celular a las 48h, las células presentaron arredondamiento y agregación, finalmente lisis celular a las 72h, que corresponde a un efecto citopático característico (Figura 10).

Se llevo a cabo la lisis total de las células por congelación y se recuperaron los sobrenadantes. Se hizo una segunda infección celular bajo las mismas condiciones que en la primera infección y se observaron los mismos efectos citopáticos. También se recuperaron los sobrenadantes y se le realizó la prueba de RT-PCR para la confirmación de la presencia del virus.

Además se realizó la prueba de IFD a las células para verificar que el efecto citopático se debía a la presencia del virus de la rabia. En las preparaciones se observaron los corpúsculos de Negri, que son indicativos de la presencia del virus (Figura 11). Con ellos verificamos que el efecto citopático producido en las células fue causado por la infección del virus.

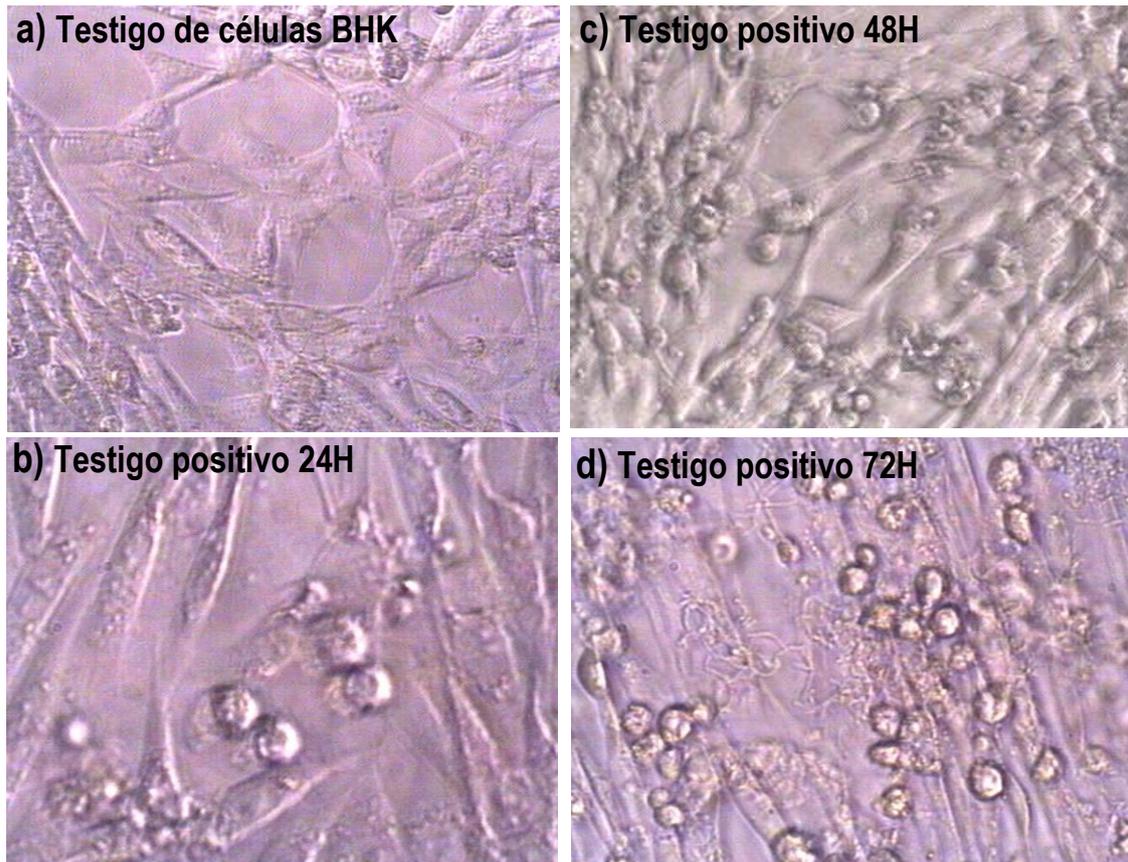


Figura 10. **Células BHK21 infectadas con el virus de la rabia** observadas a 10x. a) Células sin infección, se observa una monocapa uniforme con morfología celular normal. b) Células con 24 h de infección, se observa arredondamiento celular. c) Células con 48 h de infección, se observa arredondamiento celular en toda la monocapa. d) células con 72 h de infección, se observó células redondas y desprendimiento de la monocapa.

Las muestras positivas a IFD fueron utilizadas para realizar la infección de células BHK-21, estos cultivos fueron incubados hasta por 96 h y se observó que hubo efecto citopático poco evidente. La muestra positiva que fue colectada en el estado de Sinaloa, no fue inoculada en cultivo de células, sino que fue procesada directamente por RT-PCR.

Al cultivo de células con efecto citopático a las 48 h, se le realizó la técnica de IFD y se observaron células con presencia de corpúsculos de Negri, como se observa en la figura 11. Se observaron en el interior de la célula (figura 11a y 11b), estas inclusiones también se pudieron ver en la superficie celular, lo que nos indica que existió un reconocimiento virus-célula (figura 11c y 11d) y una infección celular.

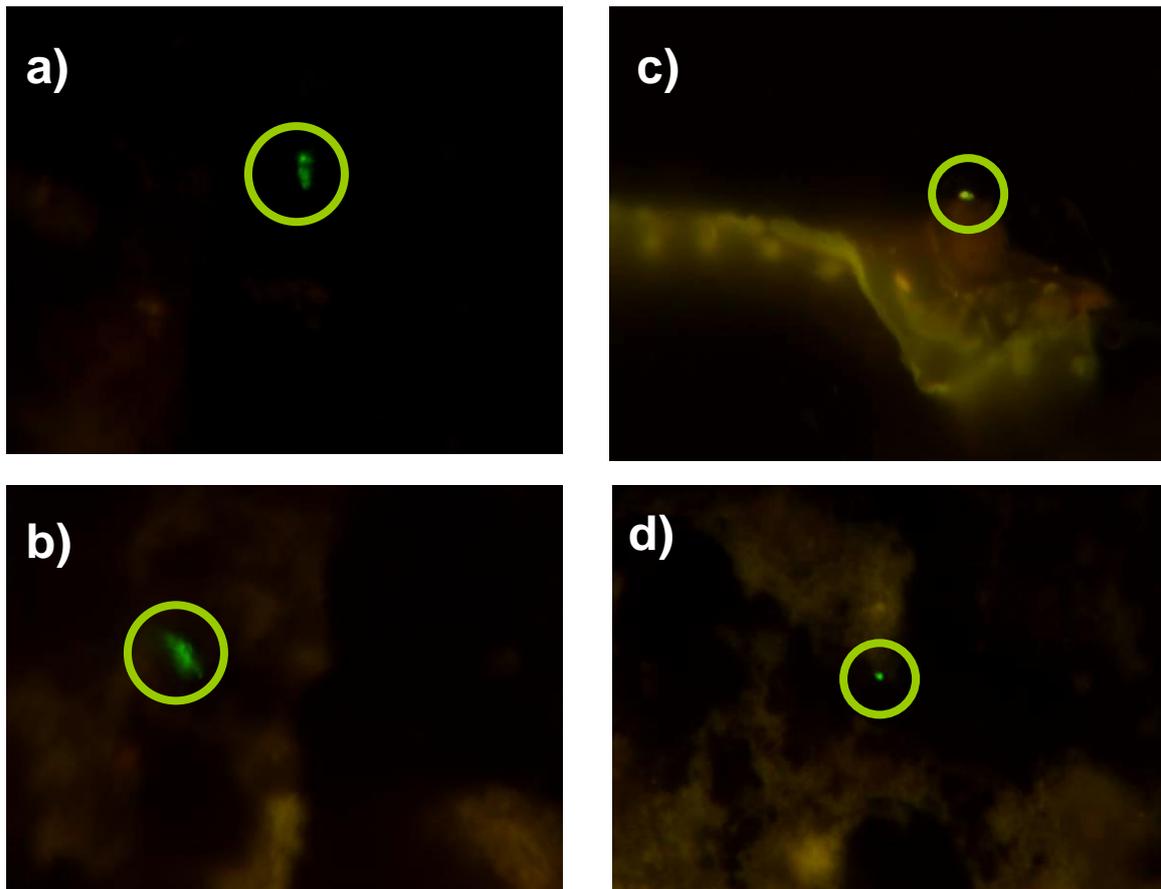


Figura 11. **Células BHK21 infectadas con IFD positiva a rabia.** Fotografías de células BHK-21 en donde se muestra la presencia de corpúsculos de Negri después de 48 h de infección, 100X. a y b) inclusiones del virus de la rabia en el interior de la célula BHK-21. c y d) inclusiones del virus de la rabia en la superficie celular.

D) Análisis de las muestras por técnicas RT-PCR.

Se realizó la técnica de RT-PCR con el Kit comercial One step RT-PCR, para la detección de un fragmento de 760pb, correspondiente al gen N. Las condiciones óptimas que se establecieron son las indicadas en los métodos; después los productos de la reacción se separaron en geles de agarosa al 1.8%.

Para la estandarización del PCR se utilizó como testigo positivo la cepa vacunal LP6021 y una muestra de cerebro de murciélago hematófago, colectado en la localidad El varal, Municipio de Tamasopo, estado de San Luis Potosí, y que previamente había sido reportada como positiva por el método de IFD por un laboratorio certificado de SAGARPA. La muestra y el Testigo se

analizaron por PCR; los amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa; luego se observaron y fotografiaron en un fotodocumentador; se observó la banda de 760pb, lo que confirmó la presencia del virus en esta muestra y que las condiciones de la técnica de PCR habían quedado ajustadas para aplicarla a muestras provenientes de cerebros (Figura 12).

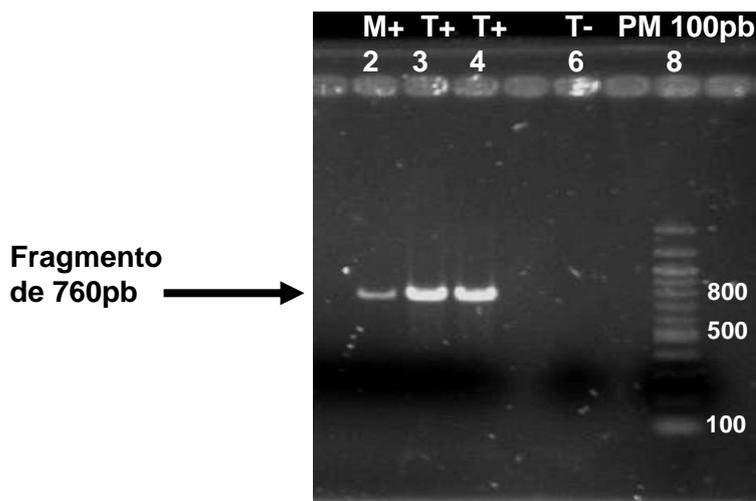


Figura 12. **Fotografía de un gel de agarosa para la detección de un fragmento de 760pb** del gen N del virus de la rabia. Carril 2: muestra positiva, Carril 3 y 4: testigo positivo, Carril 6: testigo negativo, Carril 8: marcador de peso molecular.

Por otra parte, estas muestras y el testigo se emplearon para estandarizar el RT-PCR para la amplificación de un fragmento de 727 pb correspondiente a la región del exodominio de la proteína G; para la cual, se utilizó el Kit comercial One step RT-PCR. Se establecieron las condiciones de la reacción y los productos de reacción se desarrollaron en un gel de agarosa al 1.8% (Figura 13); con lo cual quedaron establecidas las condiciones para el PCR; además, estos resultados sugieren que el diseño de los iniciadores fue el adecuado para amplificar este fragmento del G.

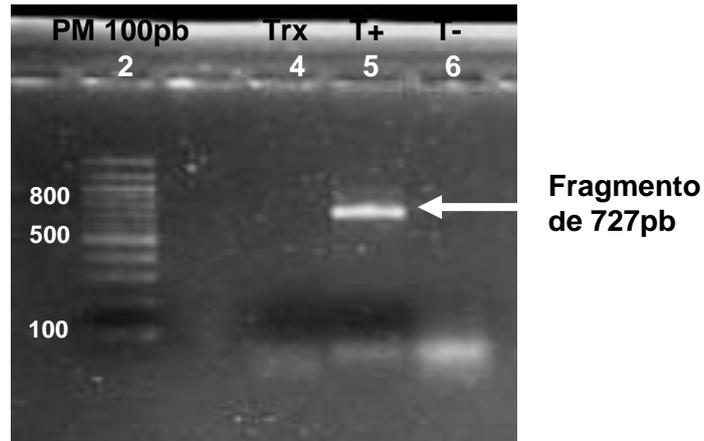


Figura 13. **Fotografía de un gel de agarosa al 1.8% para la detección de un fragmento de 727pb del exodominio del gen G del virus de la rabia.** Carril 2: marcador de peso molecular; Carril 4: testigo de reacción; Carril 5: testigo positivo; Carril 6: testigo negativo.

Se estandarizó la prueba de RT-PCR anidado para la detección de un fragmento interno de 285pb de la región del exodominio del gen G del virus rabia. Se establecieron las condiciones de la reacción y los productos de reacción se corrieron en un gel de agarosa al 1.8% (Figura 14).

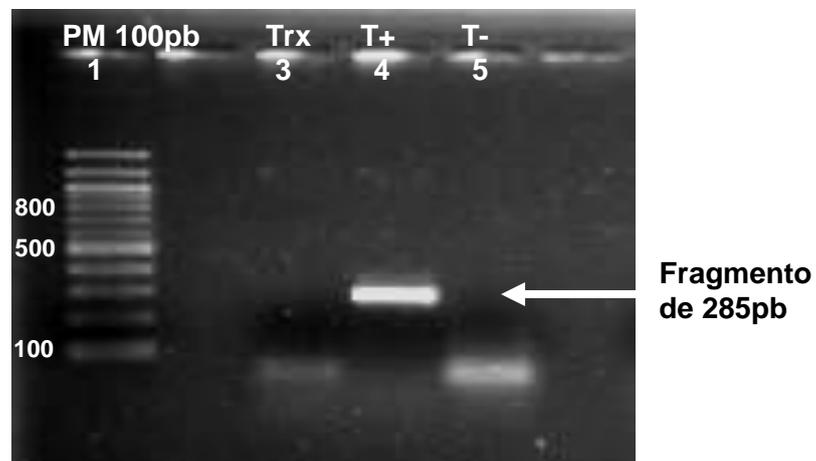


Figura 14. **Fotografía de un gel de agarosa al 1.8% para la detección de un fragmento de 285pb del exodominio del gen G del virus de la rabia.** Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 3: testigo de reacción; Carril 4: testigo positivo; Carril 5: testigo negativo.

La muestra positiva a inmunofluorescencia identificada como IPN Sin-33, que correspondía a un ejemplar macho de la Familia Mormoopidae, de la especie *Pteronotus davayi*, se le realizó la prueba de RT-PCR para la detección de un fragmento de 760pb correspondiente al gen N del virus de la rabia, como

se puede observar en las figura 15 y 16. Así como el RT-PCR para la detección del fragmento de 727pb correspondiente a la región del exodominio de la proteína G, como se ve en la figura 16. Las demás muestras que dieron positiva a la prueba de de IFD y que dieron efecto citopático en el cultivo celular no se pudieron analizar por esta prueba y quedó pendiente su análisis.

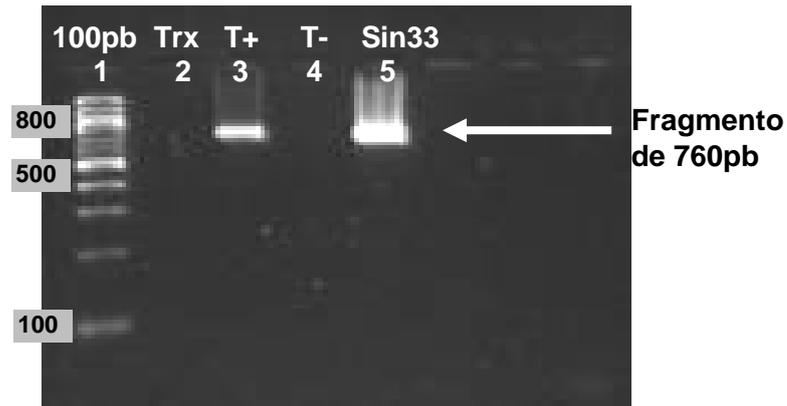


Figura 15. Prueba de RT-PCR para el gen N para la muestra del ejemplar *Pteronotus davyi*. Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: testigo de reacción, Carril 3: testigo positivo, Carril 4: testigo negativo, Carril 5: muestra positiva identificada como Sin-33.

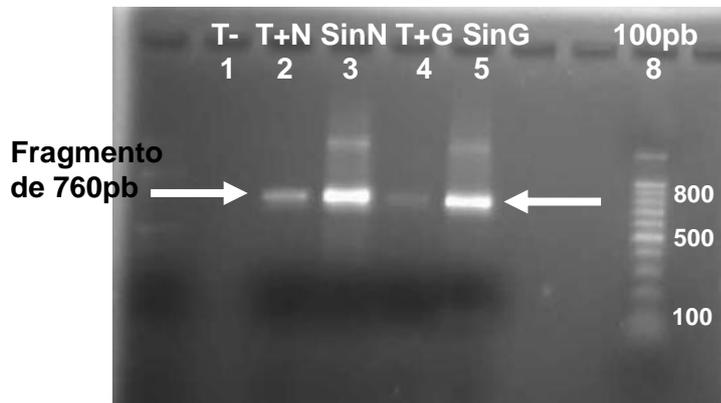


Figura 16. Prueba de RT-PCR para el gen N y G para la muestra del ejemplar *Pteronotus davyi*. Carril 1: testigo negativo, Carril 2: testigo positivo para el gen N, Carril 3: muestra IPN-Sin33 gen N, Carril 4: testigo positivo para el gen G, Carril 5: muestra Sin-33 gen G, Carril 8: marcador de peso molecular.

IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La rabia humana afecta principalmente a la población que vive en condiciones de pobreza extrema, que convive con animales domésticos y que al igual que éstos pudiera exponerse a padecer la enfermedad en cualquiera de sus ciclos, urbano o silvestre.

La OMS señala que los países en desarrollo presentan más del 99% de las muertes por rabia humana y que esta zoonosis no ha sido puesta bajo control en la mayoría de los países afectados. En África y Asia se estiman hasta 55 mil defunciones anuales. En Latinoamérica (LA) la tendencia descendente de la enfermedad ha sido desde que la OPS promovió la iniciativa de eliminar la rabia humana transmitida por perro para el año 2005.

Sin embargo, la transmitida por murciélago ha tenido un repunte importante, principalmente en países de América donde los brotes han afectado a numerosas personas al mismo tiempo. Esta problemática no es nueva, pues en Chile (Mattos *et al.*, 200) Brasil (Kobayashi *et al.*, 2005) y Perú (Warner *et al.*, 1999) ya han reportado brotes en la región del Amazonas, en áreas donde la población vive en condiciones precarias que facilitan las agresiones por quirópteros, como consecuencia de métodos de producción agropecuaria que modifican el hábitat local de las especies silvestres (desmontes, minería, desplazamiento local del ganado). En esas situaciones, las agresiones reportadas siempre fueron nocturnas, con el 62.9% de las mordeduras en los pies, el 2.9% en la cabeza y 22.9% en otros lugares del cuerpo.

Debido al papel que juegan los murciélagos hematófagos en el ciclo de transmisión de la rabia hacia animales domésticos como el ganado y los perros, así como en otros animales de vida silvestre, se decidió estudiar en este trabajo la prevalencia del virus de la rabia en los murciélagos hematófagos; así mismo se incluyó en el estudio a los murciélagos no hematófagos ya que estos por lo general viven en las mismas cuevas con los hematófagos y pudieran participar en la conservación y diseminación del virus dentro de la cueva.

Este estudio se limitó a dos áreas de la República mexicana, la Huasteca Potosina y una región del Estado de Sinaloa. En el primer caso se presentan anualmente un número considerable de casos de rabia paralítica bovina provocada por mordeduras de murciélagos hematófagos; por lo tanto esta región está en constante monitoreo dentro del programa de control y vigilancia de la rabia de SAGARPA en conjunto con los comités estatales del Servicio Nacional de Sanidad, por lo que los sitios visitados estaban ya designados por este plan en el estado de San Luis Potosí el cual se ha realizado desde hace 16 años; en este programa se realizan capturas de murciélagos hematófagos para ponerles warfarina en sus espaldas con el fin de que estos murciélagos al llegar a sus cuevas sean acicalados por sus congéneres, con lo cual ingieren la sustancia anticoagulante lo que les ocasiona la muerte; este programa sólo se realiza cuando el ganadero reporta casos de mordedura por murciélagos o cuando se ha reportado casos de rabia paralítica bovina. Cabe mencionar que durante los programas de captura también se pueden atrapar murciélagos no-hematófagos, los cuales tradicionalmente se han liberado. Nuestro grupo de trabajo junto con otros colaboradores de diferentes instituciones nacionales (SAGARPA, SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA, Y EL CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL-IPN (CIIDIR-IPN) UNIDAS SINALOA como de Estados Unidos (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE-ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE (USDA-APHIS), aprovechamos estos programas de captura de murciélagos para obtener muestras para los estudios de inmunofluorescencia y de Biología Molecular que se propusieron en este estudio para determinar la prevalencia del virus y tratar de identificar las variantes del virus involucradas en esos brotes. Adicionalmente, se realizaron capturas de murciélagos en colocando redes en la entrada de las cuevas.

El estado de Sinaloa se incluyó en este estudio debido a que en este estado no hay suficientes reportes de rabia paralítica bovina o canina, algunos han considerado este estado como libre de rabia. Por lo que resultó interesante incluirlo en el estudio. En este caso sólo se empleó la captura colocando redes

de niebla en la entrada de las cuevas. El monitoreo se realizó en colaboración con el CIIDIR unidad Sinaloa en el municipio de Guasave.

Debido a que el virus de la rabia se debe manejar con medidas de bioseguridad, en este trabajo se vacunó contra rabia a todo el personal que trabajó tanto en la captura como en el procesamiento de las muestras en el Laboratorio; además, en el laboratorio se tiene designado un área especial de trabajo con material y reactivos propios de tal manera que se trata de asegurar la contención del virus para evitar posibles contagios por accidentes. En esta área de trabajo especial se procesaron las muestras con todas las medidas de bioseguridad posibles.

Con base a los resultados de inmunofluorescencia obtenidos, el **4%** (prevalencia de 0.039) de todas las muestras fueron positivas al virus de la rabia. De los cuales, **1.8%**, 2 murciélagos hematófagos, fueron positivos y el **5.7%**, ocho de los no hematófagos fueron positivos al virus rabia, como se puede ver en la tabla 10. De los murciélagos no hematófagos positivos 2 fueron insectívoros (*Natalus sp* y *Pteronotus davyi*), 2 frugívoros (*Artibeus sp* y *Enchisthenes sp*) y 1 polinívoro (*Leptonyscteris*)

Tabla 10. Especies de murciélagos positivos a IFD

	Especie			
	Hematófago	No Hematófago		
		Frugívoro	Insectívoro	Polinívoro
San Luis Potosí	<i>Desmodus rotundus</i>	<i>Artibeus sp</i>	<i>Natalus sp</i>	<i>Leptonycteris sp</i>
		<i>Enchistenes sp</i>		
Sinaloa			<i>Pteronotus davyi</i>	
Número de muestras positivas a IF	2	8		
Prevalencia total	0.018	0.057		
Porcentaje	1.8	5.7		

Estos resultados no se esperaban ya que los murciélagos hematófagos son considerados los transmisores de la enfermedad; sin embargo, la prevalencia fue más alta en los no-hematófagos; estos resultados podrían deberse a que en los programas de control en el Estado de San Luis Potosí abarca la eliminación de murciélagos hematófagos pero los no-hematófagos quedan fuera de estos programas; lo cual implica que en las cuevas estos murciélagos pueden transmitir el virus a los hematófagos cuando estos últimos los agreden; las agresiones pueden deberse a la falta de espacio, lo cual obliga a la lucha por su territorio, o bien por falta de comida que hace que los hematófagos agredan a otros murciélagos para obtener alimento para sus crías, por ejemplo. A pesar de la importancia que podrían tener los murciélagos no-hematófagos en la diseminación del virus de rabia dentro de las cuevas, sería arriesgado para el ecosistema aplicar medidas de eliminación de las especies de murciélagos no-hematófagos ya que cumplen con funciones importantes dentro del ecosistema como la polinización, el control de insectos, la dispersión de semillas, etc. Así que, las medidas de control tienen que seguir una estrategia diferente.

En otros estudios en Latinoamérica se ha determinado que el principal transmisor del virus de la rabia es el murciélago hematófago, *Desmodus rotundus*, que es responsable de la transmisión de la rabia paralítica bovina. Existen otras dos especies hematófagas, *Diphylla ecaudata* y *Diaemus youngii*, las cuales no han sido consideradas como importantes en el mantenimiento del ciclo silvestre de la rabia. En estos estudios también se concluyó que las especies no-hematófagas son reservorios de la rabia y se piensa que mantienen ciclos endémicos independientes (Favi *et al.*, 1999).

México es un país con una gran variedad de especies de murciélagos hematófagos como son *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* y *Diaemus youngi*. La especie *D. rotundus* habita una altura menor a los 2000 msnm a lo largo de los litorales tanto del pacífico como del golfo de México; sin embargo, con mayor frecuencia se han hecho hallazgos de estos murciélagos a una altura mayor y en condiciones de baja humedad. Esto posiblemente se pueda deber a la invasión de sus áreas naturales, así como la accesibilidad del alimento.

En diferentes épocas se han reportado cada vez más especies de murciélagos no-hematófagos involucradas en la transmisión del virus de la rabia, como en Florida 1953 se notificó un caso de rabia por murciélago de la especie *Lasiurus intermedius*; en Europa se ha aislado el virus en ejemplares de las especies *Epseticus serotinus* y *Myotis dasycneme* (que fueron de importancia pública), así como en Colombia (Mejía *et al.*, 2001).

En Latinoamérica existen aproximadamente 250 especies de murciélagos no-hematófagos; los cuales pueden estar involucrados de una forma u otra en la transmisión de este virus; por ejemplo, en Chile la rabia canina se erradicó desde 1985 y la enfermedad se mantiene en un ciclo silvestre principalmente por la especie *Tadarida brasiliensis*; en México se han identificado una gran variedad de especies que pueden participar en estos ciclos tales como *Mormoops sp.*, *Artibeus sp.*, *Leptonycteris sp.*, etc. (Romero-Almaraz, M. 2006); las poblaciones de murciélagos no hematófagos en México es muy diversa por ejemplo, *Lasiurus sp*, *Artibeus sp.*, *Mormoops sp*, *Pteronotus sp*, *Micronycteris sp*, *Leptonictoris sp.* etc. muchas de ellas se les pueden encontrar en todo el país. Cabe mencionar que también en este

trabajo se encontró que algunas de estas especies de murciélagos no-hematófagos fueron como positivas al virus de rabia, además de *Natalus sp.*, *Pteronotus davyi*; lo cual sugiere que otras especies pueden estar involucradas y que no se han encontrado como portadoras de este virus. *La especie Pteronotus davyi es la primera vez que se reporta como positivo a virus de rabia en México.*

Por otro lado la complejidad de la diseminación de la rabia y su control se ha incrementado en el mundo a lo largo de los años, no solo en su ciclo urbano sino que cada vez se le pone mayor énfasis al ciclo silvestre, ya que el manejo de los factores biológicos y ecológicos es complicado. La complejidad se incrementa cuando se considera que existen diferentes variantes del virus de la rabia en México y el mundo, y que estas variantes se relacionan con diferentes especies de carnívoros silvestres tales como mapaches, zorros, mofetas, etc. y otras se relacionan con murciélagos.

Una medida de control que se ha sido efectiva para el control de la rabia en su ciclo urbano es la vacunación; sin embargo, se han hecho intentos para llevar a cabo pruebas para desarrollar vacunas para algunas especies de vida silvestre, pero es difícil, costoso y con resultados pobres (Hanlon *et al.*, 1999); hasta hace poco en Estados Unidos se estaba intentando vacunar algunos animales como mapaches y zorros; sin embargo el costo es muy alto con respecto al beneficio proporcionado a estas poblaciones.

El diagnóstico de rabia por inmunofluorescencia directa tiene sus ventajas por ser relativamente de bajo costo y más accesible a los laboratorios regionales de diagnóstico de rabia en México; sin embargo, este tipo de estudios tiene la desventaja de que el resultado depende de la pericia del técnico de laboratorio para dar un resultado certero; además, de su baja sensibilidad, se ve limitado a dar un resultado positivo o negativo sin poder dar información acerca de la variante del virus involucrada en la enfermedad. Por ello se ha desarrollado un método para la caracterización del virus de la rabia basado en un panel de anticuerpos monoclonales (Díaz *et al.*, 1994), con los cuales se puede identificar por inmunofluorescencia las variantes antigénicas del virus según el perfil de positividad que se encuentra cuando se emplean

estos anticuerpos; es decir, que la combinación de resultados positivos que se generan por estos anticuerpos da la variante del virus y no es que cada anticuerpo monoclonal de positivo a una variante; de esta manera, la identificación de la variante depende de nuevo del criterio del técnico para discriminar entre negativos y positivos, y entre estos últimos diferentes grados de positividad. A pesar de estas limitantes, mediante el empleo de estos anticuerpos se identificaron las variantes que circulan en México (Velasco-Villa *et al.*, 2002) en los murciélagos, ganado vacuno y otras especies y se identificaron las variantes V3 (vampiro), V-4 Murciélago (*Tadarida brasiliensis* spp), V-5 Vampiro (*Desmodus rotundus*), V-9 Murciélago (*Tadarida brasiliensis* mex) y V11 (vampiro), V-8 y V-10 (zorrillo) y V-7 (zorro); incluso se ha identificado la variante 1 (perro) en murciélagos.

Aún cuando se considera que la prueba estándar de oro sigue siendo la inmunofluorescencia, actualmente se están realizando aislamientos en cultivos celulares para el abasto de cepas vacunales y de virus para los estudios moleculares; así mismo se están desarrollando nuevos métodos diagnóstico más eficaces, rápidos y certeros que permitan hacer la diferenciación de las variantes que están ocasionando los brotes. En este contexto este trabajo ha pretendido contribuir al desarrollo de la identificación de virus rabia por técnicas de biología molecular a través de la amplificación de una región conservada del gen N del virus de la rabia; la cual después de ser secuenciada se podrá incorporar a árboles filogenéticos para establecer su relación con otros virus de rabia que están circulando en la República mexicana; esta información podrá ayudar a explicar las rutas de diseminación de los virus en una región o entre regiones o estados de la república.

El estudio del exodominio de la proteína G del virus de rabia es importante ya que esta proteína es la responsable de reconocer los receptores en la superficie de las células; cualquier cambio en la secuencia de aminoácidos de este dominio puede implicar también nuevas adaptaciones a nuevas especies; además, esta región es importante en los mecanismos de inmunidad, ya que los anticuerpos generados contra esta región podrán neutralizar el virus e impedir que se adhiera a la superficie celular, siempre y cuando esta no experimente variaciones significativas que ya no permitan que

le anticuerpo se una. Lo anterior es importante porque se ha visto casos en animales de vida silvestre que han sido vacunados con la cepa vacunal de perro pero que luego han desarrollado rabia debido a que no quedaron protegidos para nuevas variantes del virus que pueden estar apareciendo en vida silvestre. De esta manera, el estudio molecular de esta región en los diferentes virus de rabia aislados permitirá hacer una comparación en esta región de la proteína G y se podría determinar si una cepa puede inducir protección contra otra cepa o no. En este trabajo no se pudo cubrir estos aspectos, por lo que quedarán pendientes para trabajos de investigación posteriores.

CONCLUSIONES

- Se realizó la estandarización de la prueba de Inmunofluorescencia Directa; con la que se encontró que de las 253 muestras de los murciélagos, el 4% resultaron positivos al virus de la rabia (prevalencia de 0.039); los murciélagos no-hematófagos presentaron una prevalencia tres veces mayor que los hematófagos.
- Se observó efecto citopático en el cultivo de células BHK21 a las 48 horas de ser inoculadas con virus de la rabia de la cepa LP1249, en las que se identificó por Inmunofluorescencia Directa este virus, por lo cual se empleará para hacer el aislamiento del virus de rabia en las muestras positivas.
- Se realizó la estandarización de las pruebas de RT-PCR para la del gen N y G del virus de la rabia en murciélagos; así como de PCR anidado para el fragmento de 285pb para el exodominio de la proteína G.
- En la localidad de Cerro cabezón del municipio de Guasave, se encontró un ejemplar positivo al virus de rabia de la especie *Pteronotus davyi*, identificado por ID y por RT-PCR del gen N.

V. BIBLIOGRAFÍA

- Acha, N.P. y B. Szytres. 1992. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Mundial de la Salud, Publicación científica 503, 2da edición. Washington DC, EUA.
- Almeida MF, Martorelli LF, Aires CC, Barros RF, Massad E. 2008. Vaccinating the vampire bat *Desmodus rotundus* against rabies. *Virus Reseach*. Nov. 137(2):275-7.
- Arellano-Sota C. 1988. Vampire bat-transmitted rabies in cattle. *Review Infecions Disease*. 18:707-709.
- Baer, G.M. 1975. *História natural de la rabia*. Mexico, Ed. La Prensa Médica Mexicana. Técnicos, 709.
- Baer, G.M. 1991 *The Natural history of rabies*. 2nd ed. Boca Raton, Florida.
- Belotto, A., L.F. Leanes, M.C. Scheider, H. Tamayo, E. Correa. 2005. Overview of rabies in the Americas. *Virus Research*. 111. 5-12.
- Bourhy, H., Kissi, B. & Tordo, N. 1993. Molecular diversity of the lyssavirus genus. *Virology*. 174:70-81.
- Clark W.R., Fritzell E.K. 2001. A review of population dynamics of furbearers, In: Mccullough DR, Barrtt RH, eds. *Wildlife 2001 populations*.
- Compendium of Animal Rabies Prevention and Control, 2005. National Association of State Public Health Veterinarians, Inc. (NASPHV). March 18, Vol. 54 / No. RR-3
- Control of Diseases Center. 2005. Compendium of Animal Rabies Prevention and Control, 2005. *Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports*. 54 : 1-12.
- De Mattos. C, Carlos A. de Mattos, Elizabeth Loza-Rubio, Alvaro Aguilar, Lillian A. Orciari and Jean S. Smith. 1999. Molecular characterization of rabies virus isolates from Mexico: Implications for transmission dynamics and human risk. *AM. J. TROP. MED. HYG.*, 4 (61): 587-597.
- De Mattos A.C., Favi M., Youg V, 2000. Bat rabies in urban centers in Chile. *Journal of Wildlife Diseases*. 36 (2): 231-240.
- E. Loza-Rubio, E. Rojas-Anaya, V.M. Banda-Ruíz, S.A. Nadin-Davis & B. Cortez-García. 2005. Detection of multiple of rabies RNA using primers designed to target Mexican vampiro bat variants. *Epidemiol. Infect.* 133. 927-934.

El Sistema Nacional de Salud y el Instituto Pasteur: Simposium Internacional sobre Rabia. Vigilancia epidemiológica y prevención; México, 1990.

Fenner, F., Bachman, P.A., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Studdert, M.J., White, O. 1987. Veterinary Virology. Ac. Press Inc. London. pp.254.

Flores, C.R. 1990. Rabia en humanos transmitida por murciélagos vampiros en países de América. Tec. Pecu. Mex. 29 (1): 25

Flores C.R, 2003. Técnicas, sustancias y estrategias para el control de murciélagos vampiros. Organización Panamericana de la Salud. México: 12.

Hanlon C.A, Smith J, Anderson G. 1999. Recommendations of the working group on Rabies, Article II: Laboratory diagnosis of rabies. J Am. Veterinarian Association. 215:1444-6.

Hanlon, C.A., Rupprecht C.E. 1998. The reemergence of rabies. Emerging infections 1. Washington, D.C. 59-80.

Hanlon, C.A, James E. Childs, Victor F. Nettles. 1999. Recommendations of a national working group on prevention and control of rabies in the united states article iii: rabies in wildlife. 11 (215) : 1612-1619

Jiménez R.A. 2003. The actual situation of bovine paralytic rabies. In Posadas E, Cano P. eds. Encuentro Nacional de la Rabia. Puebla, México: Federación de medicos veterinaries. 18-19:24-27.

Jiménez R.A, De la Torre-Gonzalez. 2006. Prevención de la rabia parálitica bovina y control de las poblaciones de vampiros (*Desmodus rotundus*). 1ª ed. Impreso por Laboratorios Bayer.

King, A., Crick, J.1998. Rabies related viruses. In: Campbell JB, Charlton KM (eds). Rabies. Kluwer Ac. Publ. Boston. pp. 65174.

King, A (1998) RABIES *In Zoonoses*, ed by SR PALMER, Lord SOULSEY and D.I.H. SIMPSON, Oxford University Press, Bath Press, Avon, 1998, p.437-458.

Kobayasi y, Sato G, Shoji Y, 2005. Melocular epidemiological Analysis of Bat Rabies Viruses in brazil. Virology. Journal of Veterinary Medicine Science. 67(7):647-652.

Krauss H., Weber A., Appel M.,. 2003. Zoonoses. Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans. 3era Edición. 1: 113-119.

Lucas CH, Pino FV, Baer G, Morales PK, Cedillo VG, Blanco MA, Avila MH. 2008. Rabies control in Mexico. Developments in biologicals.131:167-75.

Martínez-Burnes, J., López, A., Medellín, J., Hanes, D., Loza, E, Martinez, M.1997. An outbreak of vampire battransmitted rabies in cattle in northeastern Mexico. *Can. Vet. J.* 38 :175.

Meltezer, M.I, Rupprecht C.E. 1998. A review of the economics of the prevention and control of rabies. Part II: rabies in dogs, livestock and wildlife. *Pharmacoeconomics.* 14:365-383.

Milosz Faber, Marie-Luise Faber, Amy Papaneri, Michael Bette, Eberhard Weihe, Bernhard Dietzschold, and Matthias J. Schnell. 2005. A Single Amino Acid Change in Rabies Virus Glycoprotein Increases. *Virus Spread and Enhances Virus Pathogenicity. Journal of Virology.* 22 (79) : 14141–14148.

Nadin-Davis, S.A., Susan, Casey, G.A. & Wandeller, A. 1994. A molecular epidemiological study of rabies virus in central Ontario and western Quebec. *J. Gen. Virol.* 75: 2575-2583.

Nagarajan, B. Mohanasubramanian, E. V. Seshagiri, S. B. Nagendrakumar, M. R. Saseendranath, M. L. Satyanarayana, D. Thiagarajan, P. N. Rangarajan and V. A. Srinivasan. 2006. Molecular Epidemiology of Rabies Virus Isolates in India. *Journal of Clinical Microbiology.* 9 (44) : 3218–3224.

Núñez C. Aldez J, 2001. Primer hallazgo de rabia silvestre en el murciélago insectívoro *Eptesicus brasiliensis* en Cali, Colombia. *Rev. Asoc. Col. Cienc.Biolo. Bogotá.* 12(1):57-61.

Office International des Epizooties world Organisation for Animal Health. 2000. *Manual of Standards of Diagnostic Test and Vaccines.* 2.2.5:276-291.

Organización Mundial de la Salud: 8o. Informe del Comité de Expertos de la OMS sobre Rabia. 1992. Serie de Informes Técnicos No. 824.

Organización Mundial de la Salud, 2004. Informe del Comité de Expertos de la OMS sobre Rabia. 2004. Situación de la rabia silvestre en México.

Organización Panamericana para la Salud-Organización Mundial de la Salud.2006. XI REDIPRA REUNIÓN DE DIRECTORES DE LOS PROGRAMAS NACIONALES DE CONTROL DE RABIA EN AMERICA LATINA.

IX Reunión Internacional sobre Avances en la Investigación y Control de la Rabia en las Américas. 8-12 diciembre 1998. Antigenic Characterization of Rabies Virus Isolates from Domestic and Wildlife Animals in Mexico. Masiel Garmendia Mariano y col. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SSA, México.

Ramírez, VM. 1987. Los mecanismos de exposición e infección rábica en el ciclo silvestre. En Simposio. La atención medica de las personas involucradas en un incidente de rabia. OPSIMSS- SSA. México. pp.51-84.

Rico A, Díaz A, Rico E. 2001. Informe de la rabia urbana en Colombia, 1996-2001. Bogotá:Programa de Zoonosis, Ministerio de Salud de la República de Colombia.

Romero-Almaraz M, Aguilar-Setien A, Sánchez-Hernández C. Murciélagos benéficos y vampiros, características, importancia, rabia, control y conservación. 1ª ed. AGT editor, S.A. 2006. México.

Salvador Gómez-Carro, Martín L. Ortiz-Alcaraz, Eusebio Jiménez-Ríos, Saúl De Los Santos-Briones, Enrique Marín-Pech. 2006. Estudio de caso de rabia humana transmitida por murciélago hematófago en Yucatán, México. *Rev Biomed* 2006; 17:118-122.

Sato, G., Takuya I., Youko S., Yasuo, M., 2004. Genetic and Filogenetic analysis of Glicoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.* 66(7):747-753.

Sato G, Kobayashi Y, Motizuki N, Hirano S, Itou T, Cunha EM, Ito FH, Sakai T. 2008. A unique substitution at position 333 on the glycoprotein of rabies virus street strains isolated from non-hematophagous bats in Brazil. *Virus genes*. Oct.22.

Schneider, M.C. y Santos Burgoa. 1995. Algunas consideraciones sobre la rabia humana transmitida por murciélago. *Salud Publica México.* 37:354-362.

Schneider, M.C, Belotto A. Adé M. 2005. Situación epidemiológica de la rabia humana en Latinoamérica en 2004. *Boletín Epidemiológico/OPS*, Vol. 26, No. 1, marzo.

Smith, J.S. & King A.A. 1996. New aspects with emphasis on epidemiology, diagnosis, and prevention of the disease in the United States. *Clin. Microbiol. Rev.* 9(2): 166-176.

Steele J.H. Fernández, P.J. 1991. The natural history: History of rabies and its global aspects. 1-24.

Susan A. Nadin-Davis, Elizabeth Loza Rubio. 2005. The molecular epidemiology of rabies associated with chiropteran host in Mexico. *Virus Research.* 94129: 1-12.

Thiravat Hemachudha, Supaporn Wacharapluesadee, Charles E. Rupprecht, Molruedee La-ongpant, Sasiwimon Juntrakul, and Jessada Denduangboripant. 2003. Sequence Analysis of Rabies Virus in Humans. Exhibiting Encephalitic or Paralytic Rabies. *Human Rabies Virus Genes.* 188 : 960-966.

Trimarchi C.V, Smith J.S. 2002. Diagnostic evaluation. In :Jackson A.C, Wunner W.H. eds. *Rabies.* San Diego, C.A, USA : Academic Press. 307-349.

Vargas, G.R., Cárdenas, L.J. 1996. Epidemiología de la rabia : Situación actual en México. En: Moreno, Ch.R. (ed). *Ciencia Veterinaria* 7: 332-358.

Velasco-Villa, A. 2006. Molecular diversity of rabies viruses associated with bats in Mexico and other countries of the Americas. *J. Clin. Microbiol.* 44 (5):1697-1710.

Velasco-Villa, A., Messenger SL, Orciari LA, Niezgodá M, Blanton JD, Fukagawa C, Rupprecht CE. 2008. New rabies virus variant in Mexican immigrant. *Emerging Infectious Diseases.* Dec;14(12):1906-8.

Wakeley P.R., Jonshon N, McElhinney L, Marston D, Sawyer J, Fooks A. 2006. Development of a real-time, differential RT-PCR TaqMan assay for lyssavirus genotypes 1, 5 and 6. *Developments in biologicals.* 126: 227-36.

Wandeler, A.I., Budde, A., Capt, S., Kappeler, A., Matter, H. 1988. Dog ecology and dogs rabies control. *Rev. Infect. Dis.* 10: S684-S688.

Warner, C., Zaki S, Wun Ju S, Rupprecht C, Laboratory investigation of human deaths from vampire bat rabies in Peru. 1999. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 60(3):502-507.

Wilkinson, L. 1988. Understanding the nature of rabies: An historical perspective. In: Campbell JB, Charlton KM (eds). *Rabies.* Kluwer Ac. Publ. Boston. pp. 1-10.

World Health Organization. 1984 Guidelines for dog rabies control. WHO. Geneva.

Wunner, W.H, Larson J.K, Dietzschold B, Smith C.L.. 1988. The molecular biology of rabies virus. *Rev. Infections Disease.* 10:771-84.

Wunner, W.H. 1991. The chemical composition and molecular structure of rabies viruses. In G. M. Baer (Ed.), *The Natural History of Rabies.* pp. 31-67.