

192



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

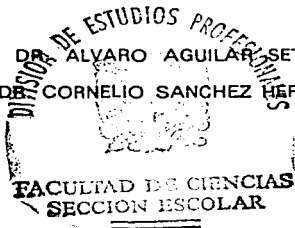
PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA RABIA Y EL VIRUS LPM (FAMILIAS: RHABDOVIRIDAE Y PARAMYXOVIRIDAE) EN MURCIELAGOS NO HEMATOFAGOS (ORDEN: CHIROPTERA) DE DOS LOCALIDADES DEL ESTADO DE COLIMA, MEXICO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MONICA SALAS ROJAS



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTOR: DR. ALVARO AGUILAR SETIEN
CODIRECTOR: DR. CORNELIO SANCHEZ HERNANDEZ



MEXICO, D.F.

2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
Presencia de anticuerpos contra el virus de la rabia y el virus LPM
(Familias: Rhabdoviridae y Paramyxoviridae) en murciélagos no hematófagos
(Orden: Chiroptera) de dos localidades del estado de Colima, México.
realizado por Mónica Salas Rojas
con número de cuenta 9326146-5, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Alvaro Aguilar Setién

Codirector
Propietario

Dr. Cornelio Sánchez Hernández

Propietario

Dra. María de Lourdes Romero Alaraz

Suplente

Dra. María Guadalupe Rico Rosillo

Suplente

Biol. Sabel René Reyes Gómez

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales

FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

DEDICATORIAS

A mis padres

*Felipe Salas Principal y Ma. Enríqueta Rojas Gutiérrez
Por su ejemplo, apoyo, cariño y comprensión, así como por estar
siempre presentes a mi lado. Gracias.*

A mis hermanos

*Tania Viviana y Erik
Por compartir conmigo grandes momentos y estar siempre
juntos.*

A mis tíos

*Ma. Inés Rojas y José Luis Arcos
Por su apoyo y cariño. Gracias por estar a mi lado.*

A Adolfo Calderón Zarza

*Por creer en mí, apoyarme y ayudarme. Gracias por enseñarme
a disfrutar más estos últimos años.*

AGRADECIMIENTOS

A Dr. Álvaro Aguilar Setién por sus enseñanzas, apoyo y confianza para la realización de este proyecto, así como por orientarme y ayudarme. Muchas gracias por sus palabras de aliento.

A Dr. Cornelio Sánchez y la Dra. Ma. de Lourdes Romero por su apoyo e instrucción en el trabajo de campo e identificación de las especies, parte fundamental de este proyecto. Gracias por iniciarme en esta área de la investigación.

A Dr. Gary D. Schnell y al Dr. Michael L. Kennedy por compartir sus conocimientos y apoyar este proyecto.

A la Dra. Ma. Guadalupe Rico y al Biol. S. René Reyes por su valiosa contribución y por sus observaciones a este trabajo.

A la Biol. Emma Lucía Espinosa Laríos su apoyo y enseñanzas en el trabajo de laboratorio, los pequeños detalles convividos y por su amistad.

A Sara González y los biólogos Luz E. Alcántara y Gilberto F. Ruiz por su colaboración en el trabajo de campo y por su amistad.

ÍNDICE

| | página |
|---|--------|
| RESUMEN | 4 |
| INTRODUCCIÓN | 6 |
| Enfermedades transmitidas por murciélagos | 9 |
| Generalidades del virus de la rabia | 11 |
| <i>Ubicación taxonómica</i> | 11 |
| <i>Morfología y composición química</i> | 13 |
| Ciclo de infección del virus de la rabia | 15 |
| Epidemiología del virus de la rabia | 20 |
| Antecedentes del virus de la rabia en murciélagos | 24 |
| Generalidades del virus LPM | 27 |
| <i>Ubicación taxonómica</i> | 27 |
| <i>Morfología y composición química</i> | 29 |
| Ciclo de infección de los paramyxovirus | 32 |
| Antecedentes para el virus LPM | 35 |
| Absorción con papel filtro | 38 |
| OBJETIVOS | 40 |
| ÁREA DE ESTUDIO | 41 |
| Clima | 45 |
| Hidrología | 45 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 46 |
| Captura | 46 |
| Diseño de la técnica para la obtención del suero y su almacenaje | 47 |
| Determinación de anticuerpos contra el virus de la rabia | 49 |
| Trabajo con murciélagos <i>Desmodus rotundus</i> en cautiverio | 53 |
| Detección de anticuerpos contra el virus LPM | 55 |
| Determinación de la interferencia de la PHA-M en la hemoaglutinación | 58 |
| Análisis estadístico | 59 |

| | |
|---|----|
| RESULTADOS | 60 |
| Estandarización de la técnica para obtener el suero | 61 |
| Detección de anticuerpos antirrábicos | 63 |
| Detección de anticuerpos contra el virus LPM | 67 |
| DISCUSIÓN | 68 |
| CONCLUSIONES | 74 |
| LITERATURA CITADA | 77 |
| APÉNDICE 1 | 85 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| | página |
|---|--------|
| Figura 1. Murciélagos <i>Desmodus rotundus</i> . | 10 |
| Figura 2. Esquema de virión de <i>Lyssavirus</i> . | 13 |
| Figura 3. Esquema del genoma del virus de la rabia. | 15 |
| Figura 4. Ciclo de infección de los rhabdovirus. | 16 |
| Figura 5. Microfotografía del virus de la rabia. | 24 |
| Figura 6. Diagrama de virión de un paramyxovirus. | 29 |
| Figura 7. Esquema del genoma de un <i>Rubulavirus</i> . | 30 |
| Figura 8. Ciclo de infección de los paramyxovirus. | 34 |
| Figura 9. Fotografía del virus LPM. | 37 |
| Figura 10. Mapa del estado de Colima. | 42 |
| Figura 11. Área de captura en el municipio de Cuauhtémoc. | 43 |
| Figura 12. Área de captura en el municipio de Manzanillo. | 44 |
| Figura 13. Células de neurablástoma murino (CCL 131). | 50 |
| Figura 14. Células de neurablástoma murino (CCL 131) infectadas con virus de la rabia cepa PV. | 53 |
| Figura 15. Parte del trabajo de campo. | 56 |
| Figura 16. Prueba de inhibición de la hemoaglutinación. | 57 |
| Figura 17. Algunos murciélagos capturados. | 60 |

| | |
|--|----|
| Figura 18. Gráfica de porcentaje de individuos por tipo de alimentación. | 61 |
| Figura 19. Gráfica de nivel de anticuerpos antirrábicos en conejo raza Nueva Zelanda. | 62 |
| Figura 20. Gráfica de nivel anticuerpos antirrábicos en <i>D. rotundus</i> . | 63 |
| Figura 21. Microfotografía de células BHK-21 infectadas con virus de la rabia. | 64 |
| Figura 22. Acercamiento de células BHK-21 infectadas con virus rábico. | 65 |
| Figura 23. Gráfica de murciélagos con anticuerpos antirrábicos según el área de captura. | 67 |
| Tabla 1. Detección de anticuerpos antirrábicos según el área de captura y la especie. | 66 |

RESUMEN

En México se reportan 136 especies de murciélagos, de las cuales 66 se encuentran en el estado de Colima, incluyendo al murciélago vampiro *Desmodus rotundus*, que es el principal transmisor en el ciclo aéreo de la rabia silvestre. La detección de virus rábico en murciélagos no hematófagos de México se remonta a 1943 cuando se le diagnosticó rabia por primera vez a un murciélago frugívoro (*Artibeus* sp.). A principios de 1980 se observó en cerdos de granjas de la región de La Piedad, Michoacán una enfermedad denominada "Síndrome del Ojo Azul o Cerdos Zarcos". En 1984 se aisló un virus proveniente de cerdos de la misma región al que se le nombró paramyxovirus de La Piedad, Michoacán (LPM). Considerando la gran diversidad y abundancia de poblaciones de murciélagos que hay en México es necesario realizar estudios que revelen el papel epidemiológico de los murciélagos no hematófagos en diferentes enfermedades en el país; sin embargo el manejo y transporte de muestras serológicas en el campo se dificulta por lo que la viabilidad se encuentra afectada.

Los objetivos del presente trabajo fueron conocer la presencia de anticuerpos (Ac) contra el virus de la rabia y el virus LPM en murciélagos no hematófagos del estado de Colima, así como utilizar una técnica que facilite el almacenamiento y transporte de los sueros en el campo. Se realizaron dos periodos de captura (de cinco noches cada uno) en los municipios de Cuauhtémoc y Manzanillo del estado de Colima, el primero en una zona de cultivo de temporal (área alterada), y el segundo en la selva baja caducifolia (área conservada). Los murciélagos se capturaron con redes de niebla y entomológicas. La detección de Ac antirrábicos se realizó por la Prueba de Reducción Rápida de Focos

Fluorescentes (PRRFF) y la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH) se utilizó para la determinación de Ac contra el virus LPM. El análisis estadístico se realizó por medio de tablas de contingencia múltiples.

Se capturaron 151 murciélagos, asignables a cuatro familias, 11 géneros y 17 especies. Se encontró que el área de captura influyó en la presencia de anticuerpos antirrábicos en los murciélagos ($p < 0.05$), no así el sexo, género y tipo de alimentación. En la prueba de IH, 99.1% de 108 sueros analizados resultaron negativos. La mayor proporción de murciélagos con anticuerpos antirrábicos encontrados en la zona conservada se puede deber a la mayor abundancia de las poblaciones de las distintas especies. El virus de la rabia se encontraba circulando entre varias especies, sin embargo, la presencia de anticuerpos indica que los murciélagos pueden estar protegidos contra la enfermedad o que está presente otro tipo de lyssavirus que muestra una reacción cruzada con el virus de la rabia. De igual manera en el suero positivo por IH contra el virus LPM puede estar interfiriendo otro paramyxovirus similar, por lo que se sugiere hacer pruebas más detalladas.

Por los resultados obtenidos se considera que es necesario hacer más estudios epidemiológicos y a un nivel más detallado (epidemiología molecular) en la fauna silvestre para conocer mejor el papel que juegan nuestras especies en la transmisión de agentes patógenos y poder desarrollar programas adecuados contra estos últimos.

INTRODUCCIÓN

Los murciélagos constituyen el segundo orden de mamíferos más abundante, actualmente se conocen 966 especies, lo que representa el 25% de todas las especies de mamíferos, su distribución es casi cosmopolita y sólo están ausentes en las regiones polares e islas remotas en los océanos, cerca de 300 especies se encuentran en África y Madagascar, 200 en el sur y centro de América y en el Caribe, y en el sureste de Asia y Australia también son cerca de 200 especies; en latitudes mayores como el norte de América y el oeste y centro de Europa se presentan aproximadamente 40 especies (Altrigham, 1996).

Todos ellos pertenecen al orden Chiroptera que se encuentra dividido en dos subórdenes: Megachiroptera y Microchiroptera, en el suborden Megachiroptera se encuentran los murciélagos de mayor talla, con ojos grandes, orejas simples y en su mayoría sin la capacidad de ecolocalizar, en este suborden se incluyen alrededor de 150 especies pertenecientes a una sola familia: Pteropodidae, que se encuentra distribuida en las regiones de Eurasia, África y Australia; los microquirópteros son murciélagos de menor tamaño, con ojos también pequeños y con la capacidad de ecolocalizar, en este suborden se encuentran cerca de 816 especies agrupadas en 17 familias: Rhinopomatidae, Emballonuridae *, Craseonycteridae, Noctilionidae *, Nycteridae, Megadermatidae, Rhinolophidae, Hipposideridae, Mormoopidae *, Phyllostomidae *, Natalidae *, Furipteridae, Thyropteridae *, Myzopodidae, Vespertilionidae *, Mystacinidae y

Molossidae *; cuya distribución es casi cosmopolita, las familias que se encuentran seguidas por un asterisco están representadas en México (Fenton, 1983).

En el continente americano se reconoce a México como el territorio con el mayor número de especies silvestres de mamíferos nativos (Ramírez-Pulido y Castro-Campillo, 1990) y en el ámbito mundial se encuentra en segundo lugar (Mittermeier y Goettsch de Mittermeier, 1992). Se reportan para el país 450 especies de mamíferos silvestres nativos asignables a 157 géneros, 35 familias y 10 órdenes, sin embargo, la importancia de México radica, mas que por el número total de especies, por los porcentajes de endemismo que en el país se encuentran, y en lo que a mamíferos se refiere 9 géneros y 140 especies son endémicas (Cervantes, Castro-Campillo y Ramírez-Pulido, 1994; Flores y Gerez; 1994).

En cuanto a murciélagos se refiere en México, se reportan 136 especies comprendidas en 59 géneros y 8 familias (Cervantes, Castro-Campillo y Ramírez-Pulido, 1994). Ramírez-Pulido *et al.* (1996) reporta para el país 261 subespecies de quirópteros, que corresponden al 30% de las especies de mamíferos presentes.

En el estado de Colima se han registrado 103 especies de mamíferos, de las cuales 64 son quirópteros (Apéndice 1) (Hall, 1981; Ramírez-Pulido y Castro-Campillo, 1990; Ramírez-Pulido *et al.*, 1983, 1986, 1996), esto representa el 25% de todas las especies de murciélagos del país. El estado tiene cubierta más de la mitad de su superficie por selva baja caducifolia, sin embargo en la década de los

80's hubo una notable reducción del 25% en la superficie cubierta por la vegetación natural; de este porcentaje, el 8.8% corresponde a vegetación secundaria; al mismo tiempo se detectó un incremento del 13.4% de la superficie estatal destinado a actividades agropecuarias (Flores y Gerez; 1994). Colima ocupa el 8° lugar en diversidad de especies de vertebrados endémicos a Mesoamérica y el 15° en número de endemismos estatales; aún así su fauna ha sido pobremente estudiada, en la distribución de vertebrados por tipo de vegetación se encuentra que en la selva baja caducifolia hay registradas 107 especies (Flores y Gerez; 1994).

Los murciélagos juegan un papel muy importante en la ecología ya que por sus hábitos alimenticios intervienen en procesos de polinización, dispersión de semillas y ayudan a mantener el equilibrio ecológico de las poblaciones de insectos, entre otras cosas. Estas mismas funciones los hacen ser importantes en la agricultura; además en la ganadería, el murciélago vampiro *Desmodus rotundus* es muy importante por ser reservorio y transmisor del virus de la rabia o derriengue que causa grandes pérdidas en el ganado y en el ser humano (Álvarez-Castañeda y Álvarez, 1991).

Sin embargo, la mayoría de los estudios epidemiológicos se han hecho en *D. rotundus* olvidando a otras especies de murciélagos a pesar de su gran importancia ecológica y económica, lo que implica que no se han considerado como especies importantes aunque puedan serlo.

Enfermedades transmitidas por murciélagos

Los murciélagos insectívoros se encuentran presentes en muchas regiones del mundo a la fecha sólo ocho géneros se han visto implicados en la transmisión de los *Lyssavirus*: *Eptesicus*, *Myotis*, *Lasiurus*, *Lasionycteris*, *Pipistrellus*, *Tadarida*, *Miniopterus* y *Nycteris* (Smith, Orciari y Yager, 1995) su presencia e importancia varía según la distribución y la biología de cada género, y las diferencias entre cada género influyen en la transmisión y dispersión de los lyssavirus (McColl, Tordo y Aguilar-Setién, 2000). Además los quirópteros también se han relacionado con otros grupos de virus como los paramyxovirus, de los cuales se reporta que en una población de murciélagos del género *Pteropus* en Australia se aisló el virus *Hendra*, el cual pertenece a la familia Paramixoviridae (Westbury, 2000; Young *et al.*, 1996).

Diversos estudios realizados con el murciélago vampiro *D. rotundus* (figura 1) han mostrado que estos pueden ser transmisores de varios microorganismos causantes de enfermedades tales como virus, bacterias, hongos y protozoarios, de los cuales en algunos casos se han encontrado individuos infectados como en la encefalomiелitis equina venezolana (VEE), el virus de la fiebre amarilla (YFV), virus del género *Aphthovirus*, que provoca la fiebre aftosa (Food and Mouth Disease, FMD), leptospirosis, salmonelosis y otras bacterias como *Aeromonas hydrophila* que causan enfermedades gastrointestinales, candidiasis, la enfermedad de Chagas, provocada por el *Trypanosoma cruzi*, la surra o peste boba causada por

T. evansi; de otras enfermedades sus desechos son fuente de infección como la histoplasmosis, scopularosis y de otras enfermedades causadas por hongos (*Microsporium gypseum* y *Allescheria boydii*); y por último de algunas enfermedades sólo se consideran posible vías de transmisión como en la lepra, dengue, la enfermedad de Epstein-Barr, estomatitis vesicular, SIDA, leishmaniasis, malaria, tifo murina y equina, y algunas otras más (Constantine, 1988).



Figura 1. Murciélagos *Desmodus rotundus* en una cueva del estado de Colima (Fotografía por Dr. Cornelio Sánchez).

Generalidades del virus de la rabia

Ubicación taxonómica

El virus de la rabia pertenece al orden Mononegavirales, familia Rhabdoviridae y género *Lyssavirus*. En el orden Mononegavirales se encuentran los virus que presentan un genoma formado por RNA de sentido negativo no segmentado, el orden tiene tres familias: Rhabdoviridae, Filoviridae y Paramyxoviridae (Tordo, 1993). Este orden incluye virus causantes de distintas enfermedades de vertebrados y del hombre, como son los virus de la rabia y de la estomatitis vesicular (Familia Rhabdoviridae), el virus Ébola (Familia Filoviridae), y los virus de parainfluenza, del sarampión y LPM (Familia Paramyxoviridae) (Crainic y Saron, 1993).

La familia Rhabdoviridae contienen más de 200 virus cuyos hospederos varían ampliamente desde vertebrados, invertebrados y plantas (Murphy *et al.*, 1995). Esta variabilidad contrasta enormemente con su estrecha similitud en morfología, estructura y mecanismos de replicación. Los artrópodos son sus vectores más frecuentes y probablemente sean los reservorios originales de los cuales se fueron adaptando hacia plantas y vertebrados (Tordo, Charlton y Wandeler, 1998).

Elementos de esta evolución se sugieren en los ciclos de transmisión de los virus, de manera que el virus sigma infecta solamente a la mosca *Drosophila*;

otros virus tienen ciclos mixtos de artrópodo-planta (virus del amarillamiento necrótico de la lechuga, LNYV) o insecto-mamífero (virus de la estomatitis vesicular, VSV). Se sugiere que algún artrópodo acuático podría transmitir los rhabdovirus de peces (virus de la necrosis hematopoyetica infecciosa, IHNV), sin embargo no hay evidencia de un ciclo de artrópodo-planta-mamífero. Finalmente se encuentran el virus de la rabia y virus relacionados. los cuales tienen como hospederos sólo a los mamíferos (Tordo, Charlton y Wandeler, 1998).

En lo que se refiere a rhabdovirus de importancia en medicina y veterinaria se encuentran tres géneros: *Lyssavirus*, *Vesiculovirus* y *Ephemerovirus*. En los *Lyssavirus* se agrupan al virus de la rabia y virus relacionados, la descripción de estos se hace más adelante. En el género *Vesiculovirus* encontramos al virus de la estomatitis vesicular con seis serotipos bien identificados; este causa periodos de fiebre en ganado, caballos y cerdos, también se presentan ámpulas en la boca que rápidamente se ulceran (Tordo, Charlton y Wandeler, 1998). Dentro de los *Ephemerovirus* se encuentran los virus que son transmitidos de insectos hematófagos al ganado y al búfalo de agua, en áreas tropicales y subtropicales (Walker *et al.*, 1992; 1994), el prototipo de este género es el virus de la fiebre efímera bovina (BEFV) (Tordo, Charlton y Wandeler, 1998).

Dentro del género *Lyssavirus* existen cuatro serotipos diferentes: 1) virus de la rabia, 2) Lagos bat, 3) Mokola y 4) Duvenhage, y los aislados de murciélagos europeos EBL1 y EBL2 (European Bat *Lyssavirus*) que aún no han sido clasificados (Dietzschold *et al.*, 1988; Rupprecht *et al.*, 1991; WHO, 1992). El

análisis filogenético de los genes de la nucleoproteína y la glicoproteína muestran que hay seis genotipos, los cuatro primeros pertenecen a los serotipos ya definidos y los dos restantes a los virus EBL1 y EBL2, por lo que el virus de la rabia pertenece al serogenotipo uno (Bouhry *et al.*, 1993).

Morfología y composición química

El virus de la rabia tienen forma de bala, es decir cilíndrica con un extremo plano y el otro redondeado, el virion mide 180 nm de longitud por 75 nm de diámetro aproximadamente. Esta se puede dividir en dos unidades estructurales distintas: Una fina envoltura exterior (8 nm) con espículas (5 nm) que engloba a una ribonucleocápside central de aspecto denso y estructura helicoidal (Tordo, 1993) (figura 2).

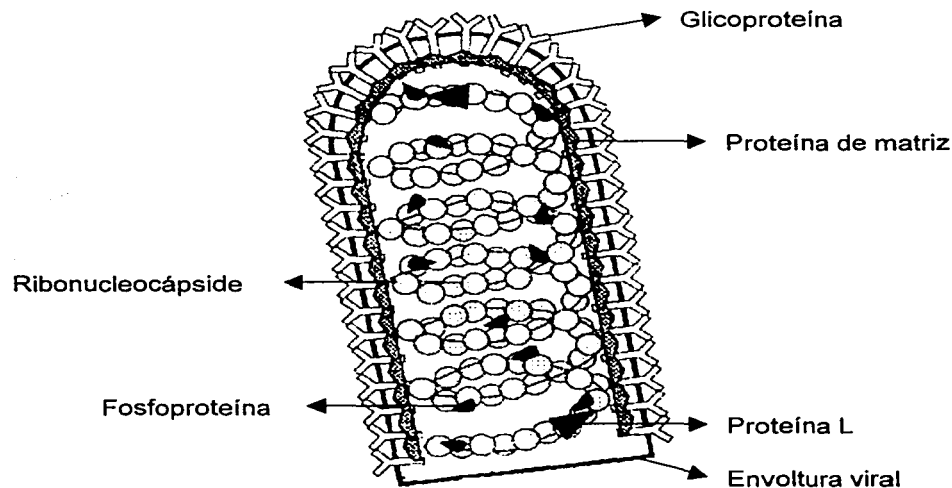


Figura 2. Esquema de un virión de lyssavirus. Modificado de Tordo, 1993.

El virus está compuesto bioquímicamente por 74% de proteínas, 20% de lípidos, 3% de carbohidratos y 3% de RNA (ácido ribonucleico) (Tordo, Charlton y Wandeler, 1998). Su genoma es de RNA lineal no segmentado, de polaridad negativa, mide 12 kb y se encuentra embebido en un complejo ribonucleoproteico helicoidal. Presenta cinco genes que codifican para cinco proteínas:

- La glicoproteína (G), de 70 kD que esta glicosilada y acilada con ácido palmítico, se encuentra anclada a la membrana, constituye las espículas salientes y cada una está compuesta de tres ectodominios, por lo que es la más antigénica.
 - La proteína de matriz (M o M₁), mide 25 kD esta palmitolada y fosforilada, se encuentra tocando la superficie interna de la membrana del virion. Además une a la proteína G con la proteína N.
 - La proteína N es la nucleoproteína o nucleocápside, mide 57 kD y forma parte del complejo ribonucleoproteico fosforilado que envuelve al material genómico.
 - La proteína L nombrada así por ser la más larga mide 180 kD, es la RNA polimerasa del virus y también forma parte del complejo ribonucleoproteico fosforilado.
 - La proteína NS (también nombrada como M₂ o P, por fosfoproteína), mide 38.5 kD, forma el complejo ribonucleoproteico fosforilado. Inicialmente era considerada como no estructural. El complejo formado por estas tres últimas proteínas es el que da la forma de bala al virion.
-

También se encuentra presente el pseudogen Ψ , cuya función aún no a sido definida. Se encuentra localizado entre los genes de las proteínas G y L, tiene 400 nucleótidos y se considera como el vestigio de algún gen que dejó la evolución de los rhabdovirus (Tordo, Charlton y Wandeler, 1998; Tordo, 1993) (Figura 3).

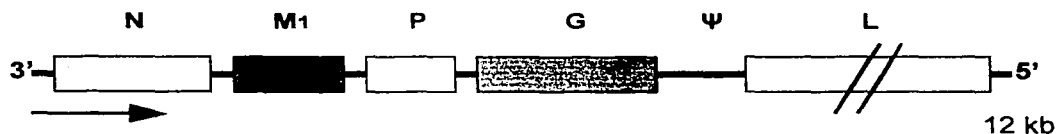


Figura 3. Esquema del genoma del virus de la rabia. Se muestran los cinco genes que codifican para las cinco proteínas respectivas: gen **N**, nucleoproteína; gen **M1**, proteína de matriz; gen **P** (**M2**), fosfoproteína; gen **G**, glicoproteína; gen **L** codifica para la RNA polimerasa, y el pseudogen Ψ . El sentido de la cadena es de 3'-5' por ser de sentido negativo.

Ciclo de infección del virus de la rabia

El virus de la rabia generalmente se transmite mecánicamente por lesiones, mordidas (que rompen la barrera cutánea), y excepcionalmente por aerosoles y lamidos penetrando por la mucosas. Una vez que el virus se encuentra en el organismo entra en una fase de eclipse en el lugar de la herida, en este tiempo el virus no es reconocido en el hospedero, posteriormente el virus penetra en las células musculares o en las terminales nerviosas periféricas dirigiéndose hacia el sistema nervioso central (SNC) vía sinapsis. Una vez en el cerebro comienza una fase de replicación y propagación de manera centrífuga de tal modo que se

infectan tejidos periféricos no nerviosos, como las glándulas salivales para asegurar la transmisión de la enfermedad (Tordo, 1993).

En el proceso de multiplicación del virus ocurren una serie de eventos que forman parte del ciclo de infección, y aunque en las células de los hospederos puedan ocurrir simultáneamente se describen de manera lineal en el siguiente orden: absorción, penetración, liberación del material genético, transcripción, translación, replicación, maduración y construcción de los viriones (figura 4).

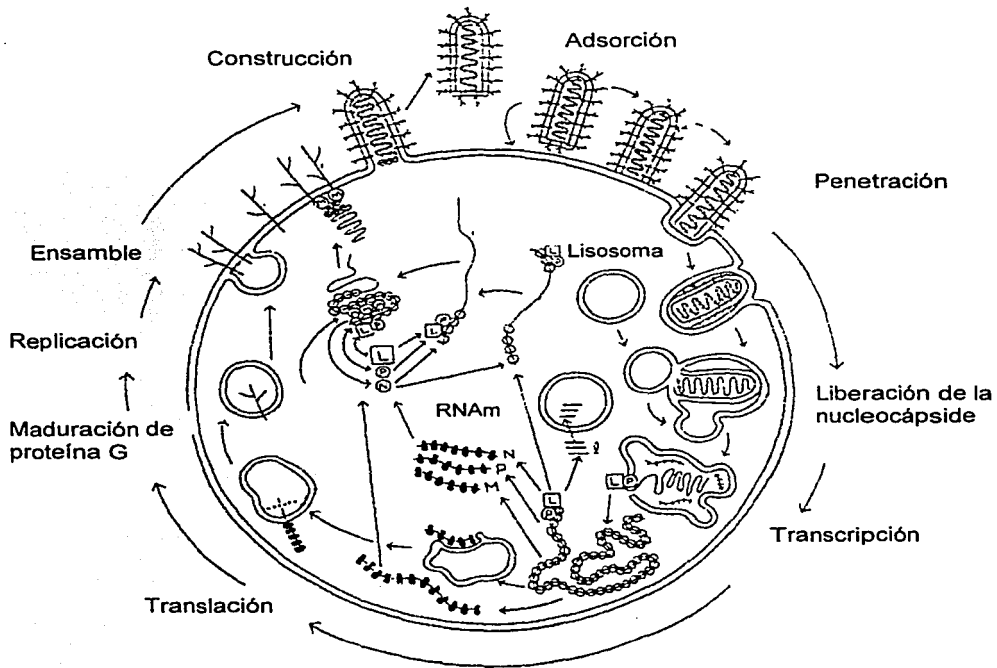


Figura 4. Ciclo de infección de los rhabdovirus. Modificado de Wagner, 1987.

En el proceso de la absorción el virus se fija en la membrana de la célula hospedera mediante trimeros de glicoproteína que reconocen a un receptor específico, varios estudios indican que el receptor nicotínico para acetil colina (AChR) interacciona con el virus de la rabia (Baer y Lentz, 1991; Tordo, 1993); sin embargo, no es el único ya que se ha encontrado que células que no expresan AchR son capaces de unir el virus, estos otros receptores aún no se han definido y probablemente funcionen in vivo (Reagan y Wunner, 1985; Tsiang *et al.*, 1986; Wunner y Reagan, 1986; Lafay *et al.*, 1991; Coulon *et al.*, 1994).

La penetración del virus en el interior celular está dada por un proceso de endocitosis, en el cual una disminución en el pH provoca una fusión entre la membrana del virion y la pared del endosoma, liberándose de esta manera el complejo ribonucleoproteico (RNP) en el citoplasma celular para servir como molde e iniciar la expresión genética. En el caso exclusivo del virus de la rabia el complejo RNP es llevado primero al pericarion neuronal por un flujo axonal retrogrado, para que ahí se lleve a cabo la transcripción (Tordo, Charlton y Wandeler, 1998; Tordo, 1993).

Debido a que el virus presenta un genoma de polaridad negativa es necesario que para la transcripción se formen cadenas complementarias de polaridad positiva, mRNAs. La transcripción inicia cuando la polimerasa viral reconoce al promotor en el extremo 3' del genoma, procediendo hacia el extremo 5'. Se producen primero cinco transcritos monocistrónicos no "capped" y no poliadenilados que sirven como RNA líder para la producción de cinco mRNAs que

codifican para las cinco proteínas virales. La eficacia de la transcripción disminuye de un gen a otro, ya que la transcriptasa deja de funcionar en cada señal de poliadenilación, pasa a través de la región intergénica y comienza a transcribir de nuevo en la siguiente señal de "capping", aunque pareciera que solo se reinicia parcialmente. Probablemente la longitud de la región intergénica examinada influya en la eficacia de la reiniciación. Los periodos de arresto entre cada gen pueden corresponder a las señales de poliadenilación y "capping" de los genes (Tordo, Charlton y Wandeler, 1998; Tordo, 1993).

La replicación comienza después de la síntesis previa de las proteínas virales. La polimerasa encargada de la replicación forma grandes cadenas de polaridad positiva anti-genoma que se ocupan en la producción del genoma para los nuevos virones. Ambas cadenas genoma y anti-genoma deben ser cubiertas por el complejo RNP para evitar su degradación, por esto primero debe haber una síntesis de las proteínas que forman dicho complejo (Tordo, Charlton y Wandeler, 1998; Tordo, 1993).

La cantidad de nucleoproteína presente en el medio intracelular es importante para la regulación entre los procesos de transcripción y replicación. Cuando hay una baja concentración de esta proteína la polimerasa se detiene al final del RNA líder y se inicia la señal de transcripción para el mRNA, lo cual da el inicio para el proceso de transcripción. La traducción de los mRNAs dan como resultado la producción de más proteínas virales. A altos niveles de nucleoproteína, la encapsidación simultanea evita que la polimerasa se detenga al

final del RNA líder, cambiando así a un modo continuo que da inicio al proceso de replicación (Tordo, Charlton y Wandeler, 1998; Tordo, 1993).

La translación ocurre entre la transcripción y la replicación y esta mediada por mecanismos celulares. Todas las proteínas virales son producidas por ribosomas libres, excepto la proteína G la cual debe ser producida por ribosomas unidos al retículo endoplásmico rugoso, ya que se sintetiza como un proteína transmembranal. Llega a la membrana citoplásmica vía Aparato de Golgi. Esta proteína se sintetiza de un modo inactivo y se activa hasta que llega a la superficie celular y por un aumento del pH se convierte a su estado natural (Tordo, Charlton y Wandeler, 1998; Tordo, 1993).

Una vez que las proteínas han sido sintetizadas y los complejos ribonucleoproteicos nuevos se han formado, la proteína de matriz lleva acabo dos funciones muy importantes, inhibe la transcripción y replicación, y compacta la ribonucleoproteína en una forma helicoidal acercándola hacia la membrana celular, en el lugar donde se encuentra la glicoproteína. De esta manera se ponen en contacto ambas partes y se forma nuevos viriones que salen de la célula con parte de la membrana de citoplasmática de la célula hospedera (Tordo, Charlton y Wandeler, 1998; Tordo, 1993).

Epidemiología del virus de la rabia

El virus de la rabia puede afectar a todos los mamíferos de sangre caliente y por esto tiene una distribución casi mundial. Las especies susceptibles a la rabia pueden ser divididas en dos categorías: la primera como reservorios, es decir animales que mantienen el virus y lo diseminan de manera eficaz, los cuales son principalmente predadores (perros, zorros, lobos, mapaches, zorrillos y el murciélago *Desmodus rotundus*, entre otros). El segundo grupo lo conforman los animales que aunque padecen la rabia no la diseminan de manera eficaz, tal es el caso de los herbívoros u omnívoros, los cuales son considerados fondos epidemiológicos de saco o huéspedes incidentales (Aguilar-Setién y Loza-Rubio, 1999).

La rabia se puede dividir por sus ciclos en urbana y silvestre. En la rabia urbana, el perro (en algunas ocasiones el gato) es el principal vector. La rabia silvestre se divide a su vez en ciclo terrestre y aéreo; en el ciclo terrestre de la rabia silvestre los vectores pueden ser varias especies dependiendo del sitio afectado (por ejemplo zorro rojo, *Vulpes vulpes*, en Europa; mangostas en las Islas del Caribe; zorros, mapaches, zorrillos, lobos y coyotes en Estados Unidos y Canadá). El principal vector de la rabia silvestre de ciclo aéreo es el murciélago *D. rotundus*, el cual afecta principalmente al ganado; sin embargo no se han realizado estudios para determinar si otras especies de murciélagos también

pueden ser importantes reservorios del virus de la rabia (Aguilar-Setién y Loza-Rubio, 1999).

En los países en los que la rabia canina (urbana) ha sido controlada y en los que también la rabia silvestre terrestre lo está siendo, se ha encontrado que los murciélagos no hematófagos (insectívoros principalmente) son transmisores ocasionales de la rabia. Sin embargo en México la situación geográfica que presenta hace que además de los vectores silvestres que se encuentran en regiones nórdicas (zorro, coyote, zorrillo, lobo, murciélagos insectívoros), también se encuentra el murciélago *D. rotundus*, que se localiza en regiones tropicales y subtropicales de América (Aguilar-Setién y Loza-Rubio, 1999).

La introducción del ganado en Latino América por los exploradores españoles tuvo importantes consecuencias en la ecología de las poblaciones del murciélago *D. rotundus*, ya que la aparición de una fuente masiva de alimento provocó una gran proliferación y con esto un aumento en la prevalencia de la rabia, particularmente para el ganado y los humanos. La rabia transmitida por el murciélago *D. rotundus* causa grandes pérdidas en la ganadería reportándose hasta 100, 000 casos de rabia paralítica bovina por año (Acha y Arámbulo, 1985). Además de ser también un importante vector en casos de rabia en humanos, así en 1975 más de 490 casos en América Latina se relacionaron con murciélagos hematófagos (Pan American Health Organization, 1991).

En México la rabia urbana se está controlando por medio de campañas de vacunación masivas dirigidas a perros y animales domésticos (Navarrete-Navarro *et al.*, 1999), sin embargo con la disminución de la rabia urbana, la rabia silvestre transmitida por murciélagos hematófagos su vuelve más importante (McColl, Tordo y Aguilar-Setién, 2000).

Como el murciélago *D. rotundus* no es una especie migratoria, la dispersión de la rabia depende de la interacción de individuos infectados de una colonia con los de otra colonia vecina, de esta forma la dispersión del virus puede avanzar de 5 a 10 km por año y la dirección depende de la densidad de las poblaciones vecinas de murciélagos (Lord *et al.*, 1975; Lord, 1988), y de la topografía, así en 1994, en Chiapas, México, la rabia transmitida por murciélago hematófago avanzó de la región montañosa hacia la costa a través de un corredor formado por un cañón (Aguilar-Setién, comunicación personal).

Asimismo, la alteración de nuevas áreas en la región tropical del país ha beneficiado el desarrollo de las poblaciones de murciélagos hematófagos, a través de la construcción de puentes, casas y canales de irrigación y drenaje que sirven como refugio, lo que provoca que la distribución de la rabia transmitida por el murciélago aumente de forma variable y poco definida, de tal manera que en la década de los 70's el área comprendida por los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Quintana Roo se encontraban libres de rabia y ahora sólo una pequeña región del estado de Tabasco (8%) se encuentra libre del virus (Batalla, Labradero y Flore-Crespo, 1996; Fernández-Calderón, 1999).

Aguilar-Setién *et al.* (1998) reportaron que los murciélagos hematófagos *D. rotundus* son menos susceptibles al virus aislado de murciélagos, que las zorras al virus aislado de zorras, además mostró que la mortalidad de los murciélagos puede ser muy alta (89%) en dosis de 10^6 LD₅₀. Experimentos realizados en murciélagos frugívoros reportan datos similares lo que sugiere que los murciélagos hematófagos y frugívoros son poco susceptible a aislados de murciélagos insectívoros, pero que también hay una pérdida de la relación dosis-respuesta entre el virus y los murciélagos (Delpietro y Russo, 1996; Ressang, Gwan y Hardjosworo, 1963; McColl, Chamberlain, Lunt, Newbury, Middleton y Wetsbury, observaciones no publicadas).

Los murciélagos tienen un papel muy importante en la epidemiología de los lyssavirus. La transmisión de lyssavirus de murciélagos a mamíferos terrestres ha sido reportada sólo en algunos casos, y la transmisión entre diferentes especies de murciélagos ha sido observada y demostrada por estudios de epidemiología molecular del virus (Amengual *et al.*, 1997; Loza-Rubio *et al.*, 1999; Smith, Orciari y Yager, 1995; Bell, 1980). Al parecer cada especie de murciélago actúa como vector de una variante del virus de la rabia lo que sugiere una adaptación precisa virus-murciélago, por lo cual se piensa que lleva mucho tiempo de coevolución (McColl, Tordo y Aguilar-Setién, 2000).

Antecedentes del virus de la rabia en murciélagos

La rabia en murciélagos no hematófagos fue diagnosticada por primera vez en murciélagos insectívoros y frugívoros de Trinidad en el año de 1931 (Pawan, 1936). En México fue en 1943 cuando el virus de la rabia fue identificado por primera vez en un murciélagó frugívoro (*Artibeus* sp.) (Téllez-Giron, 1944). En 1953 se confirmó rabia en murciélagos insectívoros en Estados Unidos (Scatterday, 1954; Venters *et al.*, 1954). También se ha encontrado el virus de la rabia en murciélagos de otras regiones como Europa, varias partes de África y la región antes denominada como Unión Soviética (King, Davies y Lawrie, 1990) (figura 5).

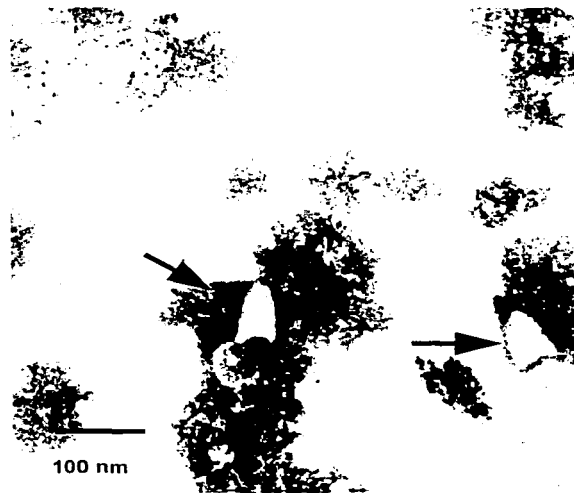


Figura 5. Microfotografía en tinción negativa en la que se observa el virus de la rabia. Las flechas señalan los rhabdovirus. Aguilar-Setién *et al.*

En una colonia de murciélagos *Tadarida brasiliensis* de 207 sueros tomados, el 65% presentaban anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia; y como estos murciélagos migran en el invierno pueden ser portadores del virus e infectar a otras especies de murciélagos en diferentes regiones (Baer, 1975). Siguiendo a murciélagos *T. brasiliensis* enfermos de rabia, encontraron dos nuevas especies de murciélagos coloniales *Myotis velifer* y *Antrozous pallidus*, y una especie de murciélago solitario *Lasiurus borealis* que habían sido infectadas (Burns *et al.*, 1956).

Otros estudios realizados en poblaciones de murciélagos *T. brasiliensis mexicana* reportan que de entre el 16 al 80% presentan anticuerpos antirrábicos (Burns y Farinacci, 1955; Burns *et al.*, 1956; Constantine, 1968; Baer, 1975).

En una colonia de murciélagos *T. brasiliensis mexicana*, ubicada en Nuevo México (Lava Cave), se encontró que de 750 murciélagos adultos, el 69% tienen altos niveles de anticuerpos (Ac) antirrábicos clase IgG, y el 2% presentan Ac clase IgM, en animales juveniles se mostraba un incremento en los niveles de Ac clase IgM en los meses de agosto y septiembre. Analizando cerebros por inmunoprinta menos del 1% resultaron positivos para los adultos, mientras que para los juveniles fue del 2%. El aumento de una infección activa en murciélagos juveniles puede indicar que hay una pérdida de protección contra el virus por disminución de los anticuerpos maternos, lo cual deja susceptibles a algunos individuos de la colonia. Sin embargo la alta prevalencia de Ac clase IgG y los

bajos niveles de Ac clase IgM muestran que la colonia puede estar protegida contra el virus de la rabia (Steece y Altenbach, 1989).

En un estudio realizado en murciélagos frugívoros (*Eidolon helvium*), de 50 sueros el 10% presentaron anticuerpos antirrábicos mayores a 0.5 UI/ ml; en el análisis de inmunofluorescencia directa de 25 muestras de cerebros colectados al mismo tiempo que los sueros todos resultaron negativos; además los altos niveles de anticuerpos encontrados en varios sueros de murciélagos sugieren que una infección reciente se presentó (Aghomo, *et al.*, 1990).

En un estudio realizado en la zona del Istmo de Tehuantepec, México, se encontró que de 234 sueros de murciélagos, 17 de ellos (6.8%) presentaban anticuerpos antirrábicos; de los cuales 16 sueros pertenecían a murciélagos no hematófagos (Valdespino, 1983). Un estudio realizado en varias colonias de murciélagos vampiro *D. rotundus*, también en la zona del Istmo de Tehuantepec demostró que más del 33% de los individuos clínicamente sanos de una colonia eran seropositivos (Ortega *et al.*, 1987).

Villa-Ramírez (1966) menciona que cerca de la tercera parte de la población total de murciélagos de México pueden ser hospederos naturales del virus de la rabia, sin embargo la presencia de anticuerpos antirrábicos sólo se detectó en seis de 49 especies y estos pueden ser una fuente de infección para otros mamíferos.

En 1955 se presentó una gran mortandad de murciélagos *Mormoops megalophylla*, que se encontraban en la cueva del "Diablo" y la mina de "Jesús María" en Nuevo León, México; meses antes hubo una notable disminución en los murciélagos que habitan las Cavernas de Carlsbad, Nuevo México; estudios realizados en la última localidad mostraron que más del 50% de los murciélagos muertos o moribundos presentaban rabia. Muestras de suero obtenidas de los murciélagos de esta caverna mostraron anticuerpos antirrábicos (Villa, 1956; Dept. of Public Health Comm. Disease Summary, 4: 11-56).

Generalidades del virus LPM

Ubicación taxonómica

El virus denominado LPM está ubicado en el orden Mononegavirales, Familia Paramyxoviridae y Género *Rubulavirus*. La familia Paramyxoviridae contiene a los agentes causantes de varias enfermedades graves, tanto de animales como del hombre, entre ellas la enfermedad de "Rinderpest", la enfermedad de Carré (moquillo), la enfermedad de "Newcastle", el sarampión y la parotiditis (paperas), estas han causado la mayor morbilidad y mortalidad que cualquier otro grupo de enfermedades relacionadas haya provocado. Además contiene otro grupo de enfermedades importantes, las enfermedades emergentes, que se caracterizan por tener un gran potencial para extenderse más allá de su distribución geográfica conocida y que su incidencia aumenta en por lo menos dos décadas o tienden a aumentar en un futuro cercano. Estas enfermedades afectan

a animales y al hombre como la enfermedad de morbillivirus equina y porcina, el moquillo de marsopas y delfines, así como el Síndrome del Ojo Azul (causado por el virus LPM), la fiebre hemorrágica del Ébola y la enfermedad provocada por un paramyxovirus que afecta a caballos y al hombre en Australia (Murphy, 1999).

En 1991 la familia de estos virus se dividió en tres géneros: *Paramyxovirus*, *Morbillivirus* y *Pneumovirus* (Kingsbury, 1991; Levy, Fraenkel-Conrat y Owens, 1994). Sin embargo Murphy, en 1999, divide a la familia en dos subfamilias: Paramixivirinae y Pneumovirinae; y cinco géneros: *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Morbillivirus*, *Pneumovirus* y *Metapneumovirus*, perteneciendo los tres primeros a la familia Paramixovirinae. Algunas de las enfermedades causadas por estos géneros son: la parainfluenza bovina tipo 3 (*Respirovirus*), La enfermedad de Newcastle y el Síndrome del Ojo Azul (*Rubulavirus*), la enfermedad de Carré (moquillo) (*Morbillivirus*), la enfermedad respiratoria sincicial bovina (*Pneumovirus*) y la rinitis de los pavos (*Metapneumovirus*). Aunque aún se encuentran virus que no han sido clasificados dentro de estos géneros como el virus Mapuera de quirópteros, el virus Nariva de roedores y los virus aislados de pingüinos nombrados paramyxovirus 1-9. El hecho de que muchos paramyxovirus se encuentren en vertebrados, principalmente en animales de sangre caliente sugiere que tienen un evolución reciente (Kingsbury, 1991).

Morfología y composición química

La familia presenta pleomorfismo, es decir que pueden presentar formas esféricas o filamentosas; lo que refleja una falta de precisión en la construcción de los viriones, o en el proceso de ensamble que además puede dar como resultado partículas virales con uno o más genomas equivalentes, es decir partículas poliploides (Hosaka, Kitano e Ikeguchi, 1966). El virion mide de 150-300 nm de diámetro. En su envoltura presentan espículas llamadas peplómeros (8-20 nm de longitud), las cuales ayudan en las fases de anclaje y penetración (figura 6). Contienen una nucleocápside de simetría helicoidal de 600-800 nm de longitud y de 18 nm de diámetro en los géneros *Paramyxovirus*, *Rubulavirus* y *Morbillivirus*.

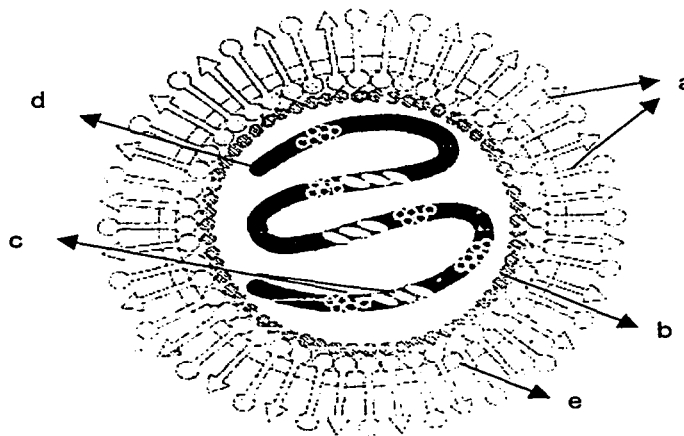


Figura 6. Diagrama de un virión de paramyxovirus. Las letras señalan diferentes proteínas: a. proteínas de fusión y hemoaglutinantes; b. glicoproteína; c. proteínas auxiliares de la transcripción y RNA polimerasa; d. nucleocápside, que contiene al material genómico (RNA); e. envoltura viral. Figura modificada de Fields, 1991.

El genoma esta compuesto por RNA de cadena sencilla de polaridad negativa no segmentado, de 15-16 kb de tamaño. Este contiene de 6 a 10 genes (7 para *Rubulavirus*) separados por secuencias conservadas no codificantes, las cuales tienen las señales de poliadenilación, y señales de inicio y término. El orden de los genes esta generalmente conservado en la familia y en el caso de los *Rubulavirus* que tiene siete genes estos codifican para 8 proteínas, de las cuales la mayoría son proteínas estructurales del virión (Murphy, 1999) (figura 7).

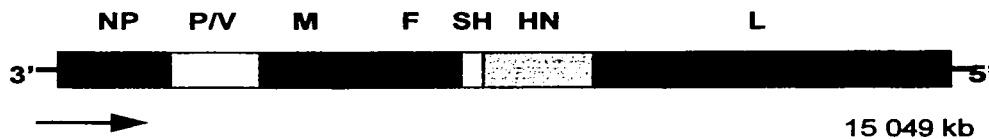


Figura 7. Esquema del genoma de un *Rubulavirus*. Se muestran siete genes que codifican para ocho proteínas, el segundo gen codifica para las proteínas P y V con diferente frente de lectura. La flecha indica el sentido de transcripción. Figura basada en el esquema de Murphy, 1999.

Los peplómeros están compuestos por dos glicoproteínas: la proteína de hemoaglutinación-neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F), ambas juegan un papel importante en la patogénesis. La proteína HN (80 kDa), actúa en anclaje a la célula y hacia esta proteína se dirigen los anticuerpos neutralizantes para evitar la entrada del virus en la célula. La proteína F (65kDa), esta presente de una forma inactiva en los viriones recién formados, esta se activa hasta que se ancla a la célula huésped y promueve la fusión de ambas membranas, celular y viral, así esta proteína juega un papel muy importante en la patogénesis del virus

(incluyendo infecciones persistentes) y en la formación de sinsicios por fusión de membranas celulares.

La nucleoproteína (NP) (60kDa), se encarga de proteger al genoma y ayuda a la formación de cadenas de RNA genómico y antígenómico. Junto a ella se encuentran la proteínas L (200 kDa) y P (60 kDa), que forman el complejo para la transcripción del genoma viral, contando con una actividad catalítica en la síntesis de RNA y adición de secuencias poli (A) en el extremo 3' de los RNAm virales; además probablemente la proteína P también actúe de un modo mecánico facilitando el alargamiento de la nucleoproteína. La proteína de matriz (M) (40 kDa), da estabilidad a la estructura viral, interviene en el reconocimiento de la nucleocápside con la envoltura y puede también participar en la formación de la envoltura. La proteína SH (small hydrophobic) (aprox. 5012 Da), como su nombre lo indica es muy hidrofóbica y aunque sus funciones no han sido bien definidas su hidrofobicidad le proporciona un gran afinidad hacia las bicapas lipídicas, y la proteína V (aprox. 20 kDa) codificada también por el gen p y considerada como una proteína no estructural, puede estar implicada en la síntesis del RNA viral, aunque no se ha descrito con certeza su función (Murphy, 1999; Kingsbury, 1991; Levy, Fraenkel-Conrat y Owens, 1994).

Estos virus son muy lábiles a los efectos del calor o la desecación y son destruidos fácilmente por desinfectantes comunes y solventes lipídicos; la formación *in vitro* de sinsicios en cultivos celulares e *in vivo* la presencia de inclusiones acidofílicas en el citoplasma son indicadores de una infección, la

hemoadsorción también ha sido probada en varios géneros, pero no en *Pneumovirus* (Murphy, 1999).

Ciclo de infección de los paramyxovirus

El proceso que sigue el virus para infectar a las células del hospedero es muy parecido al descrito para los rhabdovirus (figura 8). El virus reconoce y se adhiere a la célula por medio de la proteína hemoaglutinin-neuroaminidasa que se une a la sialoglicoproteína celular o a receptores glicolipídicos. Una vez realizada la unión la nucleocápside se libera en el citoplasma debido a que la proteína F se encarga de la fusión de la membrana celular y viral, proceso que se lleva a cabo a pH fisiológico (Murphy, 1999; Kingsbury, 1991).

El genoma es transcrito progresivamente en siete mRNAs por una síntesis secuencial interrumpida de promotor sencillo, además cadenas de genomas completos RNA con sentido positivos también son transcritas y estas sirven como molde para la formación del genoma que va a conformar la progenie del virión. La regulación entre la formación de estas dos formas de RNA al parecer es a nivel transcripcional. Un modelo de iniciación-terminación para la transcripción de los paramyxovirus es sugerido por la presencia de secuencias consenso a los lados de los genes, las cuales son parecidas a pequeñas secuencias "motifs" encontradas en cadenas de DNA para la señalización de inicio y termino de las transcripción de los genes en virus con genoma de DNA. Además en los

paramyxovirus algunos genes codifican para más de una proteína, como el gen P que puede codificar de dos a cinco proteínas *PV/C*; en el caso de los *Rubulavirus* el complejo *PV/C* es transcrito y sus productos formados. El mecanismo para que este gen codifique para más de una proteína es por que presenta diferentes frentes de lectura que pueden hacer que se formen distintos mRNAs para cada proteína (Murphy, 1999; Kingsbury, 1991).

Al igual que en los rhabdovirus, en los paramyxovirus la concentración de la proteína N (nucleoproteína) es importante para el control y cambio de un modo de transcripción a un modo de replicación. Así cuando la proteína N es producida esta se une a la transcriptasa RNA viral o con los RNAs intermediarios con sentido positivo, de este modo previene la poliadenilación y eventos de iniciación y termino que caracterizan a la transcripción y pasa a la replicación en donde las cadenas completas de RNA de sentido positivo que sirven de molde para el genoma de los nuevos viriones es más abundante. Una vez sintetizadas las nuevas cadenas de RNA de sentido negativo, la proteína N se une a ellas, junto con la transcriptasa para formar moléculas de nucleocápside; de esta forma disminuye la concentración de proteína N y se pasa de nuevo al modo de transcripción (Murphy, 1999; Kingsbury, 1991).

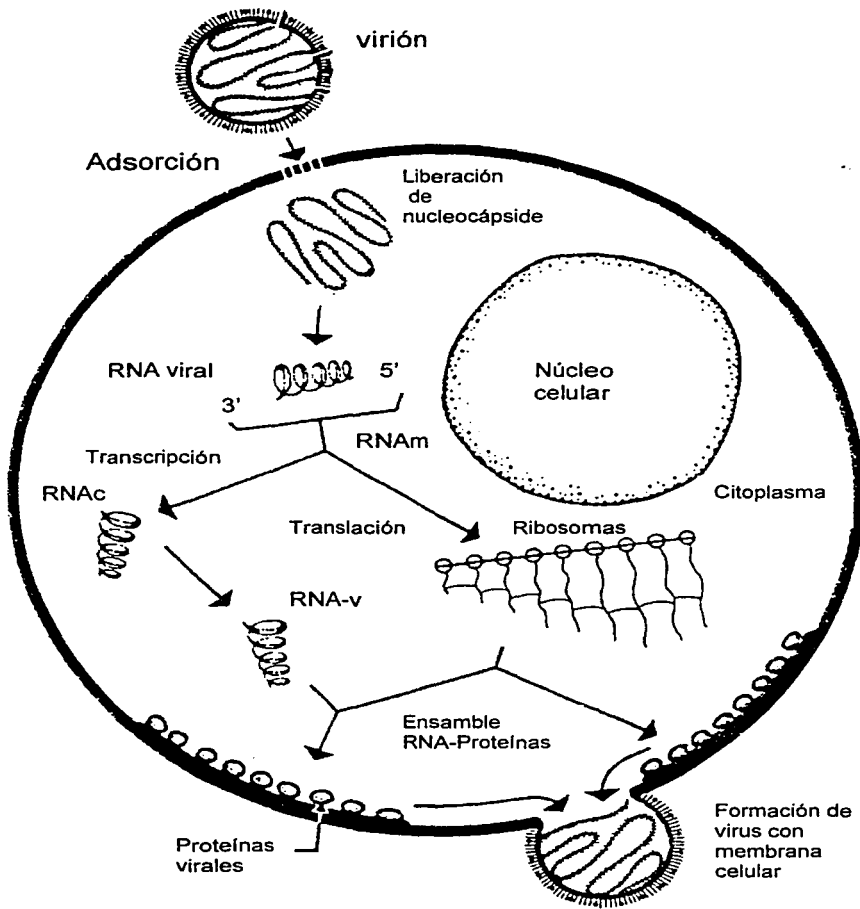


Figura 8. Ciclo de infección de las paramyxovirus. Tomado de Palmer y Martín, 1988.

El ensamble de los virones se puede dividir en dos pasos. La formación de la nucleocápside en la cual, primero se une la proteína N con el RNA genómico

para formar el molde ribonucleoproteíca helicoidal, y después se unen las proteínas auxiliares de la nucleocápside. El segundo paso es la construcción y formación de la envoltura, así primero la proteína N es concentrada cerca de la superficie celular en un área en la que es posible que se encuentre las glicoproteínas virales y que ambas interactúen por medio de interacciones no covalentes. La formación de las glicoproteínas virales implica su paso por el retículo endoplásmico y Aparato de Golgi para ser modificadas por glicosilación y que se integren a la membrana celular en la parte apical. Después la nucleocápside se alinea con la proteína M para que la envuelva y se forman los viriones con parte de la membrana celular al ser liberados. En los virones recién liberados la actividad neuraminidasa de la proteína HN probablemente sirva para evitar que se formen uniones entre viriones por uniones de la hemoaglutinina con el ácido siálico (Murphy, 1999; Kingsbury, 1991).

Antecedentes para el virus LPM

A principios de 1980 se observó en cerdos de granjas de la región de La Piedad, Michoacán una enfermedad denominada "Síndrome del Ojo Azul o Cerdos Zarcos" . Este síndrome afectaba a cerdos de diferentes edades causándoles opacidad en uno o ambos ojos de tonalidad azul turquesa y hepatitis, y presentando una mortalidad del 1% o menos (Campos, 1981).

En mayo del mismo año se encontró otro brote en el mismo lugar en el que los lechones presentaban encefalitis y los cerdos adultos tenían signos nerviosos y opacidad de la cornea. De estos animales se aisló un virus hemoaglutinante (Stephano *et al.*, 1981). Se caracterizó al virus como un Paramyxovirus (Correa-Girón *et al.*, 1986; Stephano, Gay y Kreese, 1986), a este virus se le nombro Virus del Síndrome del Ojo Azul (VSOA) (Stephano y Gay, 1985) y se mencionó que el papel que juegan otros animales en la diseminación de la enfermedad se desconoce. En 1984 se aisló un virus con propiedades hemoaglutinantes (HA) a partir del encéfalo de un cerdo proveniente de una granja en la región de La Piedad, Michoacán, en la cual los animales presentaban un síndrome que causaba encefalitis, signos respiratorios, opacidad cornea y presentaba una mortalidad del 15 al 20% (Martínez *et al.*, 1985^a; Martínez *et al.*, 1985b; Martínez *et al.*, 1985c).

Al virus aislado en 1981 se le denominó VSOA (Stephano y Gay, 1985), y al aislado en el año de 1984 se le llamó paramyxovirus porcino de La Piedad, Michoacán (LPM) (Correa-Girón *et al.*, 1986; Moreno-López *et al.*, 1986) (figura 9).

Murphy (1999) menciona que no hay reactividad cruzada de este virus con otros paramyxovirus, sin embargo el análisis genómico sugiere que hay una relación muy cercana con el virus de las paperas.

En 1987 se encontró que el suero de ratas provenientes de las granjas porcinas afectadas presentan anticuerpos IH contra el virus LPM (Rosales, *et al.*,

1987). Moreno-López *et al.* (1986) menciona que se desconoce si el virus LPM pueda infectar de manera natural a otras especies de animales ya que nunca se han reportado.

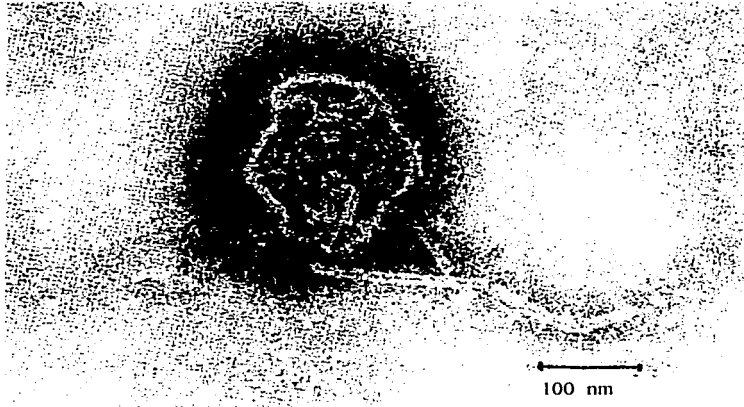


Figura 9. Fotografía del virus LPM obtenida en 1984. Tomada de Martínez-Lara, Correa-Girón y Colinas-Tovar, 1991.

En 1997 en Australia se registró una enfermedad que afecta a los cerdos más jóvenes y que en las hembras preñadas causa malformaciones en el producto y abortos. La proximidad de una colonia de murciélagos *Pteropus* sp., hace suponer que es la especie reservoria (Dedet, *et al.*, 1997), sin embargo no se ha confirmado. Al mismo tiempo se reportaron dos personas que presentaban periodos de fiebre, a este virus se le llamo *Menangle* (Halpin *et al.*, 1999).

El virus Tioman causó una epidemia en Malasia en los años 1998-1999 que provocó la muerte de 100 personas, cerca se encontraba una colonia de murciélagos (*Pteropus hypomelanus*), lo cual también hace suponer que estos

puedan ser los portadores, sin embargo no se ha comprobado (Mohd Nor, 1999; Enserink, 2000).

Wetsbury (2000) menciona que se han encontrado anticuerpos neutralizantes y se ha aislado el virus *Hendra* (HeV) de murciélagos del género *Pteropus* sp. en Australia, lo cual indica que pueden ser los probables reservorios naturales. Del mismo modo se han registrado anticuerpos neutralizantes contra el virus *Nipah* en murciélagos. La relación de estos virus con los murciélagos del género *Pteropus* sp. hacen suponer que también puedan ser reservorios de otros virus como el *Menangle*, razones de sobra para enfatizar los estudios que permitan entender el nivel microbiológico de los murciélagos.

Absorción de sueros en papel filtro

Para el estudio de la epidemiología de los virus las pruebas serológicas de las especies involucradas son básicas, sin embargo el manejo de muestras serológicas en el campo puede ser complicado, considerando que la mayoría de los estudios de laboratorio necesitan que estén libres de contaminaciones por bacterias y hongos que pueden interferir en la interpretación de resultados; así como también en ocasiones el almacenaje y transporte debe de realizarse en frío para que la muestra sea viable.

En un estudio realizado en cerdos para la detección de parvovirus porcino se utilizó papel filtro para absorber sangre de los animales, de este modo transportarla y realizar las pruebas en el laboratorio (Rodríguez-Villela *et al.*, 1988). Además la adición de una lectina (como la fitohemoaglutinina) a la sangre para que aglutine a los glóbulos rojos puede ser muy útil, ya que de esta manera se puede liberar el suero de la sangre sin necesidad de usar energía eléctrica para una centrifuga; de este modo, una vez teniendo el suero separado se podría absorber con el papel filtro.

Con estas bases es necesario desarrollar una técnica que facilite la obtención del suero, el almacenaje y transporte de las muestras asegurando que estas lleguen a su destino con un riesgo mínimo de pérdida por mal manejo. De esta manera se pueden promover estudios epidemiológicos en áreas de difícil acceso o con periodos de captura muy extensos.

OBJETIVOS

- Conocer la presencia de anticuerpos contra el virus de la rabia y el virus LPM en murciélagos no hematófagos del estado de Colima, México.
 - Desarrollar una técnica que facilite el almacenamiento y transporte de los sueros obtenidos en condiciones de campo.
-

ÁREA DE ESTUDIO

El estado de Colima se localiza en la porción suroeste de la República Mexicana, cuyo territorio está comprendido en las coordenadas extremas 103° 29' 10"- 104° 41' 04" de longitud oeste y 18° 41' 01"- 19° 30' 45" de latitud norte. Este colinda al norte, noroeste y noreste con el estado de Jalisco, al sureste con el estado de Michoacán, al oeste y sur con el Océano Pacífico. La extensión territorial del estado es de 5455.06 km² que representa el 0.27% de la superficie total del territorio nacional (INEGI, 1999).

El estado se divide en 10 municipios: Armería, Colima, Comala, Coquimatlán, Cuauhtémoc, Ixtlahuacán, Manzanillo, Minatitlán, Tecomán y Villa Álvarez (Figura 10).

Las localidades estudiadas pertenecen a los municipios de Cuauhtémoc y Manzanillo (INEGI, 1999); estas fueron seleccionadas para hacer una comparación entre ambientes, localizando en el municipio de Cuauhtémoc un área con vegetación de agricultura de temporal y por otro lado selva baja caducifolia en el municipio de Manzanillo (figuras 11 y 12).

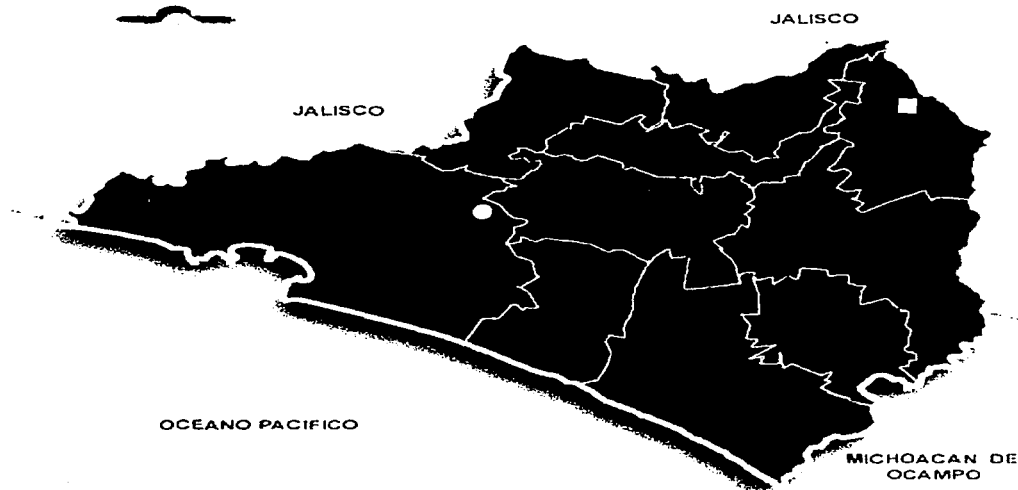


Figura 10. Mapa del estado de Colima, el círculo blanco marca el sitio de colecta en el municipio de Manzanillo y el cuadro blanco señala el sitio de colecta en el municipio de Cuauhtémoc.

Dentro del municipio de Cuauhtémoc los puntos exactos de recolecta fueron los siguientes: 1 km NE Palmillas ($19^{\circ} 21.32'N$, $103^{\circ} 53.06'W$, 756 m snm); 1 km NE Palmillas ($19^{\circ} 21.51'N$, $103^{\circ} 32.96'W$, 950 m snm); 2 km E Palmillas (950 m snm); 4.5 km E Palmillas (805 m snm); y Río El Naranjo 2 km ENE Trapichillas (360 m snm).



Figura 11. Área de captura en el municipio de Cuauhtémoc, cerca de la localidad de Palmillas, en donde se presentan grandes extensiones de tierra dedicadas a la agricultura (zona alterada).

Estas localidades se encuentran ubicadas en la provincia fisiográfica del Eje Neovolcánico en la subprovincia de los Volcanes de Colima (INEGI, 1999), Ferrusquía-Villafranca (1998) emplea el término de Provincia de la Sierra Madre del Sur y subprovincia de las Cordilleras y Cuestas del Pacífico para la misma zona. En esta subprovincia se localiza la región del Valle de Colima, que tiene una superficie de 1 280 km² aproximadamente y una altitud que va de 500 a 1 000 m. La vegetación predominante es la agricultura de temporal y el pastizal inducido, algunas de las especies que se pueden encontrar son: *Aristida adscensionis*, *Paspalum notatum*, *Cenchrus* spp., *Zea maiz*, *Sorghum vulgare*, *Saccharum officinarum* y *Cocos nucifera* (INEGI, 1999).

En el municipio de Manzanillo la colecta se realizó en: 0.5 km NE La Rosa (19° 11.483'N, 104° 06.146'W, 893 m snm); 0.6 km NE La Rosa (19° 11.523'N, 104° 06.225'W, 700 m snm); 4 km NE La Rosa (19° 11.619'N, 104° 06.146'W, 650 m snm); Río San José 0.3 km NE La Rosa (19° 11.483'N, 104° 06.146'W, 893 m snm); 3 km WNW San José de Lumbert (19° 10.808'N, 104° 09.599'W, 480 m snm); 4 km NW (by road) San José de Lumbert (19° 10.54'N, 104° 9.23'W, 466 m snm); 0.7 km W La Rosa (19° 10.55'N, 104° 06.54'W, 591 m snm); y 2.5 km W San José de Lumbert (19° 10.747'N, 104° 08.660'W, 500 m snm).



Figura 12. Área de captura en el municipio de Manzanillo, cerca de la localidad de San José de Lumbert, se presenta una vegetación de selva baja caducifolia (zona conservada).

El área se encuentra localizada fisiográficamente en la provincia de la Sierra Madre del Sur, subprovincia de las Sierras de la Costa de Jalisco y Colima, aunque Ferrusquía-Villafranca (1998) nombra a la subprovincia como de la Planicie Costera del Pacífico, que comprende la región montañosa occidental, la cuenca del río Marabasco, el Valle de Armería y la costa. La vegetación dominante del lugar es la selva baja caducifolia que se encuentra dentro de los 0-1900 m. s.n.m. Durante el periodo seco del año, más del 75% de la vegetación pierde sus hojas, las especies más representativas son *Bursera* spp., *Lysoloma* spp., *Ceiba* spp., *Ipomoea* spp., *Ficus* spp., y *Pseudo-bombax* spp.

Clima

En ambas localidades de estudio es el cálido subhúmedo con lluvias en verano (AW), es un clima isotermal en el que la oscilación entre el mes más cálido y más frío es inferior a 5° C; la temperatura media anual es de 26.6° C y la precipitación total anual de 1051.9 mm.

Hidrología

El estado de Colima cuenta con tres colectores acuíferos principales: el río Armería, El río Coahuayana y el río Minatitlán-Marabasco. El colector principal dentro de la cuenca Río Chacala- Purificación es el río Marabasco, también conocido como Minatitlán o Cihuatlán, este río tiene su origen en la sierra de

Manantlán a 2400 m. s.n.m., su longitud es de 123 km. Sus afluentes principales dentro del estado son: el arroyo Las Truchas, el arroyo Los Chicos y el río San José (INEGI, 1999).

MATERIAL Y MÉTODOS

Captura

Para la captura de los murciélagos se trabajó durante 5 días y 5 noches en cada localidad colocando 13 redes de niebla (mist-net) u ornitológicas, (de 6, 8 y 12 metros) en promedio por noche, las cuales se encontraron abiertas desde el anochecer hasta las 23:00 hrs aproximadamente. Éstas se ubicaron entre la vegetación, a la orilla o a través de ríos y arroyos, y en el exterior de los refugios. En el interior de los refugios se utilizaron redes entomológicas o de golpe. Los especímenes capturados se mantuvieron vivos en bolsas de manta y antes de ser sacrificados se les tomó la muestra de sangre.

Los especímenes fueron sacrificados con cloroformo, a cada uno se les registró el tamaño y peso, posteriormente se prepararon en taxidermia para ser identificados y utilizarlos en estudios de distribución, ecológicos, morfológicos y sistemáticos. Los especímenes se encuentran preservados en piel y cráneo, piel y esqueleto, solo esqueleto y en alcohol (70%), y se encuentran depositados en las colecciones mastozoológicas del Instituto de Biología, UNAM; en la colección del

Sam Noble Oklahoma Museum of Natural History, y en la colección de mamíferos de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. La captura se realizó con el permiso 02-3701 otorgado por el Instituto Nacional de Ecología del Área de Reservas Naturales al Dr. Cornelio Sánchez Hernández, quien realizó la identificación de las especies.

En el laboratorio se procedió al registro, resuspensión y a la división en 2 alícuotas de las muestras serológicas obtenidas en el campo. Las alícuotas se almacenaron a -35° C hasta su uso; una de ellas se destinó a la prueba de detección de anticuerpos contra el virus de la rabia y la otra a la detección de anticuerpos contra el virus LPM.

Diseño de la técnica para la obtención del suero y su almacenaje

La base para modificar la técnica propuesta por Rodríguez-Villela *et al.* (1988), es obtener el suero de una muestra de sangre sin necesidad de centrifugar, para esto se adicionó una lectina a la sangre y se esperó el tiempo necesario para que esta actúe y aglutine los glóbulos rojos en el fondo. Después, el suero libre de eritrocitos se absorbió con un papel filtro enrollado y este se guardó en una caja hermética con agente desecante en el fondo para poder conservar y transportar las muestras sin riesgo de contaminación o degradación.

Se probaron dos lectinas: fitohemoaglutinina forma M (PHA-M) (Sigma®, L2646) y Concanavalina A tipo IV (Sigma®, C2010). Se hicieron diluciones dobles de cada una en agua destilada hasta llegar a la dilución 1: 128. Se sangró un conejo raza Nueva Zelanda por la vena marginal de la oreja y se colocaron dos gotas de sangre por cada portaobjetos, hasta llegar a ocho. A cada gota de sangre se le agregó una gota de lectina y cada portaobjetos correspondía a una dilución. Los portaobjetos con las muestras se incubaron a temperatura ambiente ($\pm 28^\circ \text{C}$) por 30 min y se observó la eficacia de cada lectina y de sus diluciones para separar los eritrocitos del suero sanguíneo.

Para la elección del papel absorbente así como del tamaño adecuado, primero se realizaron pruebas de absorción con agua, se probaron tiras enrolladas de diferentes tamaños (3, 5, 7 y 10 mm de ancho por 65 mm de largo) de papel filtro Whatman No. 42 y papel filtro grueso (Mel de México).

Una vez determinado el papel adecuado y su tamaño, y con el fin de conocer la cantidad exacta absorbida por los rollos de papel se colocaron gotas de diferentes volúmenes (100, 150, 175 y 200 μl) sobre una superficie de plástico; estas se absorbieron con los rollos de papel y se marcó con un lápiz hasta donde llegó el área humedecida, de esta manera se logró saber, por comparación de longitudes, la cantidad de líquido adsorbida por el rollo y tipo de papel. En caso de que el volumen absorbido saturara el papel, se anotó y se observó si aún quedaba líquido sin absorber.

Para saber si había diferencias en la absorción entre agua y sueros se utilizaron sueros de conejo y de humanos, se hicieron las absorciones con las gotas de diferente volumen y se compararon.

A fin de evitar degradación y contaminación de los sueros absorbidos los rollos de papel filtro fueron colocados en una caja hermética con un agente desecante (Cloruro de Calcio anhidro, CaCl_2 ; $0.5\text{g}/\text{cm}^2$).

El suero absorbido en los rollos de papel filtro se resuspendió macerando los rollos en morteros de porcelana agregando buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4 estéril suficiente para obtener una dilución de 1:3, una vez bien macerado se vació a un vial de 1.5 ml (EPPENDORF, KX4259C) y se centrifugó (centrifuga "Eppendorf" mod. 5415C) a 12, 000 rpm durante 10 min, el sobrenadante obtenido se guardó en viales de 0.6 ml (DIAGGER, KX42646) y se almacenaron a -35°C .

Determinación de anticuerpos contra el virus de la rabia.

Para la detección de anticuerpos antirrábicos se utilizó la Prueba de Reducción Rápida de Focos Fluorescentes (PRRFF), con algunas modificaciones (Espinosa-Larios, 1997). La prueba consiste en inocular cantidades constantes de virus rabico con diluciones seriadas de los sueros a probar, utilizando como referencia un suero con título conocido en unidades internacionales por mililitro (UI/ ml), a una monocapa de células susceptibles al virus. Después de 24 horas de

incubación se observa la diferencia del número de focos de infección, entre el suero de referencia y los sueros problema (Bourhy y Sureau, 1996).

Como células susceptibles al virus de la rabia se utilizaron células de neuroblastoma murino (CCL 131) (figura 13), las cuales se replicaron en botellas de plástico para cultivo celular de 25 cm² (CORNING, 430168) ; con Medio Mínimo Esencial (MEM) GLASGOW (IN VITRO, S.A., ME 055) complementado con suero fetal bovino (SFB) (HYBRIMAX, F 4010) al 10% para crecimiento y al 2% para mantenimiento, además de una solución antibiótica-antimicótica (SIGMA, A-4668). Los cultivos se mantuvieron en una estufa incubadora (LAB-LINE, microprocesor CO₂ incubator) a 37° C, con atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

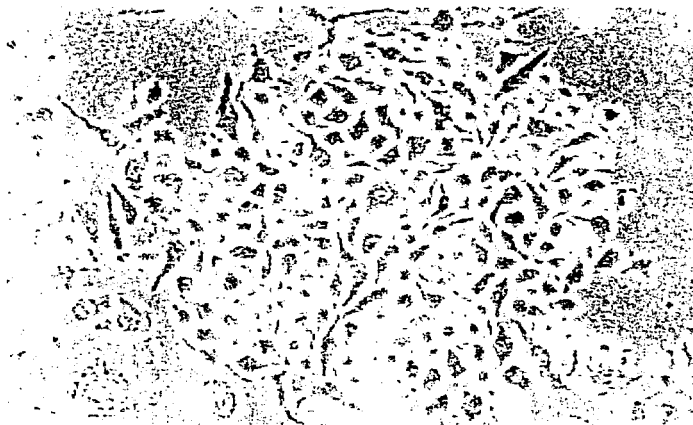


Figura 13. Células de neuroblastoma murino (CCL 131). Utilizadas para las pruebas de determinación de anticuerpos antirrábicos (100X).

Cuando la botella de cultivo celular presentó la capa de células confluyente, estas se despegaron con 2 ml de tripsina 0.3%, después se les agregó 15 ml de MEM- 10% SFB para resuspender las células. De esta suspensión se colocaron 100 μ l en cada pozo de una placa de 96 pozos de fondo plano (NUNC, 168055), esta placa se incubó por 24 hr a 37° C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂., para obtener monoestratos 100% confluentes en cada uno de los pozos.

En otra placa de 96 pozos de fondo plano (placa de neutralización), se hicieron las diluciones de los sueros a titular colocando 100 μ l de MEM sin suero, como diluyente, en cada pozo excepto en los controles de virus y células; en los pozos controles de células se agregaron 150 μ l de MEM sin suero. Se realizaron dos diluciones triples de los sueros que se encontraban ya en una dilución 1:3. Con el suero de referencia (suero humano con 10 UI/ml de anticuerpos contra rabia) se hicieron cuatro diluciones triples. Se adicionaron 50 μ l de virus PV conteniendo aproximadamente de 25-30 unidades formadoras de focos fluorescentes a cada pozo, excepto en los controles de virus que se agregaron 150 μ l y a los pozos controles de células no se les agregó. A los pozos controles de virus más PHA-M se les adicionaron 2 gotas (10 μ l) de PHA-M. La placa de diluciones se incubó por 1 hr a 37° C en atmósfera húmeda con 5% CO₂.

Se sacaron ambas placas de la incubadora y una vez que se observó que el estado de las células fuera normal y que hubiera una capa confluyente, se aspiró suavemente el sobrenadante de las células y se le cambio por las diluciones de la

placa de neutralización. Por último se agregaron 50 μ l de MEM sin suero a cada pozo y se incubó a 37° C en atmósfera húmeda con 5% CO₂ por 24 hrs.

Para fijar las células se utilizó acetona fría al 80% (aproximadamente 150 μ l en cada pozo), durante 30 min a -20° C, después se desechó la acetona y se dejó secar al aire.

Para la tinción de los focos de replicación viral se utilizaron 40 μ l de conjugado fluorescente antirrábico (Laboratorios BAER, monoclonal antinucleocápside) por pozo, se incubó por 30 min a 37° C en atmósfera húmeda, se lavó con agua corriente, se dejó secar un momento al aire y se le adicionaron 80 μ l de líquido de montaje (50% glicerol-50% PBS pH 7.2). Se observó en el microscopio invertido de larga distancia focal con lámpara UV (OLYMPUS LH50A) para realizar el conteo de focos fluorescentes (figura 14).

Para determinar si la fitohemoaglutinina (PHA-M) interfiere en la técnica de detección de anticuerpos contra la rabia, se hicieron pruebas con muestras de suero tomadas a la par, unas tratadas con PHA-M y otras manejadas de la manera convencional; es decir obteniendo el suero centrifugando la sangre. Estas muestras fueron tomadas de un conejo adulto raza Nueva Zelanda hiperinmunizado con vacuna antirrábica para uso humano producida en células VERO. Las muestras se tomaron el día de la primera estimulación, antes de que esta se realizara, y antes de cada estímulo (total: cuatro estímulos, a intervalos de tres semanas).

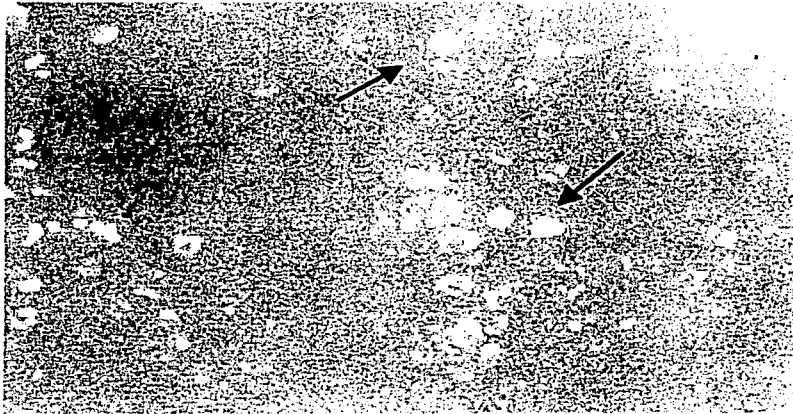


Figura 14. Células de neuroblastoma murino (CCL 131) infectadas con virus rábico. Iluminación con luz UV para observar las inclusiones intracitoplasmáticas que fueron teñidas con un conjugado fluorescente para realizar el conteo de focos fluorescentes en la prueba de detección de anticuerpos antirrábicos (100X).

Trabajo con murciélagos *Desmodus rotundus* en cautiverio

Una vez que se probó que la técnica funcionaba en el conejo, esta se aplicó a murciélagos en cautiverio, con el fin de conocer si las variables determinadas para el conejo servían también para los murciélagos por que estos eran los animales a capturar en el campo.

Se utilizaron murciélagos *Desmodus rotundus*, pertenecientes a una colonia que mantiene el Instituto Mexicano del Seguro Social en las instalaciones del CENID-Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y

Agropecuarias de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (INIFAP-SAGARPA) en Palo Alto, Cuajimalpa, D. F.

La sangre de los murciélagos se extrajo por punción intracardiaca; el espécimen se sujetó de manera que quedara el pecho descubierto manteniéndole las alas hacia atrás e introduciendo la aguja por un costado a la altura del corazón, extrayéndoles 0.5 ml de sangre en promedio. Las muestras se colocaron en viales de 1.5 ml y se les agregaron tres y seis gotas de PHA-M a diferentes tubos, se dejaron incubar a temperatura ambiente por 30 y 60 min. Se adsorbieron los sueros con rollos de papel filtro y se colocaron en la caja con el agente desecante. Esto se hizo para conocer la cantidad de PHA-M que se le debía agregar a la sangre de murciélago.

Una vez resuspendidos los sueros de murciélagos *D. rotundus* se probaron también por la técnica de reducción rápida de focos fluorescentes, los resultados se compararon con los datos obtenidos en determinaciones de anticuerpos anteriores, realizadas tomando el suero de forma clásica.

Debido a que en el desarrollo del trabajo el suero que se obtuvo se encontraba diluido por la PHA-M y además por que la técnica de PRRFF en si maneja diluciones se decidió que los resultados se interpretarían de una manera cualitativa y no cuantitativa, es decir que solo se reportaron sueros positivos o negativos sin determinar el titulo de anticuerpos en unidades internacionales. El

criterio para diagnosticar un suero como positivo fue que presentara un reducción neta de focos fluorescentes en la dilución 1:9 del suero.

Los parámetros obtenidos para *D. rotundus* se utilizaron para muestrear los murciélagos silvestres, en la figura 15 se muestra parte del manejo de las muestras en el campo.

Detección de anticuerpos contra el virus LPM

La detección de anticuerpos contra virus LPM se llevo acabo por la técnica de inhibición de la hemoaglutinación. La base de esta prueba es la interacción de una de las proteínas de superficie virales, la hemoaglutinina, con receptores en la membrana de los eritrocitos (ácido siálico). Cada partícula viral contiene muchas moléculas hemoaglutinantes (HA) que son capaces, si se encuentran en suficiente cantidad, de formar redes complejas con los eritrocitos, si los eritrocitos no se aglutinan forman un botón en el fondo del recipiente que los contiene, de tal suerte que este fenómeno es más fácil de observar en recipientes con fondo en "U" o en "V" (Barrett y Inglis, 1991) (figura 16).

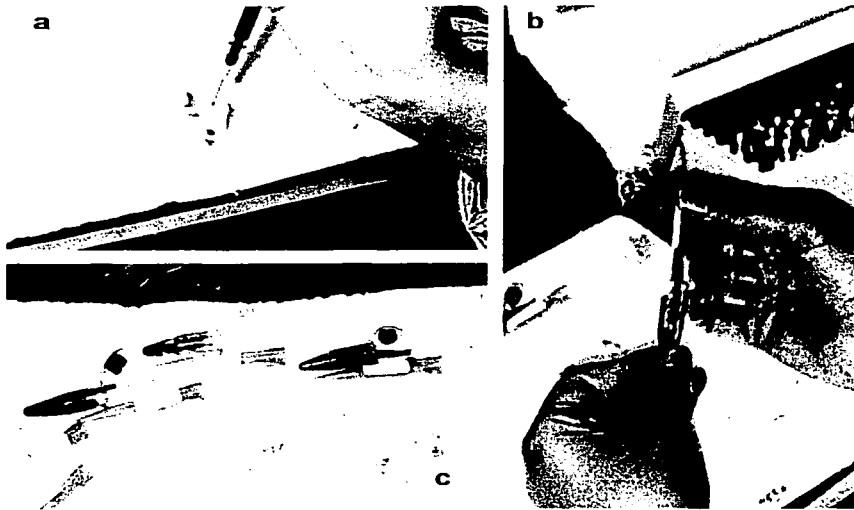


Figura 15. Parte del trabajo de campo. En a se observa cuando se coloca la sangre en el tubo para adicionar la PHA-M; en b se esta adsorbiendo el suero después de la acción de la PHA-M y en c se presentan varias muestras de sueros que van a ser colocadas en sus contenedores para guardarlas en la caja con el agente desecante, todo debidamente rotulado.

Los sueros a titular se inactivaron en baño maría a 56° C por 30 min. En una placa de 96 pozos de fondo en "V" (NUNC, 249662) se agregaron 50 µl de PBS pH 7.2, excepto en el primer pozo del control de virus y del suero de referencia. Se tomaron 50 µl de los sueros a determinar y se realizaron cuatro diluciones dobles. Como suero de referencia se utilizó un monoclonal contra LPM identificado como A₁₁, con un título de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH) de 1:10 000, del cual se agregaron 50 µl en los pozos destinados a sueros de referencia. Se adicionaron 50 µl de virus LPM con 4 unidades hemoaglutinantes (UHA) en cada uno de los

pozos, excepto en los pozos controles de eritrocitos. En los pozos destinados a control de virus a partir del segundo se realizaron diluciones dobles.

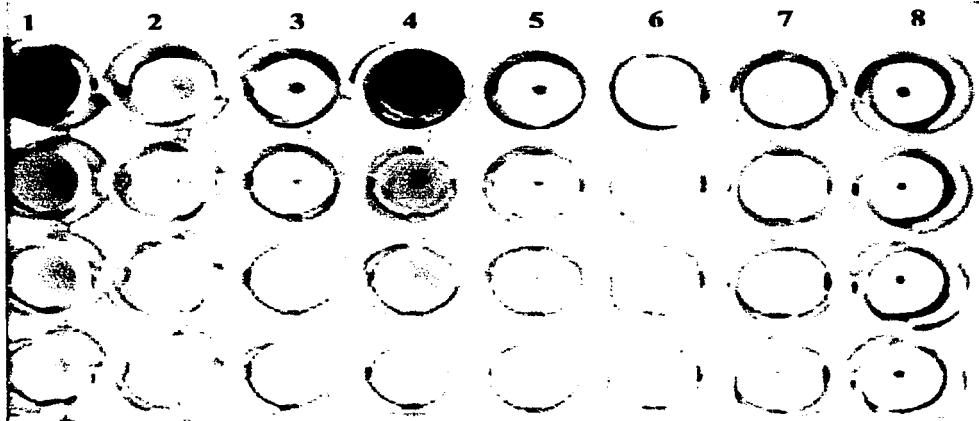


Figura 16. Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH). En las hileras uno y cuatro se observan sueros hemolisados que provocan interferencia en la lectura de resultados; hilera dos es un suero negativo; hilera tres suero positivo; hilera cinco dilución de eritrocitos; siete control positivo y ocho control negativo. En los pozos en los que se observa un punto son los eritrocitos precipitados, un pozo antes es la última dilución donde hay hemoaglutinación y ahí se cuenta como una unidad hemoaglutinante (1 HA).

La placa se incubó 1 hr a temperatura ambiente ($\pm 28^{\circ}$ C), después se adicionaron 50 μ l de eritrocitos de cobayo al 0.5% en PBS pH 7.2 en todos los pozos. Se incubó la placa por 1 hr a temperatura ambiente y se anotaron los resultados de la aglutinación. En caso que algún dato se encontrara dudoso se incubó la placa por 24 hrs a 4° C, para observar si se aclaraban los resultados (Martínez, *et al.*, 1986).

Determinación de la interferencia de la PHA-M en la hemoaglutinación.

Para conocer si fitohemoaglutinina (PHA-M) agregada a la sangre de los murciélagos interfiere en la inhibición de la hemoaglutinación se probó primero si aún había restos de PHA-M en los sueros. Primero, se incubó a temperatura ambiente ($\pm 28^{\circ}$ C) una placa de 96 pozos con fondo en "V" con una muestra de 25 μ l de suero de murciélago y 25 μ l de eritrocitos de cobayo al 0.5% en PBS pH 7.2 durante 1 hora. Se observaron y anotaron los resultados.

Después se adsorbieron seis sueros de murciélago con eritrocitos de cobayo al 50% en PBS pH 7.2, colocando 100 μ l de suero y 12.5 μ l de eritrocitos en un vial de 0.6 ml, se dejaron incubar 1 hr a temperatura ambiente ($\pm 28^{\circ}$ C). Se centrifugaron a 11,000 rpm durante 10 min en una centrífuga "Eppendorf" mod. 5415C, se separó el sobrenadante. A tres de estos sobrenadantes se les inactivó en baño maría a 56° C por 30 min.

Estos sueros fueron probados en una placa de 96 pozos con fondo en "V" colocando 50 μ l de cada suero por pozo y 50 μ l de eritrocitos de cobayo al 0.5% en PBS pH 7.2. Se dejó incubar una hora a temperatura ambiente ($\pm 28^{\circ}$ C).

Análisis estadístico

De los resultados obtenidos se realizaron tablas de contingencia para evaluar si las diferencias eran significativas. Se utilizó la siguiente fórmula para elaborar la tabla de contingencia: $E_{ij} = \frac{R_i C_j}{n}$, donde E_{ij} es cada valor de la tabla que corresponde a un valor esperado para cada valor observado, R_i es la suma de los valores del renglón x de la tabla, C_j es la suma de los valores de la columna y de la tabla, y n es el número (tamaño) de muestra. La tabla de contingencia elaborada con los valores observados para calcular los valores esperados, un modelo se muestra a continuación:

| | | | |
|----------|----|----|----------|
| | X | Y | Σ |
| A | k | l | R1 |
| B | m | n | R2 |
| Σ | C1 | C2 | n |

Donde:

X, Y, A, B son las características observadas.
 k, l, m, n son los valores observados.
 R1 es la suma de k y l.
 R2 es la suma de m y n.
 C1 es la suma de k y m.
 C2 es la suma de l y n.
 n es el tamaño de muestra.

De este modo una vez obtenidos los valores esperados se hizo el cálculo por Chi cuadrada para saber la probabilidad de que las diferencias fueran significativas.

RESULTADOS

Durante el trabajo de campo se capturaron 151 especímenes pertenecientes a cuatro familias, 11 géneros y 17 especies (figura 17). En el apéndice A se muestra la lista de las especies capturadas.



Figura 17. Algunos murciélagos capturados. De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo los especies que se presentan son: *Artibeus* sp., *Leptonycteris curasoae yerbabuena*, *Mormoops megalophylla megalophylla* y *Rhogeessa parvula major*.

De las especies enlistadas 11 (66 individuos) se capturaron en la zona alterada y 16 (85 individuos) en el área de selva baja caducifolia. El 58.3% de los especímenes fueron hembras y el 41.7% machos. Según el tipo de alimentación los murciélagos frugívoros son los que se encuentran más representados con un 72.2%, seguidos de los nectarívoros 15.2% y por último los insectívoros 12.6% (figura 18).

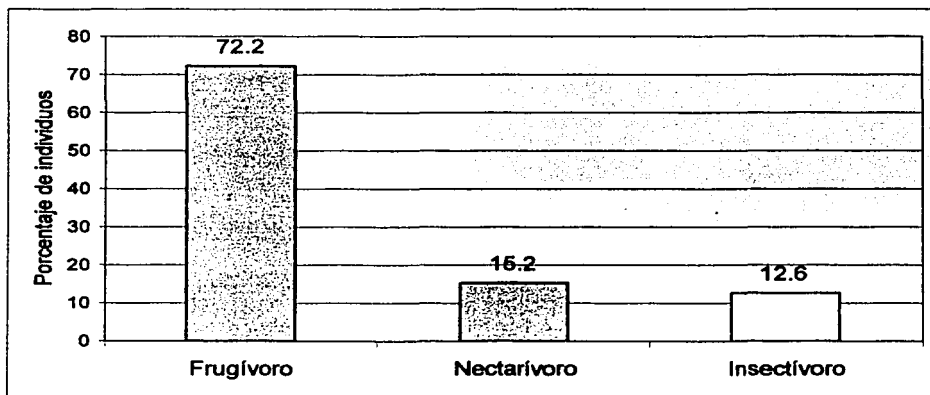


Figura 18. Gráfica de porcentajes de murciélagos capturados en ambas áreas (conservada y alterada) según el tipo de alimentación (n= 151).

Estandarización de la técnica para obtener el suero

La lectina seleccionada por su mayor eficacia fue la fitohemoaglutinina forma M (PHA-M) sin diluir (2.086 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Como papel absorbente se eligió el papel filtro Whatman No. 42 en rollos de 1 x 6.5 cm, los cuales pueden adsorber

hasta 175 μ l de suero sin que se sature. No se encontraron diferencias entre la capacidad de absorción del agua y suero por parte del papel filtro seleccionado.

La figura 19 muestra la gráfica con los títulos de anticuerpos obtenidos en el conejo inmunizado con vacuna antirrábica producida en células VERO, se puede observar que se obtuvieron títulos menores en los sueros obtenidos con PHA.

En el trabajo con los murciélagos en cautiverio como resultado se determinó agregar 5 gotas (25 μ l) de PHA-M a la sangre con una jeringa de 1 ml y se dejaron incubar 1 hr a temperatura ambiente, el suero se absorbió con los rollos (1 x 6.5 cm) de papel filtro Whatman No. 42 y se colocaron en la caja con agente desecante. Las muestras de murciélagos silvestres se les trató de la misma forma.

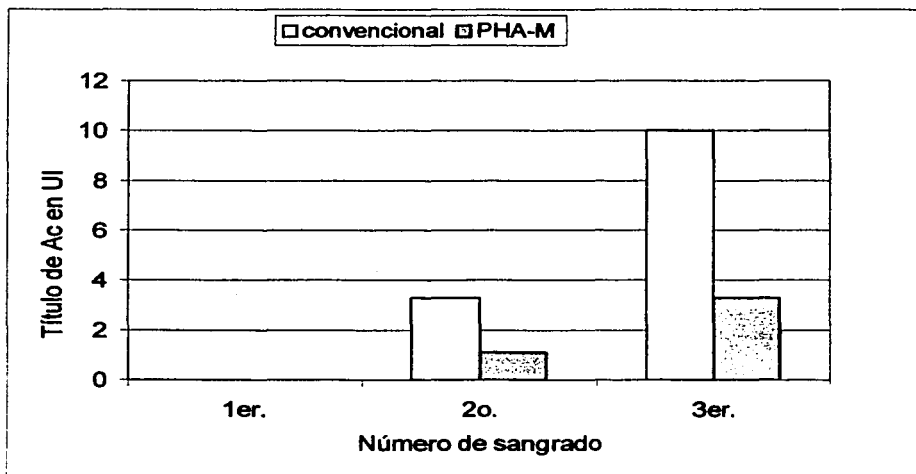


Figura 19. Gráfica con los títulos de anticuerpos antirrábicos encontrados en el conejo raza Nueva Zelanda inmunizado con vacuna para uso humano producida en células VERO. Los sueros fueron obtenidos tanto de manera convencional como por medio de la fitohemoaglutinina forma M (PHA-M).

El título de anticuerpos antirrábicos obtenidos con los murciélagos en cautiverio *D. rotundus* se muestra en la figura 20. En esta se comparan las dos técnicas utilizadas para la obtención del suero y no se encuentran grandes diferencias.

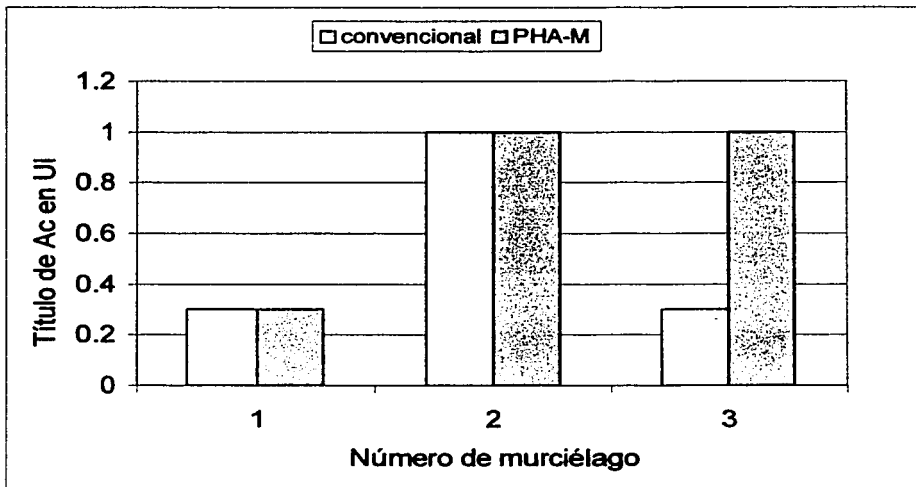


Figura 20. Gráfica con los niveles de anticuerpos (Ac) antirrábicos determinados en los murciélagos *Desmodus rotundus* mantenidos en cautiverio. El suero fue obtenido por las dos técnicas aquí descritas.

Detección de anticuerpos antirrábicos

En la detección de anticuerpos contra el virus de la rabia por la PRRFF se encontró que 89 sueros fueron negativos, 54 positivos y 8 no se lograron determinar por presentar toxicidad en el cultivo celular en el que se realizó la prueba. En las figuras 21 y 22 se muestran las inclusiones intracitoplásmicas que

se presentan en células BHK-21 infectadas con virus de la rabia cepa PV y teñidas con el conjugado fluorescente antinucleocápside del virus de la rabia (Laboratorios BAER®).

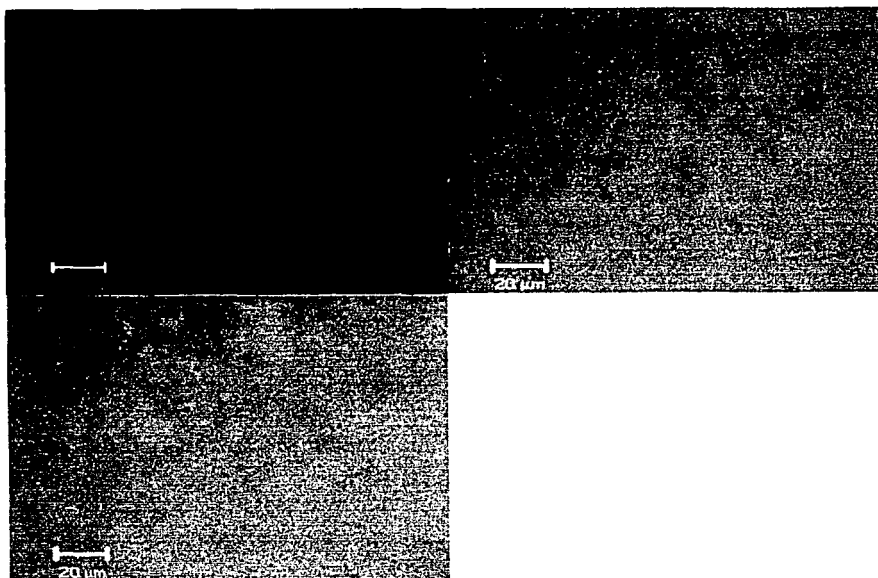


Figura 21. Células BHK-21 infectadas con virus de la rabia cepa PV. La fluorescencia muestra la presencia del virus en el citoplasma de las células. (Fotografía tomada con el microscopio confocal láser de barrido). En la parte superior izquierda se ve la preparación iluminada con luz ultravioleta; en la región superior derecha se iluminó con luz visible, y en la parte inferior se muestra la combinación de ambas imágenes.



Figura 22. Acercamiento de una célula BHK-21 infectada con virus rábico cepa PV, se notan claramente los focos fluorescentes en el citoplasma celular.

Las especies que presentaron anticuerpos antirrábicos son: *Mormoops megalophylla megalophylla*, *Pteronotus parnelli mexicanus*, *Micronycteris megalotis mexicana*, *Glossophaga commissarisi commissarisi*, *G. morenoi morenoi*, *G. soricina handleyi*, *Leptonycteris curasoae yerbabuene*, *Artibeus intermedius*, *A. jamaicensis*, *Dermanura azteca hespera*, *D. phaeotis nana*, *D. tolteca hespera* y *Sturnira liliium parvidens*. En la tabla 1 se muestra el resultado de la presencia de anticuerpos antirrábicos según la especie y el área de captura.

Tabla 1. Detección de anticuerpos antirrábicos según el área de captura y la especie.

| Familia Especie | Área de captura | | | | Total |
|--|------------------------------------|-----------|--------------------------------------|-----------|-------|
| | Alterada (número de individuos) | | Conservada (número de individuos) | | |
| | positivos | negativos | positivos | negativos | |
| Mormoopidae | | | | | |
| <i>Mormoops megalophylla megalophylla</i> | 0 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| <i>Pteronotus parvelli mexicanus</i> | 2 | 0 | 3 | 4 | 9 |
| Phyllostomidae | | | | | |
| <i>Artibeus intermedius</i> | 1 | 1 | - | - | 2 |
| <i>Artibeus jamaicensis</i> | 8 | 15 | 7 | 5 | 35 |
| <i>Artibeus lituratus</i> | 0 | 2 | 0 | 1 | 3 |
| <i>Artibeus sp.</i> | 0 | 1 | - | - | 1 |
| <i>Dermanura azteca hespera</i> | 1 | 6 | 1 | 0 | 8 |
| <i>Dermanura phaeotis nana</i> | 0 | 3 | 3 | 0 | 6 |
| <i>Dermanura tolteca hespera</i> | 0 | 8 | 1 | 0 | 9 |
| <i>Glossophaga commissarisi commissarisi</i> | - | - | 1 | 0 | 1 |
| <i>Glossophaga morenoi morenoi</i> | - | - | 1 | 0 | 1 |
| <i>Glossophaga soricina handleyi</i> | 1 | 5 | 7 | 7 | 20 |
| <i>Leptonycteris curasoe yerbabuene</i> | - | - | 1 | 0 | 1 |
| <i>Micronycteris megalotis mexicana</i> | - | - | 1 | 0 | 1 |
| <i>Stumira liliun</i> | 0 | 1 | - | - | 1 |
| <i>Stumira liliun parvidens</i> | 2 | 7 | 12 | 15 | 36 |
| Natalidae | | | | | |
| <i>Natalus stramineus saturatus</i> | - | - | 0 | 1 | 1 |
| Vespertilionidae | | | | | |
| <i>Lasiurus blosevillii teliotis</i> | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 |
| <i>Rhogeessa parvula major</i> | - | - | 0 | 3 | 3 |
| Total | 15 | 51 | 39 | 38 | 143 |

- no hay individuos capturados en esa área

La presencia de anticuerpos antirrábicos varió según el área de captura, en el área conservada (selva baja caducifolia) hubo un mayor número de murciélagos con anticuerpos comparando con el área alterada (zona de cultivos de temporal) ($p < 0.05$) (figura 23). Además se encontró que el sexo, tipo de alimentación y género no se relacionan con la presencia de anticuerpos en los individuos ($p > 0.05$).

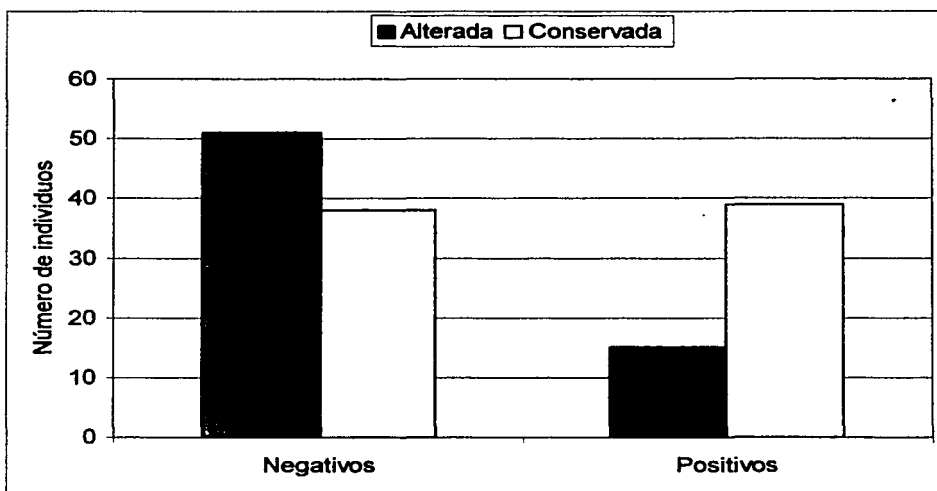


Figura 23. Resultado de la detección de anticuerpos antirrábicos en número de individuos positivos encontrados en el área alterada y conservada.

Detección de anticuerpos contra el virus LPM

En lo que se refiere a las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación (IH) se encontró que los sueros de murciélagos aún contenían restos de PHA-M, la

cual aglutinó a los eritrocitos, e interfirió en la prueba. La mejor manera de inactivar la PHA-M restante en los sueros fue calentando las muestras a 56° C por 30 min.

En la detección de anticuerpos contra el virus LPM se analizaron 108 sueros de los cuales 107 individuos resultaron negativos (99.1%). El único suero que resulto positivo pertenece a un murciélago de la especie *Rhogeessa parvula major*, (♂), capturado en la selva baja caducifolia. Este fue positivo hasta una dilución de 1: 12.

DISCUSIÓN

La perturbación de los ecosistemas en el país es un problema que aún no se ha logrado controlar, este se refleja en la disminución y aumento de distintas especies encontradas en un lugar, de tal forma que las poblaciones de las especies más susceptibles son las primeras en deteriorarse. El estado de Colima no escapa a esta problemática, en la década de los 80's hubo un notable cambio en la vegetación, disminuyendo en un 25% la vegetación natural y aumentando 13.4% el área de actividades agropecuarias (Flores y Gerez, 1994). Estos cambios pueden haber alterado a las especies registradas en el estado, en este estudio seis especies no se encontraron en la zona de cultivo (*Glossophaga commissarisii*, *G. morenoi*, *Leptonycteris curasoae*, *Micronycteris megalotis*, *Natalus stramineus* y *Rhogeessa parvula*), cuando estas especies se capturaron en el área más

conservada sólo se capturó un individuo, y el que más se presentó fue el género *Rhogeessa* con tres (tabla 1). Por el contrario sólo una especie encontrada en la zona de cultivo no se capturo en la selva baja (*Artibeus intermedius*).

La técnica para el almacenamiento y transporte de los sueros que se utilizó en este estudio funcionó bien, y permitió un manejo fácil y un transporte seguro de las muestras serológicas, independientemente de que se mantuvieron en el campo durante 15 días (tiempo de duración del trabajo de campo); evitando que se tuvieran que conservar a bajas temperaturas o con el riesgo de que se contaminaran. Una de las mayores ventajas la proporciona el que se manipulen muestras en sólido, por que el papel se guarda en la caja con desecante, evitando así transportar muestras en líquido que siempre corren el riesgo de derramarse. Además esta técnica podría estandarizarse para otro tipo pruebas, como la de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para estudios genéticos y de microorganismos patógenos. En el suero de conejo los niveles de anticuerpos detectados fueron menores en los sueros tratados con PHA-M (figura 19), lo que probablemente se deba a una falla en la técnica ya que fueron las primeras muestras tratadas de la misma manera y pudo haberse presentado un error de dilución al resuspender el suero adsorbido en el papel filtro. Esto se puede reafirmar por que en el caso de los sueros de los murciélagos las diferencias entre el método convencional (obteniendo el suero por centrifugación), y el método propuesto (por acción de la PHA-M), no fueron tan marcados (figura 20). Aunque no se logró realizar un prueba estadística por el reducido número de muestra, se

consideró que si los valores no cambiaban en los murciélagos en cautiverio esto era confiable, ya que los murciélagos eran los animales a estudiar en el campo.

En los resultados obtenidos mediante la prueba RRFF, el porcentaje de murciélagos con anticuerpos contra la rabia es alto (37.7%) considerando que se hizo un estudio en poblaciones abiertas. Se ha reportado que en una población cerrada el porcentaje de individuos con anticuerpos antirrábicos varía de 16 al 80%, y para poblaciones abiertas el número de individuos es menor, Valdespino (1983) encontró el 6.77% de 234 murciélagos capturados en el Istmo de Tehuantepec, aunque cabe aclarar que este estudio fue dirigido hacia poblaciones de murciélago *Desmodus rotundus*, sin embargo 16 de los 17 individuos con anticuerpos resultaron ser no hematófagos.

El estado de Colima esta considerado como una zona de mediana incidencia de rabia (Valdespino, 1983), de acuerdo a los brotes de derriengue que ha presentado, y aunque en esta enfermedad el principal transmisor es el murciélago vampiro *D. rotundus*. Se han encontrado reportes de posibles casos de transmisión de rabia intraespecífica en murciélagos no hematófagos observados en Arizona, Estados Unidos (Bell, 1980), donde se sugiere que el contacto físico entre murciélagos que da como resultado la transferencia del virus de la rabia puede presentarse en un contexto que no sea el colonial, de este modo un murciélago *Lasionycteris noctivagans* que aparentemente se alimentaba, agredió a otros tres murciélagos de diferentes géneros, uno de los cuales se capturó y examinó dando como resultado positivo a rabia por Corpúsculos de Negri. Se

siguieron observando murciélagos de esta especie los cuales no presentaron la misma conducta lo que hace suponer que el individuo se encontraba infectado con el virus de la rabia y por tanto tenía una conducta alterada.

Estos datos junto con los mencionados por Aghomo *et al.* (1990) en su estudio realizado en murciélagos frugívoros *Eidolon helvium*, en el que sugiere que individuos con altos niveles de anticuerpos pueden indicar una reciente infección en las poblaciones, lo que puede explicar el alto porcentaje de murciélagos que presentan anticuerpos encontrados en este estudio, ya que suponiendo que si en una población se presentó recientemente una infección con el virus de la rabia, algunos individuos pudieron haber infectado a otras poblaciones y especies, ya sea por compartir refugio o en áreas abiertas como lo menciona el caso de Arizona; explicando así el hecho de que se presentaron más individuos con anticuerpos en el área conservada (selva baja caducifolia). Además también se deben de considerar otras razones como el que en una zona más conservada hay mayor densidad de poblaciones por lo que puede haber mayor contacto interespecífico, se encuentren más poblados los refugios y en épocas de apareo o por conductas territoriales se produzcan riñas en las que la transmisión del virus de la rabia se favorezca, esta idea también la sugieren Alba y Villa en 1956, mencionando que tanto murciélagos coloniales como solitarios pueden compartir refugios con otras especies (incluyendo *D. rotundus*) y que en el estado furioso de la enfermedad un individuo pueda infectar otros.

También puede influir que al haber más especies en un área conservada se encuentren más eslabones de una cadena de transmisión del virus, en las que unas especies puedan ser más susceptibles que otras.

En este estudio se encontró que el género, sexo y tipo de alimentación no relacionaron con la presencia de anticuerpos antirrábicos, sin embargo esto podría deberse a que no todos los tipos de alimentación y géneros se encuentran lo suficientemente representados. En cuanto al sexo, se podría hacer un estudio epidemiológico en una población en la que se refleje no sólo la incidencia por sexo sino también por edades, y con una relación respecto al tiempo, este tipo de estudio también tendría la ventaja de muestrear varias especies que comparten un refugio y conocer así mejor la transmisión del virus de la rabia interespecífica, así como la susceptibilidad de cada especie.

Por los resultados encontrados y considerando que los murciélagos pueden ser transmisores o reservorios de varias enfermedades se deben de hacer más estudios para conocer mejor la biología y el papel que los murciélagos silvestres desempeñan en la diseminación del virus de la rabia. McColl, Tordo y Aguilar-Setién (2000), mencionan que un mejor entendimiento de la epidemiología y patogénesis de los lyssavirus de murciélagos ayuda a promover la prevención y el control de las enfermedades; además la información para la creación de programas de control no debe de considerarse suficiente ya que en América latina, con 30 años de aplicación de vacunas y anticoagulantes en los murciélagos *D. rotundus*, el problema de la rabia en el ganado sigue presente y aunque las

campañas de control de murciélago vampiro se siguen implementando, se ha observado un incremento en el número de casos humanos infectados por murciélagos y en el número de ganado joven que muere (McColl, Tordo y Aguilar-Setién, 2000).

Una vez conociendo un poco mejor la biología y respuesta inmunológica de los murciélagos se podría establecer su papel en la epidemiología, considerando que si algunas poblaciones o especies presentan altos niveles de anticuerpos antirrábicos pueden no ser portadores del virus, debido a que se encuentran protegidos, de este modo el desarrollo de programas para el control y erradicación de la enfermedad de la rabia se puede dirigir mejor dependiendo de la zona y de la fauna que en ella habite. De igual manera se podrían desarrollar vacunas que protejan a los individuos dependiendo de la variedad o cepa del virus que se encuentre en la zona o de la susceptibilidad de la especie a la que se le deba aplicar. Para este último punto la identificación de virus en los murciélagos ha un nivel más detallado (epidemiología molecular) es necesario, ya que si consideramos que en la región que comprende el continente Europeo con menos diversidad de fauna se han encontrado más sero-genotipos de los lyssavirus, es muy probable que en México con una mayor diversidad faunística se pueda detectar otro tipo de lyssavirus que presente una reacción cruzada en las pruebas que se emplean para la detección de anticuerpos o de virus de la rabia, sobre todo si se trata de cepas poco divergentes entre sí.

En el caso de los paramyxovirus y su relación con los quirópteros, el aislamiento del virus *Hendra* de murciélagos pteropidos y la presencia en estos de anticuerpos contra el virus *Nipah* (Westbury, 2000; Young *et al.*, 1996), muestran algunas pruebas de la vinculación entre ambos, por lo que la promoción de más estudios en los quirópteros para conocer su relación con diferentes especies de paramyxovirus se debe de aumentar. Por ahora en este estudio no se encontró una relación entre el virus LPM y los murciélagos no hematófagos del estado de Colima. El único suero positivo en la prueba de IH se pudo deber a que el murciélago haya tenido altos niveles de anticuerpos contra otro paramyxovirus similar lo que provocó una reacción cruzada con el virus LPM, además la presencia de anticuerpos IH en ratas de granjas que padecían la enfermedad (Rosales, 1987), podría indicar que la transmisión de este virus se lleve acabo por roedores y no por quirópteros.

CONCLUSIONES

1. La desecación de los sueros conservó mejor las muestras sin necesidad de refrigerar, además de que estas fueron viables para las pruebas de detección de anticuerpos por PRRFF (prueba de reducción rápida de focos fluorescentes) e IH (inhibición de la hemoaglutinación).

2. El porcentaje de individuos con anticuerpos antirrábicos encontrado fue alto (37.7%) considerando que la zona de captura se encuentra dentro del área de

mediana incidencia, y que estudios en poblaciones abiertas y realizados en zonas de alta incidencia (Istmo de Tehuantepec) reportan niveles menores (<10%) (Valdespino, 1983).

3. El área de captura está relacionada con la presencia de anticuerpos antirrábicos, no así el género, sexo y tipo de alimentación. Altos niveles de anticuerpos antirrábicos sugieren una protección contra la enfermedad en las poblaciones. Se deben realizar más estudios para conocer la biología y epidemiología de ambos, agente infeccioso-vector.

4. La presencia de otro tipo de lyssavirus que se encuentre en la fauna silvestre y provoque una reacción cruzada con el virus de la rabia es probable, por lo que estudios a nivel de epidemiología molecular son necesarios.

5. El conocimiento que hay hasta ahora es importante para las campañas tanto de control de murciélago vampiro *D. rotundus* y de la enfermedad de la rabia, sin embargo aún no se han aclarado todos los campos que abarca la diseminación y control (protección) de la enfermedad.

6. Los murciélagos no hematófagos del estado de Colima no presentan anticuerpos contra el virus LPM por lo que podría pensarse que estos animales no intervienen en la epidemiología de la enfermedad.

7. La biología de varias especies aún no es bien conocida y su importancia como posibles vectores de distintas enfermedades tampoco, por esto es necesario promover el estudio de la fauna silvestre, además con la constante devastación de los hábitats naturales se están destruyendo posibles barreras naturales contra enfermedades que ahora aparecen, y para poder controlarlas y combatirlas es necesario conocer su origen.

LITERATURA CITADA

- Acha, P. N. y Arámbulo, P. V. 1985. Rabies in the tropics- history and current status. *In: Rabies in the tropics* (Kuwert, E., Mérieux, C., Koprowski, H. y Bogel, K. eds.). Springer-Verlag. New York. 786 pp.
 - Aguilar-Setién, A. y Loza-Rubio, E. 1999. El árbol genealógico de la rabia en México. *Ciencia y Desarrollo*. 146: 17-23.
 - Aguilar-Setién, A., Brochier, B., Tordo, N., De Paz, O., Desmettre, P., Peharpre, D. y Pastoret, P.-P. 1998. Experimental rabies infection and oral vaccination in vampire bats (*Desmodus rotundus*). *Vaccine*. 16: 1122-1126.
 - Aghomo, H. O., Ako-Nai, A. K., Oduye, O. O., Tomori, O. y Rupprecht, C. E. 1990. Detection of Rabies Virus Antibodies in Fruit Bats (*Eidolon helvum*) from Nigeria. *Journal of Wildlife Diseases*. 26(2): 258-261.
 - Altrigham, J. D. 1996. **Bats: Biology and Behaviour**. Oxford University Press, Inc. New York. 262 pp.
 - Amengual, B., Whitby, J. E., King, A., Serra Cobo, J. y Bouhry, H. 1997. Evolution of European bat lyssaviruses. *J. gen. Virol*. 78: 2319-2328.
 - Baer, G. M. 1975. Rabies in nonhematophagous bats. *In: The Natural History of Rabies* (Baer, G. M. ed.). Academic Press, New York. pp. 79-97.
 - Baer, G. M. y Lentz, T. L. 1991. Rabies pathogenesis to the central nervous system. *In: The Natural History of Rabies* (Baer G. M. ed.). 2nd ed., CRC Press. Boca Raton, FL. pp. 105-120.
 - Barrett, T. y Inglis, S. C. 1991. Growth, Purification and Titration of Influenza Viruses. *In: Virology a practical approach* (Mahy, B. W. J. ed.). IRL PRESS, England. pp: 125- 129.
 - Batalla, C. D., Labrandero, E. y Flores-Crespo, R. 1996. Análisis retrospectivo de la difusión de la rabia parálitica bovina. *In: Memorias XX Congreso Nacional de Buiatría*. 14-17 Agosto, Acapulco, Guerrero. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos. México. pp: 16-18.
 - Bell, G. P. 1980. A possible case of interspecific transmission of rabies in insectivorous bats. *J. Mamm*. 61(3): 528-530.
-

-
- Bouhry, H., Kissi, B. y Tordo, N. 1993. Molecular diversity of the *Lyssavirus* genus. **Virology**. 194:70-81.
 - Bourhy, H. y Sureau, P. 1996. **Methodes de Laboratoire pour le Diagnostic de la Rage**. Comisión des laboratoires de reference et D'expertise de L'Institut Pasteur. Institut Pasteur.
 - Burns, K. F. y Farinacci, C. J. 1955. Rabies in nonsanguivorous bats of Texas. **Journal of Infectious Diseases**. 97: 211-218.
 - Burns, K. F., Farinacci, C. J. y Murnane, T. G. 1956. Insectivorous bats naturally infected with rabies in southwestern United States. **American Journal of Public Health**. 46: 1089-1097.
 - Campos, M. E. 1981. Síndrome del Ojo Azul o Cerdos Zarcos. **Mem. XVIII Convención AMEV-Ixtapa**. 81 pp.
 - Cervantes, J. A., Castro-Campillo, A. y Ramírez-Pulido, J. 1994. Mamíferos Terrestres Nativos de México. **An. Inst. Biol., Univ. Nal. Auton. México, Ser. Zool.** 65: 177-190.
 - Constantine, D. G. 1988. Transmission of pathogenic microorganisms by vampire bats. *In: Natural history of vampire bats* (Greenhall, A. M. y Schmidt, U. eds.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp. 167-189.
 - Constantine, D. G., Tierkel, E. S., Kleckner, M. D. y Hawkin, D. M. 1968. Rabies in New Mexico cavern bats. **Public Health Reports**. 83: 303-316.
 - Correa-Girón, P., Martínez, L. A., Ericsson, A. y Moreno-López, J. 1986. Characterization of a *Paramyxovirus* isolated from the rain of a piglet in Mexico. **Proc. Of the 9th International Pig Veterinary Society, Congress**. Barcelona, España. 205 pp.
 - Coulon, P., Lafay, F. *et al.* 1994. The molecular basis for altered pathogenicity of lyssaviruses variants. *In: Lyssaviruses* (Rupprecht, C. E., Dietzschold, B., Koprowsky, H. eds.). Springer-Verlag. Berlin. pp. 64-84.
 - Crainic, R. y Saron M. F. 1993. Structure et taxonomie virale. Description des principales familles de virus d'intérêt médical et vétérinaire. *In: Virologie Médicale* (Crainic, R. y Nicolas J.-C. coord.). Editions Médicales Internationales. Paris. pp. 15-36.
 - Dedet, V., Gourreau, J.-M. y Villiere, V. 1997. Un nouveau paramyxovirus en Australie. **La Semaine Vétérinaire des filières p I-II. Supplément à la Semaine Vétérinaire**. No. 868.
-

- Delpietro, H. A. y Russo, R. G. 1996. Aspectos ecológicos y epidemiológicos de la agresión del vampiro y de la rabia parálitica bovina en la Argentina y análisis de las propuestas efectuadas para su control. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.** 15(3): 971-984.
- Dept. of Public Health Comm. **Disease Summary.** New Mexico. 4: 11-56.
- Dietzschold, B., Rupprecht, C. E. *et al.* 1988. Antigenic diversity of the glycoprotein and nucleocapsid proteins rabies and rabies-related virus: implication for epidemiology and control of rabies. **Rev. Infect. Dis.** 10: S785-98.
- Enserink, M. 2000. Malaysian Researchers Trace *Nipah* Virus Outbreak to Bats. **Science.** 289: 518-519.
- Fenton, B. M. 1983. **Just Bats.** University of Toronto Press. Toronto. 165 pp.
- Fernández-Calderón, J. 1999. **Reporte de la Comisión Nacional de Sanidad Animal (CONASA).** Dirección General de Salud Animal, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México. 97 pp.
- Ferrusquía-Villafranca, I. 1998. Geología de México: una sinopsis. *In: Diversidad Biológica de México* (T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot and J. Fa, eds.). Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. pp.3-108.
- Flores, V. O. y Gerez, P. 1994. **Diversidad y conservación en México: vertebrados, vegetación y uso de suelo.** 2ª. UNAM. México. 439 pp.
- Hall, E. R. 1981. **The mammals of North America.** Vols. I y II. 2ª. ed. John Wiley and Sons, Inc. New York. 600+90, 1181+90 pp.
- Halpin, K., Young, P. L., Field, H. y Mackenzie, J. S. 1999. Newly discovered viruses of flying foxes. **Vet. Microbiol.** 68: 83-87.
- Hosaka, Y., Kitano, H. y Ikeguchi, S. 1966. Studies in the pleomorphisms of HVJ virions. **Virology.** 29: 205-221.
- INEGI. 1999. **Anuario estadístico del estado de Colima.** Ed. INEGI y gobierno del estado de Colima, México. 448 pp.
- King, A., Davies, P. y Lawrie, A. 1990. The rabies virus of bats. **Veterinary Microbiology.** 23: 165-174.

- Kingsbury, D. W. 1991. Paramyxoviridae and their replication. *In*: Fields, B. N. *et al.* **Fundamental Virology**. Raven Press. Ltd. New York. pp. 507-524.
- Lafay, F., Coulon, P. *et al.* 1991. Spread of CVS strain of rabies virus and of the avirulent mutant AVO1 along olfactory pathways of the mouse after intranasal inoculation. **Virology**. 183: 320-330.
- Levy, J. A., Fraenkel-Conrat, H. y Owens, R. A. 1994. **Virology**. 3a. ed. Prentice Hall. USA. 447 pp.
- Lord, R. D. 1988. Control of vampire bats. *In*: **Natural history of vampire bats** (Greenhall, A. M. y Schmidt, U. eds.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp. 215-224.
- Lord, R. D., Fuenzalida, E., Delpietro, H., Larghi, O. P., Díaz, A. M. O. y Lázaro, L. 1975. Observations on the epizootiology of vampire bats rabies. **PAHO Bull.** 9:189-193.
- Loza-Rubio, E., Aguilar-Setién, A., Bahloul, C., Brochier, B., Pastoret, P.-P. y Tordo, N. 1999. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in México. **Arch. Med. Res.** 30(2): 144-149.
- Málaga-Alba, M. y Villa, R. B. 1956. Algunas notas acerca de la distribución de los murciélagos de América del Norte relacionados con el problema de la rabia. **An. Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. Méx. Serie Zoología.** XXVII. 2: 529-569.
- Martínez, L. A. C., Correa, G. P., Fajardo, M. R. y Garibay, S. M. 1985a. Aislamiento y Estudio de un Virus Porcino Parecido a los Paramyxovirus. **Encuentro sobre Enfermedades Infecciosas del Cerdo, AMVEC**. Correa, P. y A. Morilla Eds. México. pp. 15-21.
- Martínez, L. A. C., Correa, G. P., Fajardo, M. R., Ramos, R. I., Garibay, S. M. y Moreno-López, J. 1985b. Un virus parecido a los paramyxovirus productor de signos respiratorios, nerviosos y mortalidad en credos. **Resúmenes XVI Cong. Nal. de Microbiología, AMM**. México. 83 pp.
- Martínez, L. A. C., Correa, G. P., Fajardo, M. R., Garibay, S. M., Moreno-López, J., Ramos, R. I. y Rosales, E. F. 1985c. Un virus hemoaglutinante similar a los paramyxovirus que produce encefalitis y mortalidad en credos. **Mem. de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1985**. México. 81 pp.

-
- Martínez, L. A. C., Correa, G. P., Rosales, E. J. A. F., Vásquez, P. C. G. y Garibay, S. M. 1987. Curva de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra el Paramyxovirus porcino de La Piedad, Michoacán, en cerdos de una granja de ciclo completo. **Tec. Pec. en Mex.** 2(28): 163-167.
 - McColl, K. A., Tordo, N. y Aguilar-Setién, A. 2000. Bat lyssavirus infection. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.** 19(1): 177-196.
 - Mittermeier, R. A. y Goettsch de Mittermeier. 1992. La importancia de la diversidad biológica de México. *In: México ante los retos de la biodiversidad* (Sarukhan, J. y Dirzo, R. comp.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. D. F. 63-73 pp.
 - Mohn Nor, M. N. 1999. Emergency Report. **Disease Information, OIE.** 12(20).
 - Moreno-López, J., Correa-Girón, P., Martínez, L. A. C. y Ericsson, A. 1986. Characterization of a *Paramyxovirus* isolated from a brain of a piglet in Mexico. **Arch. Virol.** 91: 221-231.
 - Murphy, F. A., Fauquet, C. M. *et al.* 1995. **Virus taxonomy.** Springer-Verlang. Vienna.
 - Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C. y Studdert, M. J. 1999. **Veterinary Virology.** 3a. ed. Academic Press USA. 629 pp.
 - Navarrete-Navarro, S., Aguilar-Setién, A., Ávila-Figueroa, C., Hernández-Sierra, F. y Santos-Preciado, J. I. 1999. Improved serological response to human diploid cell rabies vaccine when given simultaneously with antirabies hyperimmune globulin. **Arch. Med. Res.** 30(4): 332-337.
 - Ortega, J. R. V., Delgado, M. A. M., Campero, D. B. y Cordova, D. O. 1987. Presence of rabies antibodies and virus in *Desmodus rotundus* and other bats in a region of the humid zone of the Tehuantepec Isthmus, Mexico (English abstract.). **Vet. Bull.** 57:283.
 - Pan American Health Organization (PAHO). 1991. Expert consultation on the care of person exposed to rabies transmitted by vampire bats. 1-5 April, **Washington, D. C. PAHO.** Washington, D. C. 132 pp.
 - Pawan, J. L. 1936. The transmission of paralytic rabies in Trinidad by the vampire bat (*Desmodus rotundus murinus*, Wagner 1840). **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 30: 101-130.
-

-
- Ramírez-Pulido, J. y Castro-Campillo, A. 1990. **Bibliografía reciente de los mamíferos de México 1983/1988**. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México. D. F. 120 pp.
 - Ramírez-Pulido, J., Britton, M. C., Perdomo, A. y Castro-Campillo, A. 1986. **Guía de los mamíferos de México. Referencias hasta 1983**. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México, D. F. 720 pp.
 - Ramírez-Pulido, J., Castro-Campillo, A., Arroyo-Cabrales, J. y Cervantes, F. A. 1996. Lista taxonómica de los mamíferos terrestres de México. **Occas. Papers Mus. Texas Tech Univ.** 158: 1-62+ Errata.
 - Ramírez-Pulido, J., López-Wilchis, R., Müdespacher, C. y Lira, I. E. 1983. **Lista y bibliografía reciente de los mamíferos de México**. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México, D. F. 363 pp.
 - Reagan, K. J. y Wunner, W. H. 1985. Rabies virus interaction with various cell lines is independent of the acetylcholine receptor. **Arch. Virol.** 84: 277-282.
 - Ressang, A. A., Gwan, S. I. y Hardjosworo, S. 1963. Bats, rodents and rabies in Indonesia. **Communic. Vet.** 7: 33-59.
 - Rodríguez-Villela, M., Lara-Sagahon, V., Camacho-Machin, J., Aguilar-Setién, A. y Ciprian-Carrasco A. 1988. Détection chez la truie d'anticorps dirigés contre le parvovirus porcine par inhibition de l'hémagglutination à partir de sang adsorbé sur papier buvard. **Ann. Méd. Vét.** 132: 687-691.
 - Rosales, E. F., Ramos, R. I., Sánchez-Mejorada, P. H. y Correa, G. P. 1987. Anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (IH) contra el paramyxovirus porcino LPM en cerdos y ratas de las mismas granjas. **Mem. XXI Reunión Nacional, Asociación Mexicana de Producción Animal, AMPA-87**. México. 163 pp.
 - Rupprecht, C. E., Dietzschold, B. *et al.* 1991. Antigenic relationship of lyssaviruses. *In: The Natural History of Rabies* (Baer, G. M. ed.). 2ª ed. CRC Press. Boca Raton, FL. pp: 69-10.
 - Scatterday, J. E. 1954. **Proc. 91st Annual Meeting Am. Vet. Med. Assoc.** pp: 410-413.
 - Smith, J. S., Orciari, L. A. y Yager, P. 1995. Molecular epidemiology of rabies in the United States. **Semin. Virol.** 6: 387-400.
-

- Steece, R. y Altenbach, J. S. 1989. Prevalence of Rabies Specific Antibodies in the Mexican Free-Tailed Bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*) at Lava Cave, New Mexico. **Journal of Wildlife Diseases**. 25(4): 490-496.
- Tellez-Girón, A. 1944. **Rev. Soc. Mex. Hist. Natur.** 5: 35-42.
- Tiang, H., de la Port, S., *et al.* 1986. Infection of rat myotubes and neurons from the spinal cord by rabies virus. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 45: 28-42.
- Tordo, N. 1993. Rhabdovirus: Virus de la Rage. *In: Virologie Medicale* (Crainic, R. y Nicolas, J. -C. Coord.). Editions Médicales Internationales. Paris. pp. 317-333.
- Tordo, N., Chariton, K. y Wandeler, A. 1998. Rhabdoviruses: rabies. *In: Topley & Wilson's microbiology and microbial infections* (Collier, L. H. ed.). Arnold, London. pp. 666-692.
- Valdespino, J. R. O. 1983. **Presencia de anticuerpos y virus rábico en *Desmodus rotundus* y otros murciélagos en la zona húmeda del Istmo de Tehuantepec, región de alta incidencia de rabia paralítica bovina (derriengue)**. Tesis de Licenciatura. F. E. S. Cuautitlán. Univ. Nac. Autón. Méx. 28 pp.
- Venters, H. D., Hoffart, W. R., Scatterday, J. E. y Hardy, A. V. 1954. Rabies in bats in Florida. **Am. J. Publ. Health.** 44: 182-185.
- Villa, R. B. 1956. Una extraña mortandad de murciélagos *Mormoops megalophylla* en el norte de México. **An. Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. Méx.** 26: 547-552.
- Villa, R. B. 1966. **Los murciélagos de México**. Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. Méx. XVI+491 pp.
- Walker, P. J., Byrne, K. E. *et al.* 1992. The genome of bovine ephemeral fever rhabdovirus contains two related glycoproteins. **Virology.** 191: 49-61.
- Walker, P. J., Wang Y. *et al.* 1994. Structural and antigenic analysis of the nucleoprotein of bovine ephemeral fever rhabdovirus. **J. Gen. Virol.** 75: 1889-1899.
- Westbury, H. A. 2000. *Hendra* virus disease in horses. *In: An update on zoonoses* (P.-P. Pastoret, ed.). **Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.** 19(1): 151-159.
- WHO. 1992. **WHO Expert Committee on Rabies – Eighth Report**. WHO Geneva.

-
- Wunner, W. H. y Reagan, K. J. 1986. Nature of rabies virus cellular receptor. *In: Virus Attachment and Entry into Cells* (Croyell, R. L. y Lonberg-Holm, K. eds.). American Society for Microbiology. Washington, D. C. pp. 152-159.
 - Young, P. L., Halpin, K., Selleck, P. W., Field, H., Gravel, J. L., Kelly, M. A. y Mackenzie, J. S. 1996. Serologic evidence for the presence in *Pteropus* bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus. **Emerg. Infect. Dis.** 2: 239-240.
-

APÉNDICE 1

En el estado de Colima podemos encontrar a las siguientes especies de quirópteros según Ramírez-Pulido *et al.* (1983) y registros obtenidos del SICRIMA (Sistema de Recuperación de Información Mastozoológica de la UAMI); además se incluyen especies que Hall (1981) incluye en el estado según su distribución. Las especies que se encuentran seguidas por un asterisco son las capturadas en este estudio.

ORDEN CHIROPTERA**FAMILIA EMBALLONURIDAE****SUBFAMILIA EMBALLONURINAE****TRIBU DICLIDURINI**

Balantiopteryx plicata plicata Peters, 1867

Diclidurus albus Wied-Neuwied, 1820

Saccopteryx bilineata centralis Thomas, 1904

FAMILIA NOCTILIONODAE

Noctilio leporinus mastivus (Vahl, 1797)

FAMILIA MORMOOPIIDAE

Mormoops megalophylla megalophylla Peters, 1797 *

Pteronotus davyi fulvus (Thomas, 1892)

Pteronotus parnelli mexicanus (Miller, 1902) *

Pteronotus personatus psilotis (Dobson, 1878)

FAMILIA PHYLLOSTOMIDAE**SUBFAMILIA MACROTINAE**

Macrotus waterhousii mexicanus Saussure, 1860

SUBFAMILIA MICRONYCTERINAE

Micronycteris sylvestris Thomas, 1896

Micronycteris megalotis mexicana Miller, 1898 *

SUBFAMILIA PHYLLOSTOMINAE**TRIBU GLOSSOPHAGINI**

Anoura geoffroyi lasiopyga (Peters, 1868)

Choeronycteris mexicana Tschudi, 1844

Choeronyctus goodmani (Thomas, 1903)

Glossophaga commissarisi commissarisi Gardner, 1962 *

Glossophaga commissarisi hespera Webster y Jones, 1980

Glossophaga leachii (Gray, 1915)

Glossophaga morenoi morenoi Martínez y Villa-R., 1938 *

Glossophaga soricina handleyi Webster y Jones, 1980 *

Hylonycteris underwoodii Thomas, 1903

Leptonycteris nivalis Saussure, 1860

Leptonycteris curasoae yerbabuena Martínez y Villa-R., 1940 *

Musonycteris harrisoni Schaldach y McLaughlin, 1960

TRIBU STENODERMATINI

- Carollia subrufa* (Hahn, 1905)
Carollia perspicillata (Ver Villa-R., 1967)
Stumira liliium parvidens Goldman, 1917 *
Stumira ludovici ludovici Anthony, 1924
Artibeus intermedius intermedius J. A. Allen, 1897 *
Artibeus hirsutus Andersen, 1906
Artibeus jamaicensis Leach, 1821 *
Artibeus jamaicensis triomylus Handleyi, 1966
Artibeus lituratus (Olfers, 1818) *
Dermanura azteca hespera *
Dermanura tolteca hespera (Davis, 1969) *
Dermanura azteca azteca (Andersen, 1906)
Dermanura phaeotis nana (Andersen, 1906) *
Centurio senex senex Gray, 1842
Chiroderma salvini scopæum Handleyi, 1966

SUBFAMILIA DESMODONTINAE

- Desmodus rotundus murinus* Wagner, 1840

FAMILIA NATALIDAE

- Natalus stramineus saturatus* Dalquest y Hall, 1949 *

FAMILIA VESPERTILIONIDAE

SUBFAMILIA VESPERTILIONINAE

- Eptesicus furinalis* (D'Orbigny, 1847)
Eptesicus fuscus (Palisot de Beauvois, 1796)
Lasiurus cinereus (Palisot de Beauvois, 1796)
Lasiurus ega (Gervais, 1856)
Lasiurus intermedius intermedius H. Allen, 1862
Lasiurus borealis (Müller, 1776)
Lasiurus blossevilli teliotis (H. Allen, 1891) *
Myotis californica (Audubon y Bachman, 1842)
Myotis carteri La Val, 1973
Myotis fortidens fortidens Miller y G. H. Allen, 1928
Myotis leibii (Audubon y Bachman, 1842)
Myotis nigricans Schinz, 1821
Myotis thysanodes Miller, 1867
Myotis velifera velifera (J. A. Allen, 1890)
Myotis volans (H. Allen, 1866)
Pipistrellus hesperus (H. Allen, 1864)
Rhogeessa alleni Thomas, 1892
Rhogeessa gracilis Miller, 1897
Rhogeessa parvula H. Allen, 1866
Rhogeessa parvula major Goodwin, 1958 *

FAMILIA MOLOSSIDAE

SUBFAMILIA MOLOSSINAE

- Eumops glaucinus glaucinus* (Wagner, 1843)
Eumops underwoodii underwoodii Goodwin, 1840
Molossops greenhalli (Goodwin, 1958)
Molossus rufus E. Geoffroy St.-Hilaire, 1805
Molossus molossus (Pallas, 1766)
Molossus sinaloe sinaloe J. A. Allen, 1906
Promops centralis centralis Thomas, 1915

SUBFAMILIA TADARINAE

Nyctinomops aurispinosus (Peale, 1848)

Nyctinomops femorossacus (Merriam, 1889)

Nyctinomops macrotis (Gray, 1839)

Tadarida brasiliensis mexicana (Saussure, 1860)

La clasificación taxonómica se encuentra realizada con base a la presentada por Ramírez-Pulido *et al.* (1996).