



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Frecuencia del virus de la rabia en quirópteros hematófagos de algunas áreas endémicas del estado de Hidalgo y la Sierra Norte del Estado de Veracruz por inmunofluorescencia directa y detección molecular.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

José Ignacio Olave leyva

TUTOR:

Dr. J. Álvaro Aguilar Setién

COMITÉ TUTORAL:

Dr. José Juan Martínez Maya

Dr. Rogelio Alonso Morales

México, D.F.

Agosto, 2009



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.

## *Dedicatorias*

*Este trabajo esta dedicado principalmente a mi Esposa, Erika Judith Galindo Mendoza y a mis hijos Christian Olaf Olave Galindo y Josué Adolfo Olave Galindo quien son mi principal motivo para lograr mi superación profesional y personal.*

*A mis padres Oscar Gerardo y María del Carmen, por su apoyo e inigualable confianza para poder culminar una meta más en mi vida profesional y personal.*

*A mis Hermanos: Erika, Berenice, Alejandra, Héctor Eduardo y Victor Manuel.*

*A mis sobrinos: Erick, Agustin, Dulce, Kassandra, Jaziel, Tamara, Hector y Tania. Quienes son parte importante en mi vida, con amor y respeto.*

*Con gratitud permanente con emoción y respeto dedico este trabajo al Dr. José Álvaro Aguilar Setián por su inigualable confianza y por creer en mi.*

***José Ignacio***

## **Agradecimientos**

*A mi esposa Erika Judith Galindo Mendoza, por apoyarme siempre en todos los momentos vividos durante la realización de este trabajo y sobre todo por la gran confianza que me has demostrado.*

*Al Dr. J. Álvaro Aguilar Setién por todos sus consejos y por sembrar en mi el deseo de culminar esta meta, por su confianza muchas gracias Dr. Aguilar.*

*A Nidia G. Aréchiga Ceballos, por todo el apoyo y por compartir tus conocimientos conmigo pero sobre todo por dedicar gran parte de tu tiempo para poder culminar este trabajo.*

*A todos mis profesores de la FMVZ-UNAM: Dr. José Juan Martínez Maya, Dr. Rogelio Alonso Morales, Maestra Adriana Ducoint W., Dr. Raúl Vargas García, Humberto Ramírez Mendoza, Gerardo Suzan A. Por compartir sus conocimientos y ser una gran guía en este camino.*

*A mis compañeros y amigos de la UAEH: Juan Ocampo, Rosalinda Acosta, Jorge Acosta, Victor Martínez, Javier Piloni, Jesus Peralta, Rosario Jiménez, Lupita Torres, Isidro Alejos, Rocio Hernández, Oscar del Razo, Patricia B. Garcia, Mónica Denova, Ciro Estrada, Ana Laura Pereira. Por todos sus consejos y por ser ejemplo a seguir como profesionistas y personas.*

*A mis compañeros y Amigos del laboratorio del Centro Médico Nacional siglo XXI: Mónica Salas, Guillermo Gálvez, Martha Garcia, Leonardo Perea, Hayde Moreno, Emiliano Tesoro, Leticia Ramos. Por sus apoyo para la realización de este trabajo.*

*A mis compañeros y Amigos de la FMVZ-UNAM: Emilio Rendón, Oscar Rico, Claudia Muñoz, Ana Martínez, Froylan Rodríguez, Angel Olivares, Luis Gómez.*

*A mis amigos y colaboradores por apoyarme en las capturas de los murciélagos: Oscar Silva, Francisco Guillen, Hugo Barrios, Victor Martínez y Regino Mogollon.*

*A todo el personal administrativo y Docente del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Salud y de la Producción Animal de la FMVZ-UNAM, gracias por todas su atenciones.*

*A la Familia Ocampo Soto: Por su apoyo y gran amistad, gracias Sara E. Soto y Juan Ocampo e hijos.*

*A la Familia Pavón Islas: Por su invaluable Amistad: Gracias Griselda Islas y Edgar Pavón e hijas.*

*A todos mis alumnos que me acompañaron a las capturas y que me apoyaron en la realización de este trabajo.*

*A CONACYT: Por Otorgarme la beca para poder realizar mis estudios de Maestría en la Universidad Nacional Autónoma de México.*

<b>Índice.</b>	<b>Página</b>
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Antecedentes Históricos	3
Etiología de la rabia	4
Propiedades fisicoquímicas del virus rábico	6
Replicación del virus	11
Epizootiología de la rabia	12
La rabia en los murciélagos hematófagos	13
Control de la rabia parálitica bovina en Hidalgo y Veracruz	16
Diagnóstico de la rabia	17
Justificación	19
Objetivo general	20
Objetivo particular	20
Material y métodos	
Descripción del área de trabajo	21
Criterios para inclusión de las muestras y procesamiento de las mismas	21
Estrategias de captura	22
Toma de muestras	23
Detección de antígenos rábicos por IFD en muestras frescas	24

Diagnóstico molecular por las técnicas de RT-PCR y PCR	25
Metodología para el análisis de resultados	29
Resultados	32
Obtención y procesamiento inicial de las muestras	32
Detección de Antígenos rábicos por IFD	36
Diagnóstico molecular por RT-PCR y PCR semi anidada	37
Análisis de los datos a través del coeficiente de Kappa	40
Discusión	43
Conclusiones	49
Literatura citada	51

### **Índice de tablas**

1. Clasificación de los lyssavirus y su distribución	5
2. Patrón de reactividad antigénica de anticuerpos monoclonales en contra del virus de la rabia en América Latina	8
3. Criterios para la interpretación de los resultados de la prueba de Kappa	31
4. Sitios de Captura por municipio y mes de captura	32

<b>Índice de figuras.</b>	<b>Página</b>
1.Posición dentro del genoma de los 5 cistrones que codifican para las proteínas estructurales del virus de la rabia	6
2.Virus de la rabia y distribución de sus proteínas estructurales y ácidos nucleicos	6
3. Ciclo de replicación del virus de la rabia modificado de Lodish et al., 2005	11
4. Focos de casos de rabia paralítica bovina durante el periodo de 1997 a 2007	15
5.Desmodus rotundus capturado en refugio ubicado en Progreso de obregón Hidalgo	23
6 Sitios de captura de las muestras positivas	33
7. Captura en corral	34
8. <i>Desmodus rotundus</i> capturado en refugio	35
9. Extracción del encéfalo de murciélago hematófago ( <i>Desmodus rotundus</i> )	35
10 A y B. Comparación de un campo fluorescente positivo a rabia y un campo negativo	36
11. Productos de RT-PCR para el gen N con los oligos JW 12 y JW 6	37
12 .Productos de PCR semi anidada del gen N	38
13. Productos de PCR semi anidada del gen N	38
14. Mapa de casos positivos de RPB en el Estado de Hidalgo	48

Abreviaturas y siglas usadas.

CDC= Centro de control de enfermedades siglas en inglés

CMN= Centro Médico Nacional

DNA= Ácido desoxiribonucleico

IFD= Inmunofluorescencia Directa

IMSS= Instituto Mexicano del Seguro Social

Msnm= Metros sobre el nivel del mar

OMS= Organización Mundial de la Salud

OPS= Organización Panamericana de la Salud

pb= Pares de bases

PCR= Reacción de la Cadena de la Polimerasa

RNA= Ácido ribonucleico

RT- PCR= Reacción de la Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa

SAGARPA= Secretaria de Agricultura Desarrollo Rural Pesca y Alimentación

SENASICA = Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

SIVE= Sistema de Vigilancia Epidemiológica

UAEH= Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo



## Resumen

En los últimos 10 años en el Estado de Hidalgo y Veracruz se ha observado el aumento de la prevalencia de la rabia en bovinos, sin embargo la frecuencia del virus rábico en el vector *Desmodus rotundus* ha sido poco estudiada. El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia del virus rábico a partir de encéfalos obtenidos de *Desmodus rotundus* capturados en algunas áreas endémicas del Estado de Hidalgo y la Sierra Norte del Estado de Veracruz, aplicando 3 pruebas diagnósticas con diferente sensibilidad y especificidad: inmunofluorescencia directa (IFD), Reacción de la Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa (RT-PCR) y (PCR) semianidada ambas basadas en el gen N del virus de la rabia y amplificar 606 y 586 pares de bases . Las 100 muestras se procesaron en 2 instituciones distintas (IMSS-UAEH) resultando positivas 11 por (IFD) (11%) más alta que la reportada del 1 al 3% lo que hace suponer un alto riesgo de transmisión por la alta frecuencia en el vector, 7 por RT-PCR (7%) y 35 por PCR semianidada (35%). La concordancia de las pruebas fue evaluada por la prueba de Kappa, los valores encontrados: IFD con RT-PCR 0.42 se interpretada como buena, RT-PCR y PCR semianidada fue de 0.26 regular, de IFD-PCR semianidada fue de 0.39% regular. La alta frecuencia detectada por PCR semianidada sugiere que el virus esta circulando en títulos indetectables por la pruebas de IFD y RT- PCR, pero si por PCR semianidada.

Palabras clave: rabia, murciélagos, áreas endémicas, frecuencia.

## Abstract

At last ten years, in Hidalgo and Veracruz states, has been watch an prevalence increment of bovine rabies. The frequency of rabies virus in its main wildlife vector (*Desmodus rotundus*) in this region has not been extensively studied. The objective of this work was to determine the frequency of rabies in *D. rotundus* captured in the State of Hidalgo and the Northern Sierra of the State of Veracruz where cattle rabies outbreaks occurred. Nervous tissue samples were obtained and three tests were applied for the detection of rabies virus: direct immunofluorescence (IFD), RT-PCR, and semi-nested PCR. RT-PCR tests were performed amplifying a 606pb fragment of the N gene of rabies virus; then, a semi-nested PCR was performed using specific primers for amplifying a 586pb fragment. Both PCR reactions were performed in two different laboratories to discard false positive reactions. From the 100 captured vampire bats: 11 were positive for rabies virus (11 %) by IFD more higher than previous reports (1-3%). This permit suppose an high transmission risk because the high vector frequency than previous reports, 7 (7 %) by RT-PCR and 35 (35 %) by semi-nested PCR. The concordance estimated with the Kappa test was of: IFD-RT-PCR 0.42; RT-PCR- semi-nested PCR 0.26, and IFD- semi-nested PCR 0.39, which confirms the high sensitivity of the semi-nested PCR. The high frequency detected by semi-nested PCR in *D. rotundus* suggests that the virus circulates in this species with titers undetectable by IFD and RT-PCR.

Key works: rabies, bats, endemic areas, frequency.

## **Introducción**

### **Antecedentes históricos y generalidades**

La rabia es una enfermedad viral de los mamíferos incluyendo al humano, caracterizada por encefalomiелitis, parálisis y muerte. (Fenner *et al.*, 1987) De curso agudo y letal, se transmite por mordedura de un animal infectado a uno susceptible (Baer & Smith, 1991).

La rabia como enfermedad ha sido conocida y documentada por diversas culturas desde hace miles de años (Wilkinson, 1998), su conocimiento se remonta aproximadamente al siglo 23 A.C (Baer, 1982). La palabra rabia deriva del sanscrito *Rhabas* que significa violencia y los griegos la denominaban *Lyssa* o *Lytta* lo cual significa locura. Aristóteles en el año 322 A.C. describe por primera vez la transmisibilidad de la enfermedad posteriormente los romanos Cardanus y Marcellus Donatus logran atribuir a la saliva de los animales enfermos la capacidad infectante (Baer, 1982).

Celsus en el año 100 A.C acuña el término “Hidrofobia” y señaló que la saliva de los animales enfermos contenía al agente infeccioso además de describir que la mordedura era el principio de la transmisión de la enfermedad y enfatizó sobre los cuidados iniciales en la herida (Guinto *et al.*, 1996).

En 1804 Zinke logró reproducir la enfermedad en perros sanos al inocular la saliva de animales enfermos, con lo cual contribuyó a comprobar la propiedad transmisible de la rabia (Steele y Fernández, 1991).

En 1879 Pierre- Víctor Galtier estudia la reproducción de la enfermedad con un modelo animal utilizando conejos. En 1885 Luis Pasteur desarrolló la primera vacuna antirrábica y la aplicó por primera vez a un humano (Steele y Fernández, 1991).

En 1903 Paul Remlinger demostró la etiología viral de la enfermedad, y en ese mismo año Negri descubrió los cuerpos de inclusión que llevan su mismo nombre. Este último hallazgo contribuyó al diagnóstico histopatológico de la enfermedad.

### **Etiología de la rabia**

La rabia es causada por un virus, que pertenece al orden de los Mononegavirales, familia Rhabdoviridae, género *Lyssavirus* (Wilkinson 1988, Nadin & Loza 2006). Con base en sus propiedades genéticas y antigénicas, el género *Lyssavirus* se ha dividido en 7 genotipos. El genotipo 1 corresponde al virus de la rabia clásica que incluye a las cepas de referencia de laboratorio, a las cepas vacunales, así como a los virus aislados de animales rabiosos silvestres o domésticos a través de todo el mundo. En el continente Americano solamente el genotipo 1 ha sido encontrado, los murciélagos son hospederos del genotipo 1 y de esta manera se encuentran involucrados en la transmisión de la rabia al ser humano y a los animales domésticos ( Romero *et al.*, 2006).

Los *Lyssavirus* del genotipo 2 al 7 son virus relacionados con el virus de la rabia clásica (Tabla 1) que se han aislado sólo en el viejo mundo (África y Europa); (GT2- África) murciélago de lagos; (GT3- África) Mokola; (GT4- África) Duvenhage; (GT5- Europa) *Lyssavirus* 1 del murciélago europeo o EBL1 (GT6- Europa) EBL2, y (GT7- Australia) *Lyssavirus* del murciélago Australiano o ABLV. (Loza & Aguilar, 1998; Zerai 2002; Picard *et al.*, 2004).

Tabla 1. Clasificación de Lyssavirus y su distribución.

Nombre	Abreviación (ICTV) <sup>a</sup>	Serotipo	Genotipo	Vectores potenciales y reservorios	Distribución
Lyssavirus (Virus de la rabia clásica)	RABV	I	I	Carnívoros (todo el mundo); murciélagos (América)	El mundo entero, excepto Australia, Gran Bretaña, Irlanda, Nueva Zelanda, Japón, Antártica, Escandinavia, Hawaii.
Lagos-Bat-Virus	LBV	II	II	Murciélagos frugívoros (Megachiroptera)	Nigeria, República Centroafricana, Sudáfrica, Zimbabwe, Senegal.
Mokola-Virus	MOKV	III	III	Posiblemente musaraña, gato, perro, roedores.	Nigeria, República Centroafricana, Sudáfrica, Zimbabwe, Camerún.
Duvenhage Virus	DUVV	IV	IV	Murciélagos insectívoros	África del sur
European Bat Lyssavirus 1	EBLV 1		V	Murciélagos insectívoros ( <i>Eptesicus serotinus</i> y <i>Pipistrellus</i> .)	Europa
European Bat Lyssavirus 2	EBLV 2		VI	( <i>Myotis</i> spp.)	Europa
Australian Bat Lyssavirus	ABLV		VII	Murciélagos frugívoros/insectívoros (Megachiroptera/Microchiroptera)	Australia
Aravan virus	ARAV	?	?	Murciélagos insectívoros	Asia Central
Khujand virus	KHUV	?	?	Murciélagos insectívoros	Asia Central
Irkut virus	IRKV	?	?	Murciélagos insectívoros	Este de Siberia
West Caucasian bat virus	WCBV	?	?	Murciélagos insectívoros	Región caucásica

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. Modificado de: Bourhy & Sureau, 1991;

[http://www.who.rabies-bulletin.org/About\\_Rabies/Classification.aspx](http://www.who.rabies-bulletin.org/About_Rabies/Classification.aspx).

## Propiedades Físicoquímicas del Virus rábico

Como se ha mencionado el genoma del virus de la rabia es un RNA monocistrónico con polaridad negativa de cadena simple, no segmentado, que contiene aproximadamente 12,000 ribonucleótidos ( $4.6 \times 10^6$  Daltons) El genoma se transcribe de la extremidad 3' a la extremidad 5' en un RNA corto  $\square$  líder  $\square$  y en 5 RNA mensajeros que codifican sucesivamente para las proteínas N, M1, M2, G, y L (Figura 1) (Loza & Aguilar, 1998).

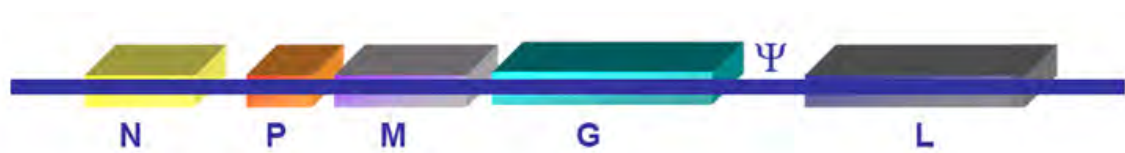


Figura 1. Posición dentro del genoma de los 5 cistrones que codifican para las proteínas estructurales del virus de la rabia. Tomada de [www.cdc.gov/rabies/virus.html](http://www.cdc.gov/rabies/virus.html).

## Proteínas estructurales y su función

El virus está envuelto por una bicapa lipídica (membrana o envoltura), cuya composición es semejante a la de la membrana neuronal. En la membrana está insertada la glicoproteína denominada G. Hacia el interior esta la proteína de matriz o M, la nucleocápside constituida por tres proteínas (N, P y L) y el ácido nucleico que es un RNA de cadena sencilla y de polaridad negativa (Figura 2).

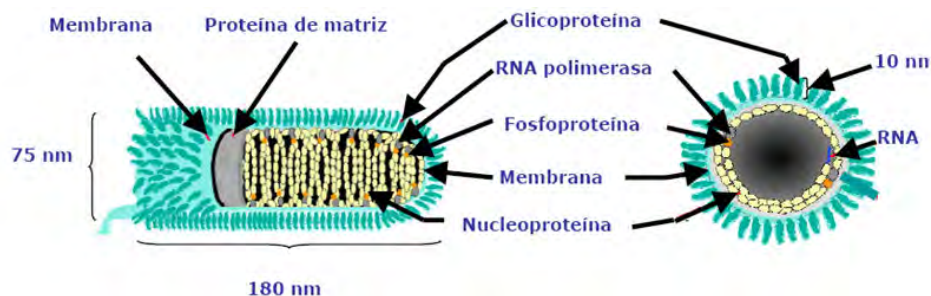


Figura 2. Virus de la rabia y su distribución de sus proteínas estructurales y ácido nucleico; corte semilongitudinal izquierda; corte transversal derecha. Tomada de [www.cdc.gov/rabies/virus.html](http://www.cdc.gov/rabies/virus.html).

## **Descripción de las proteínas en el orden que están codificadas en el virus de la rabia**

### **Proteína N**

La proteína N, deriva su nombre de nucleoproteína, es el principal constituyente de la nucleocápside (NC) alrededor del 90%, conformada por 450 aminoácidos es reconocida por la inmunidad humoral y celular (Morales *et al.*, 2006) y tiene un peso molecular aproximado a los 57,000 Daltons (Minamoto *et al.*, 1994).

Como la proteína N es la más abundante durante la replicación del virus en el sistema nervioso central y los cultivos celulares, es la que se detecta en mayor proporción durante el diagnóstico por la técnica de inmunofluorescencia directa, IFD (Trimarchi y Smith 2002, Morales *et al.*, 2006,). La interacción inmediata de la nucleoproteína y la fosfoproteína (P) impide la formación de agregados de N lo cual permite la encapsidación del complejo N-RNA (Buchholz *et al.*, 1994). El sitio de unión de N al RNA posiblemente se encuentra entre los residuos 298 y 352 (Kouznetzoff *et al.*, 1998).

El desarrollo de anticuerpos monoclonales que reconocen varios epítomos dentro de esta proteína así como su secuenciación nucleotídica parcial y total en varios aislamientos del genotipo 1 han convertido a esta proteína en un elemento importante para la identificación y tipificación de variantes del virus de la rabia con interés epidemiológico y taxonómico (Rupprecht *et al.*, 1987 y 1991, Smith, 1989).

Los anticuerpos monoclonales permiten análisis antigénicos comparativos de las variantes del virus de la rabia. En América Latina y el Caribe, los laboratorios de referencia utilizan un panel de anticuerpos monoclonales creado por el centro de control de enfermedades, Atlanta Georgia (CDC por sus siglas en inglés) para realizar la caracterización antigénica de los aislados de rabia y así poder identificar a los animales involucrados con el mantenimiento del virus de la rabia y su transmisión (Tabla 2). (Velasco Villa *et al.*, 2006).

Tabla 2. Patrón de reactividad antigénica de anticuerpos monoclonales en contra del virus rábico en América Latina.

Acs Monoclonales	C1	C4	C9	C10	C12	C15	C18	C19	Variante
CVS/ERA/SAD/PAST	+	+	+	+	+	+	+	+	Control
Perro/ mangosta	+	+	+	+	+	+	-	+	1
Perro	+	+	-	+	+	+	-	+	2
Zorro de Arizona	+	+	+	-	+	+	-	+	7
Zorrillo	-	+	+	+	+	+	+	+	8
Zorrillo de BCS	+	+	+	+	-	+	-	+	10
* <i>Lasiurus cinereus</i>	+/-	+	+	+	+	-	-	-	6
* <i>Tadarida brasiliensis</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	4
* <i>Tadarida b. mexicana</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	9
Vampiro	-	+	+	+	+	-	-	+	3
Vampiro	-	+	+/-	+	+	+/-	-	+/-	5
Vampiro	-	+	+	+	-	-	-	+	11

\* Murciélagos insectívoros  
Ciclo terrestre  
Ciclo aéreo

## Proteína M1

La proteína M1 es un componente estructural minoritario del virión. Esta conformada por 297 aminoácidos, se asocia con la ribonucleoproteína e interactúa con la polimerasa, regulando la replicación del genoma viral. Es el componente más hidrofílico de las 5 proteínas estructurales del virus ya que contiene aminoácidos polares en los dos primeros tercios del extremo amino terminal (Conzelman *et al*; 1990). Ésta sólo se acumula en el citoplasma de las células durante el proceso de replicación razón por la que inicialmente se consideraba como no estructural (Capone & Ghosh, 1984).



### **Proteína M**

La proteína M, representa casi el 30 % de la proteína total del virión, se trata de una proteína de naturaleza básica, no glicosilada de 202 aminoácidos de longitud. Su estructura primaria exhibe un segmento central rico en aminoácidos hidrofóbicos, el que le permite unirse a las membranas (Capone & Ghosh 1984; Tordo *et al.*, 1986). Una de sus propiedades funcionales es la regulación negativa de la transcripción viral y celular. La proteína M es la responsable de la forma de bala de la partícula viral y es el componente responsable de mediar la unión de la ribonucleoproteína (RNP) a la célula blanco. Promueve la gemación de las partículas virales a través de la interacción de su dominio rico en prolina con proteínas del citoesqueleto y otras proteínas involucradas en señales de transducción y regulación genética.

La proteína M juega un papel importante en el control de la transcripción del RNA viral, mediante la regulación de la función de la RNA-polimerasa viral (Finke & Conzelman, 2005). De esta manera la proteína M, también juega un papel importante dentro de la regulación de la expresión proteica y garantiza la replicación del RNA genómico dentro de las últimas etapas del ciclo de replicación (Wunner, 1991).

### **Glicoproteína G**

La proteína G participa en la unión del virus con las células blanco e inicia las relaciones entre ambos al unirse los receptores celulares y junto con la proteína M, está implicada en la formación de la envoltura vírica y en la producción de viriones. La glicoproteína G tiene un peso molecular de 67, 000 daltons, contiene 3% de carbohidratos (Benmansour *et al.*, 1992; Bourhy *et al.*, 1993).

La proteína G es importante para la patogenicidad y el neurotropismo del virus *in vivo*; además juega un papel preponderante en la respuesta inmunitaria del hospedero porque es responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes y la estimulación de los linfocitos T cooperadores y citotóxicos (Marston *et al.*, 2007), provocando que los animales vacunados con la proteína presenten inmunidad frente al desafío de la infección con la del virus.

## **Proteína L**

La proteína L (large) es una sub unidad del complejo RNA polimerasa y se encuentra combinada con unas moléculas de M1 para formar la polimerasa viral y no contribuye a la antigenicidad viral de manera significativa. Sin embargo la cantidad de proteína L que contiene el virión se relaciona con la patogenicidad; mientras mayor número de copias contiene, más patógeno el virus, (Loza & Aguilar, 1998). Es responsable de la transcripción y la replicación del RNA viral. Las proteínas N, M1, L asociadas al RNA viral constituyen la ribonucleocápside (RNP) (Poch, *et al*, 1990).

## Replicación del virus

El virus de la rabia se une a las células por medio de la proteína G; se ha demostrado que el receptor nicotínico de la acetilcolina puede servir como receptor celular para el virus de la rabia. El genoma del RNA de una sola cadena es transcrito por la RNA polimerasa vinculada con el virión a cinco especies de mRNA. La plantilla para la transcripción es el genoma de RNA en forma de ribonucleoproteína (RNP) (Encerrado en la proteína N y el cual contiene la transcriptasa viral). El mRNA monocistrónico codifica las cinco proteínas del virión. El genoma RNP es una plantilla para el RNA complementario de sentido positivo que se encarga de la generación de la progenie de RNA de sentido negativo (Brooks *et al.*, 1998).

Las mismas proteínas virales sirven como polimerasa para la replicación del RNA viral y también para la transcripción. Se requiere de la traducción simultánea para la replicación, particularmente de las proteínas virales N y M1. El RNA genómico recién formado se une a la transcriptasa viral y a la nucleoproteína para formar centro RNP en el citoplasma. Las partículas adquieren una envoltura por gemación a través de la membrana plasmática. La proteína de matriz forma una capa sobre la zona interna de la envoltura, en tanto que la glicoproteína viral se encuentra sobre la capa externa y forma las espículas (Dietzschold *et al.*, 1996), (Figura 3).

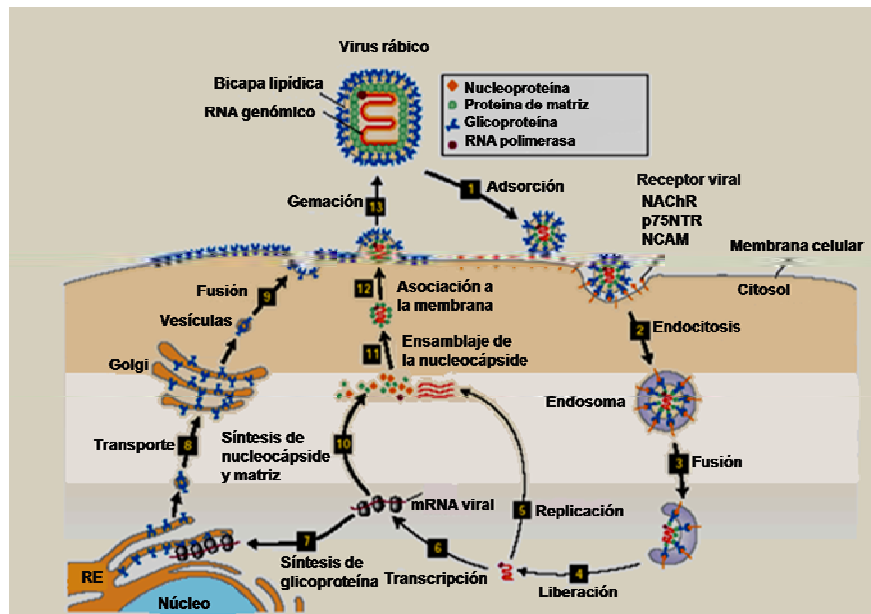


Figura 3. Ciclo de replicación del virus de la rabia. Modificado de Lodish *et al.*, 2005

## Epizootiología de la rabia en América Latina

La rabia es una zoonosis que afecta a todos los mamíferos incluyendo al ser humano. Se han reconocido 2 ciclos epidemiológicos: urbano y silvestre, en donde el principal reservorio del virus rábico del ciclo urbano es el perro y por lo tanto responsable de la transmisión de la enfermedad en las áreas urbanas (Acha & Sifres, 2001) Por el contrario en el ciclo silvestre se han reconocido una gran diversidad de reservorios como lo son los mamíferos terrestres (zorrillo, mapache, zorros, lobos, mangostas, entre otros) los cuales mantienen el ciclo de transmisión terrestre., y los murciélagos en los que se ha demostrado que son capaces de mantener el virus rábico, en donde el murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*) el cual habita en América Latina tropical y subtropical es una de las especies responsables de mantener el ciclo de transmisión aérea (Aguilar & Loza, 1999).

La rabia urbana y silvestre representa un problema económico y de salud pública en América Latina. Durante el periodo de 1990 a 1996 hubo 1,372 casos de rabia humana en esta región, pero los animales responsables de las exposiciones fueron comprobados para un total de 1,117 casos. El perro doméstico y en particular el murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*) fueron representados en un 80.6% y 11.3% de estos casos respectivamente. (De Mattos *et al.*, 1999). Aproximadamente 3,600 casos de rabia humana fueron reportados en México entre 1939 y 2003 y más del 90% de los casos fueron asociados al perro como su principal transmisor de virus. Los programas de control de la rabia canina han logrado disminuir los casos de rabia en humanos transmitida por perros de un promedio de 70 casos por año durante el periodo de 1939 a 1989 a un total de 320 casos durante el intervalo de 1990 a 2003 (Velasco Villa *et al.*, 2002), del año 2004 al 2007 sólo se han reportado 5 casos en humanos (Secretaría de Salud, 2009). La introducción de los métodos de caracterización antigénica viral ha permitido observar la inferencia entre los reservorios transmisores de la enfermedad y ha revelado que más del 30% del total de los casos reportados de rabia en humanos en los últimos 7 años están asociados con murciélagos.

## La rabia en los murciélagos hematófagos

Los murciélagos hematófagos son considerados como reservorios y vectores del virus rábico por lo tanto juegan un papel importante en el mantenimiento del virus en la naturaleza en zonas tropicales y subtropicales del continente Americano (Aguilar *et al.*, 2005). El orden Chiroptera, al cual pertenecen los murciélagos, es uno de los grupos más diversos de mamíferos. A nivel mundial están descritas más de 1000 especies, las cuales habitan todos los continentes con excepción de la Antártica (Hall, 1981). Se les encuentra en cualquier ambiente terrestre, desde las selvas tropicales hasta dentro del círculo polar Ártico y desde islas oceánicas hasta alturas de más de 3, 500 metros. Hace un poco más de 30 años los murciélagos no eran considerados como reservorios naturales de la enfermedad, sin embargo eso ha cambiado conforme al estudio de la rabia se ha profundizado y los hábitats naturales de estas especies han sido invadidos o perturbados por asentamientos humanos o por cambios en la naturaleza de los mismos. (Messenger, *et al.*, 2002, Velasco Villa *et al.*, 2002).

La rabia en murciélagos hematófagos probablemente ha existido en América desde antes de la colonización. (Malaga, 1954) Crónicas españolas de la época relatan sobre la muerte de soldados y caballos después de haber sido atacados por murciélagos vampiros (Schneider & Santos, 1995).

La rabia en los murciélagos hematófagos o vampiros es un problema limitado a América Latina, Trinidad y Tobago, la presencia del virus rábico ha sido comprobada en las tres especies de murciélagos hematófagos: *Desmodus rotundus*, *Diphylla eucaudata* y *Diaemus youngi*, pero sólo la primera tiene importancia epidemiológica. La distribución de los murciélagos hematófagos *Desmodus rotundus* comprende un área que se extiende desde México hasta la parte central de Argentina (Loza & Aguilar, 1998). *Desmodus rotundus* es responsable de pérdidas en la ganadería latinoamericana, en particular por la rabia paralítica bovina, que ha impedido el desarrollo de nuevas regiones del trópico americano. Se ha estimado que la mortalidad anual que produce este especie, es cercana a las 50,000 cabezas de ganado, lo que sumado a las pérdidas indirectas de carne y leche y la devaluación de

pieles por mordeduras de vampiros, significaría una pérdida anual superior a los US \$ 44 millones (Acha & Szifres, 2001, Jiménez, 2007).

El primer reporte científico sobre la presencia de rabia en bovinos fue realizado en Brasil en el año de 1908 (Carini, 1911). En 1913 se aisló por primera vez al virus a partir de diferentes especies de murciélagos vampiros (Haup & Rehaag, 1921). Después de 1932 y en tiempos actuales la presencia de la rabia transmitida por murciélagos vampiros también ha sido encontrada en varios países del continente Americano, como México, Guatemala, Venezuela, El Salvador, Costa Rica, Perú, Argentina, Colombia y Bolivia. (Nadin-Davis *et al.*, 2006). Actualmente hay evidencias de que los quirópteros albergan al virus de la rabia y otras enfermedades antes que los mamíferos terrestres (Badrane & Tordo 2001).

La información acerca de la prevalencia de la rabia en murciélagos de México es muy escasa, ya que existe poca vigilancia epidemiológica de las poblaciones de quirópteros en nuestro país. Generalmente, los reportes de rabia en murciélagos se refieren a casos sometidos a laboratorios de salud pública debidos a contactos con humanos o animales domésticos como sucede con la rabia parálitica bovina (Velasco *et al.*, 2001).

En México la presencia de la rabia transmitida por animales silvestres al ser humano se empezó a notar con mayor énfasis en un periodo comprendido de 13 años (1990-2003), en el 18% del total de los casos (60/327) se informó la trasmisión por murciélagos y el 5% (12/327) restante se encontraron involucrados a otros animales como zorrillos, zorros, gatos y un mapache. En el 1.5% (5/327) de los casos no se obtuvo información alguna sobre la fuente de trasmisión (Secretaria de Salud, 2003; Velasco Villa *et al.*, 2002).

En México la rabia transmitida por murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) prevalece en 25 estados de la República entre los que se destacan Hidalgo, Puebla, Veracruz, Chiapas, Tabasco, Campeche, Oaxaca, Guerrero y Morelos, donde afecta de manera importante a la ganadería (OPS, 2005, Jiménez 2007).

La prevalencia anual en México de los focos reportados (Figura 4) varía de 2.38 a 4.91%, y si a esto le sumamos la rápida diseminación a nuevas regiones, alcanza a la fecha reportes en 24 de los 25 estados endémicos de vampiros (Jiménez 2007).



Figura 4. Focos de casos de rabia parálitica bovina en México durante el periodo de 1997- 2007(Jiménez, 2007).

### **El control de la rabia paralítica bovina en Hidalgo y Veracruz**

Dentro de las actividades realizadas en la campaña nacional contra la rabia paralítica bovina y control del murciélago hematófago se encuentra la realización del diagnóstico de la enfermedad en el Estado de Hidalgo en los últimos 10 años (1998 a 2008) se han diagnosticado 404 casos de rabia paralítica bovina dentro de las áreas endémicas a murciélagos hematófagos *D. rotundus* (SAGARPA-SIVE 2009) y a la enfermedad: Huasteca, Sierra Gorda, Sierra Alta, Valle del Mezquital Norte, Valle del Mezquital Sur, Altiplano, Sierra Baja, y Sierra Tepehua. Estas actividades están coordinadas por un organismo no gubernamental denominado Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria del estado de Hidalgo, para lo cual cuenta con 16 técnicos especializados distribuidos en las zonas endémicas.

En el Estado de Veracruz de 1997 a 2008 se han diagnosticado 572 casos de rabia paralítica bovina (SAGARPA-SIVE 2009), esta actividad esta coordinada por un organismo no gubernamental denominado Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria del estado de Veracruz Zona Norte ,aquí se encuentran 39 municipios considerados como zonas endémicas de la enfermedad; a diferencia del Estado de Hidalgo en Veracruz la presencia de personal especializado para la ejecución de las actividades de campaña es en menor número y el diagnóstico sólo se realiza mediante las muestras enviadas por productores a los laboratorios regionales.

A pesar de que en ambos estados se realizan esfuerzos para controlar a las poblaciones del murciélago vampiro, el problema de la rabia no ha podido ser detenido. Lo anterior se debe a la extensión geográfica de ambos estados y el poco personal asignado al programa de control. En gran parte de los casos las acciones responden a situaciones de alarma, en momentos en que los ganaderos encuentran reses enfermas o muertas, y realizar medidas de control y prevención en estas condiciones no sirve de nada para detener los brotes de la enfermedad.

Aunado a esto, la alteración indiscriminada del ambiente y la introducción masiva de ganado a las zonas endémicas en ambos estados, agravan el problema.



## Diagnóstico de la rabia

La rabia se caracteriza por un cuadro clínico de encefalitis, cuyos signos varían según el individuo y la especie. En consecuencia, el diagnóstico clínico diferencial con otras encefalitis virales es imposible. Sólo el laboratorio permite establecer un diagnóstico seguro.

El diagnóstico en el laboratorio sirve en la toma de decisiones sobre el inicio y continuación de un tratamiento en humanos o por el contrario, sobre la no prescripción o interrupción del mismo. También tiene un impacto en la vigilancia epidemiológica, al permitir conocer la distribución de la enfermedad en el país, que orienta a las medidas preventivas de vacunación y control de los reservorios de la misma.

Tres principales métodos de diagnóstico en el laboratorio de rabia han sido estandarizados y recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS); la inmunofluorescencia directa (IFD), la prueba en cultivos celulares y la prueba de inoculación en ratones. Estos métodos varían en especificidad y confiabilidad (Heaton *et al.*, 1997; Picard *et al.*, 2004).

La (IFD) se basa en el empleo de anticuerpos dirigidos contra el virus de la rabia, los cuales son capaces de reconocer específicamente los antígenos rábicos. Este principio es utilizado para la detección directa del virus de la rabia en frotis de encéfalo (post- mortem), o en cultivos celulares. Para esto, se utiliza una globulina antinucleocápside de virus de la rabia conjugada con fluoresceína (conjugado antirrábico) (Bourhy & Serau 1991; Heaton *et al.*, 1997).

Esta técnica se empieza a emplear en México a partir de 1970 y por ello se pudieron confirmar un total de 83,491 casos (en el periodo de 1970 a 1989) de los cuales 75,977 (91%) correspondieron a perros, el 9% restante corresponde a fauna silvestre. Actualmente esta técnica se sigue utilizando por ser una prueba rápida para el diagnóstico de la rabia en los laboratorios dedicados a esta actividad (Heaton *et al.*, 1997; Picard *et al.*, 2004).

La inoculación del virus en ratones lactantes.

Los ratones lactantes recién nacidos inoculados por vía intracerebral, son muy sensibles a todos los Lyssavirus de cualquier serotipo. Son el animal de primera opción para el aislamiento del virus rábico. Después de inoculados intracerebralmente se espera que muestren signos clínicos lo cual podría presentarse hasta el día 21, el diagnóstico confirmatorio siempre se realiza a través de la técnica de inmunofluorescencia directa (Bourhy & Serau 1991, Heaton *et al.*, 1997; Picard *et al.*, 2004).

El desarrollo de la biología molecular ha permitido mejorar el diagnóstico a través del empleo de técnicas moleculares como lo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La Reacción de la Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa (RT-PCR) aplicada al diagnóstico de rabia ha demostrado ser una técnica alternativa con un alto grado de sensibilidad en comparación con los métodos de diagnóstico desarrollados antes del advenimiento de las técnicas moleculares (Picard *et al.*, 2004).

Este método diagnóstico permite la detección de ácidos nucleicos de agentes etiológicos infecciosos teóricamente permite detectar la presencia de una sola molécula de DNA los cuales se pueden observar en geles de agarosa a través de la electroforesis. Para realizar la técnica se requiere de la utilización de dos oligonucleótidos (primers) específicos que se hibridan en a las cadenas de DNA opuestas en una molécula blanco que se va a amplificar. Posteriormente se realiza síntesis de DNA, utilizando la enzima Taq polimerasa. La reacción de amplificación se lleva a cabo mediante ciclos sucesivos que comprenden tres temperaturas. Desnaturalización a 94° C, temperatura a la cual las dos hebras del DNA molde se separa en cadenas sencillas. Alineamiento de los primers a 55°C, temperatura a la cual los oligonucleótidos se acoplan con su región complementaria en las cadenas de DNA, flanqueando el fragmento que se va amplificar. Extensión o síntesis de DNA a 72°C, temperatura a la cual se incorporan los desoxiribonucleótidos trifosfato a partir del extremo 3' de los oligonucleótidos, durante la síntesis del DNA con la Taq polimerasa. El resultado de esta reacción es la acumulación exponencial de moléculas problema (Kamolvarin et al 1993, Juárez 2000).

## Justificación

En el Estado de Hidalgo de 1999 a 2008 se han diagnosticado 404 casos de rabia parálitica bovina, confirmados por el laboratorio, Para el estado de Veracruz de 1997 a 2008 se han diagnosticado 530 casos de rabia paralitica bovina. Siendo el murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*) la principal especie transmisora de la enfermedad. Sin embargo la frecuencia de la detección del virus en el vector ha sido poco estudiada. Para el caso de los murciélagos hematófagos se ha referido que la prevalencia es aproximadamente del 1% por inmunofluorescencia directa.

Por lo anterior en este trabajo pretende Determinar la frecuencia del virus de la rabia en murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) capturados en algunas zonas endémicas a rabia paralitica bovina en el Estado de Hidalgo y la Sierra Norte del Estado de Veracruz.

### **Objetivo general**

Detectar el virus de la rabia en muestras aleatorias de murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) de algunas zonas endémicas a rabia paralítica bovina en el Estado de Hidalgo y la Sierra Norte del Estado de Veracruz., utilizando las técnicas de diagnóstico: inmunofluorescencia directa (IFD), Reacción de la Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa (RT-PCR) y (PCR) semianidada para amplificar un segmento del gen N del virus rábico.

### **Objetivos particulares**

1. Colectar un mínimo de 100 murciélagos de las zonas de trabajo (algunas zonas endémicas del estado de Hidalgo y Sierra Norte del Estado de Veracruz).
  
2. A partir de muestras de tejido nervioso identificar a los animales positivos mediante la prueba de IFD.
  
- 3.- Extraer el RNA de las muestras (encéfalos) por el método de Trizol® y realizar la retro transcripción utilizando los oligonucleótidos Jw6 y Jw12 que amplifican un segmento del genoma viral dentro del gen que codifica para la proteína N.
  
4. Realizar PCR utilizando iniciadores que amplifican un segmento del genoma viral para la amplificación de un fragmento del gen N del virus de la rabia de 606 pb.
- 5.- A partir de los productos de PCR obtenidos mediante la RT-PCR se utilizaron para la realización PCR semi anidada del gen N con los oligos Jw 12 y un mix de Jw 10 (10.1, 10.2, 10.3) para un fragmento de la nucleoproteína de 586nt.
- 6.- Evaluar la frecuencia del virus rábico a partir de los resultados obtenidos mediante las 3 pruebas diagnósticas
  
- 7.- Evaluar mediante la prueba estadística de concordancia o Kappa los resultados obtenidos en las tres técnicas.

## **Material y métodos**

### **Descripción del área de trabajo.**

El trabajo de investigación se realizó en el Estado de Hidalgo el cual está ubicado en la mesa del centro de la República Mexicana. Al norte  $21^{\circ}24'$ , al sur  $19^{\circ}36'$  de latitud norte; al este  $97^{\circ}58'$ , al oeste  $99^{\circ}53'$  de longitud oeste (INEGI, 2000). Tiene una superficie de  $20,664 \text{ km}^2$ , que representa 1% del territorio nacional y ocupa el 26° lugar por su extensión entre todas las entidades. Hidalgo colinda al norte con los estados de Querétaro, San Luis Potosí y Veracruz; al este, con los de Veracruz y Puebla, al sur, con los estados de Puebla, Tlaxcala y México, y al oeste, con los de México y Querétaro.

El Estado de Hidalgo consta de 84 municipios distribuidos en 9 regiones: Huasteca, Sierra Gorda, Sierra Alta, Valle del Mezquital Norte, Valle del Mezquital Sur, Altiplano, Sierra Baja, Valle de Tulancingo y Sierra Tepehua.

El Estado de Veracruz de Ignacio de la Llave está ubicado al Norte  $22^{\circ} 28'$ , al sur  $17^{\circ} 09'$  de latitud norte; al este  $93^{\circ} 36'$  al oeste  $98^{\circ} 9'$  de longitud oeste. Representa el 3.7% de la superficie del país, colinda al norte con Tamaulipas y el Golfo de México al este con el Golfo de México, Tabasco y Chiapas al sur con Chiapas y Oaxaca; al oeste con Puebla, Hidalgo y San Luis Potosí, cuenta con 210 municipios de los cuales, Huayacocotla, Zontecomatlan y Zacualpan están ubicados en la Sierra Norte del Estado y son colindantes con algunas áreas endémicas de rabias del estado de Hidalgo (INEGI, 2000).

### **Criterios para inclusión de las muestras y procesamiento de las mismas**

Con base en la prevalencia estudiada de la rabia en murciélagos hematófagos en zonas endémicas que varia del 1 al 3%; se capturaron 100 murciélagos hematófagos *Desmodus rotundus* en las zonas de trabajo, algunas zonas endémicas del estado de Hidalgo y Sierra Norte del Estado de Veracruz obtenidos a través de capturas programadas tanto en corral como en refugio.

### **Estrategias de captura**

Se realizaron 6 capturas en corral durante los meses de Junio de 2007 a Julio de 2008, debido al hábito nocturno de los murciélagos hematófagos; el tiempo que se ausentan de sus refugios en busca de alimento lo cual puede suscitarse en las primeras horas de la noche o en las horas finales siendo el momento más adecuado, para la colocación de las redes de niebla alrededor de los corrales para la captura de vampiros en las horas de los días seleccionados.

Previo a iniciar la colocación de las redes para la captura de vampiros, el ganado que presento mordeduras se encerró en el corral, durante tres noches anteriores de la programación de la captura. De esta manera cuando el vampiro se familiarizó a ir al corral para alimentarse. Es importante una orientación de las redes, para ello se analizó la posible vía de entrada de los vampiros tales como son brechas, laderas, arroyos, caminos, cañadas, así como la probable ubicación de los refugios (cuevas, alcantarillas, troncos huecos, entre otros). El tipo de red que se utilizó para la captura de murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*), es manufacturada en una fina malla de nylon color negro, la cual tiene una altura aproximada de 2 metros y de una longitud que varía de 6 a 12 metros según las necesidades en el corral.

Una vez colocadas las redes en el lugar se revisaron cada 15 0 20 minutos aproximadamente para verificar si en ese momento habían quedado atrapados los murciélagos hematófagos para liberarlos de la red y colocarlos en una jaula especial para su traslado al laboratorio y llevar acabó la toma de muestras.

Las capturas de vampiros en refugios, se realizaron durante el día con la ayuda de redes más gruesas. Esto se llevó a cabo con la colaboración de algunos ganaderos de las áreas endémicas tanto del Estado de Hidalgo como del Estado de Veracruz, ya que son ellos quienes conocen perfectamente la ubicación de los refugios.

Los sitios de captura fueron determinados considerando que fueran áreas endémicas en el Estado de Hidalgo y en algunos de los municipios pertenecientes a la Sierra Norte del Estado de Veracruz.



### Toma de Muestras

Una vez capturados los murciélagos se trasladaron al laboratorio, Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, CMN-Siglo XXI, IMSS y al Laboratorio de Bioquímica, Biología Celular y Molecular, edificio de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, en donde se tomaron las muestras (Figura 5 ). Es importante señalar que para la realización del proyecto sólo se utilizaron las muestras de tejido nervioso y las demás (órganos torácicos y abdominales) fueron conservadas para proyectos alternos dado que es muy difícil la obtención de los especímenes y como regla protocolaria en animales de fauna silvestre se procura aprovechar al máximo cada uno de los ejemplares.

Los órganos se tomaron en una mesa de necropsia respetando las medidas de seguridad. Esto se realizó siguiendo el protocolo de necropsias, obteniendo primero los órganos de la cavidad abdominal (riñones, hígado, bazo) y los de la cavidad torácica (Corazón y pulmones). Finalmente se llevó acabo la extracción del encéfalo, las muestras obtenidas se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.



Figura 5. Desmodus rotundus capturado en refugio ubicado en Progreso de obregón Hidalgo a 1894 msnm. ( N20°15'47.5" N° 99°11'29.11").

1

18

Se seleccionó esta técnica de diagnóstico por ser una de las recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (Aguilar *et al.*, 2005) y a demás de estar estandarizada

en el laboratorio de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, CMN-Siglo XXI, IMSS.

Los portaobjetos que se utilizaron se limpiaron perfectamente con alcohol ácido al 1% y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se identificó con un lápiz punta diamante, para cada examen de encéfalo y se realizó 1 frotis en un portaobjetos en una campana de flujo laminar, se dejaron secar las láminas y enseguida se colocaron en un baño de alcohol-acetona (20:80) a -20° C durante 30 minutos.

Las láminas se retiraron del alcohol- acetona y se dejaron secar a temperatura ambiente, se depositaron 50µl de conjugado (anticuerpo monoclonal anti nucleocápside del virus de la rabia conjugado con fluoresceína FITC) en cada frotis, y se verificó que cubriera bien toda la superficie. Se incubaron las láminas 30 minutos a 37° C en atmósfera húmeda.

Se eliminó el exceso de conjugado de cada lámina agua destilada proveniente de un matraz de lavado y se colocaron las láminas en azul de Evans. Preparando una solución concentrada 1/100 (peso/volumen) de azul de Evans en agua destilada. Se eliminó el exceso de colorante con agua destilada, se dejaron secar en un papel filtro; se colocó el líquido de montaje (glicerina pH de 8.3) sobre cada frotis, se colocó un cubreobjetos. Finalmente se observaron en el microscopio de fluorescencia.

## **Diagnóstico Molecular a partir de muestras de tejido nervioso (encéfalo) por las técnicas de RT- PCR y PCR semianidada**

La aplicación de estas técnicas se realizó en 2 laboratorios: Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, CMN-Siglo XXI, IMSS y al Laboratorio de Bioquímica, Biología Celular y Molecular, edificio de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

### Extracción de RNA por el método de Trizol®

Para la extracción total del RNA se siguieron las recomendaciones técnicas del fabricante y las cuales se describen a continuación:

Se pesaron 50-100 mg de tejido y se les agregó 1 ml de Trizol®, se homogenizó (con homogenizador modelo PRO 200) y se reposaron en hielo por 5 minutos. Transcurrido este tiempo se agregaron 0.5 ml de cloroformo frío y se agitó suavemente durante 2 minutos, o con vórtex® por 15 segundos. Se dejó reposar en hielo por 5 minutos.

Posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 minutos a 4°C; se separó la fase acuosa en un tubo eppendorf nuevo y se agregaron 0.5 ml de cloroformo frío y se mezcló. Se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 minutos, a 4°C, se pasó la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo y se agregó 0.5 ml de isopropanol frío. Se dejó incubando durante 15 minutos a 20°C y posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se retiró el isopropanol completamente con jeringa o micro pipeta y se agregaron de 0.5 – 1.0 ml de etanol frío al 75 - 80% en agua DEPC, se mezcló suavemente por inversión (o con vórtex) y se incubó a temperatura ambiente por 5 min, se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 minutos, a 4°C. El etanol se retiró por completo con jeringa y se dejó evaporar a temperatura ambiente (2 a 3 minutos). El RNA fue re-suspendido en el volumen adecuado de agua inyectable previamente calentada a 45°C. Los tubos se colocaron a 45°C por 3 minutos, posteriormente el RNA se homogenizó levemente con micro-pipeta. La concentración de RNA se cuantificó mediante espectrofotometría y por visualización en geles de agarosa al 1.5 %. El RNA se almacenó hasta su empleo a -70°C.

## **Retrotranscripción**

La transcripción inversa del RNA con el iniciador específico Jw6, se realizó bajo las siguientes condiciones; las mezclas de reacción se hicieron en tubos eppendorff® para PCR de 0.2 ml.

La retro transcripción se llevó a cabo empleando 2 µg de RNA total y el oligonucleótido Jw6 usando la enzima Superscript (Invitrogen) en un volumen final de 20 µl bajo las siguientes condiciones:

**Iniciadores utilizados para la amplificación de un fragmento del gen N del virus de la rabia de 606 pb.8** (Heaton *et al.*, 1997, Picard *et al.*, 2004)

Sentido (JW 12)      5' ATGTAACACCYCTACAATTG 3'

Anti sentido (JW 6)      CARTTVGCRCACATYTTTRTG

**La primer mezcla de reacción** se preparó mezclando el iniciador Jw 6 (10 pM) con 2 µg de RNA total, se agregó 1 µl de una mezcla de (dNTP's) desosixiribonucleótidos (10 pM). La mezcla se ajustó 12 µl con agua dietil pirocarbonato (DEPC) se colocó en el termociclador Eppendorf Mastercycler gradient® a 65° C durante 5 minutos; se dejó en hielo durante 5 minutos.

**La segunda mezcla de reacción** se preparó mezclando 4 µl de Buffer first strand 5X, 2 µl de DTT (0.1 M), 1 µl de RNasa out (Invitrogen®) y se mezcló cuidadosamente, se colocó en el termociclador a 42° C durante 2 minutos.

Finalmente se adicionó 1 µl SuperScript (200 U) y se homogenizó cuidadosamente y se incubó a 42° C durante 50 minutos. Para conservarse a -20° C.

### Reacción de PCR con cDNA (Picard *et al.*, 2004)

Se realizó bajo las siguientes condiciones:

Para cada reacción de PCR se utilizaron 1.2 µl del cDNA y se agregaron 0.3 µl de la Taq polimerasa y 18.5 µl de la mezcla de reacción, obteniendo un volumen final de 20 µl utilizando tubos para PCR. Se utilizaron iniciadores para un fragmento de la nucleoproteína del virus de la rabia, de 606 pares de bases: Jw 12 (sentido) y Jw 6 (antisentido) previamente descritos por Heaton *et al.*, 1997.

Sentido (JW 12)            5' ATGTAACACCYCTACAATTG 3'

Anti sentido (JW 6)        CARTTVGCRCACATYTTTRTG

### Mezcla de reacción para amplificar el gen N del virus de la rabia

Se realizó bajo las siguientes condiciones, utilizando los siguientes reactivos descritos a detalle:

Reactivos	Cantidad
Regulador 10X	2.0 µl
MgCl <sub>2</sub> (30 mM)	1.6 µl
dNTP's mezcla (10mM)	0.4 µl
Iniciador Jw 12 (10 pM)	0.5 µl
Iniciador Jw 6 (10 pM)	0.5 µl
Agua DEPC	13.5 µl
cDNA	1.2 µl
Taq polimerasa (5U/µl)	0.3 µl
Volumen final	20 µl

La mezcla de reacción se incubó en un termociclador bajo las siguientes condiciones:

Disociación	94°C/30 seg	} 35 ciclos
Asociación	55°C/30 seg	
Extensión	72°C/60 seg	
Extensión final	72°C/10 min	

### **Visualización de los productos de PCR en geles de agarosa al 1.5**

Se fundió 1.5 gr de agarosa en 100 ml de regulador TAE 1X (tris-acetato EDTA), empleando un horno de microondas . Se colocó la agarosa en la cámara de electroforesis y se dejó polimerizar por lo menos 1 hora a temperatura ambiente.

Se adicionó el regulador TAE 1X a la cámara de electroforesis, se mezclaron 5 µl del producto de PCR con 2 µl del regulador de carga y se colocaron los 7 µl en el pozo correspondiente. Adicionalmente, se colocó un marcador de peso molecular, un control positivo (virus de la rabia CVS *Challenge Virus Strain*) y un control negativo.

Posteriormente se corrieron las muestras con un voltaje constante de 70 a 80 voltios, hasta que el azul de bromofenol del regulador de carga recorrió 2/3 del gel.

Una vez terminado el corrimiento electroforético, se puso el gel en una solución de bromuro de etidio con una concentración de 0.5 µg/ml durante 10-15 minutos.

Finalmente se observó el gel en un fotodocumentador Bio-Rad, con luz UV y se guardaron las imágenes.

### **PCR semi-anidada (Picard *et al.*, 2004).**

Después de la primera amplificación con los oligos Jw6 y Jw12 se realizó una amplificación del producto por la técnica de semi-anidada bajo las siguientes condiciones:

**Iniciadores utilizados para la amplificación de un fragmento del gen N del virus de la rabia de 586pb.**

Forward	Jw12	5´ ATG TAA CAC CYC TAC AT TG 3´
Reverse	Jw10.1	5´ GTC ATC AAA GTG TGR TGC TC 3´
	Jw10.2	5´ GTC ATC AAT GTG TGR TGT TC 3´
	Jw10.3	5´ GTC ATT AGA GTA TGG TGT TC 3´

Condiciones:

Buffer 10X	2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	1 $\mu$ l
dNTP's	0.4 $\mu$ l
Jw12	0.5 $\mu$ l
Jw10 (mix)	0.5 $\mu$ l
Producto de PCR 1	2.0 $\mu$ l
Taq Polimerasa	0.3 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	13.3 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

Se realizó la corrida en un termociclador bajo las siguientes condiciones de PCR:

94°C 5 min	}	1 ciclo
94°C 30 seg		
55°C 30 seg	}	30 ciclos
72°C 30 seg		
72°C 10 min		1 ciclo

Los productos de esta reacción se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

#### **Metodología para el análisis de resultados:**

Para el análisis de los resultados de las tres pruebas diagnósticas se calculó la frecuencia utilizando la siguiente fórmula tomada de Moreno y colaboradores (2000).

Frecuencia=  $\frac{\text{Número de muestras positivas}}{\text{Total de las muestras.}}$

\_\_\_\_\_

Total de las muestras.

Evaluación de la concordancia a través de la prueba de Kappa.

Cuyo coeficiente refleja la concordancia entre dos resultados con valores clasificados en la escala nominal (dicotómicas) (Moreno *et al.*, 2000, Carrasco & Jover 2004). A través de la aplicación de la siguiente fórmula:

$$K = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

Donde:

$P_o$  = probabilidad de observados.

$P_e$  = probabilidad de esperados.

$$P_o = \frac{a + b}{n}$$

$$P_e = \frac{(m_i)(n_i) + (m_o)(n_o)}{n^2}$$

Los valores se ordenaron en una tabla de 2 x 2 la cual se muestra a continuación.

		Prueba A		
		+	-	
P r u e b a	+	a		Ni
	-		b	No
		$m_i$	$m_o$	N
B				



Tabla 3. Criterios para la interpretación de los resultados de la prueba de Kappa.

<i>Valores de kappa</i>	<i>Acuerdo</i>
<i>Menos de 0</i>	<i>Ninguno</i>
<i>0-0.2</i>	<i>Mínimo</i>
<i>0.21-0.4</i>	<i>Regular</i>
<i>0.41-0.6</i>	<i>Bueno</i>
<i>0.61-0.8</i>	<i>Excelente</i>
<i>0.81-1</i>	<i>Casi perfecto</i>

## Resultados

### Obtención y procesamiento inicial de las muestras.

Se realizaron 5 trampeos programados en corral y 4 en refugios durante el periodo de Junio de 2007 a Julio de 2008 (Tabla 4), en diferentes áreas endémicas de la rabia parálitica bovina en el Estado de Hidalgo específicamente en los municipios de Progreso de Obregón, Atotonilco el Grande, Huehuetla y San Felipe Orizatlan (Figura 6). Además en la Sierra Norte del Estado de Veracruz en los municipios de Huayacocotla y Zacualpan los cuales son colindantes del Estado de Hidalgo. Se lograron capturar 100 murciélagos hematófagos del género *Desmodus rotundus*.

Tabla 4. Sitios de captura por municipio y mes de captura.

Fecha de captura	Número de Especímenes capturados	Localización por municipio.	Altura sobre el nivel del mar (msnm)
Agosto 2007	2	<u>Huayacocotla Ver.</u>	
Octubre 2007	2	<u>Huayacocotla Ver.</u>	874
Octubre de 2007	2	<u>Huayacocotla Ver.</u>	2082
Octubre de 2007	7	<u>Huayacocotla Ver.</u>	874
Noviembre de 2007	3	<u>Huayacocotla Ver.</u>	856
Noviembre de 2007	63	<u>Progreso, Hgo.</u>	1894
Marzo 2008	7	<u>Atotonilco Hgo</u>	2161
Junio de 2008	8	<u>Zacualpan Ver</u>	1365
Julio 2008	6	<u>Huehuetla Hgo</u>	725



**Figura 6.** ● Sitios de captura de las muestras positivas.

### Capturas en corral

Para la realización de las capturas en corral o en campo se utilizaron redes de niebla de 6 y 12 metros de largo y 3 metros de alto respectivamente se solicitó a los ganaderos que encerraran a los animales (bovinos) 2 noches antes de la captura ya que se ha observado que uno de sus hábitos alimenticios de los murciélagos hematófagos (*D. rotundus*) es regresar al mismo sitio en donde se encuentra su fuente de alimentación y esto es aprovechado para realizar el trampeo (Jiménez & De la Torre 2006). A través de las capturas en corral se obtuvieron 21 ejemplares de los 100 capturados (Figura 7).



Figura 7. Captura en corral realizada el 18 de Junio de 2008 en la localidad de la Cebolla municipio de Zacualpan Veracruz. N 20° 30' 28.1" N° 98° 18'45.10" elevación de 1365 msnm.

### **Capturas en refugio**

Las condiciones ambientales de las zonas tropicales y subtropicales del país y la orografía de las zonas endémicas son propicias para que el murciélago hematófago (*D. rotundus*) se establezca en una gran diversidad de refugios como cuevas, minas, tuneles, construcciones abandonadas y troncos huecos, que hacen el hábitat ideal para estos quirópteros. Esta condición fue aprovechada para realizar las capturas en algunos refugios localizados por los mismos ganaderos de las zonas endémicas consideradas para el muestreo. Estas se realizaron durante el día, se utilizaron redes de niebla de 6 metros de largo y 3 metros de alto colocándolas en la entrada del refugio (Figura 8). A través de estos trampeos se obtuvieron 79 ejemplares destacando un refugio ubicado en el municipio de Progreso de Obregón en el Estado de Hidalgo N20°15'47.5" N°99° 11' 29.1" 1894 msnm. En donde se capturaron 63 ejemplares el 11 de Noviembre del año 2007.



Figura 8. *Desmodus rotundus* capturado en refugio “la mina” localidad Tejocotes municipio de Huayacocotla Veracruz N 20° 30'31.3" N° 98°32' 28.5" elevación 2082msnm.

De los 100 ejemplares capturados se les obtuvo el tejido nervioso a través de la técnica de necropsia (Figura 9) y se conservaron en un ultracongelador Thermo Electron corporation ® a  $-70^{\circ}\text{C}$  ya que se ha demostrado que a esta temperatura se conserva la viabilidad de los virus durante meses e inclusive años (Burleson *et al.*, 1992).



Figura 9. Imagen que muéstrala el inicio de la extracción del encéfalo de murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*).

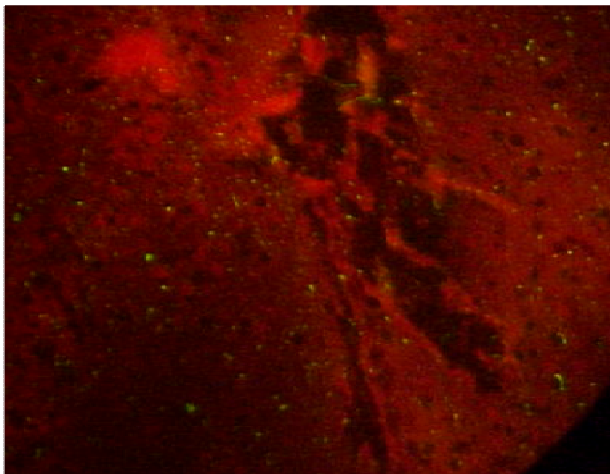


## **Detección de antígenos rábicos por inmunofluorescencia directa en muestras frescas**

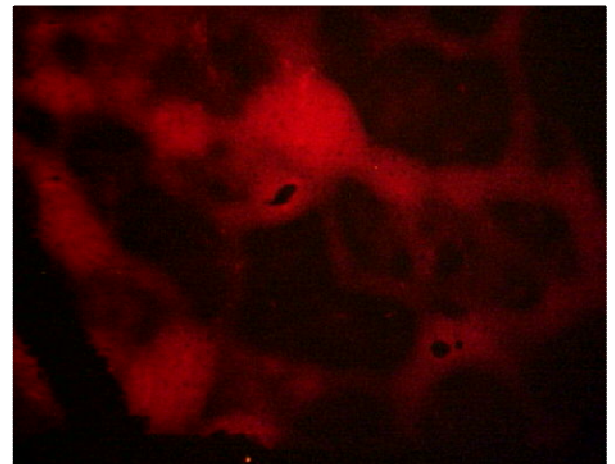
En la *Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, CMN-Siglo XXI, IMSS*. Se realizó el diagnóstico a través de la técnica de inmunofluorescencia directa al 100% de las muestras obtenidas. La lectura de las laminillas la realizó el Dr. Álvaro Aguilar Setién el mismo día en que estas fueron preparadas.

### **Interpretación de la IFD**

Una respuesta positiva se fundamenta en la presencia de inclusiones fluorescentes de color verde manzana, nítidamente brillantes, de formas diversas y tamaños variables (Figura 10). Las más luminosas generalmente están coloreadas en su periferia. Existen también inclusiones filamentosas que corresponden a los axones o a las dendritas llenas de inclusiones virales. En los frotis encefálicos, es difícil precisar la localización de estas inclusiones sobre todo cuando la muestra es tomada (por el contrario, en los cultivos celulares son claramente intracitoplasmáticas, nunca nucleares), (Bourhy & Serau, 1991).



A



B

Figuras 10.- Comparación de una impronta de cerebro positivo a rabia (A) y un cerebro negativo (B) en donde solo se observan las células del tejido nervioso con el objetivo 40x.

Frecuencia del virus rábico a través del empleo de la IFD.

Para el caso de las muestras procesadas para obtener el diagnóstico a través de la inmunofluorescencia directa la frecuencia obtenida es de el 0.11% (11/100), considerando el 100% de las muestras obtenidas en el total de los sitios de captura.

## Diagnóstico Molecular a partir de muestras de encéfalo por las técnicas de RT- PCR y PCR semianidada

Para la detección del virus de la rabia a través de la técnica de RT- PCR a las 100 muestras obtenidas, se emplearon los iniciadores que amplifican un fragmento de la nucleoproteína de 606 pares de bases del virus de la rabia utilizando los iniciadores Jw 12 (sentido) y Jw 6 (antisentido) y los resultados se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% (Figura 11).

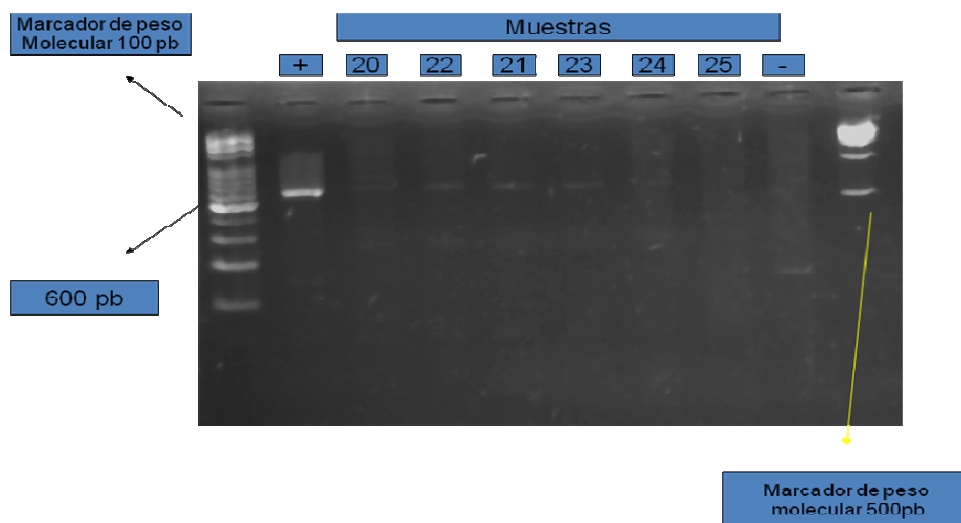


Figura 11. Productos de RT- PCR para el gen N con los oligos JW6 y JW12. Carril 1 Ladder 100 pb, carril 2 CVS, carril 3 muestra (20), carril 4 muestra (22), carril 5 muestra (21), carril 6 muestra (23), carril 7 muestra (24), carril 8 muestra (25), carril 9 control negativo (Encéfalo de ratón lactante no inoculado), carril 10 Ladder. 500pb.

Para el caso de las muestras procesadas para obtener el diagnóstico a través de la RT-PCR, la frecuencia obtenida fue de el 0.07% (7/10), considerando el 100% de las muestras obtenidas en el total de los sitios de captura.

### PCR semianidada

Los productos de PCR obtenidos mediante esta técnica se utilizaron para la realización de la técnica PCR semi anidada del gen N con los oligos Jw 12 y una mezcla de Jw 10 (10.1, 10.2, 10.3) para un fragmento de la nucleoproteína de 586 pb los resultados se visualizaron en un gel de agarosa al 1% por electroforesis (figura 12 y 13).



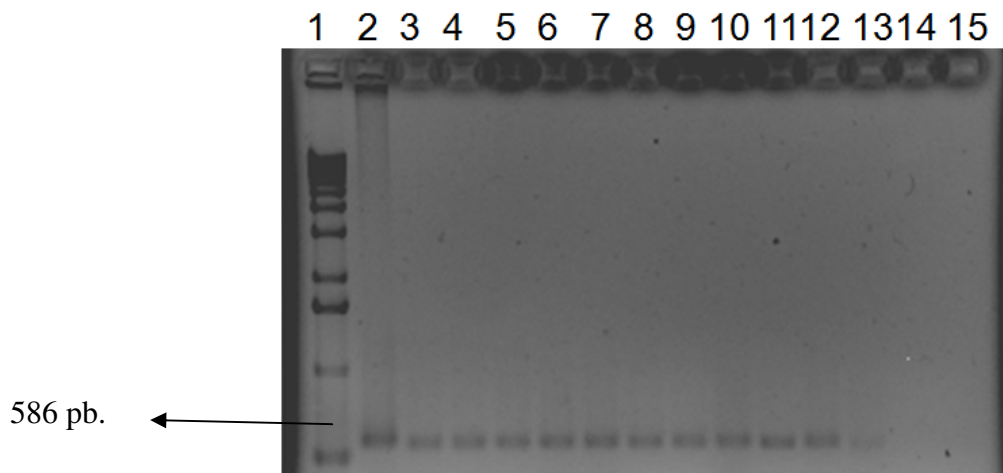


Figura 12. Productos de PCR semi anidada del gen N usando los primers Jw12 y un mix de Jw10. En el carril 1 ladder. 2: CVS amplificado. Carriles 3-13 muestras: 26, 28, 29,31, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 44. 14: control negativo y el 15: Control negativo de reacción sin DNA.

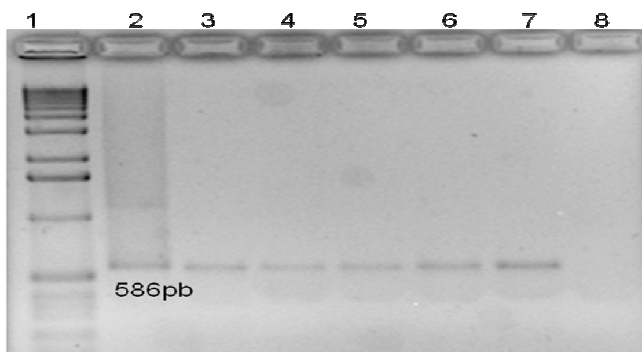


Figura 13 .productos de PCR semi anidada del gen N con los oligos Jw12 y una mezcla de Jw10 Carriles: 1: Ladder; 2: CVS control positivo; 3: muestra 20; 4: muestra 21; 5: muestra 22; 6: muestra 23; 7: muestra 24. 8: Control negativo de reacción sin DNA.

Para el caso de las muestras procesadas para obtener el diagnóstico a través de la PCR semi anidada, la frecuencia obtenida es de el 0.35% (35/100), considerando el 100% de las muestras obtenidas en el total de los sitios de captura.

Es importante señalar que el 90.9% de las muestras positivas a IFD (10/11) se obtuvieron de la captura realizada en refugio en el Municipio de Progreso de Obregón en el Estado de

Hidalgo a 1894 msnm., el día 11 de Noviembre del 2007. A sí mismo el 85.7% de las muestras positivas a la RT-PCR (6/7) y el 88.5 % de las muestras positivas a la prueba de PCR semi anidada (31/35).

El 8.57 % de las muestras positivas a la prueba de PCR semi anidada (3/35), se obtuvieron de 7 murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) capturados en refugio localizado en la localidad de San Pedro Vaquerias en el municipio de Atotonilco el Grande Hidalgo a 2161 msnm., el día 13 de Marzo de 2008.

El 2.8% de las muestras positivas a la prueba de PCR semi anidada (1/35), fueron obtenidas de 6 murciélagos hematófagos *Desmodus rotundus* capturados en corral en el municipio de Huehuetla Hidalgo a 725 msnm., el día 11 de Julio de 2008.

Las pruebas de PCR semianidada se realizaron por duplicado y se emplearon dos controles negativos, por un lado encéfalo de ratones no infectados y la mezcla de reacción sin DNA. Adicionalmente se realizaron las pruebas de IFD, RT-PCR y PCR semianidada por doble ciego en dos instituciones (Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, CMN-Siglo XXI, IMSS y al Laboratorio de Bioquímica, Biología Celular y Molecular, edificio de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo) por separado y los resultados fueron siempre consistentes.

## Análisis de los datos a través del coeficiente de kappa

RT-PCR- IFD

Po = probabilidad de observados.

Pe = probabilidad de esperados.

$$P_o = \frac{3 + 89}{100} = 0.92$$

$$P_e = \frac{(3)(11) + (97)(89)}{100^2} = 0.86$$

		RT- PCR		
		+	-	
I F D	+	3	8	11
	-	0	89	89
		3	97	100

Coficiente Kappa.

$$K = \frac{0.92 - 0.86}{1 - 0.86} = 0.42$$

La interpretación es que la concordancia o valor de kappa, entre las dos pruebas es de 0.42, la cual es buena. Interpretando que la efectividad de las técnicas es diferente y que no pueden emplearse de manera indistinta en el diagnóstico del virus de la rabia.

PCR-semianidada- IFD

Po = probabilidad de observados.

Pe = probabilidad de esperados.

$$P_o = \frac{11 + 65}{100} = 0.76$$

$$Pe = \frac{(35)(11) + (65)(89)}{100^2} = 0.61$$

		PCR - semianidada		
		+	-	
I F D	+	11	0	11
	-	24	65	89
		35	65	100

Coficiente Kappa.

$$K = \frac{0.76 - 0.61}{1 - 0.61} = 0.39$$

La interpretación es que la concordancia o kappa, entre las dos pruebas es de 0.39, que corresponde a regular. Interpretando que la efectividad de las técnicas es diferente y que no pueden emplearse de manera indistinta en el diagnóstico del virus de la rabia.

PCR semianidada- RT-PCR

Po = probabilidad de observados.

Pe = probabilidad de esperados.

$$Po = \frac{7 + 65}{100} = 0.72$$

$$Pe = \frac{(35)(7) + (65)(93)}{100^2} = 0.62$$

PCR - semianidada

R  
T  
P  
C  
R

	+	-	
+	7	0	7
-	28	65	93
	35	65	100

Coficiente Kappa.

$$K = \frac{0.72 - 0.62}{1 - 0.62} = 0.26$$

La interpretación es que la concordancia o kappa, entre las dos pruebas es de 0.26, que corresponde a regular. Interpretando que la efectividad de las técnicas es diferente y que no pueden emplearse de manera indistinta en el diagnóstico del virus de la rabia.

## Discusión

Las acciones emprendidas por el Programa Nacional de Control de la Rabia en México han logrado disminuir gradual y significativamente la incidencia de rabia en humanos y en Perros. Los datos oficiales referentes a los últimos años indican que en gran parte del territorio nacional se ha logrado interrumpir la cadena de transmisión de la rabia de perro a perro y minimizar el riesgo de transmisión perro a humano. De las acciones más importantes, es la aplicación de las campañas de vacunación antirrábica en animales domésticos (perros y gatos) en las comunidades urbanas y rurales en donde se aplican un promedio anual de 16 millones de dosis en todo el territorio nacional alcanzando así un cobertura superior al 80% (OPS 2005) y con ello lograr el objetivo principal que es disminuir los casos de rabia en perros y gatos y así aminorar el riesgo de transmisión de la enfermedad al ser humano.

Se ha observado que la rabia transmitida por animales silvestres ha tomado mayor importancia en donde la multiplicidad de reservorios agrava el problema al contrario de la rabia urbana donde la principal especie transmisora es el perro (OPS 2005), La fauna silvestre participa manteniendo ciclos estables de transmisión por mucho tiempo en áreas geográficas específicas. En América latina los murciélagos hematófagos *D. rotundus* han sido plenamente identificados como reservorios del virus rábico (De Mattos *et. al*, 1996).

En América Latina aproximadamente el 74.8% de la población vive en áreas urbanas pero, la mayoría de los casos reportados de rabia, tanto en humanos como en animales domésticos, ocurre en las zonas rurales, donde fácilmente pueden traslaparse los ciclos aéreo y terrestre. Específicamente en México, a pesar de que se han reportado casos de rabia debidos a murciélagos no hematófagos y mamíferos terrestres, el principal vector sigue siendo el murciélago hematófago *D. rotundus* (De Mattos *et. al*, 1999, Aguilar *et al.*, 2005).

En el continente Americano se han identificado unas 300 especies de quirópteros sobre un total de aproximadamente 1000 especies reconocidas en el mundo. De estas 300 especies de solamente 3 son hematófagos. Taxonómicamente pertenecen a la familia Philostomidae, subfamilia Desmodinae con solamente tres géneros *Desmodus*, *Diphylla* y *Diaemus* (Calisher *et al.*, 2006):

De los tres géneros *Desmodus* es el más abundante tanto en México Centro y Sudamérica con muy amplia distribución; en este sentido también es el de mayor importancia epidemiológica ya que es reconocido como el principal reservorio del virus rábico y por lo tanto transmisor de la rabia paralítica bovina en las zonas tropicales y subtropicales debido a que los bovinos representan la principal fuente de alimentación para los murciélagos hematófagos comúnmente llamados vampiros (Aguilar *et al.*;2005). El papel epidemiológico de los otros dos géneros *Diphylla* y *Diaemus* es desconocida (Loza Rubio & Aguilar 1998).

En este trabajo se compararon tres técnicas para el diagnóstico de rabia en encéfalos de *D. rotundus*. De 100 muestras trabajadas 11 fueron positivas (11%) por la técnica de Inmunofluorescencia directa (IFD), 7 muestras (7%) fueron positivas por RT-PCR amplificando un fragmento de 606 pb que codifica para el gen de la nucleoproteína y 35 fueron positivas por PCR semianidada (586pb. del mismo gen) lo que representa un 35% de positivos, un porcentaje muy alto que difiere con lo que se ha reportado previamente en la literatura para quirópteros que es del 1 al 3% ( Flores Crespo, citado por Jiménez 2007).

La concordancia de éstas técnicas se determinó mediante una prueba de Kappa (Moreno *et al.*, 2000, Carrasco & Jover 2004). Los valores para esta prueba fueron: de IFD con RT-PCR el valor que arrojó el estadístico fue de 0.42 lo que corresponde a una concordancia considerada buena. RT-PCR y PCR semianidada fue de 0.26, este valor de concordancia es regular y de de IFD-PCR semianidada fue de 0.39% de igual manera se considera un valor regular.

En esta prueba mientras más alto sea el valor se interpreta como que las técnicas comparadas resultan equivalentes o que tienen el mismo grado de eficacia.

La baja concordancia que se obtuvo en este trabajo indica que la efectividad de las técnicas es diferente y que no pueden emplearse de manera indistinta en el diagnóstico del virus de la rabia y esto puede deberse a varios motivos.

El diagnóstico de rabia por Inmunofluorescencia directa es la prueba considerada como estándar de oro por la OMS (Aguilar *et al.*2005). Sin embargo esta prueba cuando se realiza en animales de vida silvestre como los quirópteros presenta algunas dificultades tales como, la limitada cantidad de muestra que se puede obtener de éstos pequeños

mamíferos, además que el sitio del encéfalo a partir del cual se toman las muestras para inmunofluorescencia no sea el sitio donde el virus se encuentra en mayor concentración y aunado a que no corresponda al lugar a partir del cual se realiza la extracción de RNA lo que podría representar una diferencia de concentración de virus. El porcentaje de positivos que se obtuvo por inmunofluorescencia directa fue del 11% este valor concuerda con lo que se reporta para el estado de Texas en el que cada año se analizan de 600 - 1300 murciélagos y reportan un 11% de positivos por inmunofluorescencia ( Rohde *et al.*, 2004 ) Por otro lado, a pesar de que la técnica es sencilla se requiere de personal con experiencia para poder hacer una correcta interpretación, lo que hace a la prueba la más subjetiva de las tres que se emplearon en este trabajo.

El bajo porcentaje de muestras positivas por RT-PCR se podría considerar como falsos negativos debido a que si la concentración de DNA es menor a 10 ng/microlitros no es posible visualizarla en electroforesis en gel de agarosa, por lo que la prueba se considerará negativa aun cuando no lo sea y esto se debe principalmente a la baja concentración viral (Heaton, *et al.*, 1997, J. Rojas *et al.*, 2006), por eso es conveniente un segundo ciclo de amplificación.

Sin embargo la RT-PCR puede ser empleada como una importante herramienta cuando las muestras no son adecuadas para realizar técnicas de diagnóstico tradicionales como es el caso de México que debido a las condiciones climáticas y a la inaccesibilidad de algunas localidades las muestras pasan muchas horas en condiciones de temperatura inapropiadas lo que puede ocasionar la inactivación de las partículas virales. Además esta técnica se ha empleado ampliamente demostrando alta especificidad (Picard *et al.*, 2004; Ermine *et al.*, 1989, (Sacramento *et al.* 1991, Kamolvarin *et al.* 1993).

La prueba de RT-PCR semianidada resultó la más eficiente y con la que se obtuvo mayor porcentaje de positivos. Con esta técnica se obtuvo el mayor porcentaje de positivos 35%.

Estos resultados se pueden explicar ya que un segundo ciclo de amplificación incrementa la sensibilidad de la prueba posibilitando la detección de virus en cantidades mínimas (Picard *et al.*, 2004). Esta prueba se ha descrito que es altamente sensible y específica e incluso



puede aplicarse en estudios epidemiológicos retrospectivos, ya que es posible emplearla para la detección del virus de la rabia en muestras de tejidos descompuestos, sin embargo su sensibilidad es reducida en estas tipo de muestras.(Araujo *et al.*, 2008).

Dado que no existe en la literatura suficiente información acerca de la patogenia de la rabia en murciélagos no podemos decir que un resultado positivo implique que el murciélago está transmitiendo activamente el virus.

En estudios realizados para detectar anticuerpos contra rabia, en murciélagos capturados en zonas alteradas y conservadas, se encontró que más del 35 % de la población fue positiva, encontrándose una mayor cantidad de murciélagos con anticuerpos en las áreas conservadas (Salas *et al.*, 2004). En otro estudio realizado en poblaciones de murciélagos de diferentes especies de Chamela se encontró que 60 de los 77 organismos capturados fueron seropositivos (77.9%). El mayor porcentaje de seropositivos, por género, fue *D. rotundus* (66%). En este mismo estudio se reportó que en el estado de Veracruz, 32 de los 79 organismos capturados fueron seropositivos (40.5%). Del 62% de positivos a Ac contra rabia Los géneros *Desmodus* y *Artibeus* representan este porcentaje (Perea, 2008).

En este trabajo fue posible detectar mediante PCR semianidada un 35% de muestras positivas al virus de la rabia, en muchos de los casos estas muestras fueron negativas por inmunofluorescencia y por RT-PCR. Este porcentaje tan alto de muestras positivas podría explicar de alguna manera la alta seroprevalencia que se ha reportado para murciélagos de diversas especies.

Otros aspectos que se deben considerar son las propiedades biológicas del virus, la virulencia puede estar determinanda en gran medida por el éxito en la trasmisión. Es posible que la trasmisión vía aerosoles, que se ha sugerido ocurre dentro de los refugios donde habitan estos animales, no sea una ruta muy eficaz para desencadenar una infección en los murciélagos dada la poca cantidad de virus que puede ingresar por esta vía, sin embargo explicaría de alguna manera la presencia de poca cantidad de virus en los murciélagos que se detecta únicamente después de dos ciclos de amplificación por PCR anidado, y de manera que genere la producción de anticuerpos sin que se pueda aislar el virus. La suceptibilidad al virus de la rabia en la mayoría de los quirópteros ha sido poco estudiada, en algunos podría ser baja lo que explicaría también una tasa de replicación baja.

De acuerdo a lo reportado por el SIVE en el año 2008 (cierre preliminar al 1 noviembre de 2008), para los casos de rabia paralítica bovina y su distribución por municipios podemos observar que en las regiones en donde se realizaron las capturas se presentaron 6 casos de rabia paralítica transmitida por murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) en los municipios de Santiago de Anaya, Actopan, Zacualtipan y San Bartolo Tutotepec en el año 2008. Las capturas se realizaron durante el periodo agosto de 2007 al mes de Junio de 2008, como se muestra en los resultados, 29 muestras positivas corresponden con el sitio de captura el cual es un refugio localizado a una elevación de 1888 msn en el municipio de Progreso de Obregón, la captura se realizó el día 11 de Noviembre de 2007 y para el año 2008 y principios del 2009 la SAGARPA reporta la aparición de focos en esa región (Figura 14). De acuerdo a los resultados obtenidos se puede corroborar la correlación existente en el área de transmisión activa del virus de la rabia entre los murciélagos hematófagos (*D. rotundus*) y las especies ganaderas de estas regiones ya que se ha demostrado que la variante antigénica del virus de la rabia que prevalece en estas zonas endémicas es la V11 (murciélago- vampiro) (Loza *et al.*, 1999, Velasco Villa, 2002).

La frecuencia de detección de las tres pruebas diagnósticas utilizadas puede catalogarse como alta, por lo anterior estos resultados podrían emplearse para que las autoridades los tomen como una herramienta para planear medidas de prevención y control de la enfermedad de manera más eficiente dentro de las áreas endémicas estudiadas.

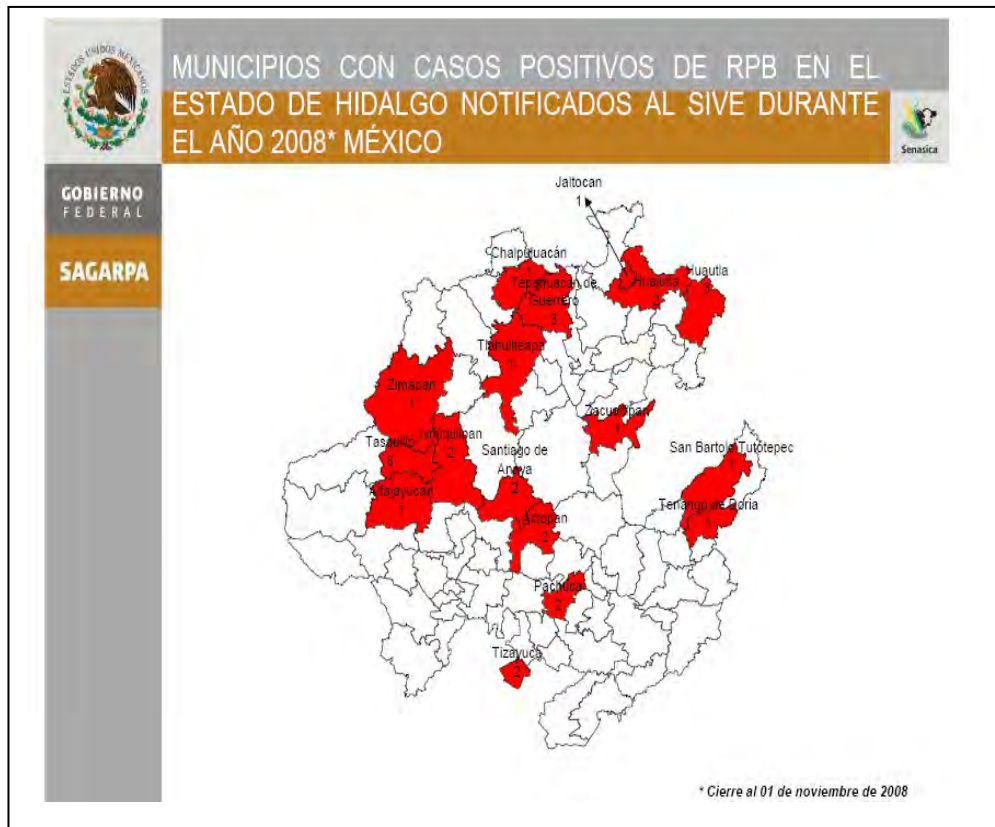


Figura 14. Mapa de casos positivos de RPB en el Estado de Hidalgo.

## CONCLUSIONES:

- 1.-El 79% de los murciélagos hematófagos fueron capturados en refugio ya que este tipo de capturas resultan ser más exitosas que las realizadas en corral. Destacando un refugio en particular ubicado en el municipio de Progreso de Obregón Hidalgo a 1894 msnm. En donde se obtuvieron 63 ejemplares.
2. La alta frecuencia detectada por la prueba de IFD 11% fue más alta que la que se ha reportado previamente la cual va del 1 al 3% lo cual hace suponer un alto riesgo de transmisión por la alta frecuencia en el vector.
- 3.- La alta frecuencia detectada por PCR semianidada sugiere que el virus esta circulando en títulos indetectables por las pruebas de IFD y RT-PCR.
- 4.- Para realizar la prueba de IFD se requiere de personal entrenado para su interpretación esto podría considerarse una desventaja ante el empleo de las técnicas moleculares que si bien es cierto también requieren de personal capacitado para su realización la interpretación de estas esta basada en la observación de la amplificación en el gel de agarosa y no se requiere más que la comparación con el control positivo.
- 5.- Debido al desconocimiento de la patogenia de la rabia en murciélagos no podemos decir que un resultado positivo implique que el murciélago está transmitiendo activamente el virus, pero sí es potencialmente un vector de transmisión.
- 6.- La mejora de las técnicas diagnósticas es un factor para el aumento de la frecuencia y la prevalencia de las enfermedades sin embargo son una herramienta fundamental en la vigilancia epidemiológica

7.- La alta frecuencia detectada a través de la PCR semianidada sugiere que esta técnica sea considerada para aplicar medidas de vigilancia epidemiológica en animales silvestres pero sobre todo en *D. rotundus* el cual es el principal vector de la rabia parálitica bovina y otras especies ganaderas y a partir de ello planear medidas de prevención y control de la enfermedad.

8.- la interpretación de los resultados a través de la prueba de Kappa indica que la efectividad de las técnicas es diferente y que no pueden emplearse de manera indistinta en el diagnóstico del virus de la rabia.

### **Literatura Citada**

Acha PN & Szyfress B. 2001: Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. OPS/OMS.

Aguilar S. A. & Loza R. E. 1999: El árbol genealógico de la rabia en México. Ciencia y Desarrollo Volumen 25: 146. Pp.17-23.

Aguilar S. A., Loza R. E., Salas R. M., Brisseau N. Cliquet F., P. Pastoret., Rojas D. S., E. Tesoro. And Kretschmer R. 2005: Salivary excretion of rabies virus by healthy vampire bats. Epidemiology and infection. 133. 517-522.

Araújo D. B., Langoni H., Almeida F Marilene & Megid J.2008: Heminested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus detection in stored and decomposed samples. BMC Research notes. 1:17

Badrane, H.& N. Tordo. 2001: Host switcheing in Lyssavirus history from the chiroptera to the cRNAivore orders. The Journal of Virology. 75:8096-8104.

Baer G.M. 1982: Rabia. La Prensa Médica Mexicana. México. 370.

Baer, G. M & J. S. Smith. 1991: Rabies in nonhematophagous bats. P.342-362. InG. M. Baer (ed.), The natural history of rabies, 2<sup>nd</sup> ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Benmansour, A., M. Brahim, C. Tuffereau, P. Coulon, F. Lafay, A. Flamand. 1992: Rapid Sequence evolution of street rabies glycoprotein is related to the highly heterogeneous nature of the viral population. Virology. 187:33-45

Bourhy H. & Sureau P. 1991: Métodos de laboratorio para el diagnóstico de la rabia, versión en español por J.A Montaña Hirose. Commission des laboratoires de référence et d'expertise de l'Institut Pasteur Unite de la Rage, Paris Francia.

Bourhy, H.,B., Kissi B., and N., Tordo. 1993: Molecular diversity of Lyssavirus genus. *Virology*. 194:70-81.

Brooks Geo F., A. Morse Stephen, S. Butel Janet. 1998. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. Ed. El Manual Moderno Mex. D. F. 648.

Buchholz, C. J., C. Retzler, H. E Omán, & W. J Neubert. 1994: The carboxy-terminal domain of sandal virus nucleocapsid protein is involved in complex formation between phosphoprotein and nucleocapsid.like particles. *Virology*. 204:770-776.

Burleson, F.G., CHambers, T.M. & Wiedbrauk D.L. *Virology*. 1992: A Laboratory Manual. Academic Press.

Calisher CH. H., Childs J. E., Field H. E., Holmes K. V., Schountz T. 2006: Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical microbiology reviews* Vol. 19 num. 3 p. 531-545.

Capone, J. & H. P Ghosh. 1984: Association of the nucleocapsid protein N of vesicular stomatitis virus with phospholipid vesicles containing the matrix protein. *M. Can. J, Biochem. Cell Biol.*62: 153-158.

Carini, A. 1911: Sur une grande épizootie de rage. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*. 25: 843-846.

Carrasco L. J. & Jover L. 2004: Métodos estadísticos para evaluar la concordancia *Medicina Clínica* 122. 28-34 Barcelona España.

Conzelman, K. K., J. H., Cox; L.G Scheneider, H. J., Theiel: 1990. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of attenuated rabies virus. SAD B19. *Virology*. 175:485-499.

De Mattos C. A, De Mattos C.C , S. Smith J. T. Miller, Papo S., Utrera A. and I. Osburn B. 1996: Genetic Characterization of Rabies Field Isolates from Venezuela. *Journal of Clinical microbiology*, vol. 34 No 6. 1553-1558.

De Mattos, C. C., C. A. De Mattos, E. Loza- Rubio, a. Aguilar- Setién, L. A. Orciani, J. S. Smith. 1999: Molecular characterization of rabies virus isolates from Mexico: Implications for transmission dynamics and human risk. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61:587-597.

Dietzschold B. Rhabdovirus. 1996. In *Fields Virology 3rd Ed.* Fields BN et al (Editors) Lippincott-Raven,

Ermine A, Larzul D, Ceccaldi PE, Guesdon JL, Tsiang H.1990: Polymerase chain reaction amplification of rabies virus nucleic acids from total mouse brain RNA. *Mol Cell Probes.*4(3):189-91.

Fenner F, Bachman PA, Gibbs EPJ, Murphy FA, Studdert MJ, O. White .1987: *Veterinary Virology.* Ac. Press Inc. London. 254, 1987

Finke, S., K. K., Conzelmann. 2005: Replication strategies of rabies virus. *Virus Research.* 111: 120-131.

Flores C. R.1998: *la rabia en las diferentes especies sus transmisores y su control* 1ra edición, Editado por INIFAP-SAGAR-PAIEPEME.

Guninto. G., Felix, Y., Rivas, A. 1996: Un caso de encefalitis rábica de larga evolución. *Correlación Clínica.*

Hall, E. R. 1981: *Mammals of North America*, P. 173-176, 240-247, and 1013-1018. *John Wiley and Sons, Inc., New York, N. Y.*



Haup, H., H. Rehaag. 1921: Durch fledermäuse verbreitete seuchenhafte tollwut unter viehbeständen in Santa catharina (Süd- Brasilien). Zinfektinskrankh. Haustiere. 22:76-78; 104-127.

Heaton P, Johnstone P, McElhinney L, Cowley R, O'Sullivan E, Whitby J. 1997: Heminested PCR Assay for Detection of Six Genotypes of Rabies and Rabies-Related Viruses J. Clin Microbiology (35): 2762-2766.

INEGI. 2000: Anuario estadístico del estado de Hidalgo. P.p 3 -11.

Jiménez Ramírez J. A & De la Torre González Alejandro. 2006: Prevención de la rabia paralítica y control de poblaciones de vampiros (*Desmodus rotundus*). Impreso por Bayer de México. México D. F

Jiménez Ramírez J. A. 2007: Impacto sanitario y económico de la rabia bovina transmitida por bovinos: Memorias de la 15ª reunión anual del CONASA. México D.F

Juárez Islas V. M. 2000: Aplicación de la técnica: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) acoplada a la transcripción reversa (RT-PCR) para el estudio de la rabia en México. Tesis de licenciatura UNAM- Iztacala.

Kamolvarin N, Tirawatnpong T, Rattanasiwamoke R, Tirawatnpong S, Panpanich T, Hemachudha T. 1993: Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. Journal of infectious diseases 167: 207-210.

Kouznetzoff A., M. Bucle., N. Tordo. 1998: Identification of a region of the rabies virus N protein involved in direct binding to the viral RNA. Journal genetic virology. 79: 1005-1013

Lodish Harvey F. Berk A., Zipursky L. S., Matsudaira P., Baltimore P., Darnell J. E. 2005: *Molecular Cell Biology* 5ª Edición. Editorial Panamericana.

Loza-Rubio E. & Aguilar-Setién A. 1998: Estudio de la variabilidad molecular del virus de la rabia en México. *Ciencia Veterinaria México*. 52-77

Loza Rubio E., Aguilar Setién A., Bahloul CH., Brocjier B., Pastoret P. P., Tordo N. 1999: Discrimination between epidemiological cycles of rabies in Mexico. *Archives of medical research* 30: 144-149

Malaga Alba A. 1954: Vampire bats as a carrier of rabies. *American Journal of Public Health*. 44: 910-917.

Marston D. A., McElhinney L. M., Johnson N., Müller T., Conzelman K. K., Tordo N., and Fooks A. R. 2007: Comparative analysis of the full genome sequence of European bat lyssaviruses and evidence for conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G-L 3' non-translated region. *Journal of General Virology* 88, 1302-1314.

Messenger, S. L., J. S., Smith, C. E., Rupprecht. 2002: Emerging epidemiology of bats-associated cryptic cases of rabies in humans in the United States. *Clin Infect Dis*. 35: 738-47.

Minamoto, H., Tanaka, M. Hishida, H. Goto, H. Ito, S. Naruse, K. Yamamoto, M. Sugiyama, M. Sugiyama, T. Kinjo, K. Mannem, K. Mufine. 1994: Linear and conformation-dependent antigenic sites on nucleoprotein of rabies virus. *Microbiol Immunol*. 38:449-455.

Morales M. E., Rico R. G., Gómez O. J.L., Aguilar S. A. 2006: Importancia inmunológica de la proteína N en la infección por virus de la rabia. *Veterinaria México*. 37 (6): 351-367.

Moreno Altamirano A., López Moreno S., Corcho Verdugo A. 2000: Principales medidas en epidemiología. *Salud pública de México* 42: 4:337-348.

Nadin- Davis, S. A., E. Izoa-Rubio. 2006: The molecular epidemiology of rabies associated with chiropteran host in Mexico. *Virus Res.* 117:215-2

OPS, 2005: sistema de información para la vigilancia Epidemiológica de la Rabia en la Américas, SIRVERA. En [url:portal.panaftosa.org.br](http://portal.panaftosa.org.br). Consultada en enero de 2006

Perea M. L. 2008: "Prevalencia del virus de la rabia en murciélagos de los estados de Jalisco (Chamela) y Veracruz (Martínez de la Torre)". Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional (IPN).

Poch, O.B. M. Blumerg, L. Bouguelert, N. Tordo. 1990: Sequence comparison of five polymerases (L. Proteins) of unsegmented negative strand RNA viruses: Theoretical assignment of functional domains, *J. Gen. Virol.* 71:1153-1162.

Picard-Meyer E., Bruyère V., Barrat J., Tissot E., Barrat M. J., Cliquet F. 2004: Development of a hemi-nested RT-PCR method for the specific determination of European Bat Lyssavirus 1 Comparison with other rabies diagnostic methods. *Vaccine* 22 1921–1929.

Rohde R. E., Mayes B. C., Smith J. S., and Neill S. U. 2004: Bat Rabies, Texas, 1996–2000. *Emerging Infectious Diseases.* 10(5): 948-952

Rojas Anaya E, Izoa-Rubio E, Banda Ruiz VM, Hernández Baumgarten E. 2006: Use of reverse transcription-polymerase chain reaction to determine the stability of rabies virus genome in brains kept at room temperature. *J Vet Diagn Invest.* 18(1):98-101.

Romero – Almaraz M. L, Aguilar Setién A., Sanchez- Hernandez C. 2006: Murciélagos benéficos y vampiros: Características, importancia, rabia, control y conservación. AGT Editor, S.A México D.F

Rupprecht, C.E., L.T Glickman, P.A Spencer, T. J. Wiktor. 1987: Epidemiology of rabies virus variants. Differentiation using monoclonal antibodies and discriminant analysis. Am. J. epidemiology. 126:298-309.

Sacramento D, Bourhy H, Tordo N. 1991: PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. Mol Cell Probes.5(5):397.

SAGARPA- SENASICA 2009: [www.senasica.gob.mx](http://www.senasica.gob.mx) Mapas de casos positivos de rabia paralítica bovina reportados al SIVE.

Salas R. M., Sanchez H. C., Romero A. M.L.,Schenellc G. D., Kretschmer S. R., Aguilar S. A. 2004: Prevalence of rabies and LPM paramyxovirus antibody in non- hematophagous bats captured in the central pacific coast of Mexico. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (2004) 98, 577—584.

Secretaria de Salud, SSA. 2001: Programa de acción: Rabia. México D. F Secretaria de Salud , pp. 13-33s

Secretaria de Salud, SSA, 2003: Dirección general de epidemiología. Anuarios de morbilidad., <http://www.epi.org.mx/infoepi/index.htm>.

Secretaria de Salud, SSA, 2009: Dirección general de epidemiología . Anuarios de morbilidad., <http://www.epi.org.mx/infoepi/index.htm>.

Schneider M. C. & Santos B. C. 1995: Algunas consideraciones sobre la rabia humana transmitida por murciélago. Salud publica de México. 37:4 pp. 354-362.

Smith, J. S. 1989: Rabies virus epitopic variation: Use in ecologic studies. Adv. Virus Res. 36:215-253.

Steele J. H., P. J. Fernandez. 1991: History of rabies and global aspects. P. 1-24 In G. M. Baer (Ed.), The natural history of rabies, 2nd ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Tordo, N., O. Poch, A. Ermine, G. Keith, F. Rougeon 1986: Walking along the rabies genome: is the large G-L intergénica region a remnant gene? Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A. 83:3914-3918.

Trimarchi C. V., J. S., Smith. 2002: Diagnostic Evaluation, P. 308-344. In Jackson A. C., and W. H. Wunner (Ed). Rabies. Academic Press.

Velasco-Villa A, Gómez-Sierra M, Hernández- Rodríguez G, Juárez-Islas V, Meléndez-Félix A, Vargas Pino F, Velázquez- Monroy, and Flisser A.2002: Antigenic diversity and distribution of rabies virus in Mexico. Journal of Clinical microbiology, vol. 40 No 3. 951-958

Velasco- Villa A, A. Orciari L., Juárez Islas V., Gómez Sierra M., Padilla Medina I., Flisser A., Souza V., Castillo A., Franka R., Escalante Mañe M., Sauri Gonzalez I., E. Ruprecht CH. 2006: Molecular Diversity of Rabies Viruses Associated with Bats in Mexico and Other Countries of the Americas. . Journal of Clinical microbiology, vol. 44 No 5. 1697-1710

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

Wunner , W.H. 1991: The chemical composition and molecular structure of rabies viruses In: The natural history of rabies, Baer G. M. (ed.), ( ed.) CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Zerai W. 2002: Rabies: recent developments. Research in veterinary science, 73, 17-25

Páginas electrónicas consultadas.

[www.cdc.gov/rabies/virus.html](http://www.cdc.gov/rabies/virus.html).

[www.epi.org.mx/infoepi/index.htm](http://www.epi.org.mx/infoepi/index.htm).

[www.senasica.gob.mx](http://www.senasica.gob.mx)

[www.who.int/rabies/epidemiology/en/](http://www.who.int/rabies/epidemiology/en/)