



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**Detección del virus de la rabia en tejidos no nerviosos de murciélagos frugívoros *Artibeus*  
*spp.* inoculados experimentalmente**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**CIRANI YANELLY OBREGÓN MORALES**

**ASESOR:**

**ÁLVARO AGUILAR SETIÉN**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

**GUADALUPE GORDILLO PÉREZ**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**GERARDO SUZÁN ASPIRI**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**México, D.F. Agosto 2014**



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.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	9
1) El virus de la rabia .....	10
1.1 Morfología y composición química .....	18
1.2 Características de las proteínas del virus de la rabia .....	20
1.3 Ciclo de replicación .....	22
1.5 Epidemiología .....	25
1.6 Situación epidemiológica de la rabia en México .....	26
2) Quirópteros .....	28
2.1 Los quirópteros en México .....	30
2.2 EL género <i>Artibeus</i> . .....	30
2.3 Evolución de los <i>Lyssavirus</i> y relación con los quirópteros .....	31
ANTECEDENTES .....	33
JUSTIFICACIÓN .....	40
OBJETIVOS.....	42
HIPÓTESIS .....	43
MATERIAL Y MÉTODOS.....	44
1. Virus de la rabia .....	44
2. Líneas celulares .....	45
3. Titulación de la 5020 en cultivo celular .....	45
4. Titulación de la CASS 88 en ratones de 21 días .....	46
5. Recolección de los quirópteros.....	46
5.1 Criterios de inclusión .....	48
5.2 Detección de Anticuerpos Neutralizantes .....	48
6. Infección experimental.....	49
6.1 Experimento 1 .....	49
6.2 Experimento 2 .....	50
6.3 Experimento 3 .....	50
7. Muestras biológicas .....	51
8. Diagnóstico de laboratorio: identificación y serología.....	52

8.1 Prueba de inmunofluorescencia directa para la detección del virus rábico en Sistema nervioso .....	52
8.2 Prueba rápida de reducción de focos fluorescentes (RFFIT) .....	52
9. Detección molecular del virus rábico .....	53
9.1 Extracción de RNA .....	53
9.2 Retrotranscripción .....	54
9.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cDNA .....	55
9.4 Reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidada) .....	56
RESULTADOS .....	57
1. Resultados de obtención de abasto de virus en ratón lactante .....	57
2. Titulación de la 5020 en cultivo celular. ....	58
3. Titulación de la CASS 88 en ratón .....	59
4. Resultados de la infección con la 5020 Experimento 1. ....	60
4.1 Grupo I. Vía de inoculación subcutánea con dosis $1 \times 10^{-3}$ .....	61
4.2 Grupo II. Vía de inoculación subcutánea con dosis $1 \times 10^{-5.34}$ .....	61
4.3 Grupo III. Vía de inoculación intramuscular con dosis $1 \times 10^{-3}$ .....	62
4.4 Grupo IV. Vía de inoculación intramuscular con $1 \times 10^{-5.34}$ .....	63
4.5 Título de anticuerpos neutralizantes .....	64
4.6 Resultados de pruebas moleculares RT-PCR y PCR anidada .....	65
4.7 Estudios histopatológicos .....	68
5. Resultados de la infección con la CASS88 experimento 2 .....	69
6. Resultados de la infección con I 5020 Experimento 3 .....	72
6.1 Grupo I. Vía de inoculación intracerebral, dosis $6.49 \times 10^4$ .....	72
6.2 Grupo II. Vía de inoculación intramuscular (músculo macetero), dosis $6.49 \times 10^4$ .....	73
6.3 Grupo III. Vía de inoculación Subcutánea, dosis $6.49 \times 10^4$ .....	73
DISCUSIÓN .....	76
CONCLUSIÓN .....	86
BIBLIOGRAFÍA .....	87
ÁPENDICE .....	97

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

ABLV	Australian bat Lyssavirus
ARN	Ácido ribonucleico
BHK	Baby Hamster Kidney
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
CENACEVE	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
CINVESTAV	Centro de Investigación de Estudios Avanzados
CMN SXXI	Centro Médico Nacional Siglo XXI
COOH	Extremo carboxilo
DEPC	Dietil pirocarbonato
DL50 %	Dosis Letal 50%
EBLV1	European bat Lyssavirus 1
EBLV2	European bat Lyssavirus 2
ED	Ectodominio
G	Glicoproteína
HE	Hematoxina-Eosina
HPRT	Hipoxantina fosforribosil transferasa
IC	Intracraneal
ICTV	Comité Internacional para la Taxonomía de los virus
IFD	Inmunofluorescencia
IKOV	Ikoma virus
IM	Intramuscular
IMSS	Hospital de Pediatría, Instituto Mexicano del Seguro Social
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos

INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
L	Polimerasa del virus de la rabia
LLEBV	Lleida Bat Lyssavirus
M	Proteína de matriz
N	nucleoproteína
nAChR	Receptor de Acetilcolina
NH <sub>2</sub>	Extremo amino
NTD	Neglected Tropical Diseases
NZD	Neglected Zoonotic Diseases
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
P	Fosfoproteína
PAHO	Pan American Health Organization
PAS	Ácido Peryódico de Shiff
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PV	Pasteur Virus
RABV	Virus de la rabia
RFFIT	Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test
rpp	revoluciones por minuto
SC	Subcutánea
SNC	Sistema nervioso central
SS	Puentes disulfuro
TM	Dominio transmembranal
UFF	Unidades formadoras de focos fluorescentes

UI	Unidades Internacionales
UIM-I	Unidad de Investigación Médica en Inmunología
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
WCBV	West Caucasian Bat virus
WHO	Organización Mundial de la Salud

## RESUMEN

El género *Artibeus* es abundante en las regiones tropicales y subtropicales de México; se sabe que algunas especies son simpátricas a *Desmodus rotundus* y en algunos casos comparten los mismos refugios. Los virus de la rabia (RABV) que circulan en *Artibeus spp.* en México están relacionadas con variantes de murciélagos vampiros. En un estudio de seroprevalencia de anticuerpos contra rabia en murciélagos, nuestro equipo encontró 6 de 51 sueros positivos (11.8%) de *Artibeus spp.*, esto sugiere que han estado expuestos al RABV. El objetivo de este trabajo fue estudiar la patogénesis y distribución de RABV en *Artibeus spp.* del Estado de Morelos, con dos aislados de murciélago vampiro (Variante 3). Se inocularon dosis  $1 \times 10^{5.34}$  UFF y  $1 \times 10^3$  UFF de RABV, por dos vías y fueron comparadas. Todos los animales eran seronegativos contra rabia antes de la inoculación. Solo un de 38 murciélagos inoculados falleció a los 14 días post inoculación y fue positivo por inmunofluorescencia directa (IFD) en cerebro, pero no presentó signos clínicos. El resto de los murciélagos tampoco mostraron signos clínicos de la enfermedad, no obstante se determinaron títulos altos de anticuerpos a partir del séptimo día post inoculación. Estos resultados sugieren una exposición previa al RABV y que la inoculación podría estar actuando como un refuerzo en este estudio. La PCR anidada de RABV fue positiva en cerebro, estómago, hígado y corazón en animales que no mostraron signos clínicos de la enfermedad aunque fueron negativos por IFD y además sobrevivieron al desafío. Éstos resultados sugieren que exposiciones previas no letales a RABV podrían proteger a *Artibeus spp.* de infecciones subsecuentes con RABV, independientemente de las dosis y rutas de inoculación. Sin embargo, el papel epidemiológico de las especies frugívoras en el mantenimiento del virus de rabia en la naturaleza aún no ha sido bien estudiado.

Palabras claves: *Artibeus*, *Desmodus rotundus*, seroprevalencia, inmunofluorescencia, PCR y PCR anidada.



## ABSTRACT

*Artibeus spp.* bats are abundant in tropical and sub-tropical regions of Mexico and other Neotropical countries; they are sympatric as the *Desmodus rotundus* vampire bat. Furthermore, it has been observed that both species may occupy the same roosts. Rabies virus (RABV) variants circulating in *Artibeus spp.* in Mexico are closely related to vampire bat variants. In a study of seroprevalence of rabies antibodies in bats our team found 6 out of 51 positive sera (11.8%) from *Artibeus spp.*, suggesting that they have been exposed to RABV. The aim of this work was to study the pathogenesis and distribution of RABV in *Artibeus spp.* We performed an experimental infection of *Artibeus spp.* with vampire bat isolates (V3). High ( $1 \times 10^{5.34}$  FFU) and low ( $1 \times 10^3$  FFU) doses of RABV, inoculated by two routes, were compared. All animals were tested for rabies antibodies before the infection. Only one bat out of 38 died at day 14 post inoculation and was positive to FDA, but no clinical signs were observed. The bats in this experiment do not showed clinical signs of the disease, but high titers of antibodies were determined since 7<sup>th</sup> day post-inoculation. These data suggest pre-exposure to RABV and fall of antibodies titers below detection levels previous this study and the inoculation could act as a booster. RABV nested PCR was positive in organs such as brain, stomach, liver and heart in animals that did not show clinical signs of disease and were negative by immunofluorescence. These results suggest that previous non lethal exposure to RABV somehow protected *Artibeus spp.* from rabies infection in this study, independently of doses and inoculation routes, but the epidemiological role of frugivorous species in the maintenance of rabies virus in the wild remains to be studied.

Key words: *Artibeus*, *Desmodus rotundus*, seroprevalence, immunofluorescence, PCR and nested-PCR.

## INTRODUCCIÓN

La rabia es una enfermedad neurológica de los mamíferos, causa una encefalitis aguda, progresiva y casi siempre es mortal, una vez que se desarrollan los signos clínicos (Centers for Disease Control and Prevention [CDC] 2009).

Es provocada por un virus de la familia *Rhabdoviridae*, del género *Lyssavirus*, orden *Mononegavirales* (Fooks, 2004).

La rabia es una de las diez principales zoonosis que afectan al género humano, por lo que representa un problema de salud pública. Es considerada una enfermedad reemergente en diferentes países del mundo y está asociada al aumento en las tasas de contacto con los reservorios (Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud, 2005).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud hay rabia en más de 150 países y territorios. Alrededor de 60 000 personas mueren de rabia por año en el mundo. De éstas 60 000 muertes, 30 000 se estima que ocurren en Asia, (20 565 de ellas en la India) y 23 700 en África. Cada año más de 15 millones de personas reciben tratamientos profiláctico post- exposición con la vacuna. Se calcula que de este modo se previenen cientos de miles de muertes anuales por rabia (OMS, Septiembre 2012). La exposición de casos de rabia humana se da especialmente en niños de aproximadamente de 5-14 años de edad en áreas rurales y periurbanas (World Health Organization (WHO). Rabies Facts in short. Geneva; 2006).

En América Latina la rabia es considerada un problema importante de salud pública y se llevan a cabo programas de vigilancia, prevención y control de acuerdo a las recomendaciones del Comité de Expertos en rabia de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2006)

Las personas se infectan por la mordedura o el arañazo profundos de un animal infectado. Los perros son los principales huéspedes y transmisores de la rabia. Los murciélagos insectívoros son la principal fuente de infección en los casos mortales

de rabia en los Estados Unidos y Canadá, mientras que en Europa el principal vector es el zorro rojo, *Vulpes vulpes*. Las encefalitis tipo rabia provocadas por murciélago constituyen una amenaza para la salud pública en Australia, América Latina y Europa Occidental. Los casos mortales en humanos por contacto con zorros, mapaches, mofetas, chacales, mangostas y otros huéspedes carnívoros salvajes infectados son raros (OMS, Septiembre 2012).

También puede haber transmisión al ser humano en caso de contacto directo de material infeccioso (generalmente saliva) con mucosas o heridas cutáneas recientes. La transmisión de persona a persona por mordeduras es teóricamente posible, pero nunca se ha confirmado (Collins, 2005).

Aunque es raro, también puede contraerse la rabia por trasplante de órganos infectados o inhalación de aerosoles que contengan el virus (Constantine et al., 1968; Gibbons, 2002). La ingestión de carne cruda o de otros tejidos de animales infectados no es fuente de infección humana (OMS, Septiembre 2012).

Las medidas de prevención de rabia en humanos comprenden tanto el tratamiento profiláctico pre o post exposición como las de intervención sobre los reservorios u hospederos incidentales del virus de la rabia: el perro, los murciélagos y otros mamíferos terrestres.

### 1) El virus de la rabia

El virus de la rabia pertenece al orden de *Mononegavirales*, los virus que pertenecen a este orden se caracterizan por poseer un genoma constituido por ARN de una sola cadena de polaridad negativa, no segmentado. El International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ICTV reporta que éste orden comprende las siguientes familias (Jiménez, 2006; Sacramento et al., 1992, Grard G, Fair JN, Lee D, et al., 2012 (**Figura 1**):

Familia *Bornaviridae* (Virus de la enfermedad de Borna)

Familia *Paramyxoviridae*. (Parainfluenza del sarampión y LPM)

Familia *Filoviridae* (Virus del ébola)

### **Familia *Rhabdoviridae*.**

La familia *Rhabdoviridae* comprende seis géneros (*Lyssavirus*, *Vesiculovirus*, *Ephemerovirus*, *Novirhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus* y *Cytorhabdovirus*) y más de 130 virus sin clasificar (ICTV) (Jackson *et al.*, 2005 y Kuzmin *et al.*, 2009). Tres de los géneros de esta familia infectan a mamíferos y son de interés veterinario: *Vesiculovirus* (Virus de estomatitis vesicular, VSV), ***Lyssavirus* (Virus de la rabia)** y *Ephemerovirus* (Virus de la fiebre efímera bovina) (Aguilar Setién y Loza Rubio, 1998). Los *Novirhabdovirus* infectan numerosas especies de peces, mientras que los *Cytorhabdovirus* y *Nucleorhabdovirus* son transmitidos por artrópodos e infectan plantas (Bouhry *et al.*, 2005, van Regenmortel *et al.* 2000). A causa de este variado número de hospedadores, los rhabdovirus se consideran ancestrales, y han podido estar presentes a lo largo de la evolución de animales y plantas (Iwasaki *et al.*, 2004). Esto confiere a esta familia un gran potencial de emergencia de zoonosis por salto de especie hospedadora.

Con base en estudios de secuenciación de los genes de la nucleocápside, se pueden emplear la terminología de genotipos para clasificar a los diferentes *Lyssavirus* (Dietzschold, 1987).

Estas especies se confirmaron mediante el análisis del genoma completo (Badrane *et al.*, 2001) y son: virus de la rabia clásica (genotipo 1), Lagos bat (genotipo 2), Mokola (genotipo 3), Duvenhage (genotipo 4), EBLV1 European bat Lyssavirus, (genotipo 5), EBLV2 (genotipo 6) y ABLV Australian bat Lyssavirus (genotipo 7), y Aravan virus, Khujand virus, Irkut virus y West Caucasian bat virus, los recientemente descritos que aún no tienen clasificación: Shimoni bat virus, Bokeloh, Ikoma virus y Lleida Bat Lyssavirus (LLEBV) (Aréchiga- Ceballos N y *et al.* 2013)

Los *Lyssavirus* pueden ser clasificados al menos en tres filogrupos con base en las secuencias de su genoma completo, inmunogenicidad y patogenicidad (Badrane *et al.*, 2001, Fooks, 2004). El filogrupo I incluye las especies I, IV, V, VI y VII así como los virus Aravan, Khujand e Irkut mientras que el filogrupo II a los

genotipos II, III y Shimoni. El filogrupo III está formado por el West Caucasian Bat virus (WCBV); Ikoma virus (IKOV) y el más reciente Lleida Bat Lyssavirus (LLEBV), estos dos últimos son los más divergentes miembros del género *Lyssavirus*, por lo que es importante realizar más estudios para determinar si forman parte del filogrupo III o representan un nuevo filogrupo (Kuzmin et al., 2005; Kuzmin et al., 2008, Marston y et al., 2012, Aréchiga y et al., 2013) (**Figura 2 y Cuadro 1**).

Por otro lado, a diferencia de los virus del filogrupo I, los del filogrupo II y III no son neutralizados por los anticuerpos generados por vacunas comerciales, todas ellas dirigidas contra el virus de la rabia (genotipo I), por lo cual no existe posibilidad de una profilaxis post-exposición efectiva tras la exposición a Lyssavirus de los filogrupos II y III (Markotter et al., 2009).

De las especies identificadas en el mundo, de éstos sólo el genotipo III *Mokola virus* y el *Ikoma virus*, no han sido aislados de murciélagos. El genotipo I o rabia clásica está ampliamente distribuido en el mundo y es el de mayor importancia epidemiológica porque está asociado a un elevado número de casos de rabia, en comparación con los otros genotipos, es el único hasta ahora identificado en toda América (Fooks, 2004) (**Figura 3, 4 y 5**).

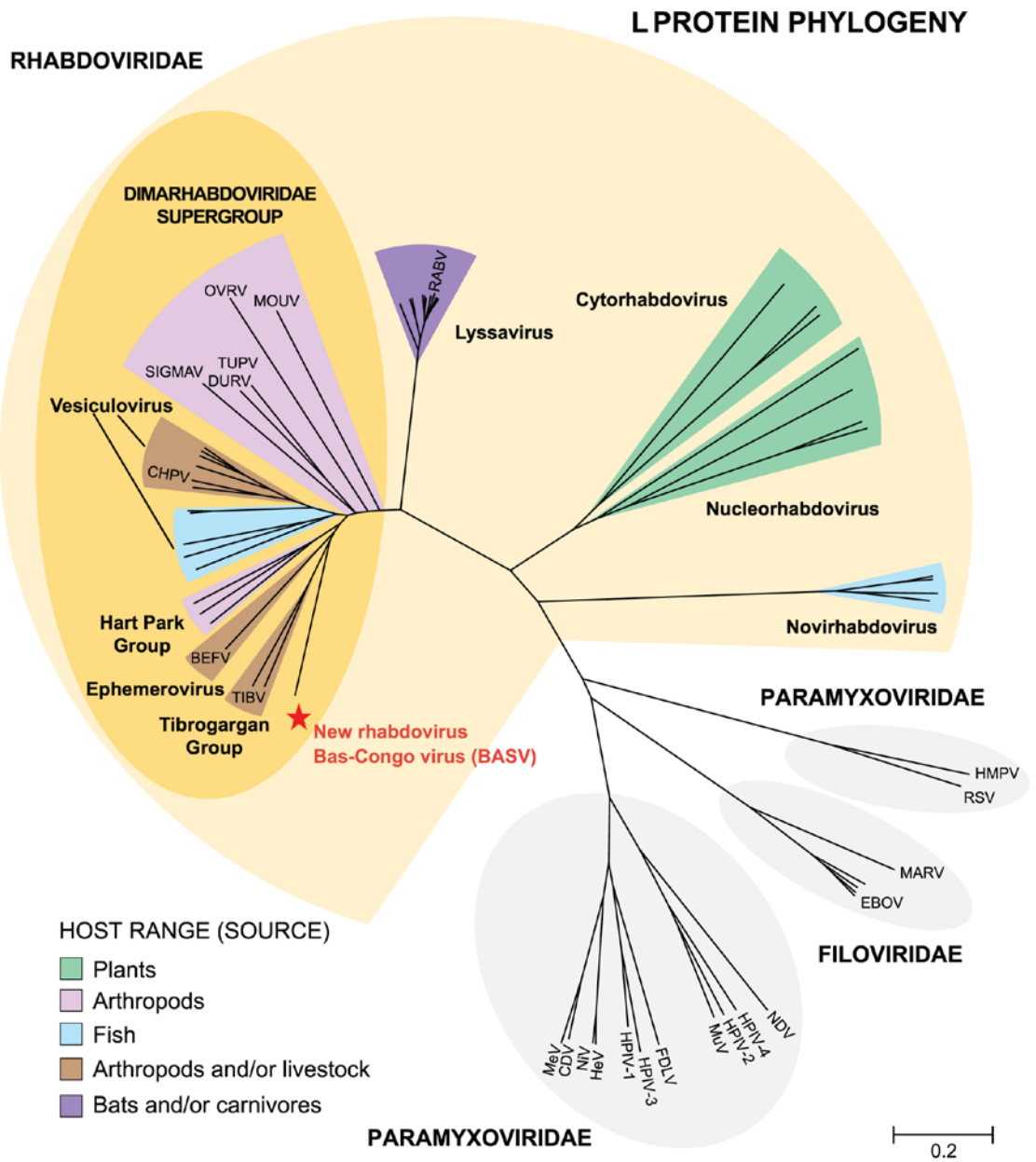


Figura 1. Análisis filogenético de las proteínas L de los virus del orden Monegavirales. (Grard G., Fair JN., Lee D y et al. 2012).

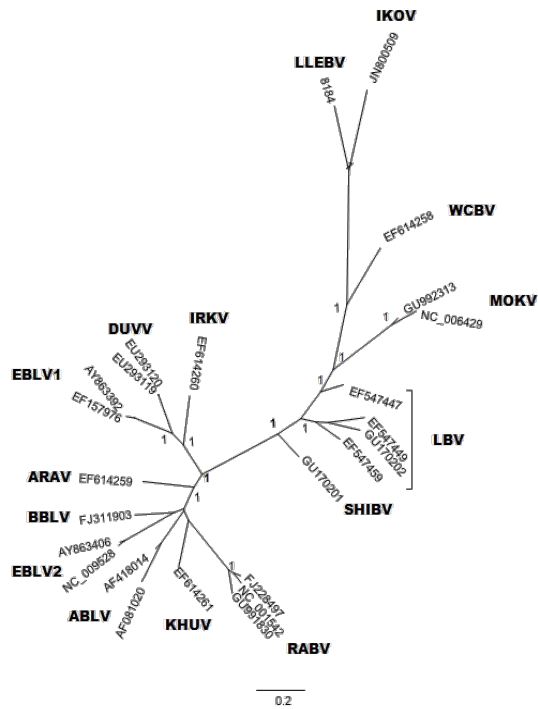


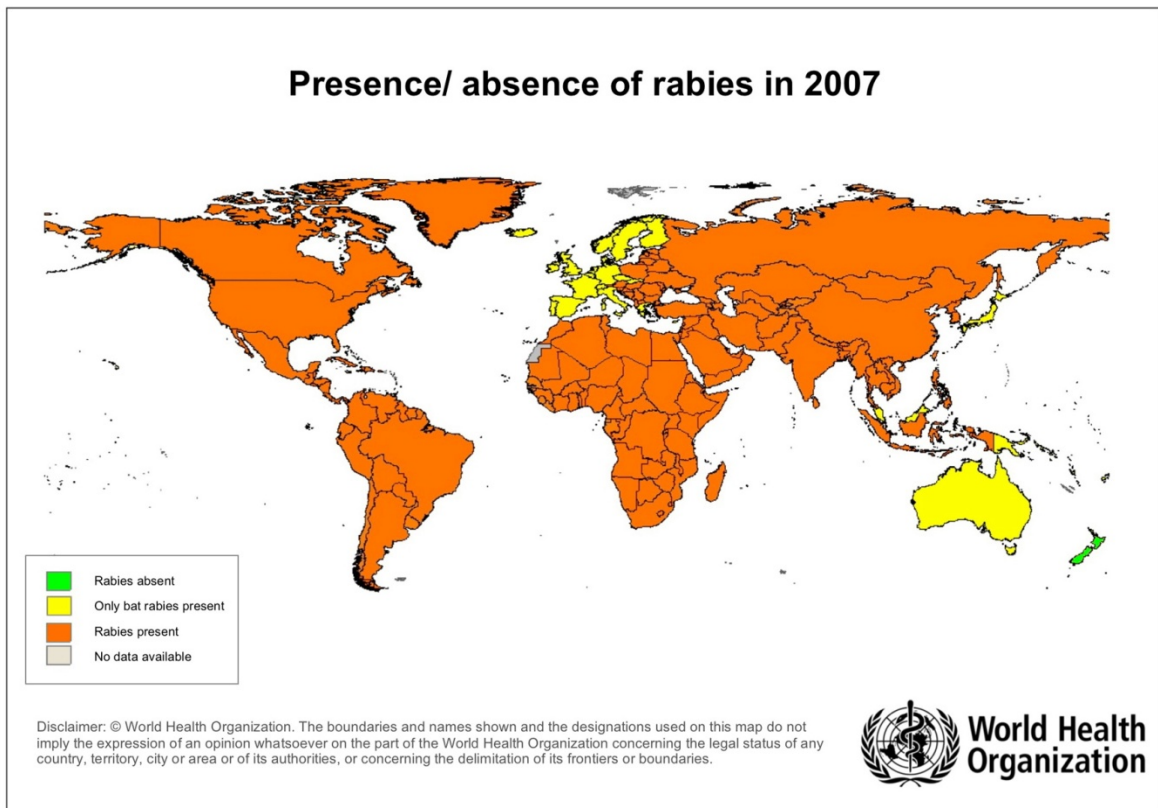
Figura 2. Relaciones filogenéticas entre *Lyssavirus* descritos actualmente. Este árbol se hizo en base a secuencias parciales del gen de la nucleoproteína (405 pb). Sistema Bayesiano basado en Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) (Aréchiga- Ceballos N y et al. 2013).

**Cuadro 1. Origen y distribución tradicional de los *Lyssavirus* Familia *Rhabdoviridae*  
(Modificado de: Bourdhy y Sureau, 1990)**

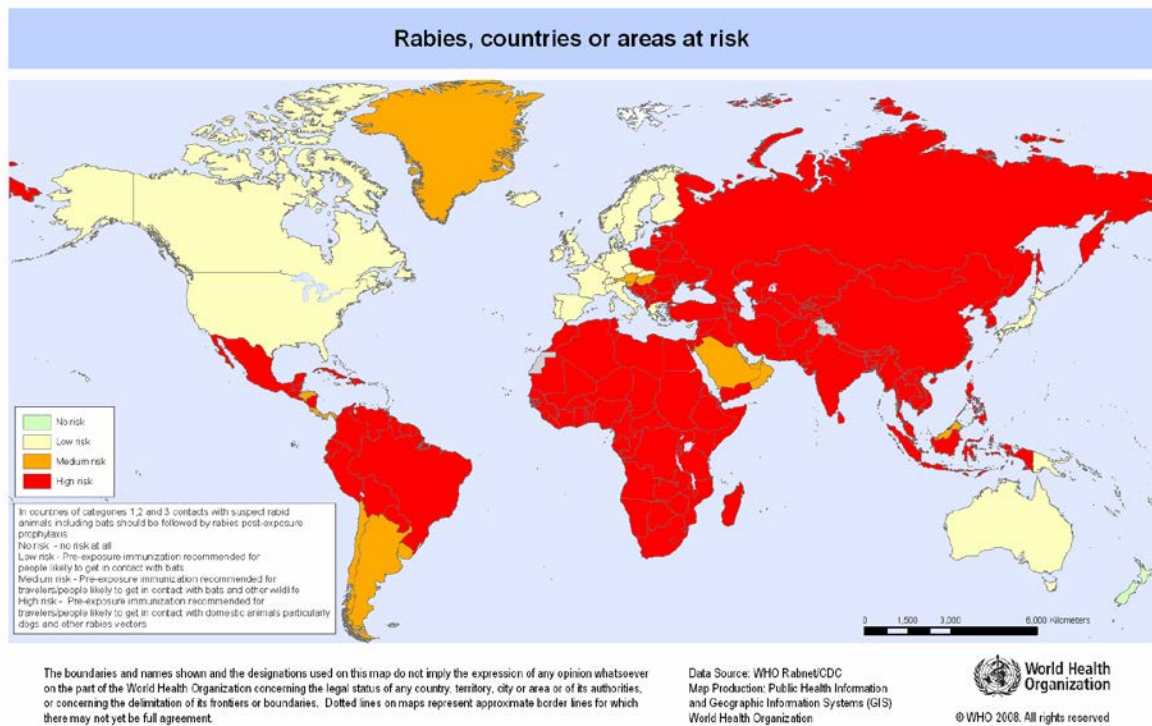
Nombre	Especie	Filogrupo	Vectores potenciales y reservorios	Distribución
Virus de la rabia (RABV)	1	I	Carnívoros (todo el mundo) y murciélagos (América)	Mundial <sup>a</sup>
Lagos Bat Virus (LBV)	2	II	Murciélagos frugívoros ( <i>Megachiroptera</i> )	Nigeria y África
Mokola Virus (MOKV)	3	II	Musaraña, roedor	Nigeria y África
Duvenhage Virus (DUVV)	4	I	Murciélagos insectívoros	Sudáfrica y Zimbabue
European Bat Lyssavirus 1 (EBL-1)	5	I	Murciélagos insectívoros ( <i>Eptesicus serotinus</i> <i>Pipistrellus</i> )	Dinamarca, Alemania, Países Bajos, Polonia, Rusia, Eslovaquia, Francia y España
European Bat Lyssavirus 2 (EBL-2)	6	I	Murciélagos insectívoros ( <i>Myotis spp.</i> )	Países Bajos, Reino Unido, Finlandia y Suiza
Australian Bat Lyssavirus (ABLV)	7	I	Murciélagos frugívoros/insectívoros ( <i>Megachiroptera</i> y <i>Microchiroptera</i> )	Australia y Filipinas
Aravan Virus (ARAV)	SC	I	Murciélagos insectívoros	Sur de Kirguistán
Khujand Virus (KHUV)	SC	I	Murciélagos insectívoros	Norte de Kayikistán
Irkut Virus (IRKV)	SC	I	Murciélagos insectívoros	Este de Siberia
West Caucasian Bat Virus (WCBV)	SC	III	Murciélagos insectívoros	Región caucásica
Shimoni Bat Virus (SHIBV)	SC	II	Murciélagos insectívoros ( <i>Hipposideros commersoni</i> )	Kenia
Bokeloh Bat Virus <sup>b</sup>	SC	I	Murciélagos insectívoros	Europa
Ikoma	SC	¿III?	Civeta Africana <i>Civettica civetta</i>	África
Lleida Bat Lyssavirus (LLBV)	SC	¿III?	<i>Miniopterus schreibersii</i>	España

<sup>a</sup> Salvo Escandinavia, Islandia, Reino Unido, Irlanda, Australia y Nueva Zelanda, SC sin clasificar y <sup>b</sup> propuestos recientemente como *Lyssavirus*, pero pendientes de clasificar por el Comité Internacional de Taxonomía del Virus.





**Figura 3. Distribución geográfica de la Rabia en 2007.** En verde se encuentran los países libres de rabia, en amarillo donde solo se encuentra rabia en murciélagos, en naranja los países donde existe el genotipo 1 y en gris aquellos países donde no hay datos disponibles (rabia (Neglected Zoonotic Diseases (NZD), Department of Neglected Tropical Diseases (NTD), World Health Organization, 2009 Y RabNet/Rabies Bulletin in Europe/Bulletin of Epidemiological Surveillance of Rabies in the Americas/Office International d'Epizooties, 2007). ([http://www.who.int/rabies/rabies\\_maps/en/](http://www.who.int/rabies/rabies_maps/en/)).



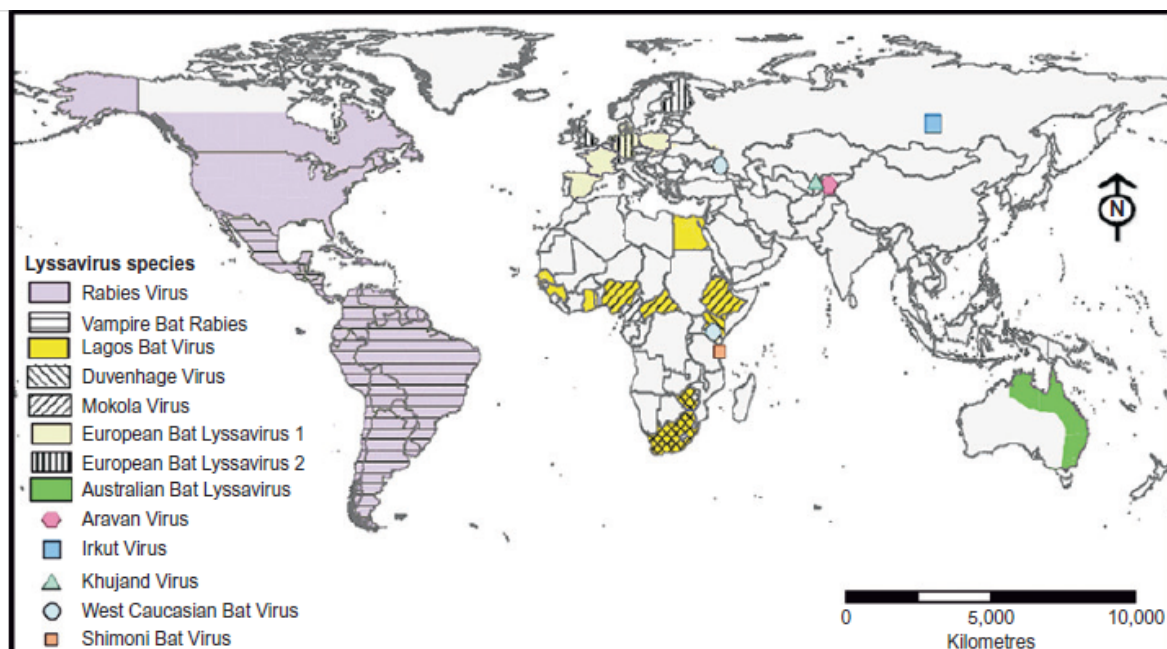
**Figura 4. Ciudades y áreas que están en riesgo de Rabia.** Los países de las categorías 1, 2 y 3 que están en contacto con animales presuntamente rabiosos incluyendo murciélagos deben seguir profilaxis post-exposición.

Sin riesgo: No hay riesgo

Menor riesgo: La inmunización pre-exposición se recomienda para personas que puedan ponerse en contacto con murciélagos

Riesgo medio: La inmunización pre-exposición se recomienda para personas que puedan ponerse en contacto con murciélagos y otros animales silvestres.

Alto riesgo: La inmunización pre-exposición se recomienda para personas que entren en contacto con animales domésticos particularmente perros y otros vectores de la rabia (Neglected Zoonotic Diseases (NZD), Department of Neglected Tropical Diseases (NTD), World Health Organization, 2009 Y RabNet/Rabies Bulletin in Europe/Bulletin of Epidemiological Surveillance of Rabies in the Americas/Office International d'Epizooties, 2007). ([http://www.who.int/rabies/rabies\\_maps/en/](http://www.who.int/rabies/rabies_maps/en/)).



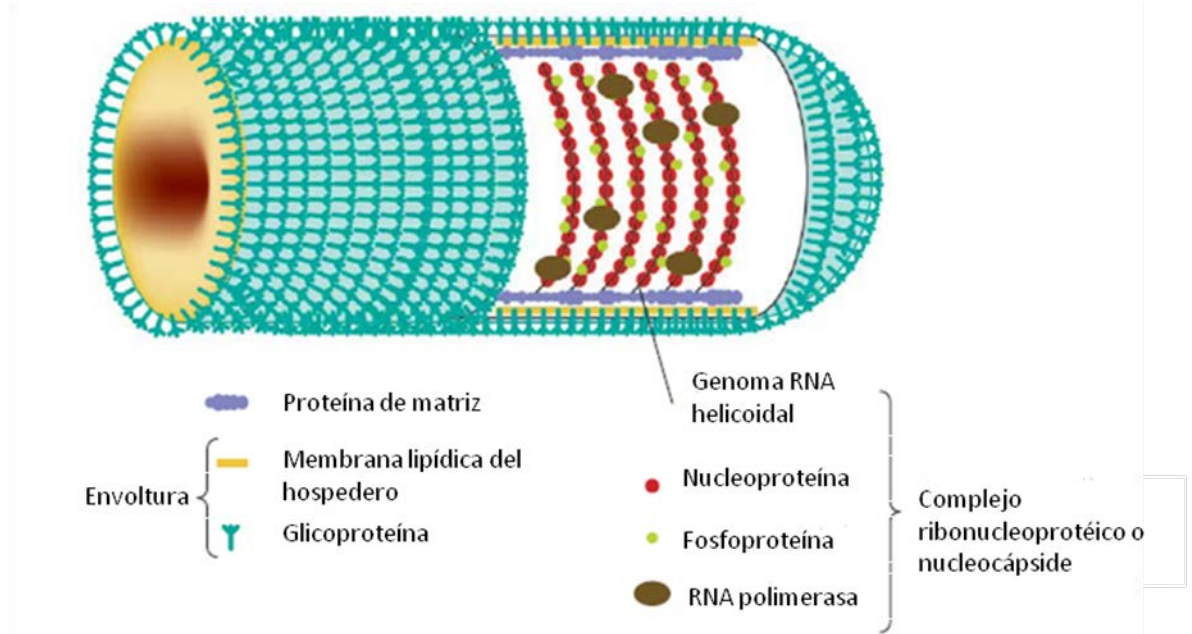
**Figura 5. Distribución geográfica de *Lyssavirus* de murciélagos aislados en el mundo.** Los países se encuentran marcados de acuerdo a la detección de las diferentes especies de *Lyssavirus* en murciélagos. ([http://www.who.int/rabies/rabies\\_maps/en/](http://www.who.int/rabies/rabies_maps/en/)).

### 1.1 Morfología y composición química

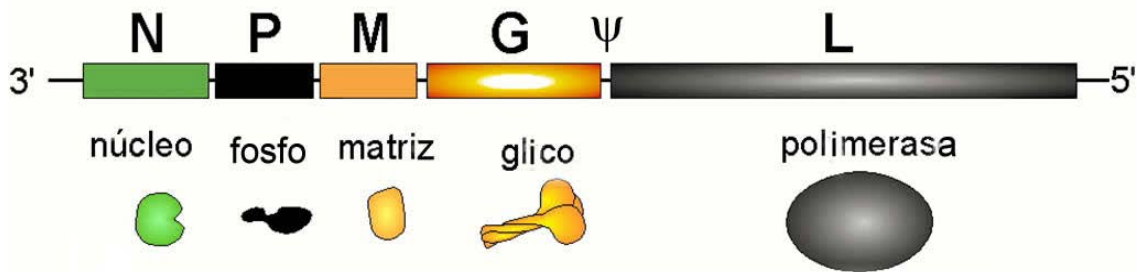
El virus de la rabia tiene forma de bala, es decir cilíndrica con un extremo plano y de otro redondeado, el virión mide 180 nm de longitud por 75 nm de diámetro aproximadamente. Tiene una fina envoltura exterior (8nm) con espículas (5nm) que engloban a una ribonucleocápside central de aspecto denso y estructura helicoidal (Tordo, 1993 y Tordo 1996).

El virus de la rabia tiene 12,000 ribonucleótidos ( $4.6 \times 10$  Daltons). Está compuesto bioquímicamente por 74% de proteínas, 20% de lípidos, 3% de carbohidratos y 3% de RNA (ácido ribonucleico) (Tordo, Charlton y Wanderler, 1998). El genoma se transcribe de la extremidad 3' a la extremidad 5' en un RNA corto (líder) y en 5 RNA mensajeros que codifican sucesivamente para 5 proteínas: nucleoproteína (N), proteína de matriz (M), fosfoproteína (P), glicoproteína (G) y la polimerasa (L) (Lancet, 2004; Aguilar Setién y Loza Rubio, 1998) (**Figuras 6 y 7**). La proteína N es la

más conservada, seguida de la L, M, G y P (Jonhson *et al.*, 2002 y Bourhy *et al.* 1993).



**Figura 6. Estructura del virión de la rabia.** El virión mide 180 x 75 nm, el genoma, es de RNA 11.9 kb, de cadena sencilla, no segmentado y de sentido negativo. Tiene una nucleoproteína, una RNA polimerasa dependiente de RNA, que forman el complejo ribonucleoprotéico. Una capa de la proteína de matriz cubre la estructura cilíndrica. La lipoproteína envuelve la bicapa lipídica llena de glicoproteínas de la rabia de picos triméricos. (Warrell, 2004).



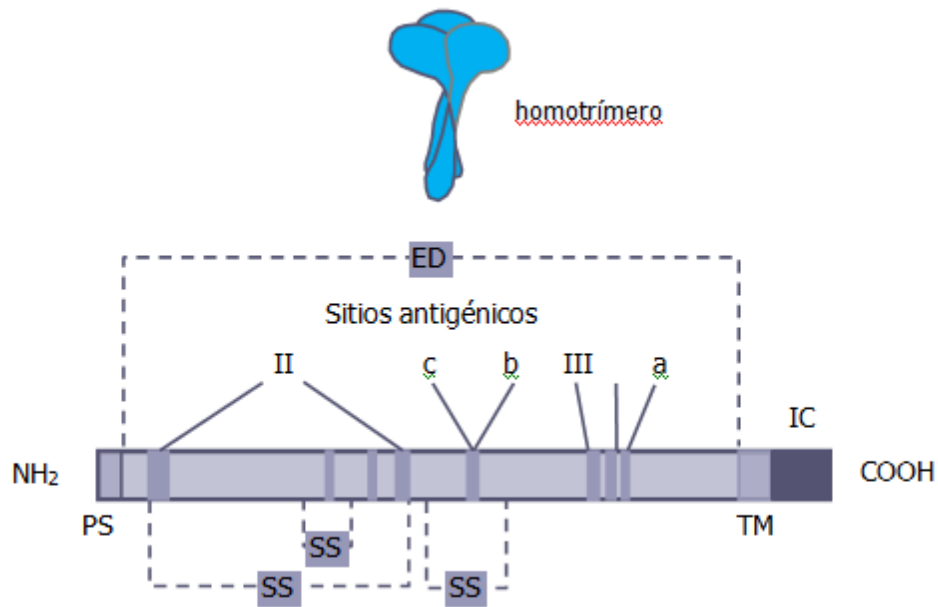
**Figura 7. Genoma del virus de la rabia.** McColl *et al.*, 2000.

## 1.2 Características de las proteínas del virus de la rabia

La nucleoproteína (N) de los rabdovirus se asocia al RNA genómico, y lo empaqueta fuertemente formando una nucleocápsida (o ribonucleoproteína) resistente a las RNasas, que sirve como molde tanto para la replicación como para la transcripción. La nucleoproteína está altamente conservada dentro de los distintos rabdovirus, siendo la proteína mayoritaria. La nucleoproteína, antes de asociarse al RNA, se asocia a la fosfoproteína (P), que mantiene a la proteína N en una forma soluble (Jayakar et al., 2004; Kuzmin et al., 2009). La fosfoproteína (P), junto con la polimerasa, constituyen los componentes de la actividad RNA polimerasa RNA dependiente. La polimerasa viral tiene dos actividades diferentes; transcripción y replicación, y estudios recientes indican que estas dos actividades se desarrollan por distintos complejos de la polimerasa, el complejo L-(P)<sub>3</sub>, en la actividad transcriptasa, o N-P-L en la replicasa. Los complejos de la transcriptasa y la replicasa también se asocian con proteínas celulares, que son necesarias para la actividad. La polimerasa está fuertemente asociada con la ribonucleoproteína. El ensamblaje de la polimerasa viral dentro de los viriones es esencial, ya que el genoma viral, que es RNA negativo, no puede ser usado como RNAm, y las células huésped no tienen las enzimas apropiadas para catalizar la transcripción. La polimerasa de los rabdovirus y de otros mononegavirales está organizada en seis bloques muy bien conservados (Assenberg et al., 2010; Jayakar et al., 2004; Kuzmin et al., 2009; Poch et al., 1990), que cabe presumir que reflejan funciones diferentes (Assenberg et al., 2010). Por ejemplo, el bloque III, que es una región muy conservada, tiene un papel esencial en la actividad de la polimerasa viral según han confirmado estudios de mutagénesis dirigida (Ruedas & Perrault, 2009; Schnell & Conzelmann, 1995), y sería el dominio catalítico (Kondo et al., 2006). El bloque V, también conservado, juega un papel esencial en la adición de la caperuza durante el procesamiento del RNAm viral. El bloque VI es la región mejor caracterizada y codifica para la metilasa viral que realiza la metilación de la caperuza 5' del RNAm viral. No se conocen bien las funciones de las regiones conservadas I, II y IV (Ruedas & Perrault, 2009).

La proteína de la Matriz es la proteína más pequeña, y forma una capa entre la envuelta y la nucleocápside, actuando como puente de unión entre la parte de las espículas de la glicoproteína que atraviesan la membrana y la nucleocápside (Nel & Markotter, 2007). Participa en múltiples funciones del ensamblaje de los rabdovirus, incluyendo la condensación de la ribonucleoproteína (RNP) y la formación de los viriones en forma de bala. También participa en la salida por gemación de los viriones desde la membrana celular (Jayakar et al., 2004) y media la inhibición de la expresión génica en las células huésped (Kopecky & Lyles, 2003).

La proteína G de los rabdovirus es una glicoproteína tipo I, con un dominio extracelular de gran tamaño, un dominio transmembrana, y un dominio citoplasmático (**Figura 8**). El dominio extracelular forma las espículas triméricas que sobresalen de la membrana y juegan un papel imprescindible en la patogenia, ya que es responsable de la unión del virus a su receptor, necesario para la entrada del virus en las células huésped y también colabora en el ensamblaje de los viriones. La glicoproteína es la única capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes protectores en el huésped (Jayakar et al., 2004).



**Figura 8. Estructura de la glicoproteína del virus de la rabia.** En la imagen superior se representa su posible conformación como homotrímero y en la imagen inferior se muestra la representación lineal con sus dominios II y III y sitios antigénicos a b y c. PS: péptido señal, ED: ectodominio, TM: dominio transmembranal, IC: dominio intracitoplásmico, NH<sub>2</sub> extremo amino, COOH extremo carboxilo; SS puentes disulfuro. Modificado de Bahloul, 1997.

### 1.3 Ciclo de replicación

Una vez que el virus penetra en el huésped, se adsorbe a las células musculares o nerviosas mediante trímeros de glicoproteína que se unen a receptores celulares como el nicotínico para la acetilcolina (nAChR), el receptor para neurotropina p75 (Tuffereau et al., 1998a; Tuffereau et al., 2001) o moléculas de adhesión de células neuronales (NCAM), posteriormente es endocitado, al disminuir el pH del endosoma se induce un cambio conformacional en la glicoproteína viral, que conduce a la fusión de la envoltura viral con la bicapa lipídica del endosoma liberándose la nucleocápside en el citosol. Antes de iniciar la replicación del RNA viral ocurre la transcripción del genoma. La glicoproteína del virus se sintetiza sobre los ribosomas adosados al retículo endoplásmico, luego es transportada hacia el aparato de Golgi donde es modificada. La glicoproteína madura es



transportada por vesículas hacia la membrana plasmática de la célula huésped, con la que se fusiona. Por otro lado, se sintetizan las proteínas de la matriz y de la nucleocápside, se ensamblan y se asocian con la membrana plasmática que contiene las glicoproteínas transmembranales. Finalmente, la membrana plasmática se pliega alrededor de la nucleocápside y los viriones son liberados por gemación (Figura 9).

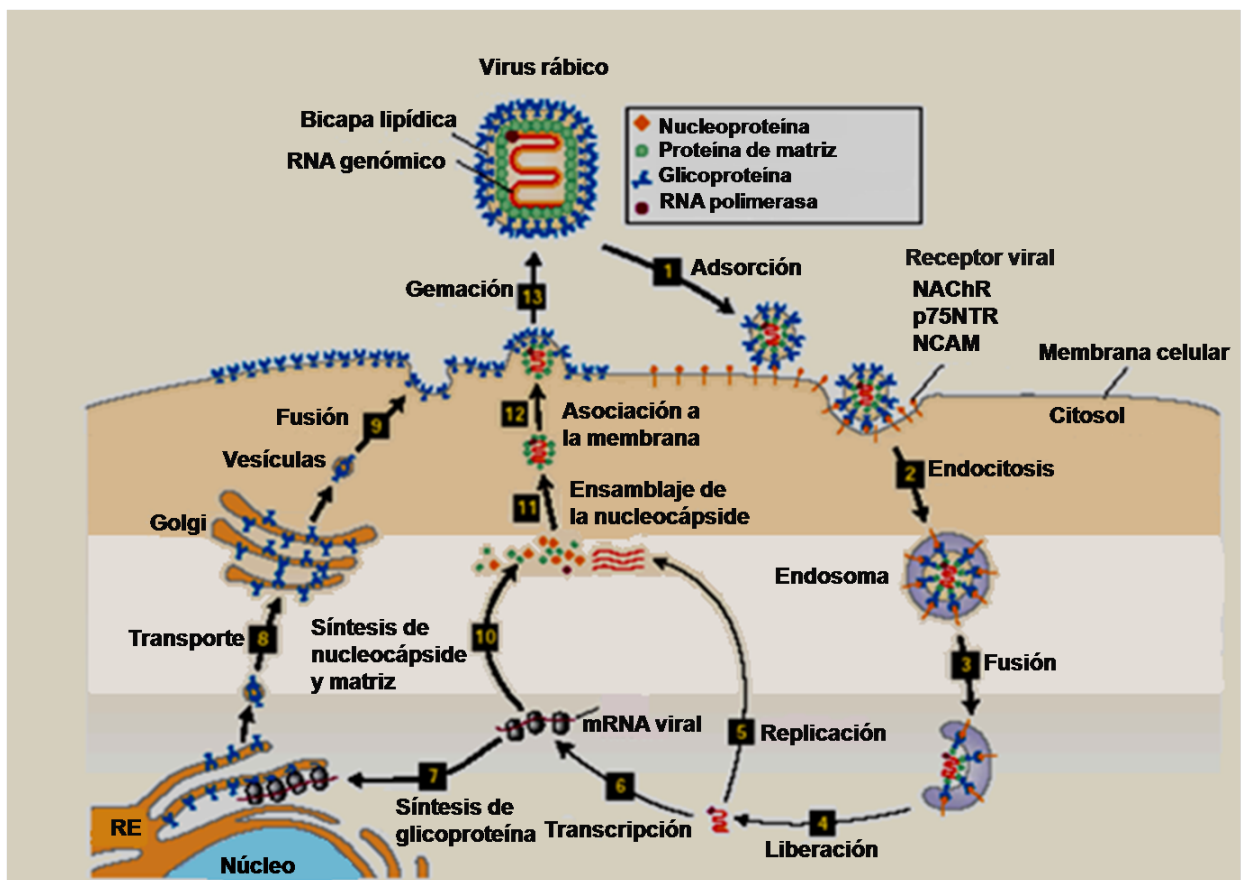


Figura 9. Ciclo de replicación del virus de la rabia.

Modificado de Lodish et al., 2005.



## 1.4 Patogenia

Los Lyssavirus se transmiten por la mordedura de un animal infectado, o por el contacto de la saliva infecciosa con una herida previa, aunque en algunos casos la infección se puede producir también por contacto con membranas mucosas (ej. ojos, nariz, boca). Por otro lado, se ha informado de cuatro casos de rabia humana seguida de la inhalación del virus por aerosoles, dos casos en un laboratorio (Winkler et al., 1973), y otros dos en una cueva de quirópteros (Gibbons, 2002). Aunque estos casos no se muestran concluyentes, particularmente el de la cueva, donde podría haber habido otro mecanismo de infección ya que uno de los sujetos tenía una herida abierta en la cara (Constantine, 1962; Gibbons, 2002). Sin embargo, la transmisión de Lyssavirus por vía aérea ha sido demostrada experimentalmente (Johnson et al., 2006). Existen también diversos casos transmitidos por murciélagos insectívoros en Estados Unidos de América en el que no existe antecedente conocido de mordedura u otro tipo de contacto físico, aunque éste bien podría haber pasado inadvertido. Hay también un pequeño número de casos mortales de rabia humana en pacientes que recibieron órganos de donantes infectados por virus de la rabia sin diagnosticar (Hellenbrand et al., 2005; Houff et al., 1979; Srinivasan et al., 2005). La severidad, localización y cantidad de mordeduras influye en la transmisión del virus, habiéndose asociado las mordeduras en la cabeza o en el cuello con los periodos de incubación más cortos y las tasas de mortalidad más altas (Rupprecht et al., 2002). El éxito de la transmisión depende de la dosis, la ruta de administración, las características del virus y la susceptibilidad del hospedador (Nel & Markotter, 2007).

Una vez el virus es inoculado, se une a los receptores celulares. El virus se puede replicar en las células de músculo estriado o infectar directamente las células nerviosas. Posteriormente infecta las neuronas a través de las placas motoras o fibras sensoriales y se propaga hasta alcanzar el sistema nervioso central (SNC), donde comenzará la rápida replicación del virus. Es entonces cuando comienzan los efectos patológicos, y se manifiestan los síntomas clínicos. Posteriormente el

virus es transportado desde el SNC, a través de los nervios periféricos, a múltiples localizaciones entre las que destacamos las glándulas salivales por su importancia en la transmisión. Con la diseminación del virus por la saliva se completaría el ciclo de infección de la rabia (WHO, 2011). El periodo de incubación suele variar de dos semanas a 6 años (siendo 2-3 meses la media), dependiendo de la cantidad de virus en saliva, la distancia del sitio de inoculación al cerebro y la cepa del virus (Smith et al., 1991; Turmelle et al., 2010).

### 1.5 Epidemiología

La rabia es una enfermedad que se mantiene en la naturaleza por diferentes especies de animales domésticos y silvestres de los órdenes *Carnivora* y *Chiroptera* que representan una gran variedad de hábitos alimenticios. Estas especies son llamadas reservorios (Smith, 1996).

Las especies susceptibles a la rabia pueden ser divididas en dos categorías: la primera como reservorios, es decir animales que mantienen el virus y lo diseminan de manera eficaz, los cuales son principalmente predadores (perros, zorros, lobos, mapaches, zorrillos y los murciélagos hematófagos, entre otros). El segundo grupo lo conforman los animales que aunque padecen la rabia no la diseminan de manera eficaz, tal es el caso de los herbívoros u omnívoros, los cuales son considerados fondos de saco epidemiológicos o huéspedes incidentales (Loza Rubio et al., 1999).

La rabia se puede dividir por sus ciclos en urbana y silvestre. En la rabia urbana el perro (en algunas ocasiones el gato) es el principal vector. La rabia silvestre se divide a su vez en ciclo terrestre y aéreo; en el ciclo terrestre los vectores pueden ser varias especies dependiendo del sitio afectado (por ejemplo zorro rojo, *Vulpes vulpes*, en Europa; mangostas en las Islas del Caribe; zorros, mapaches, zorrillos lobos y coyotes en Estados Unidos y Canadá). El principal vector de la rabia silvestre del ciclo aéreo en América Latina es el murciélago hematófago

*Desmodus rotundus*, el cual afecta principalmente al ganado; las otras dos especies de murciélagos hematófagos presentes que se localiza en regiones tropicales y subtropicales de América: *Diphylla ecaudata* y *Diaemus youngii*, no son consideradas de importancia en el mantenimiento de la rabia (Brass, 1994; Loza-Rubio et al., 2000), además de los murciélagos insectívoros o frugívoros (Favi y Catalán, 1986; Favi y Durán 1991).

En los países en los que la rabia canina (urbana) ha sido controlada y en los que también la rabia silvestre terrestre lo está siendo, se han encontrado que los murciélagos no hematófagos (insectívoros principalmente) son transmisores ocasionales de la rabia (*Lasiurus intermedius* en Estados Unidos). Sin embargo en México la situación geográfica que presenta hace que además de los vectores silvestres que se encuentran en regiones nórdicas (zorro, coyote, zorrillo, lobo, murciélagos insectívoros), también se encuentra el murciélago *Desmodus rotundus* (Aguilar-Setién y Loza-Rubio, 2000). Los murciélagos no hematófagos también son reservorios de la rabia y mantienen los ciclos endémicos independientes; su importancia como reservorios de la enfermedad en América Latina se evidenció en Chile, donde la rabia canina se eliminó desde 1985 y la enfermedad se mantiene en su ciclo silvestre, principalmente por la especie *Tadarida brasiliensis* (Favi y Catalán, 1986; Favi y Durán 1991, Loza-Rubio y col., 2000) que eventualmente puede infectar a los animales domésticos y al ser humano.

### **1.6 Situación epidemiológica de la rabia en México**

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

En México, la información sobre rabia está enfocada principalmente en quirópteros hematófagos por su impacto en la ganadería y en perros por ser un problema de salud pública. En los últimos años se ha reportado rabia en otros mamíferos silvestres como: zorrillos, coaties, y en otras especies de murciélagos no hematófagos como *Tadarida brasiliensis* y *Lasiurus cinereus*, entre otras de las que poco se sabe sobre su participación en el mantenimiento y transmisión de la infección.

La presencia de rabia en la fauna silvestre sigue causando preocupación, puesto que todos los años de la serie histórica analizada, excepto el 2003, se registraron casos humanos transmitidos por animales silvestres (**Apéndice 1**).

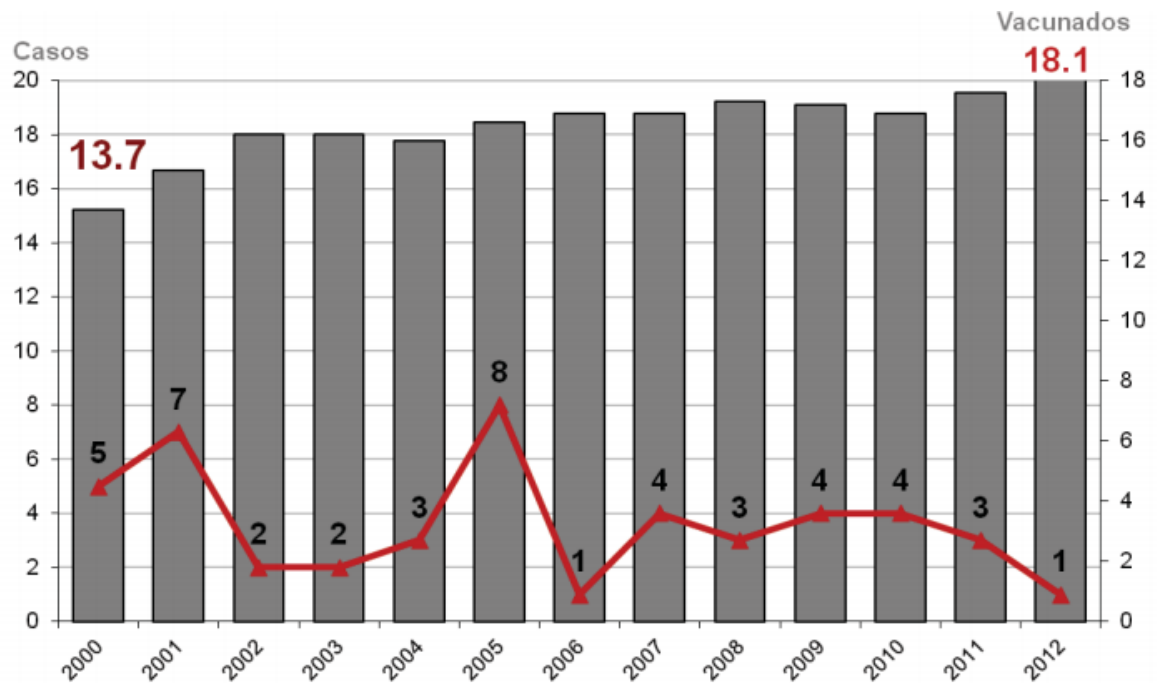
Los casos de rabia transmitida por especies de vida silvestre en nuestro país presentaron un comportamiento cíclico y recurrente, destacándose la persistencia de factores de riesgo de rabia transmitida por vampiros en áreas tropicales y subtropicales (OMS, 2005).

Se ha reportado 20 casos de rabia humana durante el periodo de 2006 a 2012 en México, estos casos transmitidos por otras especies diferentes del perro como: murciélago hematófago (14), Zorrillo (3), Zorro (2) y bovino (1) (**Figura 10, Apéndice 2 y 3**). (CENAPRECE 2013).

Poco se sabe acerca de la epizootiología de la rabia asociada con murciélagos en México; la vigilancia activa y pasiva en poblaciones de murciélagos apenas se está iniciando y la tipificación molecular de especímenes positivos obtenida de animales domésticos no se ha realizado rutinariamente.

La rabia transmitida por murciélagos no hematófagos es un problema que afecta también a poblaciones urbanas y áreas desarrolladas económicamente. El riesgo está dado por la transmisión directa del murciélago al hombre, o del murciélago a otras especies domésticas que pueden actuar como transmisores incidentales. No obedecen a patrones epidemiológicos definidos y, en varios casos registrados,

la agresión ha pasado desapercibida por el paciente, llegándose al diagnóstico *post-mortem* de rabia producida por murciélago (OPS/OMS, 2005).



**Figura 10. Casos de rabia humana transmitida por cualquier especie en México de 2006-2012.** Información epidemiológica CENACEVE. La barras grises muestran el número de dosis (millones) aplicadas en humanos y en rojo se muestran los casos de rabia humana transmitida por cualquier animal (CENAPRECE 2013).

## 2) Quirópteros

Los murciélagos son animales de hábitos nocturnos crepusculares que viven en colonias y representan a un grupo muy antiguo y especializado de los mamíferos, el llamado orden *Chiroptera*. Existen en todo el mundo, exceptuando las regiones polares y se destacan de los demás mamíferos por ser los únicos que tienen el dominio del vuelo (Jiménez y De la Torre 2006, Jaramillo *et al.*, 2001). Viven generalmente en estado gregario, formando colonias de algunos a miles de

individuos, en cuevas, huecos de árboles y otros refugios húmedos y oscuros, naturales y artificiales.

Los murciélagos constituyen el segundo orden de mamíferos más abundantes, actualmente se conocen más de 1000 especies, lo que representa el 25% de todas las especies de mamíferos. Su distribución es casi cosmopolita y sólo están ausentes en las regiones polares e islas remotas en los océanos; cerca de 300 especies se encuentran en África y Madagascar, 200 en el sur y centro de América y en el Caribe; en el sureste de Asia y Australia también son cerca de 200 especies; en latitudes mayores como el norte de América y el oeste y centro de Europa se presentan aproximadamente 40 especies (Altringham, 1996).

El orden *Chiroptera* incluye 2 grandes subórdenes, el *Microchiroptera*, o murciélagos verdaderos, que comprende 1000 especies, y el *Megachiroptera*, o zorros voladores, que comprende 175 especies (Neuweiler, 2000; Fowler, 2008).

Los *Microchiroptera* sin excepción poseen un desarrollado sistema de ecolocación: sus señales de ecolocación son producidas por la laringe. El grupo con el mayor número de especies y mayor distribución mundial es el *Vespertilionidae*. Estas especies poseen un especializado sistema de ecolocación que los ayuda a reconocer insectos voladores basados en un patrón del movimiento de sus alas. Algunas especies son neotropicales, especialmente las que pertenecen a la gran familia *Phyllostomidae* (Wimsott, 1970).

La clasificación de los microquirópteros usada hoy en día está basada en el sistema desarrollado por Miller en 1907. En este suborden se encuentran cerca de 816 especies agrupadas en 17 familias (aquellas que se encuentran seguidas por un asterisco, están presentes en México): *Rhinopomatidae*, *Emballonuridae*\*, *Craseonycteridae*, *Noctylionidae*\*, *Nycteridae*, *Megadermatidae*, *Rhinolophidae*, *Hipposideridae*, *Mormoopidae*\*, *Phyllostomidae*\*, *Natalidae*\*, *Furipteridae*, *Thyropteridae*\*, *Myzopodidae*, *Vespertilionidae*\*, *Mystacinidae*, y *Molossidae*\*, cuya distribución es casi cosmopolita (Fenton, 1992; Ceballos y Navarro, 1991).

Los *Chiroptera* incluyen miembros que se especializan en casi todas las dietas concebibles (Schimidly, 1999).

### 2.1 Los quirópteros en México

México es uno de los países con mayor número de especies nativas de mamíferos, alrededor de 525, sólo debajo de Indonesia o Brasil, que tienen 560 y 540, respectivamente. Los murciélagos no son la excepción, y; en comparación, Estados Unidos y Canadá juntos sólo tienen alrededor de 5% de las especies de murciélagos (Álvarez CSS y Álvarez ST, 1991).

La diversidad de especies de murciélagos mexicanos incluye una gran variedad en hábitos y ecologías; se encuentra en las zonas tropicales, principalmente en las costas, en Oaxaca y Chiapas, sin embargo están ampliamente representados por todo el país. Aunque muchas especies son insectívoras, en el grupo encontramos especies frugívoras y nectarívoras, que pueden llegar a ser muy abundantes, cómo los géneros *Artibeus*, *Carollia*, *Leptonycteris* o *Glossophaga*, o las tres especies que comen sangre, los vampiros: *Desmodus rotundus*, sus presas son mamíferos, y las dos especies de vampiros que prefieren aves: *Diaemus youngi* y *Diphylla ecaudata* (Álvarez CSS, Álvarez ST, 1991).

### 2.2 EL género *Artibeus*.

Es un género de murciélagos frugívoros neotropicales que pertenecen a la familia *Phyllostomidae*. El género cuenta con 18 especies, las cuáles son nativas del Centro y Sur América. Estos murciélagos miden en promedio de 5 a 10 cm de largo y pesan de 10 a 85 g. Dependiendo de la especie el pelaje puede ser color café o gris en la parte de arriba, el lado de abajo es brillante. En algunas especies, la cara tiene cuatro líneas blancas o difusas. El patagio (la piel entre las extremidades inferiores) es muy pequeño y carecen de cola. Al igual que otros murciélagos filostómidos la nariz tiene una pequeña y aguda hoja nasal que es usada para la ecolocación.

Estos murciélagos se encuentran desde el norte de México y las Bahamas hasta el norte de Argentina, incluyendo las Antillas (**Apéndice 4, 5 y 6**). Viven en ambientes variados, desde bosques hasta pastizales. Pueden reproducirse tres o cuatro veces al año. Son frugívoros, consumen higos, ciruelas, guayabas, moras y zapotillos entre otros; también pueden alimentarse de néctar, polen y algunos insectos. Es una de las especies más abundantes de México (Álvarez CSS, 1991; Altringham, 1996 y Romero *et al.*, 2006).

### 2.3 Evolución de los *Lyssavirus* y relación con los quirópteros

Los primeros fósiles que se conocen de quirópteros se remontan a unos 53 millones de años, pero curiosamente, esos fósiles nos muestran animales muy similares a los actuales, unos murciélagos completamente desarrollados que no nos aportan información acerca de su antepasado terrestre. Se sugiere que la diversidad de los microquirópteros es resultado del aumento en la diversidad de presas; y la variedad en las estrategias de vuelo y ecolocación puede ser producto de la explotación de diferentes nichos ecológicos en esa época (Teeling *et al.*, 2005). Se cree que los murciélagos evolucionaron a partir de un mamífero placentario insectívoro y arborícola que fuera desarrollando la capacidad de planear.

Los virus de RNA están desprovistos de un mecanismo de prueba del marco de lectura por lo que se consideran de rápida evolución (Drake *et al.*, 1998) y producen diversas poblaciones virales llamadas *cuasiespecies* (Domingo *et al.*, 1998) que pueden explorar nuevas condiciones o escapar de las defensas del sistema inmunológico (lo último no se ha descrito para ningún *Lyssavirus* hasta la fecha) (Domingo *et al.*, 1998).

Parece que existe una correlación muy estrecha entre los murciélagos y los *Lyssavirus* (Shope, 1982; Badrane *et al.*, 2001, Kuzmin *et al.*, 2005). Mediante el análisis del gen de la glicoproteína de los diferentes *Lyssavirus*, se observó que esta proteína G tiene una gran diversidad dentro de las especies de este género, mostrando solo un 54% de aminoácidos conservados. Este estudio muestra que los



*Lyssavirus* de murciélagos existen mucho antes que los *Lyssavirus* de carnívoros (RABV), y que tuvo lugar un exitoso cambio de hospedador desde los quirópteros a los carnívoros en la historia reciente de los *Lyssavirus*. Es más, se data este cambio del virus RABV en un periodo entre hace 888 y 1.459 años (Badrane y Tordo, 2001).

Estos datos sugieren que el género *Lyssavirus* tuvo su origen a partir de un *Rhabdovirus* de insecto, el cual fue transmitido a los murciélagos insectívoros hace unos 7 a 11 mil años (Badrane et al., 2001).

Como apoyo a esta teoría tenemos que los murciélagos se relacionan con la mayoría de los *Lyssavirus* descritos con excepción del Mokola y el Ikoma (Badrane y Tordo 2001, Marston et al., 2012).

Actualmente, la transmisión del virus de la rabia de murciélagos a mamíferos terrestres sigue produciéndose, fenómeno que los epidemiólogos llaman *spillover* ("derrame") y pueden dar origen a enfermedades emergentes. Cuando el virus gana suficiente adecuación a un nuevo hospedero se presenta el fenómeno "*host switching*" (cambio de huésped) (Kuzmin et al. 2012).

Los *host switching* del virus de la rabia de murciélagos a carnívoros son importantes para comprender la evolución y emergencia, implicaciones en la salud pública, particularmente para las áreas donde la rabia terrestre ha sido eliminada (Kuzmin et al. 2012).

## ANTECEDENTES

En el siglo XIX y principios del XX, las grandes explotaciones de bovinos de Argentina, Brasil, México, Perú y Venezuela sufrían la pérdida de animales por una enfermedad que en Brasil llamaban peste das cadeiras, en México derriengue o derrengadera, y con otros nombres en distintos lugares. Los animales afectados por esta enfermedad fatal presentaban signos nerviosos como agitación, parálisis de los miembros posteriores que evolucionaba a parálisis generalizada, dificultad para respirar y deglutir, y respuesta exagerada a estímulos externos como luz, sonido, etcétera.

Sin embargo, en aquella época no se conocía el origen de esta enfermedad. No fue sino hasta los años treinta del siglo XX que los estudios de investigadores latinoamericanos como Queiros Lima (1934), de Brasil, demostraron que esta enfermedad que diezma al ganado, no era otra sino la rabia, conocida hace milenios en el antiguo continente, pero que en este caso era transmitida por murciélagos hematófagos, además de perros, lobos o zorros.

El papel de los murciélagos hematófagos en la trasmisión del virus de la rabia, se confirmó cuando Haupt y Rehaag identificaron la presencia de cuerpos de Negri en el sistema nervioso de un murciélago vampiro que se estaba alimentando de una vaca (Hurst y Pawan, 1931, Haupy y Reghaag 1921). Los murciélagos *Desmodus rotundus*, son los reservorios del virus de la rabia en América Latina, y son endémicos del norte de Chile, Argentina hasta el Norte de México y algunos países del Caribe (Koopman, 1988).

En México, entre 1944 y 1945, el doctor Téllez Girón (1944) demostró que la enfermedad, conocida también en nuestro país con los nombres de huilla, tronchado o renguera (dependiendo de la región) era igual a la peste das cadeiras del Brasil, y que correspondía a la rabia ancestral, como había descrito Queiros Lima.

La rabia en murciélagos no hematófagos fue diagnosticada por primera vez en un murciélago frugívoro (*Artibeus planirostris*) en Trinidad en 1931 (Bigler et al.1997). Después de esto se tienen pocos reportes descritos de la detección del virus de la rabia y anticuerpos neutralizantes en *Artibeus spp* (Shoji, 2004).

En 1953 en Florida (Estados Unidos) un joven fue atacado por un murciélago insectívoro *Lasiurus intermedius*, éste suceso hizo que las investigaciones pusieran interés a la pregunta sobre el papel que juegan los murciélagos no hematófagos en el mantenimiento del virus de la rabia. Poco después se confirmó el diagnóstico de rabia en otros murciélagos de diferentes hábitos alimenticios como insectívoros, frugívoros, omnívoros, polinívoros y piscívoros (Baer, 1975).

En 1997 en Brasil dos cepas de rabia aisladas de un murciélago frugívoro (*Artibeus lituratus*) fueron examinadas con anticuerpos monoclonales por primera vez y resultaron corresponder a variantes de vampiros. Sin embargo la dinámica de la epidemiología de la rabia en esta especie de murciélagos es desconocida aún (Shoji, 2004).

Un reciente estudio analizó el efecto de las dosis sobre la supervivencia dentro de los murciélagos vampiros (Almeida et al., 2005). Este estudio corroboró observaciones que son de interés particular. En primer lugar no fue posible la detección temprana de signos clínicos de la enfermedad, ya que los animales solo se separaban del grupo cuando los signos clínicos eran muy evidentes. Esto sugiere que los murciélagos vampiros que se separan y muestran cuadros clínicos claros de rabia se encuentran en la etapa tardía de la infección, aunque no se sabe de qué manera la progresión clínica de la enfermedad se correlaciona con la excreción del virus. Esto puede tener consecuencias significativas para el contacto y las tasas de transmisión entre especies murciélagos. En segundo lugar en otros estudios, no todos los animales que sucumben a la infección presentan un cuadro clínico de la enfermedad (Pawan 1936; Aguilar-Setién et al, 1998; Rodríguez y Tamayo 2000). Es importante mencionar que la detección de signos

clínicos de rabia en animales silvestres puede resultar difícil. Ya desde 1963, Pawan observó que aquellos animales que presentan la enfermedad clínicamente no muestran necesariamente un comportamiento agresivo.

Otro estudio realizado por Aguilar Setién *et al.* 2005, buscó evaluar la excreción del virus en un modelo de murciélago vampiro utilizando una gran dosis ( $10^6 \text{MIC}_{\text{LD50}}$ ) de un aislado de virus de rabia de murciélago vampiro. Se observó disminución del apetito, decaimiento, deshidratación y muerte. A los murciélagos infectados se les tomaron muestras de saliva antes y después de la aparición de la enfermedad clínica. No fue posible detectar la presencia del virus en las muestras de animales clínicamente enfermos. Sin embargo si se pudo hacer aislamiento viral en cultivo celular de tres murciélagos que sobrevivieron a la infección al día 6 y 21. Los tres permanecieron sanos y tenían anticuerpos neutralizantes al final del experimento.

Correa-Scheffer *et al.*, 2007, llevaron a cabo un estudio para identificar las especies de murciélagos que participan en el mantenimiento del ciclo de la rabia en Brasil, y al mismo tiempo para conocer la distribución del virus de la rabia en los diferentes órganos de estos animales. La distribución del virus se evaluó inoculando ratones y células N2A con suspensiones a partir de fragmentos de los diferentes órganos. De total de los murciélagos muestreados, 82 (1.9%) resultaron positivos a rabia. Las especies que resultaron positivas incluyeron: *Artibeus sp.*, *Myotis nigricans*, *Myotis sodalis*, *Eptesicus sp.*, *Lasiurus ega*, *Lasiurus cinereus*, *Nyctinomps laticaudatus*, *Tadarida brasiliensis*, *Histiotus velatus*, *Molossus rufus*, *Eumops sp.* y *Desmodus rotundus*. La investigación del virus en los diferentes órganos mostró fue a partir del cerebro (89.5%), glándula salival (57.9%) y lengua (32.9%) de donde se aisló más frecuentemente el virus encontrándose con menos frecuencia en sistema digestivo (3.1%).

En un estudio publicado por Freüling *et al.*, 2009, se realizó una infección experimental en 29 murciélagos *Eptesicus serotinus* con EBLV 1a, utilizando diferentes vías de inoculación; la mortalidad fue alta en el grupo intracraneal,

seguida por la ruta subcutánea. El periodo de incubación fue de 7 a 26 días dependiendo de la vía de inoculación. En conclusión la vía subcutánea que puede ser causada por mordeduras en vida libre podría ser la forma más eficiente de transmisión de EBLV-1 en *E. serotinus* de vida libre.

En otro estudio realizado por Salas y *et al.*, en 2010 se buscó la seroprevalencia de anticuerpos contra rabia principalmente en *Artibeus sp.* Las muestras de suero de 51 *Artibeus* del Golfo y las costas del Pacífico de México fueron sometidas a prueba FAVN contra rabia. Seis resultaron positivos (11.8%) 2/9 de las Costas del Golfo (ambos con 0.22 UI/ml) y 4/22 de las costas del Pacífico (2 con 0.22UI/ml) y 2 con 0.64UI/ml). En este estudio, otras especies de frugívoros, *Carollia sp.* de las costas del Pacífico, y *Artibeus sp.* de las costas del Golfo, resultaron positivas también (0.22 UI/ml). Esto sugiere que estas especies han estado en contacto con el virus de la rabia.

Un estudio reciente en Brasil documentó que 41 especies de murciélagos han sido asociados históricamente con la transmisión de la rabia de murciélagos, incluyendo 25 géneros y tres familias: *Phyllostomidae*, *Vespertilionidae* y *Molossidae*. (Sodre *et al.*,2010).

De igual manera en Brasil, Allendorf *et al.*, 2012, aislaron el virus de la rabia de 13 murciélagos frugívoros y 13 insectívoros infectados naturalmente; el objetivo fue investigar la distribución del virus de la rabia en tejidos y órganos diferentes de Sistema Nervioso Central. Se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada encontrándose que el cerebro y glándulas salivales resultaron positivos en el 100% de los animales analizados. En lo que respecta a otros órganos, el corazón fue positivo en 20% de los frugívoros y 40% de los insectívoros, los pulmones en 31% y 38%, el hígado en 20% y 32%, el riñón en 38% y 19%, la vejiga urinaria en 42% y 37%; el intestino en 38% y 19%, el estómago en 50% y 29%; la grasa interescapular en 38% y 42% respectivamente. Cabe señalar que el 50% de los estómagos y el 42% de las vejigas positivas en los frugívoros permite suponer que este puede encontrarse en las excretas de los murciélagos. La diseminación

del RABV en diferentes tejidos y órganos diferentes del SN refuerza la teoría de otras formas de transmisión en estos animales.

En América entre 1993 y 2002, el 16% de los casos de rabia humana fueron transmitidos por especies de murciélagos, en su mayoría, murciélagos no hematófagos (Belotto *et al.*, 2005).

En 2004, por primera vez en la historia del Programa Regional de Eliminación de la Rabia que coordina la Organización Panamericana de la Salud (PAHO; OPS), el número de casos humanos transmitidos por animales silvestres fue mayor que los de rabia transmitida por perros. En 2005, esa tendencia se manifestó claramente cuando se notificaron 51 casos de rabia humana transmitida por murciélagos, frente a 11 casos humanos de rabia transmitida por perros (Sistema de Información Regional de Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas [SIRVERA/OPS], 2006).

A partir del 2006 en México se han reportado 20 casos de rabia humana transmitidos por otras especies diferentes del perro, de los cuáles 14 casos fueron transmitidos por murciélago hematófago. (CENAPRECE 2013).

En México, a la fecha se han reportado 9 de las 11 variantes del genotipo I descritas en América (Velasco-Villa y *et al.*, 2002), empleando un panel de 8 anticuerpos monoclonales creado por el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (Díaz y *et al.*, 1994).

Estas variantes son: V1 (perro), V3, V5 y V11 (murciélago vampiro), V4 y V9 (murciélago insectívoro *Tadarida brasiliensis*), V7 (zorro de Arizona), V8 y V10 (zorrillo) (**Figuras 11, 12 y tabla 1**).

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

\*Murciélagos insectívoros  
Ciclo terrestre: V1, V2, V7, V8, V10  
Ciclo aéreo: V6, V4, V9, V3, V5, V11

Tabla 1. Panel de anticuerpos monoclonales para detectar variantes antigénicas del virus de la rabia clásica en América. CDC, Atlanta. (Aréchiga-Ceballos N, 2010)

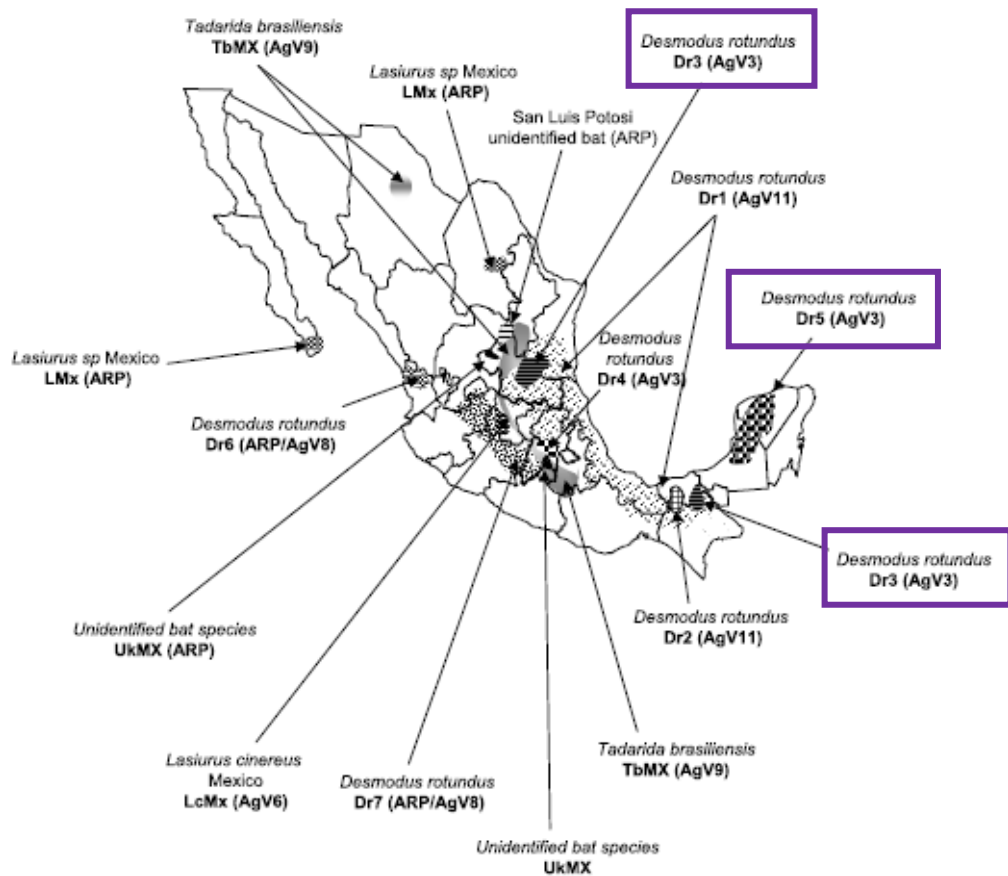


Figura 11. Distribución geográfica de clados asociados con virus de rabia en murciélagos en México (Modificado de Velasco-Villa et al., 2006). Los cuadros en morado muestran la distribución de la variante 3 del virus de la rabia.

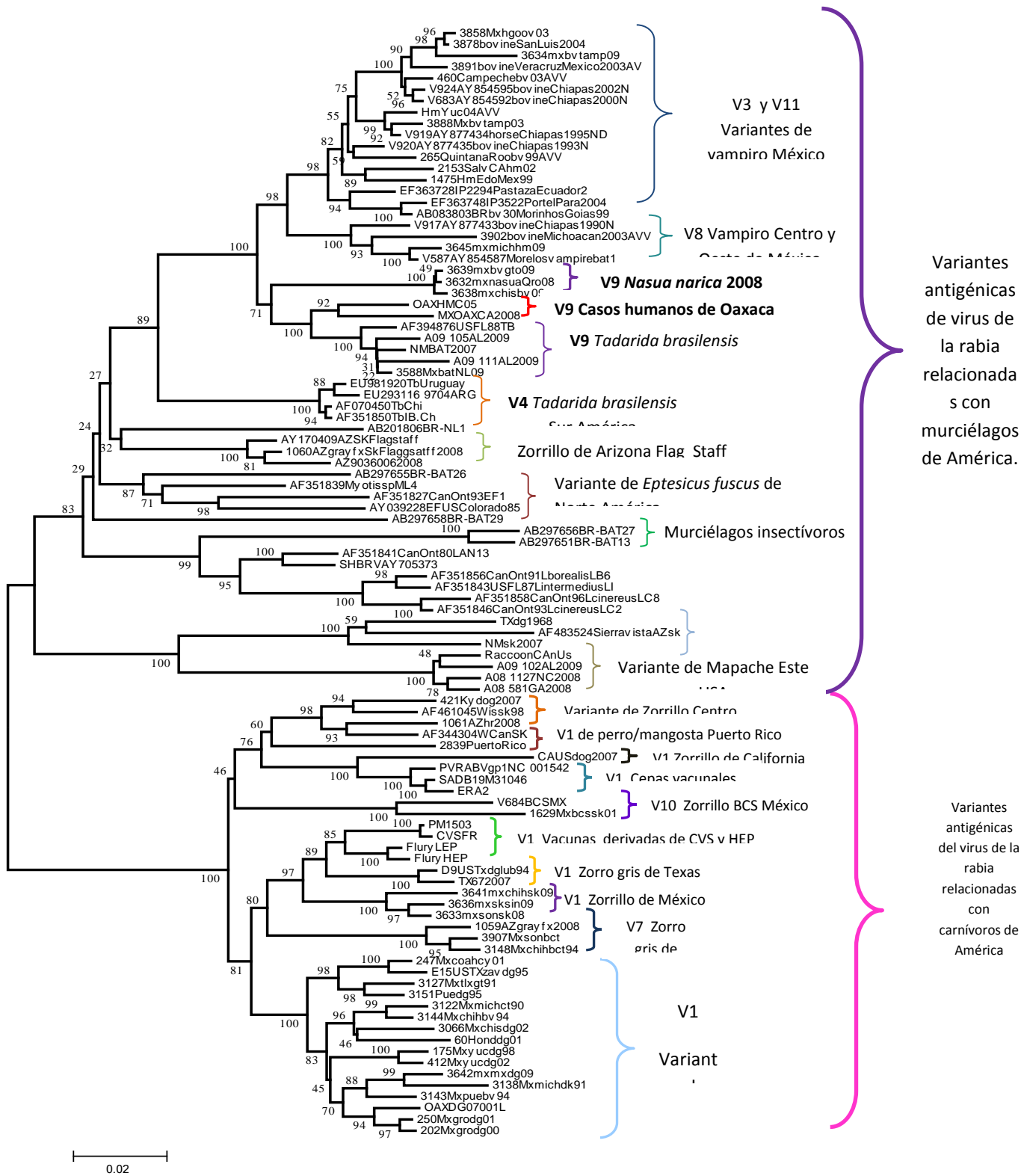


Figura 12. Reconstrucción filogenética realizada por el método de Neighbor joining. Se empleó el gen completo de la nucleoproteína del virus de la rabia. Se incluyeron todas las variantes antigénicas descritas para América (Aréchiga-Ceballos et al., 2010).



## JUSTIFICACIÓN

Actualmente la rabia urbana es controlada mediante campañas masivas de vacunación, sin embargo, otros reservorios silvestres permanecen como fuente de transmisión del virus a humanos (Belotto *et al.*, 2005). Estos reservorios parecen mantener variantes de RABV dentro de las poblaciones, que pueden producir eventos de *spill-over* en animales domésticos y en ocasiones a los seres humanos.

La rabia transmitida por murciélagos hematófagos y no hematófagos ha tomado mayor importancia y actualmente en países latinoamericanos, los murciélagos se están volviendo los principales transmisores de rabia a humanos y animales domésticos; sin embargo las investigaciones sobre rabia en quirópteros han estado enfocadas a hematófagos por su importancia en salud pública y animal pero, no se conoce como se mantiene el virus de la rabia en otras especies de quirópteros no hematófagos (Ruíz y Chávez, 2010; Schneider *et al.*, 2005).

La distribución actual de los murciélagos hematófagos está aumentando como consecuencia de alteraciones y condiciones climáticas. Se ha sugerido que un aumento de la temperatura durante las próximas décadas podría resultar en una expansión sustancial de su actual hábitat (Shahroukh y Valdez-Moreno, 2009).

Los murciélagos *Artibeus spp.*, son abundantes en las regiones tropicales y subtropicales de México, son simpátricos al murciélago vampiro *Desmodus rotundus*, se ha observado que ambos cohabitan los mismos refugios; además de presentar una distribución geográfica antropogénica, debido a la deforestación. Estudios publicados han demostrado que las variantes de rabia circulantes en *Artibeus spp.*, están relacionadas con las variantes de murciélagos vampiros, lo que implica que existe una interacción y estrecha relación entre estas especies (Kobayashi 2007 y Shoji *et al.*, 2004). Sin embargo, el rol que juegan estas especies en el mantenimiento y propagación del virus de la rabia; así como la frecuencia del virus en murciélagos frugívoros es desconocida aún (Greenhall, 1990).

Como se mencionó anteriormente se ha logrado aislar el virus de la rabia en animales infectados naturalmente de otros órganos diferentes del SN como: pulmón, estómago, corazón, riñones, vejiga, órganos reproductivos entre otros, (Correa-Scheffer *et al.*, 2007; Allendorf, *et al.*, 2012). Los estudios experimentales sobre el virus de la rabia en murciélagos no hematófagos en América no existen.

Se ha observado una distribución atípica del virus en los diferentes órganos de *Artibeus* infectados de forma que no se conoce la patogenia del virus en esta especie (Correa-Scheffer *et al.*; Freuling *et al.*, 2009 y Allendorf *et al.*, 2012)

Los antecedentes demuestran que la distribución de los *Lyssavirus* y su patogenia podría ser diferente en quirópteros con relación a mamíferos terrestres.

El presente trabajo pretende estudiar la distribución del virus rábico en *Artibeus spp.* infectados experimentalmente con la variante 3 de murciélago vampiro, esto nos proporcionará datos de la patogenia de la infección de animales al virus de la rabia lo que reportará elementos que permitan una mejor comprensión del ciclo de infección, patogenia, mantenimiento y posibles vías de transmisión del virus de la rabia en estos animales y su epidemiología en general.

## OBJETIVO

- o Detectar la presencia de virus rábico en diferentes órganos de murciélagos frugívoros del género *Artibeus* (cerebro, médula espinal, glándulas salivales, pulmón, riñón, corazón, bazo, hígado y sistema digestivo) infectados experimentalmente con la variante 3 del RABV procedente de murciélago hematófago.

## HIPÓTESIS

Estudios previos han demostrado que algunas especies de murciélagos, son resistentes a la inoculación con *Lyssavirus* y que la patogenia podría diferir de la reportada en carnívoros terrestres, incluyendo la replicación del virus en tejidos diferentes al del sistema nervioso.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología (UIM-I), Hospital de Pediatría, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN SXXI).

Todo el personal que participó en este proyecto estaba vacunado contra el virus de la rabia de manera preventiva y monitoreado, en el propio laboratorio, cada 4-6 meses para asegurar que los títulos de anticuerpos contra la rabia, en ningún caso sean menores de 0.5 Unidades Internacionales.

### 1. Virus de la rabia

Los virus utilizados para las inoculaciones y como controles positivos en la técnica de PCR corresponden al virus de la rabia son: 5020 y CASS-88.

La 5020 es de origen humano, procede de Guerrero, del año 2006 y corresponde a la variante 3 de *D. rotundus*. Esta cepa fue amablemente donada por la Dra. Alejandra Mééndez del Laboratorio de Rabia del Instituto Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) para su uso en los experimentos realizados en este trabajo (**Apéndice 7**). Se obtuvo un abasto de este virus a partir de ratón lactante.

La variante 3 utilizada en este trabajo es una variante de vampiro circulante en nuestro país.

En el Estado de Morelos no han sido reportadas variantes de murciélagos hematófagos, por lo tanto, se decidió utilizar la variante de rabia más cercana geográficamente, la 5020 aislada en el estado de Guerrero.

La CAS88 se aisló en 1988 de murciélago vampiro rabioso (INIFAP, Ciudad de México), pertenece a la colección de cepas de rabia del laboratorio de Inmunovirología de UIM-I. Ha sido empleada en los estudios que anteceden al

presente: Aguilar-Setién et al., 1998 y Aguilar- Setién et al., 2005. La mortalidad en los trabajos realizados con CASS 88 fue de 79% en murciélagos hematófagos antes de los 21 días pos inoculación.

## 2. Líneas celulares

La línea celular empleada en los ensayos realizados fue BHK 21 (células de riñón de hámster lactante) donada por Dra. Rosa María del Angel del CINVESTAV. Se cultivaron en medio *Minimal Essential Medium* (Gibco), adicionado de 10 % de suero fetal bovino. Para cultivarlas se utilizaron botellas estériles de plástico de 25 y 75 cm<sup>2</sup> y placas de 96 pozos. Las células se crecieron a una temperatura de 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub>.

## 3. Titulación de la 5020 en cultivo celular

En una placa de 96 pozos se distribuyeron 100 µl de medio Glasgow sin suero fetal bovino. Se hicieron diluciones seriadas 1:2 colocando 100 µl de cada dilución del virus rábico (3 repeticiones por cada dilución). Como testigo se empleó una suspensión de un virus adaptado a cultivos celulares PV (*Pasteur Virus*) con un título conocido y previamente determinado. Se dejó una columna sin inóculo de virus como control de la viabilidad del cultivo celular. A partir de un cultivo confluyente de la línea celular BHK 21, se preparó una suspensión con 40,000 células/50 ul, cantidad que fue depositada en cada pozo. La placa se incubó 48 horas a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5%. El sobrenadante se decantó y la placa se fijó con acetona-alcohol (80:20) por media hora a -20°C. Se retiró el fijador y se secó al aire. Una vez seca se añadieron 60 µl de conjugado fluorescente anti-nucleocápside de rabia a cada pozo y se incubó por 45 min a 37°C en cámara de humedad en agitación. La placa se lavó con agua, se añadieron 100 µl de líquido de montaje (glicerina-PBS al 50% pH 8.2-8.4) y se observó al microscopio invertido con lámpara de fluorescencia. Se contaron los focos fluorescentes en cada uno de los pozos (Bourhy y Sureau, 1990).

El resultado se expresó en unidades de focos fluorescentes (UFF) por ml (Hoskins 1967).

#### 4. Titulación de la CASS 88 en ratones de 21 días

Se realizaron diluciones logarítmicas base diez del virus CASS 88 ( $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ ). Se formaron grupos de 7 ratones BALB/C de 21 días c/u. Cada uno de los grupos de ratones fueron inoculados por vía intracraneal (IC), con 0.03 ml de cada una de las diluciones del virus.

Los ratones se observaron diariamente durante 28 días post-inoculación y se registraron las muertes y los signos de rabia previamente descritos. El título del virus se obtuvo siguiendo la fórmula de Spearman-Kärber (NORMA Oficial Mexicana NOM-067-ZOO-2007).

#### 5. Recolección de los quirópteros

Las capturas de los murciélagos se realizaron en Cocoyoc en el Estado de Morelos, México, en los meses de Septiembre 2011, Enero 2012 y Septiembre 2012 (**Apéndice 8**). El número de permiso bajo el que se realizó la captura es FAUT – 0124. En cada área de trabajo se colocaron de dos a cinco redes de niebla durante 4 horas. Las redes se colocaron entre los árboles de un jardín donde se ha detectado la presencia de esta especie (**Figura 13**). Los especímenes capturados se trasladaron a un área especialmente acondicionada para mantener a estos animales dentro de las facilidades del bioterio del Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Se confinaron en jaulas de  $1\text{m}^3$ , con las condiciones de humedad relativa de 80% y temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ . Una vez instalados en el bioterio, se siguió un periodo de cuarentena y adaptación de un mes durante el cual los animales fueron alimentados y observados diariamente para constatar que se encontraban en buen estado de salud.

Todos los especímenes se mantuvieron en el área de confinamiento durante el periodo que requirieron los experimentos, siguiendo los métodos éticos

recomendados por el "Animal Care and Use Committee" (Olfert et al., 1998), aproximándose a su hábitat natural, dieta y peculiaridades de su comportamiento (Figura 14). El personal que manejó a los animales utilizó guantes de carnaza, guantes de látex, cubrebocas, y goggles para mayor protección personal.

La dieta proporcionada consistió en una mezcla de frutas como: mango, papaya, manzana, guayaba y naranja en cubos pequeños (*ad libitum*) y una cucharada de mezcla de cereales (trigo, avena, arroz y maíz), a la que se le adicionó y se complementó con vitaminas Vitafort A® (Figura 15).



**Figura 13.** Captura de murciélagos en Cocoyoc Morelos.



**Figura 14.** Murciélagos en condiciones de cuarentena.



**Figura 15.** Mezcla de frutas, vitaminas y agua *ad libitum* proporcionadas a los animales en cautiverio.



**Figura 16.** Manejo de los animales para monitorear el peso, esto se realizó cada 15 días.



### 5.1 Criterios de inclusión

Los animales se pesaron, midieron y marcaron para su identificación (**Figura 16**). Se les tomó una muestra de sangre y para la obtención de suero y detectar la presencia de anticuerpos contra rabia al inicio y al final del periodo de cuarentena.

Los criterios para seleccionar a los murciélagos para el experimento, fueron animales adultos, aparentemente sanos, pelo saludable, sin presencia de ectoparásitos, vuelo normal, alertas, hembras no gestantes, ni en lactancia y libres de anticuerpos contra rabia.

Se estudiaron 38 especímenes de *Artibeus spp.*, 23 hembras y 15 machos, los cuales se capturaron por medio de redes de niebla.

### 5.2 Detección de Anticuerpos Neutralizantes

Para realizar la toma de muestra se anestesiaron los animales con una dosis de Xilacina/Ketamina 1:1 (0.03 ml), con jeringas hipodérmicas de 1ml, vía subcutánea. La sangre se obtuvo de la vena marginal de la membrana antebraquial de los murciélagos, se realizó un corte con un bisturí y se dejó drenar la sangre, se recolectaron aproximadamente 500 µl y se colocaron en tubos con gel para separar el suero, se dejaron reposar 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron 15 minutos a 12000 rpm, se separó el suero. Los sueros se inactivaron a 56° C durante 1 hora y se almacenaron a -37°C. Este procedimiento se llevó a cabo al principio y final de la cuarentena y durante el experimento para realizar la prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes (RFFIT) (Smith *et al.* 1996) (**Figura 17**).



**Figura 17.** Toma de muestra sanguínea de la vena braquial



**Figura 18.** Inoculación del virus de la rabia con la cepa 5020 V3

## 6. Infección experimental

Se realizaron 3 inoculaciones experimentales utilizando con virus de la rabia: 5020 y CASS88, las dos variantes 3 de murciélago hematófago (*D. rotundus*) (**Figura 18**).

### 6.1 Experimento 1

Para el primer ensayo se utilizó la 5020 con un título de  $1 \times 10^{5.34}$  UFF. Previamente a la inoculación se anestesiaron los animales con el procedimiento descrito anteriormente.

Una vez comprobado que carecían de anticuerpos antirrábicos, se seleccionaron al azar los especímenes los cuales se dividieron en 5 grupos:

Grupo I. Inoculación subcutánea de 1ml con dosis  $1 \times 10^3$  UFF a 3 individuos.

Grupo II. Inoculación subcutánea de 1ml con dosis  $1 \times 10^{5.34}$  UFF a 3 individuos.

Grupo III. Inoculación intramuscular de 1ml con dosis  $1 \times 10^3$  UFF a 3 individuos.

Grupo IV. Inoculación intramuscular de 1ml con dosis  $1 \times 10^{5.34}$  UFF a 3 individuos.

Grupo V. Control Inoculado vía subcutánea con 1 ml de PBS a 2 individuos.

El experimento tuvo una duración de 51 días, los animales que sobrevivieron al desafío fueron sacrificados. Durante este período se obtuvieron muestras de sangre los días 0, 15, 30, 45 y 51. Los animales se observaron diariamente para detectar signos sospechosos de rabia como: depresión, incoordinación, temblor, bajo consumo de alimento, flacidez, etc., y se registró cualquier cambio de comportamiento.

## 6.2 Experimento 2

Se utilizó CASS-88, con un título de  $6.49 \times 10^5$  DL50/ml, se utilizaron 9 murciélagos los cuales se dividieron en un grupo experimental con 8 individuos que fueron inoculados vía subcutánea con 1 ml con  $6.49 \times 10^4$  DL50/ml y un control al cual se le administró 1 ml de PBS por vía subcutánea.

Se obtuvieron muestras de sangre los días 0, 7, 14 y 21 post-inoculación. Los animales se observaron diariamente para detectar animales sospechosos de tener infección por el virus de la rabia durante 22 días.

## 6.3 Experimento 3

La dosis de inoculación que se utilizó en este ensayo fue de  $1 \times 10^{4.34}$  UFF de la 5020. Previamente a la inoculación se anestesiaron los animales con el procedimiento descrito anteriormente. Se seleccionaron al azar (con base en los criterios de inclusión) los especímenes los cuales se dividieron en 4 grupos:

Grupo I. Inoculación intracerebral de 1 ml con dosis  $1 \times 10^{4.34}$  UFF a 6 individuos.

Grupo II. Inoculación intramuscular (músculo macetero) de 1 ml con dosis  $1 \times 10^{4.34}$  UFF a 3 individuos.

Grupo III. Inoculación subcutánea de 1 ml con dosis  $1 \times 10^{4.34}$  UFF a 3 individuos.

Grupo IV. Inoculación vía subcutánea con 1 ml de PBS con dosis  $1 \times 10^{4.34}$  UFF a 3 individuos (controles).

Para el grupo inoculación vía intracerebral, la inoculación se llevó a cabo en la fase de anestesia profunda, se utilizó una jeringa de 3 ml con aguja hipodérmica calibre de 0.80 mm.

El experimento tuvo una duración de 61 días, animales que sobrevivieron al reto fueron sacrificados. Durante este período se obtuvieron muestras de sangre los días 0, 20 y 61 post-inoculación. Los animales se observaron diariamente para detectar animales sospechosos de tener infección por el virus de la rabia durante 61 días.

### 7. Muestras biológicas

Se obtuvieron muestras de saliva de cada uno de los individuos con hisopos estériles cada tercer día, las muestras se colocaron en tubos eppendorf con 600 µl de buffer de lisis (**Apéndice 9**) y se congelaron a -70°C, hasta su procesamiento.

Los ejemplares de los diferentes grupos que sobrevivieron al desafío con rabia se sacrificaron humanitariamente, se anestesiaron con 0.03 ml de Ketamina/Xilacina (1:1), para posteriormente sangrarlos en blanco vía intracardiaca con una jeringa de 3 ml. Inmediatamente después del sacrificio, se les realizó la necropsia y se colectaron muestras de: lengua, glándulas salivales, hígado, páncreas, corazón, bazo, pulmones, estómago, intestino, riñón (glándulas suprarrenales), vejiga y cerebro. Las muestras se dividieron en tres partes iguales de las cuales una se fijó en formalina amortiguada al 10% para las pruebas histológicas, la segunda se conservó a -70 °C para la detección del virus por técnicas moleculares y la tercera para aislamiento viral e inmunofluorescencia.

## 8. Diagnóstico de laboratorio: identificación y serología

El diagnóstico de laboratorio se llevó a cabo a través de la identificación del virus (IFD), detección de ácidos nucleicos (RT-PCR) y detección de anticuerpos contra rabia (RFFIT).

### 8.1 Prueba de inmunofluorescencia directa para la detección del virus rábico en Sistema nervioso

Para detectar el virus de la rabia en los cerebros de los murciélagos y de los ratones inoculados se utilizó una modificación de la técnica recomendada por la OMS. Brevemente; se hicieron improntas de fragmentos de encéfalo en portaobjetos previamente desengrasados con alcohol ácido (99% alcohol, 1% ácido clorhídrico). Se eliminó el exceso de tejido con un pedazo de papel filtro Whatman™, presionando la impronta, posteriormente se dejó secar al aire. Las improntas se fijaron durante 30 minutos con acetona-alcohol al 80 %, en vaso de Coplin, a -20°C. Pasado el tiempo de fijación, las preparaciones se dejaron secar al aire. Se les agregó 50 µl del anticuerpo anti-nucleoproteína del virus de la rabia conjugado a fluoresceína (Fujirebio®), de manera que cubriera toda el área delimitada. Se colocaron en una cámara húmeda y se incubaron 30 minutos a 37°C. Las laminillas se enjuagaron 2 veces con agua destilada, agitando manualmente por 20 segundos en cada lavado. Como colorante de contraste se empleó Azul de Evans al 0.2% y se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. Las preparaciones se lavaron con agua destilada dos veces, se agregó una gota de líquido de montaje (glicerina-PBS al 50% pH 8.2-8.4) sobre cada una y se colocó el cubreobjetos para ser observadas en un microscopio de epifluorescencia (Bourhy, H. y P. Sureau. 1990).

### 8.2 Prueba rápida de reducción de focos fluorescentes (RFFIT)

Se utilizó la técnica descrita por Smith *et al.* 1996. Brevemente: En una placa de 96 pozos se distribuyeron 100 µl de medio MEM sin suero fetal bovino. Después se realizaron diluciones seriadas 1:3 de cada uno de los sueros que se trabajaron. Posteriormente se agregó a cada dilución de suero, 50 ul de una suspensión de

virus de rabia PV (*Pasteur Virus*) con 20-50 Unidades Formadoras de Focos Fluorescentes. Se dejó una columna sin inóculo de virus como control de la viabilidad del cultivo celular. La placa se dejó incubar 1 hora a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> (neutralización). Después del periodo de incubación se agregó a cada pozo una 50 ul de una suspensión de células BHK 21 (40,000 células por pozo). La placa se incubó durante 48 horas a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, se decantó el sobrenadante y la placa se fijó con acetona-alcohol (80:20) por media hora a -20°C. Se retiró la acetona y la placa se dejó secar al aire. Una vez seca se añadieron 60 µl de conjugado anti-nucleocápside del virus de la rabia (Fujirebio) a cada pozo y se incubó por 45 min a 37°C en cámara de humedad en agitación. La placa se lavó con agua, se añadieron 80 µl de líquido de montaje (glicerina-PBS al 50% pH 8.2-8.4) y se observó al microscopio invertido con fluorescencia. Se contaron los focos fluorescentes en cada uno de los pozos. Los resultados se expresaron en Unidades Internacionales UI tomando como base la reducción de focos fluorescentes producida por un suero de referencia con título conocido (10 UI).

## 9. Detección molecular del virus rábico

Para la detección del virus de la rabia en los murciélagos infectados experimentalmente se llevaron a cabo pruebas como: RT-PCR y PCR anidada.

### 9.1 Extracción de RNA

Para la extracción del RNA se utilizó Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente: se pesaron 50-100 mg de tejido y se les agregó 1 ml de Trizol, se homogeneizó (con homogeneizador modelo PRO 200) y se dejó reposar en hielo por 5 minutos. Transcurrido este tiempo se agregó 0.5 ml de cloroformo frío y se agitó con agitador vórtex por 15 segundos. Se dejó reposar en hielo por 5 minutos.

Posteriormente se centrifugó (Eppendorf® 5415R) a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se separó la fase acuosa, se agregaron 0.5 ml de cloroformo frío y se mezcló. Se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos, a 4°C, la fase acuosa se pasó a un tubo Eppendorf nuevo y se agregaron 0.5 ml de isopropanol frío. Se incubaron durante 15 minutos a -20°C y posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se retiró el isopropanol completamente con jeringa o micropipeta y se agregaron de 0.5 – 1.0 ml de etanol frío al 75 - 80% en agua DEPC (dietil pirocarbonato), se mezclaron suavemente por inversión (o con vórtex) y se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. Se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos, a 4°C. El etanol se retiró con una jeringa y se dejó evaporar por completo a temperatura ambiente (2 a 3 minutos). El RNA se resuspendió en el volumen adecuado de agua MilliQ estéril previamente calentada a 45°C. Los tubos se incubaron a 45°C por 3 minutos, posteriormente el RNA se homogeneizó levemente con una micropipeta.

La concentración de RNA se cuantificó por espectofotometría y visualmente por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 %

## 9.2 Retrotranscripción

La retrotranscripción se llevó a cabo empleando 2 µg de RNA total y el oligonucleótido correspondiente usando la enzima Superscript™ (Invitrogen®) en un volumen final de 20µl.

Iniciador (10 pM)	0.5 µl
RNA total: 2.0 µg	2.0 µl
dNTP's mix (10 pM)	1.0 µl
Agua DEPC: ajustar a	12 µl

Calentarlos 5 minutos a 65 °C.

Se dejó en hielo 5 minutos. Para la segunda mezcla de reacción se agregaron:

Buffer First strand 5X	4.0 µl
DTT (0.1 M)	2.0 µl

RNasa out 1.0 µl

Se mezcló cuidadosamente y se calentó a 42 °C por 2 min.

SuperScript (200 U). 1.0 µl

Se homogeneizó cuidadosamente y se incubó a 42 °C por 50 min.

### 9.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cDNA

En cada mezcla de reacción de PCR (**Tabla 2**) se utilizaron de 2 µl del cDNA para obtener un volumen final de 20 µl. Se utilizaron los iniciadores diseñados específicamente para amplificar el gen de la nucleoproteína.

**Tabla 2.** Mezcla de reacción para PCR

Reactivos	Volumen
Buffer 10X	2.0 µl
MgCl <sub>2</sub> (30 mM)	1.6 µl
dNTP´s Mix (10mM)	0.4 µl
Iniciador sentido JW6 (10 pM)	1.0 µl
Iniciador antisentido JW12 (10 pM)	1.0 µl
cDNA	2.0 µl
Taq polimerasa (5U/µl)	0.1 µl
Agua DEPC ajustar a	20.0 µl



Los oligonucleótidos específicos para amplificar el gen que codifica para la nucleoproteína se presentan en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Secuencias de los oligonucleótidos empleados para amplificar el gen que codifica para la nucleoproteína (Heaton *et al.*, 1997).

Oligo	Sentido	Secuencia	Región
Jw12	Forward	5' ATGTAACACCCYCTACAATG 3'	55- 73
Jw6	Reverse	5' CARTTVGCRCACATYTTRTG 3'	660-641

#### 9.4 Reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidada)

En cada mezcla de reacción de PCR anidada se utilizaron de 2 µl del producto obtenido en la PCR, para obtener un volumen final de 20 µl. Se utilizaron los iniciadores diseñados específicamente para amplificar el gen de la nucleoproteína: Jw12 y un mix de Jw10.1, Jw10.2 y Jw10.3 (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Secuencias de los oligonucleótidos empleados para amplificar el gen que codifica para la nucleoproteína en PCR anidada (582 pb)

Oligo	Sentido	Secuencia
Jw12	Forward	5' ATG TAA CAC CYC TACAATG 3'
Jw10.1	Reverse	5' GTCATCAAAGTGTGRTGCTC 3'
Jw10.2		5' GTCATCAATGTGTGRTGTC 3'
Jw10.3		5'ATTAGAGTATGGTGTC 3'

## RESULTADOS

### 1. Resultados de obtención de abasto de virus en ratón lactante

La mortalidad en los ratones inoculados con 5020 se presentó entre los días 11 y 13 post-inoculación (**Tabla 5**). Se obtuvo un stock de virus de la cepa 5020 con el macerado de los cerebros de ratón de tres camadas (I, II y III) se colocaron en tubos Eppendorf, se diluyeron al 20% con 15 ml de medio Glasgow sin suero. Se centrifugaron 20 minutos a 2000 rpm 4°C. El sobrenadante se colocó en microtubos 1ml, en total se obtuvieron 14 tubos.

**Tabla 5. Inoculación de ratones lactantes con la cepa 5020 del virus de la rabia.**

Camada	Día 0	Día 1	Día 11	Día 12	Día 13
I	1 (por la inoculación)	1 ( Canibalismo)	1+	1+	1+, 4*+
II	1 (por inoculación)				2*+
III				1+	1+

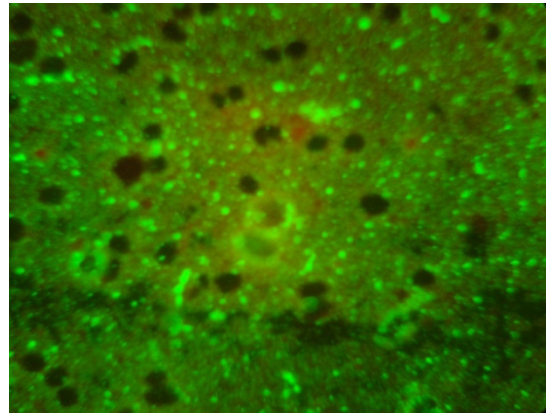
(\*) Sacrificados y positivos a rabia por Inmunofluorescencia.

(+) Muertos y positivos a rabia por Inmunofluorescencia.

Los encéfalos de los ratones lactantes inoculados fueron en todos los casos positivos a la prueba de inmunofluorescencia directa. (**Figura 19 y 20**).



**Figura 19.** Necropsias realizadas a los ratones lactantes y preparación de improntas.



**Figura 20.** Inmunofluorescencia directa en impronta de ratón lactante, positivo al virus de la rabia objetivo 10x. En verde manzana se observan los focos fluorescentes que corresponden a acumulaciones de nucleoproteína del virus de la rabia. En rojo se observa el tejido de sistema nervioso.

## 2. Titulación de la 5020 en cultivo celular.

A continuación se muestran los resultados de la titulación de la 5020 en cultivo celular.

Volumen inoculado = 0.1 ml C\* incontables

0.1 ml de una dilución  $10^{-1.19}$  de virus contiene  $(31+34+35)= 100$  FFU

Virus diluido	No. de Focos Fluorescentes		
	C*	C*	C*
10 <sup>-0.39</sup>	C*	C*	C*
10 <sup>-0.79</sup>	C*	C*	C*
10 <sup>-1.19</sup>	31	34	35
10 <sup>-1.59</sup>	27	18	17
10 <sup>-1.98</sup>	18	9	8
10 <sup>-2.38</sup>	7	2	5
10 <sup>-2.78</sup>	5	1	1
10 <sup>-3.18</sup>	4	0	0

0.01 ml de una dilución 10<sup>-1.19</sup> de virus contiene (27+18+17)= 62 FFU

0.001 ml de una dilución 10<sup>-1.19</sup> de virus contiene (18+9+8) = 35 FFU

0.0001 ml de una dilución 10<sup>-1.19</sup> de virus contiene (7+2+5) = 14 FFU

0.00001 ml de una dilución 10<sup>-1.19</sup> de virus contiene (5+1+1) = 7 FFU

0.11111 ml de dilución de virus contiene (100+62+35+14+7)= 160 FFU

Por lo tanto 0.11111 ml de virus contiene (1/0.11111 x 160 x 10<sup>-1.19</sup>) FFU

Por lo tanto el título de suspensión original de virus = 223031.82

Log 223031.81= 5.34

1x 10<sup>5.34</sup>

### 3. Titulación de la CASS 88 en ratón

Los ratones que fallecieron dentro de los primeros 4 días post-inoculación con CASS-88 se descartaron, se calcularon los resultados con los que murieron a partir del quinto día por el método de Spearman-Kärber, expresados como las dosis letal 50 por ciento para el ratón (DLR-50%), (NORMA Oficial Mexicana NOM-067-ZOO-2007). A los ratones que murieron o presentaron signos atribuibles a rabia, se les realizó pruebas de inmunofluorescencia a partir del cerebro, por lo menos un animal por dilución (Tabla 6).

**Tabla 6. Titulación de ratones (Mitchell Hoskins M. A, 1967)**

Brevemente se presenta los cálculos para la titulación de la CASS 88:

$$\text{Distancia proporcional} = \frac{71-50}{71-0} = 0.29 \quad 4 + 0.29$$

50 % de infectividad es  $10^{-4.29}$

Por lo tanto el título de la suspensión original  $10^{-4.29}$

0.03 ml de  $10^{-4.29}$  de una dilución de virus contiene 1 ID<sub>50</sub>

Por lo tanto 0.03 ml de virus sin diluir contiene  $10^{4.29}$  ID<sub>50</sub>

Por lo tanto 1ml de virus sin diluir contiene  $\left(\frac{1}{0.03} \times 10^{4.29}\right) \text{ID}_{50}$

	B		C		D		E	
Dilución virus	Número de infectados	Número de inoculados	Número de infectados	No. infectados	Suma Número infectados	Vivos	% Mortalidad	
$10^{-2}$	7	7	7	0	19	0	19/19	100%
$10^{-3}$	7	7	7	0	12	0	12/12	100%
$10^{-4}$	5	7	5	2	5	2	5/7	71%
$10^{-5}$	0	7	0	7	0	9	0/9	0%
$10^{-6}$	0	7	0	7	0	16	0/9	0%

$$= (33.3 \times 10^{4.29})$$

$$= (33.3 \times 10^4 \times \text{antilog de } 0.29)$$

$$= (33.3 \times 10^4 \times 1.94)$$

$$= 649298.25$$

Por lo tanto el título de la suspensión del virus original =  $6.49 \times 10^5$  DL 50/ ml

#### 4. Resultados de la infección con la 5020 Experimento 1.

Se obtuvieron sueros de los murciélagos al inicio y al final de la cuarentena y se realizó el título de anticuerpos neutralizantes con una prueba rápida de anticuerpos fluorescentes (RFFIT), se expresó en Unidades Internacionales por ml de suero, en las dos ocasiones las pruebas fueron negativas en los 14 individuos. En quirópteros no está estandarizado el título de anticuerpos que protegen de

una infección con rabia, por lo que se utiliza como referencia de que en humanos un título de 0.5 UI se considera suficiente para una protección contra rabia (OMS, 1992).

A partir del día 15 post-inoculación los grupos experimentales tuvieron una pérdida de peso que continuó hasta el final del experimento entre 2g y 12g. (Tabla 7 y Apéndice 10).

**Tabla 7. Monitoreo de los pesos de los murciélagos expresados en gramos**

Murciélago	01/11/11	13/12/11	27/12/11	11/01/12	19/01/12
15	48	44	58	46	44
17	72	62	66	64	66
23	54	50	56	52	54
3	56	46	44	***	***
20	54	48	56	48	50
22	54	46	50	48	50
19	38	34	34	***	***
21	54	46	48	48	48
24	58	50	54	54	56
1	36	30	30	***	***
9	60	50	50	52	54
25	50	46	48	48	50
C1	64	50	54	54	54
C2	46	40	40	44	42

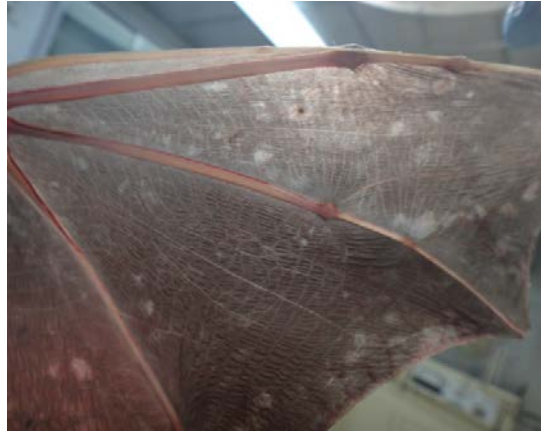
#### 4.1 Grupo I. Vía de inoculación subcutánea con dosis $1 \times 10^{-3}$

No se observaron cambios de comportamiento. A partir del día 40 se detectó la presencia de ectoparásitos en todos los individuos de este grupo, en general mostraban alas en buen estado excepto el murciélago 23 con algunas manchas blancas en las alas.

#### 4.2 Grupo II. Vía de inoculación subcutánea con dosis $1 \times 10^{-5.34}$

Después de la inoculación los murciélagos se mostraron alertas. A los murciélagos 3 y 20 al día 30 post- inoculación se les observó la presencia de ectoparásitos y huevecillos en las alas, posteriormente se identificaron con el género *Periglyphichurs iheringi*. El murciélago 3 estaba decaído, con manchas blancas circulares y vasos

sanguíneos del ala congestionados. Éste individuo murió el día 33 post-inoculación (**Figuras 21**).



**Figura 21.** Lesiones en ala del murciélago 20 día 51.

#### 4.3 Grupo III. Vía de inoculación intramuscular con dosis $1 \times 10^{-3}$

Todos los individuos de este grupo tenían gran cantidad de ectoparásitos y huevecillos en las alas, esto se observó al día 30. El murciélago 19 se observó decaído, con manchas blancas y orificios en las alas, la piel se le observó reseca. Éste individuo murió el día 33 post-inoculación (**Figuras 22 y 23**).



**Figura 22.** Ectoparásitos hematófagos (*Periglyphus iheringi*) en la región del plagiopatagio del murciélago 19 marcados con rojo.



**Figura 23.** Acercamiento de *Periglyphus iheringi* en la región del plagiopatagio del murciélago 19

#### 4.4 Grupo IV. Vía de inoculación intramuscular con $1 \times 10^{-5.34}$

A partir del día 5 post-inoculación el murciélago No. 1 del grupo IV se mostró nervioso y emaciado; los siguientes días presentó un comportamiento inusual, algunos días alerta y otros días sin resistencia al manejo. El día 20 dejó de volar y perchar, se observaron en sus alas manchas circulares blancas, adelgazamiento de la piel en las alas y lesiones circulares. En las alas, orejas y hoja nasal se encontraron huevecillos de ectoparásitos. Distribuidos en varias regiones de las alas se observaron otros ectoparásitos, se recolectaron para después llevar a cabo la identificación de los mismos. El individuo murió el día 28 post-inoculación (Figura 24).



Figura 24. Estado físico del M1.

Al día 51 post-inoculación todos los murciélagos de los diferentes grupos, incluso del grupo control se encontraron infestados de *Periglyphis iheringi* en las alas, nariz, orejas y uropatagio. Las alas se observaban con manchas de aproximadamente 1 cm de diámetro y muy resacas



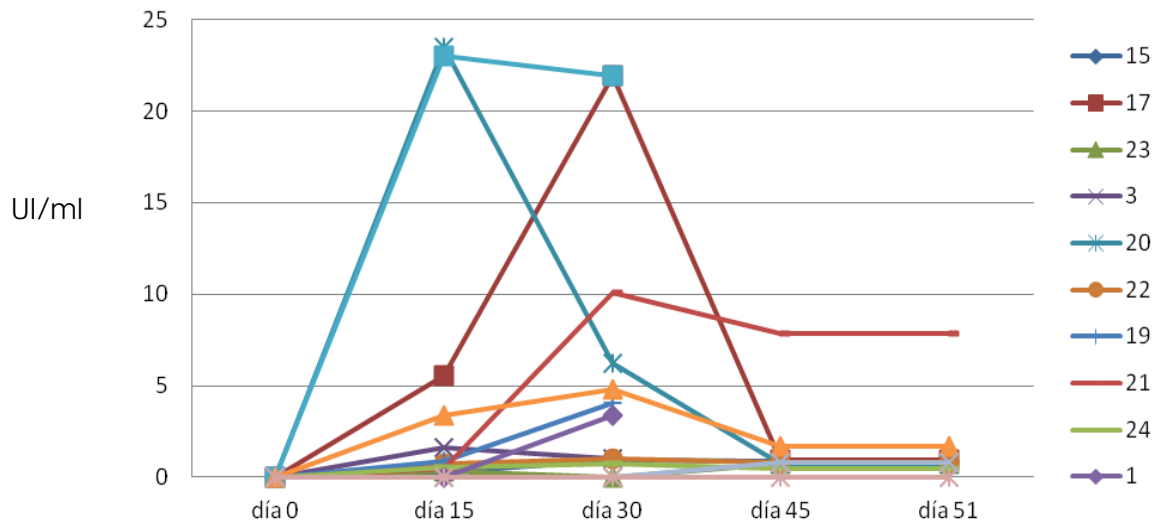
#### 4.5 Título de anticuerpos neutralizantes

Cada 15 días se realizó la toma de muestras sanguíneas, para monitorear el título de anticuerpos de los animales inoculados con rabia mediante la técnica RFFIT. Todos seroconvirtieron con títulos entre 0.28 UI a 23.5 UI, a partir del día 15 post-inoculación; excepto el murciélago 1 del grupo IV dosis alta vía intramuscular en el cual no se detectó la presencia de anticuerpos contra rabia, los controles también fueron negativos (Figura 25, tabla 8 y apéndice 11).

Tabla 8. Monitoreo de título de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia.

Murciélago	Grupo	ANV 07/11/11	ANV 13/12/11	ANV 27/12/11	ANV 19/01/12
15	1x10 <sup>3</sup> UFF SC	Negativo	0.28 UI	0.925 UI	0.91 UI
17		Negativo	5.58 UI	21.89 UI	0.96 UI
23		Negativo	0.32 UI	Negativo	0.75 UI
3	1x10 <sup>5.34</sup> UFF SC	Negativo	1.65 UI	0.98 UI	-----
20		Negativo	23.5 UI	6.23 UI	0.75 UI
22		Negativo	0.749 UI	1.028 UI	0.78 UI
19	1x10 <sup>3</sup> UFF IM	Negativo	0.85 UI	4.08 UI	-----
21		Negativo	0.45 UI	10.05 UI	7.84 UI
24		Negativo	0.52 UI	0.76 UI	0.48 UI
1	1x10 <sup>5.34</sup> UFF IM	Negativo	Negativo	3.4 UI	-----
9		Negativo	23 UI	21.89 UI	-----
25		Negativo	3.4 UI	4.81 UI	1.71 UI
C1	Control	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
C2		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

\_\_Sin suero



**Figura 25.** Títulos de anticuerpos detectados en murciélagos inoculados por vía subcutánea e intramuscular, con diferentes dosis del aislado 5020 (Variante 3)

#### 4.6 Resultados de pruebas moleculares RT-PCR y PCR anidada

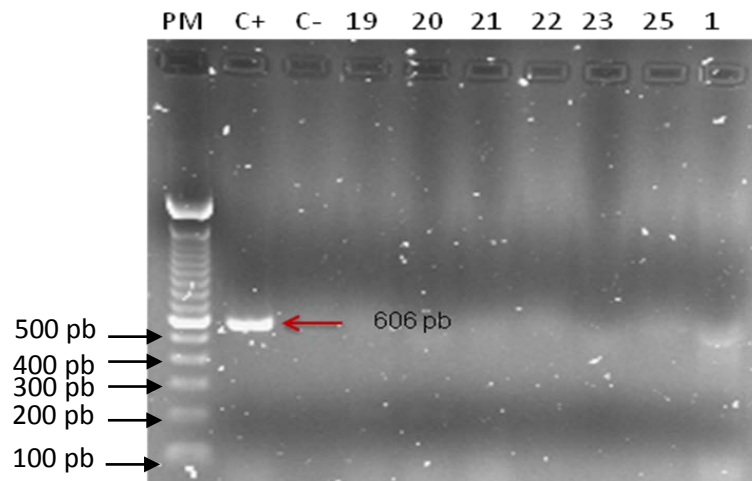
Los individuos que sobrevivieron a la inoculación experimental se sacrificaron humanitariamente el día 51 post-inoculación, se les realizó la necropsia y se colectaron los órganos de los diferentes sistemas a procesar, no se encontraron cambios patológicos aparentes en ninguno de los sistemas.

Los encéfalos de los murciélagos inoculados con virus de rabia y los controles fueron en todos los casos negativos a la prueba de inmunofluorescencia directa, para la cual se empleó un anticuerpo monoclonal anti nucleocápside del virus de la rabia, esta es la prueba de rutina más empleada en el diagnóstico de rabia.

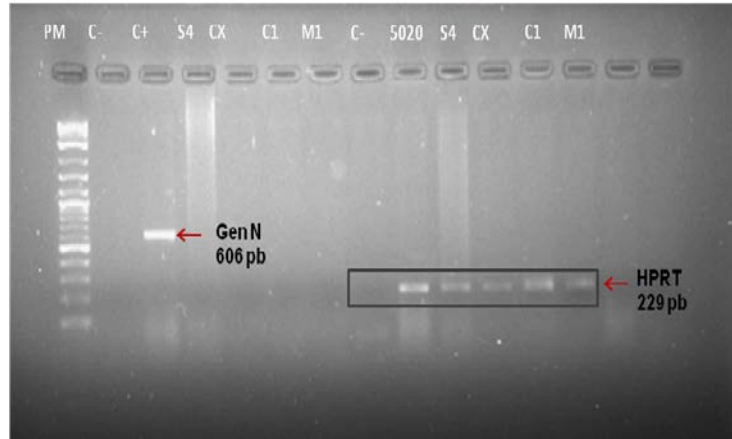
Para observar la integridad del RNA extraído de los cerebros de los ratones utilizados como control positivo, negativo y de las muestras de murciélagos, se hicieron geles de agarosa al 1.5%.

Las muestras de saliva y órganos de los murciélagos en todos los grupos tuvieron un resultado negativo para la PCR de punto final (**Figuras 26 y 27**) y PCR anidada (**Figuras 28 y 29**).

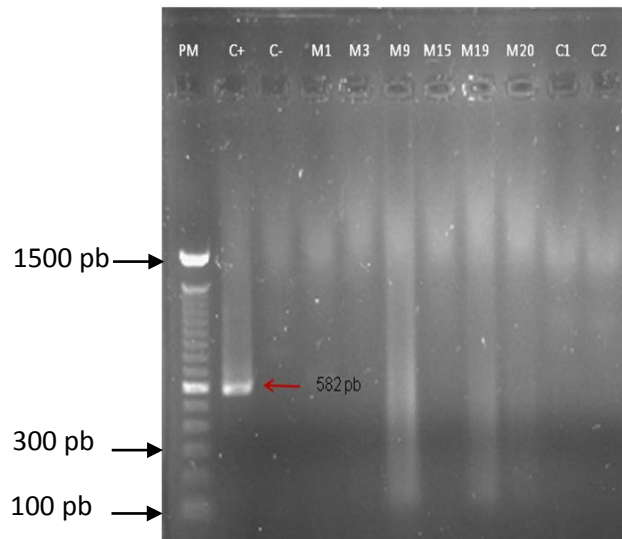
Como control de la PCR se amplificó un fragmento del gen constitutivo HPRT (Hipoxantina fosforribosil transferasa), de 229 pb, el cual se muestra junto a los geles de los productos de PCR para la amplificación de un fragmento N del virus de la rabia de las muestras estudiadas, se visualizaron en geles de agarosa al 1.5 %, junto con los controles positivo y negativo (**Figura 29**).



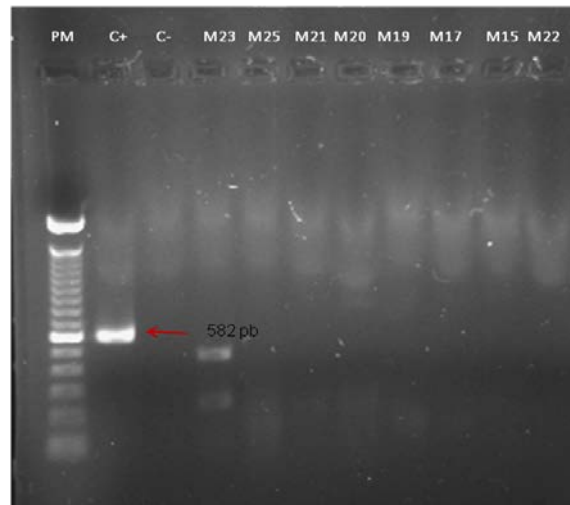
**Figura 26.** PCR para la detección del gen N del virus de la rabia a partir de los estómagos de los murciélagos del Experimento 1 inoculados con 5020 variante 3 del virus de la rabia, utilizando un fragmento del gen N. Carriles: 1 Peso molecular de 100 pb, 2 Control positivo rabia (C+), 3 control negativo para rabia (C), 4 Murciélago 19 (19), 5 Murciélago 20 (20), 6 Murciélago 23( 23), 7 Murciélago 25( 25) y 8 Murciélago 1 (1).



**Figura 27.** PCR para la detección del virus de la rabia, a partir de hisopados de saliva del primer experimento de murciélagos inoculados con 5020 variante del virus de la rabia, utilizando un fragmento del Gen N y un Gen HPRT. Carriles: 1 Peso Molecular de 100 pb (PM) , 2 control negativo para rabia (C-), 3 control positivo rabia (C+), 4 muestra de humano HPRT (S4), 5 muestra de ratón HPRT (CX), 6 control 1 murciélago (C1), 7 murciélago 1 (M1).



**Figura 28.** PCR anidada a partir de cerebros de murciélagos inoculados con la 5020 variante del virus de la rabia, utilizando un fragmento de 582 pb del Gen N. Carriles: 1 Peso Molecular (PM), 2 control positivo rabia (C+), 3 control negativo para rabia (C-), 4 murciélago 1 (M1), 5 murciélago 3 (M3), 6 murciélago 9 (M9), 7 murciélago 15 (M15), 8 murciélago 19 (M19), 9 murciélago 20 (M20), 10 murciélago Control 1 (C1), 11 murciélago control 3 (C2),

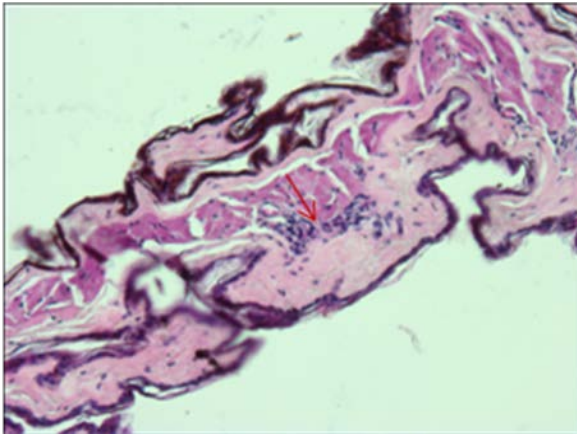


**Figura 29.** PCR anidada a partir de estómagos de murciélagos inoculados con 5020 variante del virus de la rabia, utilizando un fragmento de 582 pb del Gen N. Carriles: 1 Peso Molecular (PM), 2 control positivo rabia (C+), 3 control negativo para rabia (C-), 4 murciélago 23 (M23), 5 murciélago 25 (M25), 6 murciélago 21 (M21), 7 murciélago 20 (M20), 8 murciélago 19 (M19), 9 murciélago 17 (M17), 10 murciélago Control 15 (M15), 11 murciélago control 22 (M22),

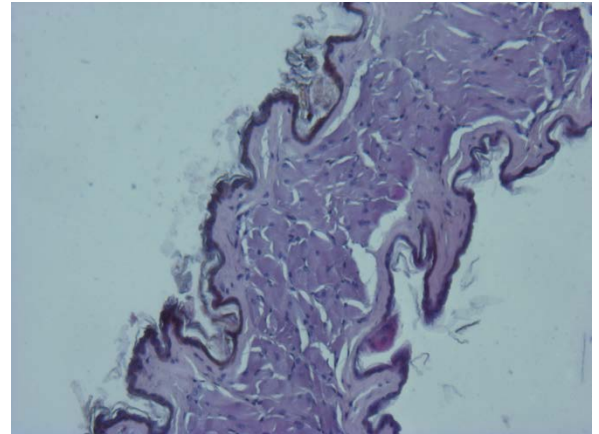
#### 4.7 Estudios histopatológicos

Se realizaron biopsias de piel, se congelaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  y otras se colocaron en formol al 10%.

Se realizaron cortes histológicos con tinción Hematoxina-Eosina (HE) y Ácido Peryódico de Shiff (PAS), en los cortes se observa un infiltrado linfocitario entre la lámina propia de la piel y la túnica muscular (**Figura 30**). Se descartó infección y lesiones por hongos en las alas de los murciélagos con los resultados de un examen microscópico del tejido con la tinción de PAS (**Figura 31**).



**Figura 30.** Piel de ala de murciélago con tinción HE. 4x. Se observa infiltrado linfocitario en el tejido.



**Figura 31.** Piel de ala de murciélago con tinción PAS 4x. No se observan hongos en el tejido.

## 5. Resultados de la infección con la CASS88 experimento 2

En este experimento no se encontraron signos clínicos de posible infección con rabia, los 9 murciélagos sobrevivieron a la inoculación, se sacrificaron, se realizó la toma de muestras y se llevaron a cabo las pruebas correspondientes.

Cada 7 días se realizó la toma de muestras sanguíneas, para monitorear a los animales mediante la técnica de RFFIT, de los animales inoculados con rabia a partir del día 8 post-inoculación todos seroconvirtieron con títulos entre 0.18 UI a 13.68 UI; con excepción del murciélago 5 del grupo control y el murciélago 6 inoculado vía subcutánea (**Tabla 9, Fig. 32 y Apéndice 12**).

Los encéfalos de los murciélagos inoculados con virus de rabia y los controles fueron en todos los casos negativos a la prueba de inmunofluorescencia directa.

Tabla 9. Monitoreo de título de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia.

Murciélago	Grupo	ANV 23/07/12	ANV 31/07/12	ANV 07/08/12	ANV 14/08/12
5	Control PBS	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
6	Subcutánea	Negativo	Negativo	1.1	Negativo
7		Negativo	3.3	3.3	***
8		Negativo	11.1	10	0.18
9		Negativo	10.5	4.56	***
10		Negativo	5.77	8.32	3.08
11		Negativo	10	4.56	3.08
12		Negativo	13.68	4.63	0.34
13		Negativo	4.78	15.9	0.34

\*\*\* Sin suero

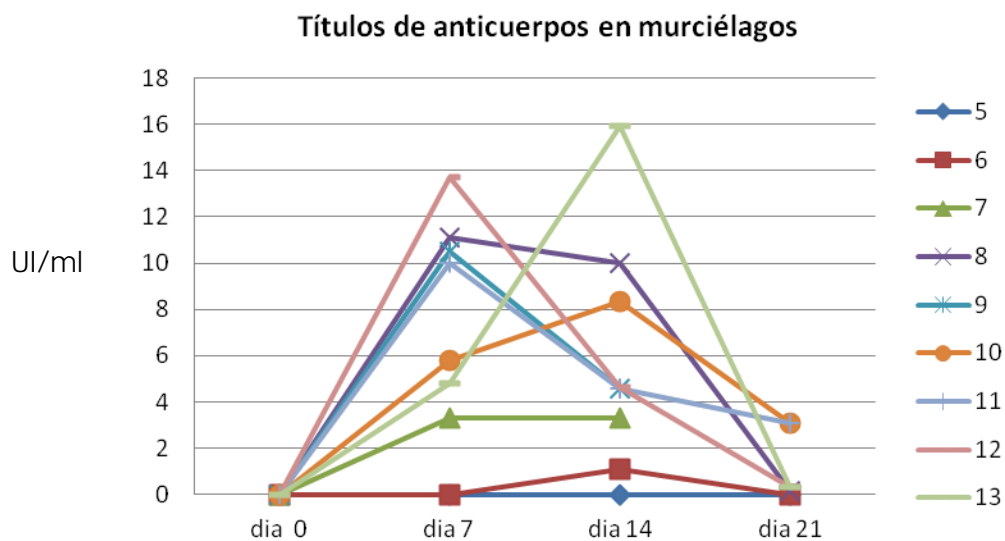
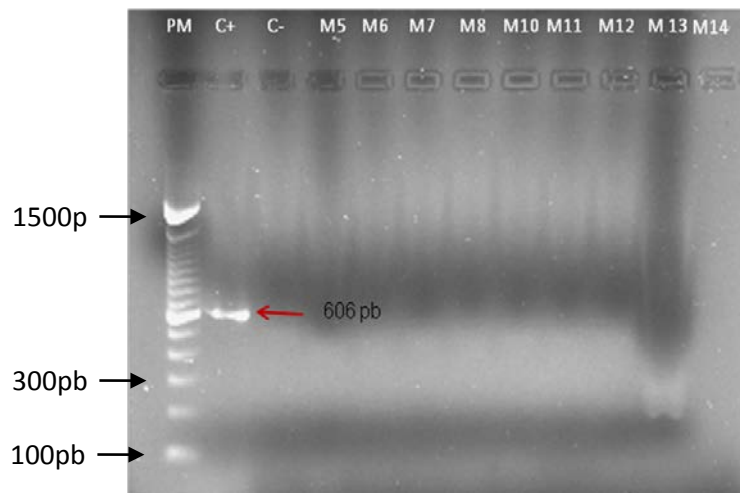
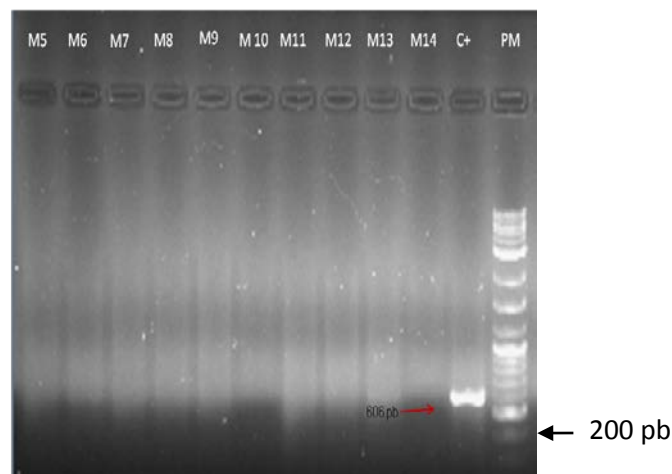


Figura 32. Títulos de anticuerpos detectados en murciélagos inoculados con CASS 88 por vía subcutánea.

Se hicieron geles de agarosa al 1.5%, las muestras de los órganos de los murciélagos de este experimento tuvieron un resultado negativo para la PCR de punto final, sin embargo en el caso de las pruebas de PCR anidada los cerebros de los murciélagos M6, M8 y M10 fueron positivos y para PCR anidada de estómago fue positivo en murciélagos M10 (Figuras 33, 34 y 35).

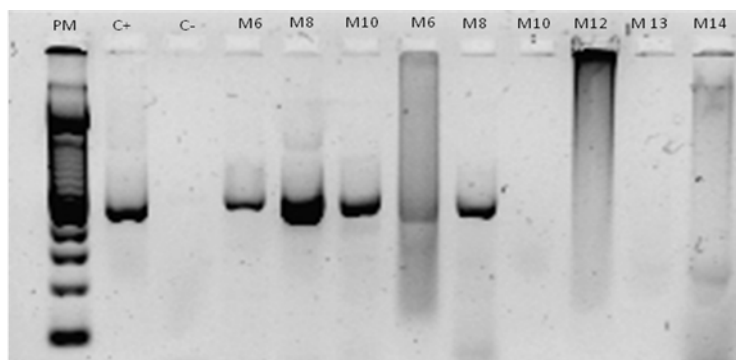


**Figura 33.** PCR a partir de los estómagos de los murciélagos del Experimento 2 inoculados con la cepa CASS88 del virus de la rabia, utilizando un fragmento de 606 pb del Gen N. Carriles: 1 Peso Molecular (PM), 2 control positivo rabia (C+), 3 control negativo para rabia (C-), 4 murciélagos 5 (M5), 5 murciélagos 6 (M6), 6 murciélagos 7 (M7), 7 murciélagos 8 (M8), 8 murciélagos 10 (M10), 9 murciélagos 11 (M11), 10 murciélagos 12 (M12), 11 murciélagos 13 (M13), 12 murciélagos 14 (M14).



**Figura 34.** PCR a partir de los cerebros de murciélagos inoculados por vía subcutánea con la cepa CASS 88 variante del virus de la rabia, utilizando un fragmento de 582 pb del Gen N. Carriles: 1 murciélagos 5 (M5), 2 murciélagos 6 (M6), 3 murciélagos 7 (M7), 4 murciélagos 8 (M8), 5 murciélagos 9 (M9), 6 murciélagos 10 (M10), 7 murciélagos 11 (M11), 8 murciélagos 12 (M12), 9 murciélagos 13 (M13), 10 murciélagos 14 (M14) 11 control negativo para rabia (C-) control positivo rabia (C+), Peso Molecular (PM)





**Figura 35.** PCR anidada a partir de estómagos y cerebros de murciélagos inoculados por vía subcutánea con la cepa CASS 88 variante del virus de la rabia, utilizando un fragmento de 582 pb del Gen N. Carriles: 1 Peso molecular (PM), 2 control positivo rabia (C+), 3 negativo para rabia (C-), 4 cerebro de murciélago 6 (M), 5 cerebro murciélago 8(M8), 6 cerebro murciélago 10 (M10), 7 estómago murciélago 8 (M8), 8 estómago murciélago10 (M10), 9 estómago murciélago 6 (M10) 6, cerebro murciélago 12 (M12), 7cerebro murciélago 13 (M13,13 cerebro murciélago 14 (M14).

## 6. Resultados de la infección con I 5020 Experimento 3

Este experimento se llevó a cabo con los procedimientos descritos anteriormente, con la diferencia de que este grupo contó con un grupo experimental inoculado intracerebralmente (**Apéndice13**).

### 6.1 Grupo I. Vía de inoculación intracerebral, dosis $6.49 \times 10^4$

No se observaron cambios de comportamiento, los murciélagos 4, 13 y 14 murieron los primeros dos a los días 2 y 6 post-inoculación y a la necropsia se encontraron lesiones en el cerebro aparentemente causadas por la inoculación, los murciélagos 2 y 15 del mismo grupo se sacrificaron el día 21 y 13 post-inoculación.

El murciélago 3 inoculado experimentalmente por vía intracerebral murió el día 14 post-inoculación, días anteriores no se observó ninguna sintomatología clínica correspondiente a rabia, no mostró cambios de comportamiento, depresión o disminución en el consumo de alimento. A la necropsia se observó que tenía una lesión hemorrágica en el miembro posterior derecho, hematomas en los codos, fosas nasales sanguinolentas. No se observaron hemorragias internas y los órganos se encontraban sin cambios patológicos aparentes.

### 6.2 Grupo II. Vía de inoculación intramuscular (músculo macetero), dosis $6.49 \times 10^4$

Este grupo no mostró ningún cambio de comportamiento, en general todos exhibían en buen estado de salud. Los tres murciélagos sobrevivieron hasta el final del experimento.

### 6.3 Grupo III. Vía de inoculación Subcutánea, dosis $6.49 \times 10^4$

No se observaron cambios de comportamiento relevantes, sin embargo a partir del día 50 se observaron ectoparásitos en las alas. Todos los animales de este grupo sobrevivieron al desafío.

Todos los murciélagos seroconvirtieron con títulos entre 0.11 UI a 0.78 UI con la técnica de RFFIT; con excepción del Murciélago 5 del grupo control. No se obtuvo suero de los murciélagos 1, 2 y 4, debido a que murieron antes de la toma de muestra sanguínea post-inoculación.

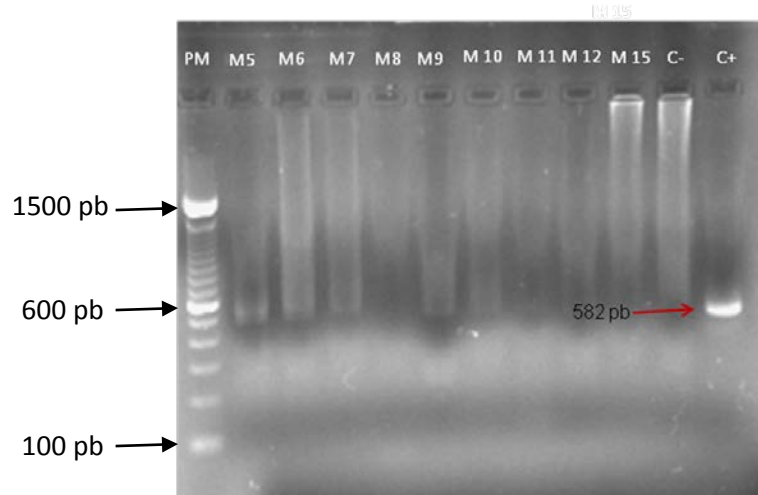
De los 15 murciélagos 9 sobrevivieron al desafío de la inoculación con rabia, 6 murieron y de éstos solo 1 el murciélago 3 del grupo inoculado intracerebralmente fue positivo a rabia por inmunofluorescencia (**Figura 36**).

Para los murciélagos 2 y 4 del grupo inoculados intracerebralmente, las improntas de cerebro resultaron con diagnóstico dudoso, por lo tanto se llevó a cabo la prueba biológica inoculando con macerado de los cerebros de los murciélagos

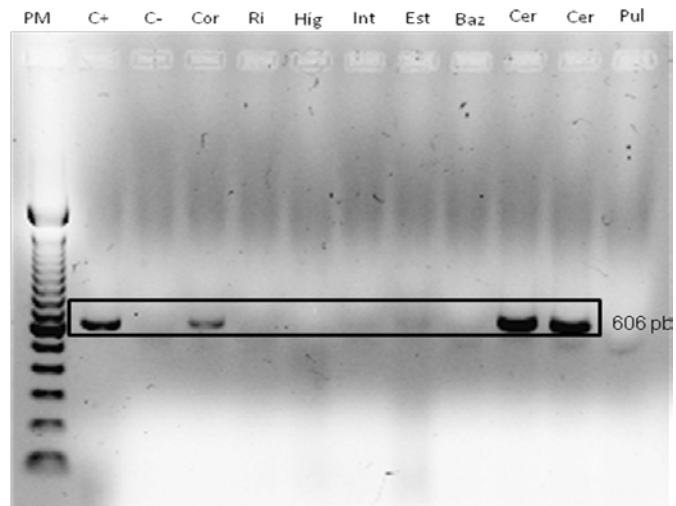
a ratones Balb-c de 21 días de edad, en los dos casos los ratones sobrevivieron al desafío, dando como resultado negativos en ambos.

Las muestras de órganos de los murciélagos en todos los grupos tuvieron un resultado negativo para la PCR de punto final y PCR anidada excepto en el murciélago 3 del grupo inoculado intracerebralmente (**Figura 37**).

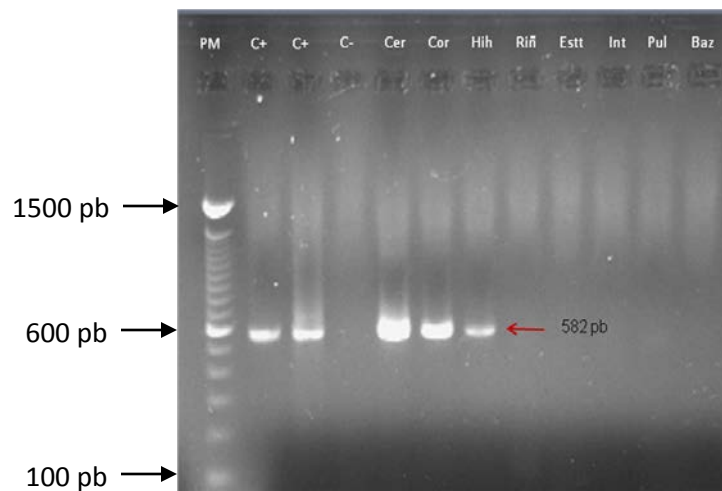
Para la PCR punto final del murciélago 3, cerebro y corazón fueron positivos. La PCR anidada dio positiva para cerebro, corazón e hígado (**Figuras 37 y 38**).



**Figura 36.** PCR anidada a partir de cerebros de murciélagos del experimento 3 inoculados con la cepa 5020 variante 3 del virus de la rabia, utilizando un fragmento de 582 pb del Gen N. Carriles: 1 Peso Molecular (PM), 2 murciélago 5 (M5), 3 murciélago 6 (M6), 4 murciélago 7 (M7), 5 murciélago 9 (M9), 6 murciélago 10 (M10), 7 murciélago 11 (M11), 8 murciélago 12 (M12) 9 control negativo para rabia (C-), 10 control positivo rabia (C+).



**Figura 37.** PCR de los órganos recolectados del murciélago 3 del experimento 3 inoculados por vía intracerebral con la variante 5020, utilizando un fragmento de 582 pb del Gen N. Carriles: 1 Peso molecular (PM), 2 Control positivo (C+), 3 control negativo (C-), 4 Corazón (Cor), 5 Riñón (Riñ), 6 hígado (Hig), 7 Intestino (Int), 8 Estómago (Est), 9 Bazo (Baz), 10 Cerebro (Cer) 11 repetición cerebro (Cer) y 12 Pulmón (Pul)



**Figura 38.** PCR anidada de los órganos del murciélago 3 inoculado intracerebralmente con la cepa 5020 variante del virus de la rabia, utilizando un fragmento de 582 pb del Gen N. Carriles: 1 Peso Molecular (PM), 2 control positivo rabia (C+), 3 control positivo rabia (C+), 4 control positivo para rabia (C-), 5 cerebro (Cer), 6 corazón (Cor), 7 Hígado (Hig), 8 Riñón (Riñ), 9 Estómago (Est), 10 Intestino (Intes), 11 Pulmón (Pul), 12 Bazo (Bazo),

## DISCUSIÓN

En este trabajo de 38 murciélagos adultos *Artibeus spp.*, inoculados con dos aislados de la variante 3 del RABV (CASS 88 y 5020), diferentes dosis ( $1 \times 10^3$  UFF,  $1 \times 10^{5.34}$  UFF y  $6.49 \times 10^4$  DL50) y vías (intramuscular, subcutánea e intracerebral) únicamente un murciélago desarrolló una infección fatal diagnosticada por Inmunofluorescencia y PCR como rabia.

Debido a la baja tasa de mortalidad obtenida en el periodo de observación (60, 21 y 51 días), no fue posible determinar el tiempo de incubación de la enfermedad en esta especie.

En ninguno de los murciélagos inoculados experimentalmente se pudo observar algún signo clínico de rabia como alteraciones nerviosas, cambios de comportamiento o disminución del consumo de alimento; incluso el único animal que fue positivo a IFD y PCR.

Hasta el momento no se ha descrito un cuadro clínico de rabia en quirópteros, en varios trabajos de infecciones experimentales en *Eptesicus fuscus*, *Eptesicus serotinus* y *Desmodus rotundus*, se han observado algunos signos clínicos de la enfermedad como reducción en el consumo de alimento, aislamiento del grupo, temores y parálisis en solo algunos de los infectados (Aguilar Setién *et al.*, 2005, Davis *et al.*, 2007, Freuling *et al.*, 2009, Franka *et al.*, 2008). En el estudio realizado por Aguilar Setién *et al.* 2005, donde se utilizó la cepa CASS 88, misma que se empleó en nuestro estudio, el 79% de los murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) sucumbieron a la inoculación con rabia por vía IM; mostrando signos como: depresión, anorexia, temores, parálisis de las alas, entre otros; pero se observó que los murciélagos inoculados solo presentaban estos signos 48 a 72 horas antes de la muerte. Comparando nuestro estudio la mortalidad fue muy baja (3.1%).

Reid y Jackson (2001) realizaron una inoculación experimental con 2 variantes: CVS-B2c y CVS-N2c, usando como modelo a murciélagos frugívoros *Artibeus jamaicensis*, se comparó la patogenicidad de éstas y los resultados mostraron que los murciélagos inoculados con CVS-N2c tuvieron signos clínicos como: parálisis, ataxia e inhabilidad para el vuelo; mientras que con la CVS-B2c no se produjeron signos clínicos en los murciélagos. Sin embargo al realizar las pruebas de inmunoperoxidasa ambas variantes se encontraron en cerebro. En este trabajo no se demostró la letalidad de la infección ya que los animales fueron sacrificados después de un periodo corto de incubación.

Esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo ya que animales que no muestran signos clínicos son positivos a pruebas de PCR en diversos órganos.

En los tres experimentos realizados, solo un murciélago (M3) de 6 inoculados por la vía IC con la variante 5020, murió al día 14 post inoculación, además fue el único positivo por IFD (**Apéndice 13**). Este animal no presentó signos de la enfermedad, se alimentó diariamente, no tuvo pérdida de peso, se mostró alerta todo el tiempo y al día 14 p.i. se encontró muerto con hemorragias en las fosas nasales. La muerte súbita sin signos aparentes de rabia, ha sido reportada en algunos casos en los cuales al capturar poblaciones abiertas de murciélagos, individuos que se encuentran aparentemente sanos tienen una muerte súbita sin ningún signo previo y al realizar pruebas de rabia son positivos al virus (comunicación personal del Dr. Juan Emilio Echevarría).

Este animal (M3) a la necropsia mostró el cerebro hemorrágico, sin cambios patológicos aparentes en otros órganos. Además, este individuo fue positivo a rabia por PCR en cerebro y PCR anidada en hígado y corazón simultáneamente. Todos los murciélagos restantes del experimento 1, inoculados con 5020, fueron negativos a las pruebas de IFD, PCR y PCR anidada en los órganos probados (lengua, glándulas salivales, hígado, páncreas, corazón, bazo, pulmones, estómago, intestino, riñón, glándulas suprarrenales y vejiga) incluyendo el cerebro.

Por otro lado, en el experimento 2 (animales inoculados con CASS 88), fue posible la detección del genoma viral por PCR anidada, en el cerebro de 3 (37.5%, murciélagos M6, M8 y M10) de 8 murciélagos. Ninguno de ellos presentó signos clínicos y además fueron negativos a pruebas de IFD (**Apéndice 12**). De estos animales el M10 fue también positivo por PCR anidada en estómago simultáneamente (**Figura 35**). En un estudio realizado por Allendorf *et al* (2012), se detectó la presencia en 50% de los estómagos de murciélagos infectados naturalmente.

Los resultados en conjunto, nos muestran que por PCR anidada los animales inoculados mostraron una diseminación de RABV en órganos como cerebro, estómago, hígado y corazón. Esta distribución tisular puede sugerir otras posibles formas de eliminación y transmisión de rabia entre estos animales.

Hay poca información acerca de la distribución del virus de la rabia clásica (Genotipo I) en los órganos de murciélagos infectados natural y experimentalmente. En este estudio se detectó la presencia del virus en diferentes tejidos, pero no se observó ningún patrón significativo de distribución viral.

La distribución viral en órganos y tejidos de murciélagos infectados pueden estar relacionados al sitio de inoculación, dosis infectante y especies de murciélagos. Los resultados de un estudio donde se inocularon experimentalmente *Eptesicus fuscus* con European Bat Lyssavirus 1 (EBLV-1), se observó que los animales que recibieron una dosis baja intramuscular tuvieron una distribución en los órganos más amplia del virus que aquellos animales que fueron inoculados intracerebralmente con dosis altas (Freuling *et. Al.* 2009). En nuestros resultados se observó algo similar, ya que al inocular dosis altas ( $1 \times 10^{5.34}$  UFF del aislado 5020) del virus en murciélagos, no se pudo reproducir la enfermedad, ni se detectó el virus en ningún órgano; en cambio al inocular con dosis bajas ( $1 \times 10^{4.34}$  /ml UFF de 5020 y  $6.49 \times 10^4$  DL50/ml de CASS 88) fue posible la detección del virus en diferentes órganos como cerebro, estómago, hígado y corazón.

Recientes estudios han sugerido que el frecuente contacto con dosis bajas o no letales en las colonias de *Eptesicus fuscus* puede dar como resultado presencia de anticuerpos y protección de los murciélagos a futuras exposiciones (O'shea *et. al.*, Shankar *et. al.*, 2004).

Varios estudios han reportado la presencia del virus en glándulas salivales de *Desmodus rotundus*, *Myotis daubentonii*, *Eptesicus serotinus*, entre otros (Carneiro *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2008; Freuling *et al.*, 2009 y Allendorf *et al.*, 2012); en éste trabajo, de los 38 murciélagos inoculados ninguno fue positivo por PCR y/o PCR anidada en glándulas salivales.

En este estudio se probaron diferentes rutas de infección como: subcutánea, intramuscular e intracerebral. La vía i.c. fue la más eficiente en cuanto a letalidad. Sin embargo, las rutas de inoculación entre murciélagos más comunes serían la vía i.m. y s.c., no hubo mortalidad en los grupos de murciélagos inoculados.

En cuanto a distribución del virus en los órganos de los murciélagos inoculados se refiere, la vía i.c. fue la más eficiente (cerebro, hígado y corazón) seguida de la vía subcutánea (cerebro y estómago), por vía intramuscular no se obtuvo ningún resultado positivo.

En varios estudios realizados se ha demostrado que la vía subcutánea es más eficiente que la vía intramuscular (Freuling *et al.*, 2009), como sucedió en nuestro trabajo, en animales inoculados vía s.c. fue posible la detección del virus de la rabia en cerebro y estómago, pero no necesariamente desarrollan signos clínicos de la enfermedad.

Se ha observado que la vía intracerebral induce períodos de incubación más cortos (7 a 13 días), concuerda con el período de incubación en murciélagos frugívoros *Artibeus spp.*, fue de 14 días post inoculación en este estudio; pero no fue posible compararlo con las otras vías de inoculación, debido a que no hubo mortalidad por las otras dos vías utilizadas.



En un estudio realizado por Freuling *et al.* (2009) el período de incubación para la vía s.c. fue de 17-18 días y vía intramuscular 26 días. En este trabajo a los 21 días fue posible la detección del virus en cerebro y estómagos de animales inoculados vía s.c y por vía i.m. no se detectó el virus en ningún órgano de animales inoculados. Sin embargo si se encontraron anticuerpos neutralizantes a rabia en animales inoculados por las dos vías, por lo cual sugerimos realizar experimentos más largos, ya que los períodos de incubación del virus pueden variar dependiendo de la variante del virus utilizada, dosis, vía de inoculación y especie de murciélago.

No hubo relación entre el peso y animales positivos a rabia, de los tres experimentos realizados, solo los murciélagos del primer experimento inoculados con la 5020 fueron los únicos que tuvieron una pérdida de peso que fue de entre 2 y 12 g, estos animales fueron negativos a las pruebas de PCR realizadas (**Tabla 7**)

De los 38 murciélagos inoculados con rabia todos seroconvirtieron a partir del 7° día post inoculación con títulos que variaron de entre 0.28 UI a 23.5 UI (primer experimento); 0.18 UI a 13.68 UI (2° experimento) y 0.11 UI a 0.78 UI (3er experimento) (**Tabla 8 y 9**).

Todos los animales que fueron positivos a RABV por PCR seroconvirtieron a partir del 7° día post inoculación, (**Apéndice 10, 11,12 y 13**), excepto el murciélago M1 que no tuvo actividad neutralizante, hasta el día 45 con 3.4 UI y el murciélago M6 fue negativo al día 7 y al día 14 se obtuvo un título de 1.1 UI encontrándose negativo el día del sacrificio. Este individuo resultó positivo a rabia en cerebro por PCR anidada (**Tabla 9 y Figura 35**).

En el primer experimento con la 5020 se observó actividad neutralizante a partir del día 15 post inoculación con títulos >0.5 UI excepto los individuos M15 y M23 del grupo de dosis baja vía subcutánea (0.28 y 0.32 UI), M21 del grupo dosis baja vía intramuscular (0.45 UI) y M1 del grupo dosis alta vía intramuscular (sin actividad

neutralizante). A los 51 días post inoculación todos los murciélagos inoculados tenían anticuerpos  $>0.5$  UI (**Figura 25**).

En el segundo experimento CASS 88, desde el día 7 post inoculación, los 8 murciélagos inoculados presentaron actividad neutralizante  $> 0.5$  UI, al día 21 post inoculación solo 2 individuos (M10 Y M11) tenían anticuerpos  $> 0.5$  UI, los 6 restantes presentaron títulos de  $< 0.5$  UI. El M10 fue positivo a PCR anidada en cerebro y estómago, el M11 fue negativo a las pruebas moleculares realizadas. Los M6 y M8 positivos por PCR a RABV en cerebro a los 21 días post inoculación pero negativos a las pruebas de seroneutralización a esa misma fecha (**Figura 32 y 35**).

Se observó que en los murciélagos inoculados con CASS 88 se perdía actividad neutralizante a los 21 días post inoculación (títulos  $< 0.5$  UI), mientras que con la 5020 los murciélagos tuvieron actividad neutralizante  $>0.5$  UI hasta los 51 días post inoculación independientemente de la dosis y de la vía de inoculación.

Los resultados de los títulos de anticuerpos obtenidos en este trabajo, muestran que existe una alta actividad neutralizante, la infección está siendo controlada y los animales sobreviven. Mientras que en otros trabajos como: Hughes, *et.al.* 2006, Davis, 2012 y Freuling, 2009; hay poca o nula actividad neutralizante y alta mortalidad, ya que los murciélagos no están eliminando la infección. Es posible que lo que estamos viendo sea una exposición a múltiples dosis bajas o no letales, que se han acumulado a lo largo de la vida de los murciélagos de vida libre.

Estos resultados sugieren que las diferencias genéticas, origen y distribución geográfica entre 5020 y CASS 88, podría ser de importancia en la progresión de la enfermedad y diseminación del virus en los murciélagos *Artibeus spp.*

La variante 3 se encuentra cercana al Estado de Morelos, por lo tanto la 5020 podría estar circulando en las poblaciones de murciélagos frugívoros *Artibeus spp.* La respuesta inmunológica de los murciélagos podrían estar más adaptada a esta

cepa del virus de la rabia y por lo tanto ser más resistentes a la inoculación y neutralizar la infección.

Se ha observado que en los quirópteros los anticuerpos neutralizantes que se observan después de un estímulo (reto o vacunación), son de corta duración (Aguilar Setián *et. al.*, 1998 y Jackson *et. al.*, 2008).

Almeida *et. al.*, reportó una disminución de anticuerpos neutralizantes en *Desmodus rotundus*, después de inocularlos con una variante de vampiro del virus de la rabia. El 53% de los murciélagos fueron seropositivos al día 30 p.i., el 44% al día 60 p.i. y el 35% al día 90 p.i.

En un experimento realizado por Aguilar Setián *et. al.* (2002), se observó que los murciélagos *Desmodus rotundus* pierden anticuerpos a los 30 días después de ser vacunados y Jackson *et. al.*, (2008) al día 43 en *Eptesicus fuscus*.

Se sugiere que los *Artibeus* están controlando la infección ya que sus niveles de anticuerpos neutralizantes contra rabia se mantienen más tiempo, en comparación con otras especies como *Desmodus rotundus* y *Eptesicus fuscus*.

En nuestra experiencia hemos detectado la presencia de anticuerpos neutralizantes contra rabia en quirópteros de vida silvestre (incluso títulos >0.5 U.I.) al momento de su captura. Cuando estos anticuerpos son monitoreados en cautiverio, muchos de estos animales presentan un descenso rápido en los títulos iniciales, llegando a ser indetectables en la mayoría en un periodo de 60 días (resultados no publicados).

La variabilidad de los resultados en los títulos de anticuerpos obtenidos sugiere que los murciélagos utilizados en este trabajo tuvieron previas exposiciones no letales al RABV en su ambiente natural, y que la inoculación podría estar actuando como un refuerzo. Por ejemplo los murciélagos 9 y 20 del primer experimento inoculados con 5020 a los 15 días p.i. tuvieron títulos de 23.5 UI y 23 UI respectivamente (**Apéndice 11 y 12**).

La ausencia de anticuerpos antes del reto, no constituye una prueba absoluta de que estos animales no hayan tenido alguna exposición previa al virus. Los murciélagos capturados podrían haber estado en contacto con el virus en su ambiente natural, generar anticuerpos de corta duración y al realizar las pruebas de seroneutralización ser negativos.

Por otro lado, es difícil establecer el título de anticuerpos que pueda conferir protección contra la rabia en quirópteros, ya que no hay estudios al respecto (CDC, 1991; OMS, 1992). Sin embargo, la ausencia de genoma viral en la mayoría de los animales inoculados y la presencia de anticuerpos, denota una infección controlada en la que el agente está siendo eliminado (no hay infección activa).

Al realizar el análisis de los resultados obtenidos con las pruebas de PCR y los títulos de anticuerpos neutralizantes, se observó que de los animales inoculados con la cepa 5020, solo uno fue positivo a las pruebas de PCR en órganos como cerebro, corazón e hígado y en general todos los murciélagos mantuvieron un título mayor a 0.5 UI hasta el día de su sacrificio. Mientras que con CASS 88, en 3 animales inoculados fue posible la detección del virus en cerebro y estómago, este animal al día 21 p.i. presentaba títulos menores a 0.5 UI, por lo cual se sugiere que al perder esta protección el virus se propaga en los órganos de los animales inoculados. Por otro lado en murciélagos inoculados con 5020 el nivel de protección se mantiene por un periodo más largo y no es posible que se lleve a cabo una diseminación del virus en los animales.

Jackson *et. al.*,(2008), al inocular murciélagos *Eptesicus fuscus* con una variante del RABV con dosis  $10^3$  DL50/ml, 3 murciélagos que sucumbieron en un periodo corto de incubación del virus no desarrollaron anticuerpos detectables después del desafío.

Los resultados de los títulos de anticuerpos difieren de algunos trabajos experimentales en los que se utilizan especies diferentes a las del presente trabajo. Freuling *et al.*, 2009, reportan que ninguno de los murciélagos (*E. serotinus*) inoculados con EBLV tipo 1a mostraron actividad neutralizante, mientras que y

Davis et al. (2013) al inocular murciélagos *E. fuscus* nacidos en cautiverio con diferentes aislados de Rabia obtenidos de *E. fuscus* tampoco obtiene la formación de anticuerpos neutralizantes detectables.

Aparentemente no todas las especies de murciélagos son igualmente susceptibles a la infección por lyssavirus o al RABV por lo cual los resultados obtenidos son variables, por ejemplo, la misma autora (Davis et al., 2012), encontró que, no solo los animales que sobreviven a la infección seroconvierten, sino también lo hacen aquellos que sucumben a la inoculación y por otro lado, animales que no tienen actividad neutralizante pueden sobrevivir o no al desafío.

Por otro lado Turmelle et al. (2010), realizaron infecciones repetidas en *E. fuscus* con un aislado de un murciélago de la misma especie, infectado naturalmente de una variante de RABV. Sus resultados sugieren que la infección repetida a largo plazo puede conferir memoria inmunológica y reducción de la susceptibilidad a la infección RABV con o sin la presencia de anticuerpos. Esto último concuerda con los resultados observados en este estudio.

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que el virus de la rabia es altamente variable con respecto a la progresión de la enfermedad, independientemente de las dosis y vías de inoculación, cuando se utilizan animales capturados en la naturaleza. Factores como diversidad biológica entre las especies de quirópteros, estado inmunológico y las variantes circulantes en las colonias pueden estar influyendo en los resultados obtenidos.

Davis (2014) realizó inoculaciones experimentales en *Eptesicus fuscus* utilizando dos aislados del virus de rabia de esta misma especie: EfV1 y EfV2. Los resultados demostraron diferentes características de virulencia y alta variabilidad en la progresión de la enfermedad.

La respuesta inmune innata juega un papel importante en las infecciones experimentales de rabia en murciélagos, como se observó en el presente trabajo animales que no tienen actividad neutralizante pueden sobrevivir o no al reto. Por

lo cual se requiere la realización de más estudios para entender los mecanismos de infección, transmisión y excreción del virus en *Artibeus spp.*

Se tienen reportes de la posible interferencia entre virus y otros agentes infecciosos, como por ejemplo una bacteria del género *Wolbachia* puede inducir resistencia a Dengue y otros *Arbovirus* (Lu Pen *et al.* 2012); esto podría complicar los trabajos experimentales de animales de vida silvestre, de los cuáles se desconoce su historia clínica y los criterios de inclusión para los experimentos realizados en este trabajo son el estado físico y pruebas serológicas de rabia, descartando previas infecciones de rabia y otras enfermedades.

Los resultados obtenidos demuestran que los *Artibeus* son especies altamente resistentes al virus de la rabia, convirtiéndolos en excelentes reservorios del virus. Aún cuando no es posible establecer el rol que juegan estas especies, se ha demostrado que las variantes de rabia circulantes en *Artibeus spp.*, están relacionadas con las variantes de murciélagos vampiros y es un hecho que existe una interacción y estrecha relación entre estas especies (Kobayashi 2007 y Shoji *et al.*, 2004). Los *Artibeus* al ser simpátricos a *Desmodus rotundus*, podrían manteniendo el virus en las poblaciones de murciélagos hematófagos, estos al ser más susceptibles, desarrollarían la enfermedad y diseminarian la enfermedad. Pero el papel que juegan los murciélagos del género *Artibeus* en el ciclo de la rabia silvestre aún no está determinado.

## CONCLUSIÓN

Nuestro estudio representa el primer trabajo de una infección experimental con rabia en *Artibeus spp.*, capturados en su ambiente natural en México utilizando una variante de vampiro.

Se detectó la presencia del RABV en órganos como: estómago, hígado y corazón de los murciélagos infectados. En estos animales no se pudo detectar ningún signo clínico de la enfermedad.

La distribución atípica en órganos distintos del sistema nervioso; puede sugerir otras posibles formas de transmisión de la rabia en esta especie.

Se observó una seroconversión variable después de la infección experimental con títulos con un rango de 0.18 UI a 23.5 UI. Esto sugiere que aquellos que presentaron altos títulos de anticuerpos tuvieron previas exposiciones al virus de la rabia.

El hecho de que solo un murciélago de 38 inoculados experimentalmente sucumbiera a la enfermedad, sugiere que los murciélagos *Artibeus spp.*, podrían ser poco susceptibles a la infección con diferentes dosis y vías de la variante 3 del virus de la rabia.

Los resultados sugieren que las dosis bajas no letales podrían favorecer la presencia de anticuerpos y a su vez el mantenimiento del virus de la rabia en poblaciones de murciélagos de vida silvestre.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar-Setien, A., Brochier, B., Tordo, N., De Paz, O., Desmettre, P., Peharpre, D., and Pastoret, P. P. Experimental rabies infection and oral vaccination in vampire bats (*Desmodus rotundus*). *Vaccine* 1998; 16:1122–1126.
2. Aguilar Setián A y Loza Rubio E. Estudio de la variabilidad Molecular del virus de la rabia en México. *Ciencia Veterinaria* 1998; 8.
3. Aguilar –Setián A,Loza-Rubio E, Salas-Rojas M, Brisseau N, Cliquet F, Pastoret PP, Rojas-Dotor S, Tesoro E. and Kretschmer R. Salivary excretion of rabies virus by healthy vampire bats. *Epidemiology. Infect*; 2005; 133 ; 517-522.
4. Allendorf SD, Cortez A, Heinemann MB, Appolinario Harary CM, Antunes JM, Gea PM, Ferreria VA, Martos SM, Ruckert da Rosa A y Megid J. Rabies virus distribution in tissues and molecular characterization of strains from naturally infected non hematophagous bats. *Virus Research* 2012.
5. Almeida MF, Martorelli LF, Aires CC, Sallum PC, Durigon EL and Massad E. Experimental rabies infection in haematophagous bats *Desmodus rotundus*. *Epidemiol. Infect* 2005; 133-523-527.
6. Altringham JD. Bats: Biology and behaviour. Oxford University Press. Reino Unido, 1996.
7. Álvarez CSS, Álvarez ST. Nuevos registros de murciélagos (Orden: *Chiroptera*) para los Estados de México y Chiapas. México. Anales. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México. 1991.
8. Aréchiga-Ceballos N., Velas A, Shi M, Chávez-Flores S, Barrón B, Cuevas-Domínguez E, Gónzales-Origel A, Aguilar-Setián A. New rabies variant found during an epizootic in White-nosed coatis from the Yucatan Peninsula. *Epidemiol. Infect.* Cambridge University Press 2010; P: 1-4.
9. Aréchiga-Ceballos N, Sonia Vázquez MS, Berciano JM, Olga N, Aznar LC, Javier J, Rodríguez NC, Aguilar-Setián JA, Echevarría JE. Novel *lyssavirus* in Bat, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 2013; Volume: 19; Issue: 5; Article ID: 12-1071 DOI: 10.3201/eid1905.121071.
10. Assenberg, R., Delmas, O., Morin, B. & other authors. Genomics and structure/function studies of Rhabdoviridae proteins involved in replication and transcription. *Antiviral Res* 2010; 87, 149-161.
11. Baer GM. Rabies in non hematophagous bats. In: *The natural history of rabies*. New York: Academic; 1975; Press.: P. 79-97.
12. Badrane H y Tordo N. Host switching in Lyssavirus history from the chiroptera to the carnivore ordens. *Journal of virology* 2001; 75 (17): 8096-8104.
13. Bahloul C. Thesis/Dissertation Immunisation Génique: Immunogénicité de la Glycoprotéine rabique et vaccins élargis aux Lyssavirus. Université Paris XI; 1997; 1-181.



14. Belotto AL, Leanes MC, SCHNEIDER H, Tamayo y Correa E. Overview of rabies in the Americas. *Virus Res* 2005; 111:5-12.
15. Bigler WJ, Hoff GL, Buff EE. Chiropteran rabies in Florida: a twenty –year analysis 1954 to 1973. *Am J Trop Med Hyg.* 24,k(2):347-52.
16. Bourhy, H. y P. Sureau. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de la rabia. Instituto Pasteur, Paris; 1990; pp. 103-152.
17. Bourhy y Sureau, URL: [http://www.who\\_rabies-bulletin.org/About\\_Rabies/Classification.asp](http://www.who_rabies-bulletin.org/About_Rabies/Classification.asp). 1990.
18. Bourhy H, Kissi B, Tordo N. Molecular diversity of *lyssavirus*genus. *Virology.* ; 1993 194 :70-81.
19. Bourhy, H., Cowley, J. A., Larrous, F., Holmes, E. C. & Walker, P. J. Phylogenetic relationships among rhabdoviruses inferred using the L polymerase gene. *J Gen Virol* 2005; 85 2849-2858.
20. Brass, D.A. Vampire bats of the American tropics. En: Brass D.A., edit. *Natural History and Public Health implications*. Ridgefield (Co); Livia Press; 1994; 57-82.
21. Carini, A. About one large epizootie of rabies. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*; 1911; 25:843–846.
22. Carneiro, A.J.B., Franke, C.R., Stöcker, A., Dos Santos, F., De Sá, J.E.Ú., Moraes-Silva, E., Alves, J.N.M., Brünink, S., Corman, V.M., Drosten, C., Drexler, J.F. Rabies virus RNA in naturally infected vampire bats, northeastern Brazil. *Emerg. Infect. Dis* 2010; 16 (12), 2004–2006.
23. Carrada-Bravo T. Investigación documental de la primera epidemia de la rabia registrada en la república mexicana en 1709. *Sal Pub Mex* 1978; 20: 705-716.
24. CDC. Rabies prevention United States. Recommendations of the Immunizations Practices Advisory Committee. *MMWR.* 199; 40 (RR-3):1-19.
25. Ceballos G, Navarro D. Diversity and conservation of Mexican mammals. In: M. A. Mares y D.J Schimidly. *Topics in Latin American Mammalogy: history, biodiversity and education*. University of Oklahoma. EUA, 1991.
26. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) <http://www.cdc.gov/rabies/m>.
27. Collins, R.A. Rabies in China: diagnosis, treatment and prevention. *The Biomedical Scientist.* 2005; 232-236.
28. Constantine. D.G., E.S. Tierkel, M.D. Kleckner, y D.M. Hawkin. Rabies in New Mexico cavern bats. *Public Health Reports* 1968; 83: 303-316.
29. Constantine D.G. Rabies transmission by nonbite route. *Public Health*; 1962; Rep 77, 287-289.
30. Correa-Scheffer K,Carreiri ML, Alvas A, Pires dos Santos HC, Kotait I y Honma Ito F. Rabies virus in naturally infected bats in the State of Sao Paulo, Southeastern Brazil. *Rev Saude Publica* 2007; 41 (3).
31. Crichton EG, Omaha HD, Krutzsch PH. *Reproductive Biology of Bats*. Universidad de Arizona. Cambrigde, 2000.
32. Davis, A.D., Rudd, R.J., Bowen, R.A. Effects of aerosolized rabies virus exposure on bats and mice. *J. Infect. Dis* 2007; 195, 1144–1150.
33. Davis A.D., Gordy P.A., Bowen R.A. Unique characteristics of bat rabies viruses in big brown bats (*Eptesicus fuscus*). *Arch virol* 2012; DOI 10.1007/ s00705-012-1551-0.

34. Davis A.D, Jarvis J.A., Pouliott C., Rudd R.J., Rabies Virus infection in *Eptesicus fuscus* Bat born in captivity (Naive Bats). PLoS ONE 2013; 8(5): e64808. doi:10.1371/journal.pone.0064808.
35. Delpietro HD, Fuenzolidá E, Bell UF. Determinación de la tasa de ataque de rabia de murciélago. Bol Oficina Sanit Panam. Septiembre 1972; 73(3): 222-30.
36. Díaz, A.M., S. Papo, A. Rodríguez y J.S. Smith. Antigenic analysis of rabies-virus isolates from Latin American and the Caribbean. Journal of Veterinary Medicine. Series B. 1994; 41: 153-160.
37. Dietzschold, B., M. Lafon, H. Wang, L. Otvos Jr. E. Celis, W.H. Wunner y H. Kropowski. Localization and immunological characterization of antigenic domains of the rabies virus internal N and NS proteins. Virus Research. 1987;103-125.
38. Domingo, E., E. Baranowski, C.M. Ruiz-Jarabo, A.M. Martín Hernández, J.C. Saiz y C. Escarmis. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. Emerging Infectious Diseases 1998; 4: 521-527.
39. Drake, J.W., B. Charlesworth, D. Charlesworth y J.F. Crow. Rates of spontaneous mutation. Genetics 1998; 148: 1667-1668.
40. Favi CM y Durpan RJC. Epidemiología de la rabia en Chile (1929-1988) y perspectivas en mamíferos silvestres. Avances en Ciencia Veterinaria 1991; 6:13-21
41. Fenton MB. Bats, Facts on file, USA, 1992.
42. Flamand, A., T.J. Wiktor y H. Kropowski. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins I. The nucleocapsid protein. Journal of General Virology 1990; 48: 97-104.
43. Fooks AR. The Challenge of new and emerging *lyssaviruses*. *Expert Rev Vaccines* 2004; 3 (4): 33-6.
44. Forment, W.L., Schmidt, U., Greenhall, A.M., Movement and population studies of vampire bat (*Desmodus rotundus*) in Mexico. J. Mammal 1971 52, 227-228.
45. Fowler ME, Muller ER. Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy. Saunders Elsevier 2008; Volumen 6.
46. Franka, R., Johnson, N., Muller, T., Vos, L., Neubert, L., Freuling, C., Rupprecht, C.E., Fooks, A.R. Susceptibility of north American big brown bats (*Eptesicus fuscus*) to infection with European bat lyssavirus type 1. J. Gen Virol 2008; (Pt 8):1998-2010. doi: 10.1099/vir.0.83688-0.
47. Freuling C, Vos A, Johnson N, Kaipf I, Denzinger Z, Neubert L, Mansfield K, Hicks D, Nuñez A, Tordo N, Rupprecht CE, Fooks AR and Muller T. Experimental infections of serotine bats (*Eptesicus serotinus*) with European bat lyssavirus type 1a. *Journal of General Virology* 2009; 90, 2493 -2502. Garrido GJA, Fichas de Fauna Silvestre Ibérica. Revista Digital Sierra de Baza, 2004-2007: URL. www.sierradebaza.org.
48. Gibbons, R.V. Cryptogenic rabies, bats, and the question of aerosol transmission. Annals of Emergency Medicine 2002; 39(5): 528-536.
49. Gómez A J. La rabia: ¿Una historia de nunca acabar? Neurología. 2006; 2-1(4): 169 -170.

50. Goto, H., N. Minamoto, H. Ito, N. Ito, M. Sugiyama, T. Finjo y A. Kawai. Mapping epitopes and structural analyses of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus. *Journal of General Virology* 2000; 81: 119-127.
51. Grard G, Fair JN, Lee D, *et al.* A novel *Rhabdovirus* associated with acute hemorrhagic fever in Central Africa. *PLOS Pathogens* 2012; DOI: 10.3371.
52. Greenhall, A.M. Feeding behavior. In: Greenhall, A.M., Schmidt, U. (Eds.), *Natural History of Vampire Bats*. CRC Press, Boston 1998; pp. 111–131.
53. Greenhall AM. Rabies in vampire bats and other bats: Proposed Plan of Action for PAHO/WHO, *Veterinary Public Health* 1990; pp 1-28.
54. Haup H y Rehaag H. Epizootic rabies in a herd from Santa Catarina (south-east Brazil) transmitted by bats. *Zeitschr. InfektionsHyg. Haustiere* 76-90 (XXII): 104-107.
55. Heaton, P., P. Johnstone, L. McElhinney, R. Cowley, E. O'Sullivan y J. Whitby. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies related viruses. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35:2762–2766.
56. Hellenbrand, W., Meyer, C., Rasch, G., Steffens, I. & Ammon, A. Cases of rabies in Germany following organ transplantation. *Euro Surveill* 2005; 10, 50224-50226.
57. Houff, S. A., Burton, R. C., Wilson, R. W. & other authors. Human-to-human transmission of rabies virus by corneal transplant. *N Engl J Med* 1979; 300, 603-604.
58. Hughes, G.J., Kuzmin I. V., Schmitz A, Blanton J, Manangan J, Murphy S, and Rupprecht C.E. Experimental infection of big brown bats (*Eptesicus fuscus*) with Eurasian bat lyssaviruses Aravan, Khujand, and Irkut virus. *Archives of virology* 2006; 151: 2021–2035.
59. Hurst EW, Pawan JL. An outbreak of rabies in Trinidad. *Lancet infect.* 191;3 Dis 2:622-628.
60. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).
61. Iwasaki, T., Inoue, S., Tanaka, K. & other authors. Characterization of Oita virus 296/1972 of Rhabdoviridae isolated from a horseshoe bat bearing characteristics of both Lyssavirus and Vesiculovirus. *Arch Virol* 2004; 149, 1139-1154.
62. Jackson, A. O., Dietzgen, R. G., Goodin, M. M., Bragg, J. N. & Deng, M. Biology of plant rhabdoviruses. *Annu Rev Phytopathol* 2005; 43, 623-660.
63. Jackson FR., Turmelle AS., Farino DM., Franka R., McCracken GF., and Rupprecht CE. Experimental rabies virus infection of big brown bats (*Eptesicus fuscus*). *Journal of Wild Diseases*, 2008; 44 (3) pp 612-621.
64. Jayakar, H. R., Jeetendra, E. & Whitt, M. A. Rhabdovirus assembly and budding. *Virus Res* 2004; 106, 117-132.
65. Jaramillo JT, Olivera LJ, Velázquez MJ. *Reproducción y Manejo de Fauna Silvestre*. UAM. Unidad Iztapalapa. 2001; 1ª Ed.
66. Jiménez RJA, De La Torre GD. *Prevención de la rabia parálitica bovina y control de poblaciones de vampiros (Desmodus rotundus)*. 2006; 1ª. Ed. Bayer. México.
67. Johnson N, McElhinney LM, Smith J, Lowings P, Fooks AR. Phylogenetic comparison of the genus *Lyssavirus* using distal coding sequences of the glycoprotein and nucleoprotein genes. *Arch Virol* 2002; 147:2111-2123.

68. Johnson, N., L. M. McElhinney, J. Smith, P. Lowings y A.R. Fooks. Phylogenetic comparison of the genus Lyssavirus using distal coding sequences of the glycoprotein and nucleoprotein genes. *Archives of Virology* 2002; 147: 2111-2123.
69. Johnson, N., Phillpotts, R. & Fooks, A. R. Airborne transmission of Lyssaviruses. *J Med Microbiol* 2006; 55, 785-790.
70. Johnson, N., Vos, A., Neubert, L., Freuling, C., Mansfield, K.L., Kaipf, I., Denzinger, A., Hicks, D., Nuñez, A., Franka, R., Rupprecht, C.E., Muller, T., Fooks, A.R. Experimental study of European bat lyssavirus type-2 infection in Daubenton's bats (*Myotis daubentonii*). *J. Gen. Virol.* 2008; 89, 2662-2672.
71. Kondo, H., Maeda, T., Shirako, Y. & Tamada, T. Orchid fleck virus is a rhabdovirus with an unusual bipartite genome. *J Gen Virol* 2006; 87 2413-2421.
72. Konz TH, Racey PA. *Bat Biology and Conservation*. Smithsonian Institution Press, British Library Cataloguing in Publication Data available. EUA, 1998.
73. Koopman KF. Systematics and distribution. In: Greenhall AM, Schmidt U. editors. *Natural history of vampire bats*. Florida: CRC Press 1988; P7-17.
74. Kopecky SA, Lyles DS. Contrasting effects of matrix protein on apoptosis in HeLa and BHK cells infected with vesicular stomatitis virus are due to inhibition of host gene expression. *J Virol* 2003; 77 4658-4
75. Kuzmin, I.V., G.J. Hughes, A.D. Botvinkin, L.A. Orciari y C.E. Rupprecht. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition. *Virus Research* 2005; 111(1):28-43.
76. Kuzmin IV, Niezgodá M, Franka R, Agwanda B, Markotter W, Beagley JC, et al. Possible emergence of West Caucasian bat virus in Africa. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14:1887-9. doi: 10.3201/eid1412.080750.
77. Kuzmin, I. V., Novella, I. S., Dietzgen, R. G., Padhi, A. & Rupprecht, C. E. The rhabdoviruses: biodiversity, phylogenetics, and evolution. *Infect Genet* 2009; vol 9, 541-553.
78. Kuzmin IV. Molecular inferences suggest multiple host shifts of rabies viruses from bats to Mesocarnivores in Arizona during 2001-2009. *Plos pathogens.* 2012.
79. Lodish, H., A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore y J.E. Darnell. *Biología celular y Molecular*. 5a Ed. Panamericana. Colombia 2005; 137-143 pp.
80. Loza Rubio E, Discrimination between epidemiological cycles of rabies in Mexico Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias INIFAP, Mexico, D F, Mexico Arch Med Res 1999; 30:144-9.
81. Loza-Rubio E., Aguilar SA, Mattos CC, Mattos CA. Aislamiento y caracterización molecular de un virus rábico, obtenido de un murciélago no hematófago en la Ciudad de México. *Vet. México* 2000; pp.147-152.

82. Loza-Rubio E., Mattos CC, Aguilar SA, Mattos CA. Aislamiento y caracterización molecular de un virus rábico, obtenido de un murciélago no hematófago en la Ciudad de México. *Vet. México* 2000; pp.147-152.
83. Lu P, Bian G., Pan X., Xi Z., Wolbachia Induce Density –Dependent Inhibition to Dengue Virus in Mosquito Cells. *PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES*. 2012.
84. Markotter, W., Kuzmin, I. V., Rupprecht, C. E. & Nel, L. H. Lagos bat virus virulence in mice inoculated by the peripheral route. *Epidemiol Infect* 2009;137, 1155-1162
85. Marston, D.A., L.M. McElhinney, N. Johnson, T. Müller, K.K. Conzelmann, N. Tordo y A.R. Fooks. Comparative analyses of the full genome sequence of European bat Lyssavirus type 1 and type 2 with other Lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G-L 3' non translated region. *Journal of General Virology* 2007; 88: 1302-1314.
86. Marston DA, Horton DL, Ngeleja C, Hampson K, McElhinney LM, Banyard AC, Haydon D, Cleaveland S, Rupprecht CE, Bigambo M, Fooks AR, Lembo T. Ikoma lyssavirus, highly divergent novel lyssavirus in an African civet. *Emergent Infect Dis.* 2012; Apr;18(4):664-7. doi: 10.3201/eid1804.111553.
87. Masters, P.S. y A.K. Banerjee. Sequences of Chandipura virus N and NS genes: evidence for high mutability of the NS gene within vesiculoviruses. *Virology* 1987; 157: 298-306.
88. McColl, K.A., N. Tordo y A. Aguilar-Setién. Bat Lyssavirus infections. *Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz.* 2000; 19 (1): 177-196.
89. Mitchell Hoskins M. A., PH.D Head of the Virus Research Department, Swiss Serum and Vaccine Institute, Berne, Switzerland; formerly Lecturer in Bacteriology and Virology, University of Sheffield. *Virological Procedures* .London Vutter Worths 1967.
90. Morales-Martínez, M. E., G. Rico-Rosillo, J.L. Gómez-Olivares y A. Aguilar-Setién. Immunologic importance of the N protein in the rabies virus infection. *Veterinaria México* 2006; 37(3): 351-367.
91. Navarrete-Navarro S, Aguilar-Setién A, Ávila FC, Hernández SF y Santos PJ. Improved serological response to human diploid cell rabies vaccine when given simultaneously with antirrabies hyperimmune globulin. *Archives of Medical Research* 1999; 30: 332–337.
92. Neglected Zoonotic Diseases (NZD), Department of Neglected Tropical Diseases (NTD), World Health Organization, 2009
93. Nel, L. H. & Markotter, W. Lyssaviruses. *Crit Rev Microbiol* 2000; 33, 301-324.
94. Neuweiler G. The biology of bats. 1ª. Ed. Oxford. E. U. A.
95. NORMA Oficial Mexicana NOM-067-ZOO-2007. Campaña nacional para la prevención y control de la rabia en bovinos y especies ganaderas.
96. Olfert ED, Cross BM Y McWilliam AA., Consejo canadiense de Protección de los Animales. Canadian Council Care 1510-130 Albert Street, Ottawa Ontario. Canada. 1998; Volumen 1, 2ª Edición.
97. OPS/OMS. Sistema de información para la vigilancia epidemiológica de la rabia en las Américas, SIRVERA. En url: [portalpanaftosa.org.br](http://portalpanaftosa.org.br). 2005.

98. O'shea TJ., Shankar V., Bowen RA., Ruprecht CE., and Wimsatt JH. Do bats acquire immunity to rabies? Evidence from the field. *Bat Research News* 2003 44: 161.
99. Pawan JL, Rabies in the vampire bat of Trinidad , with especial reference to the clinical course and the latency on infection. *Ann, Trop. Med. Parasitol.* 1936; 30:410-422.
100. Poch, O., Blumberg, B. M., Bougueleret, L. & Tordo, N. Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol* 71, 1990; 1153-1162
101. Poisson, N., E. Real, Y. Gaudin, M.C. Vaney, S. King Y. Jacob, N. Tordo y D. Blondel. Molecular basis for the interaction between rabies virus phosphoprotein P and the dynein light chain LC8: dissociation of dynein-binding properties and transcriptional functionality of P. *Journal of General Virology.* 2001; 82: 2691-2696.
102. Prehaud, C., P. Coulon, F. Lafay, C. Thiers y A. Flamand. Antigenic site II of rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence. *Journal of Virology.* 1988; 62: 1-7.
103. RabNet/Rabies Bulletin in Europe/Bulletin of Epidemiological Surveillance of Rabies in the Americas/Office International d'Epizooties. 2007.
104. Rodrigues YJ, Tamayo JG. Pathology of experimental infection with the rabies virus hematophagous bat (*Desmodus rotundus*).*Rev. Fac. Cs. Vets.* 2000; 41:71-72.
105. Romero AML, Aguilar SA, Sánchez HC. Murciélagos benéficos y vampiros: características, importancia, rabia, control y conservación. 1ª. Ed. AGT Editor. México, 2006.
106. Ruedas, J. B. & Perrault, J. Insertion of enhanced green fluorescent protein in a hinge region of vesicular stomatitis virus L polymerase protein creates a temperature-sensitive virus that displays no virion-associated polymerase activity in vitro. *J Virol* 2009; 83 12241-12252.
107. Ruiz, M., and Chavez, C. B. Rabies in Latin America. *Neurol. Res.* 2010; 32:272-277.
108. Rupprecht, C. E., Hanlon, C. A. & Hemachudha, T. Rabies re-examined. *Lancet Infect Dis* 2001; 2, 327-343.
109. Sacramento, D., H. Badrane, H. Bourhy, and N. Tordo. Molecular epidemiology of rabies virus in France: comparison with vaccine strains. *J. Gen. Virol.* 1992; 73:1149-1158
110. Saarbrücken ZN/ Egyptian Fruit Bat (*Rousettus aegyptiacus*). 2009. URL: [www.flickr.com/photos/sexexecutioner/3225691678/](http://www.flickr.com/photos/sexexecutioner/3225691678/)
111. Salas RM. Presencia de anticuerpos contra el virus de la Rabia y el virus LPM (Familias: Rhabdoviridae y Paramyxoviridae) en murciélagos no hematófagos orden: Chiroptera de dos localidades del Edo. De Colima (Tesis de licenciatura). México, DF: UNAM, 2002.
112. Sacramento, D., Bourhy, H. & Tordo, N. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Mol Cell Probes* 1991; 5, 229-240.

113. Shahroukh M and Moreno-Valdéz A. Climate change, vampire bats, and rabies: Modeling range shifts on the US- Mexico border. 94 th. ESA Annual Meeting, Albuquerque Conference Center, Albuquerque, México. 2009
114. Shankar V., Bowen RA., DAVIS AD., Ruprecht CE., and O'shea J. Rabies in a captive colony of big brown bats (*Eptesicus fuscus*). *Journal of Wildlife Diseases* 2004; 40: 403-413.
115. Schimidly DJ. The bats of texas. Texas A&M University Press Collage Station, 2a Ed. UAE, 1999.
116. Shoji Y, Kabayashi Y, Itou T, Miura Y, Mikamp T, Cuhna EMS, Samara SI, Carvalho AAB, Nocitti DP, Ito FH, Kurane I y Sakai T. Genetic Characterization of rabies viruses isoleted from frugivorous bat (*Aribeus* spp.) in Brazil. *Virology J. Vet. Med. Sci* 2004; 66 (10): 1271-1273.
117. Shope, RE Rabies-related viruses. *Yale Journal of Biology and Medicine* 55:271.275-1982
118. Sistema de Información Regional de Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas [SIRVERA/OPS], 2006.
119. Smith, J. S., Fishbein, D. B., Rupprecht, C. E. & Clark, K. Unexplained rabies in three immigrants in the United States. A virologic investigation. *N Engl J Med* 1991; 324, 205-211
120. Smith JS. New aspects of rabies with of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis, prevention of the disease in the United States. *Clin Microb Rev.* 1996; 9(2): 166-176.
121. Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid flourescent focus test (RFFIT) for determing rabies neutralizing antibodies. In: Meslin IX, Kaplan MM, Koprowski H, eds. *Laboratory techniques in rabies*, 4<sup>th</sup> ed. Geneva: World Health Organization, 1996; 181-191.
122. Schneider MC, Belotto A,AdeMP, Leanes, L. F., Correa, E., Tamayo, H., Medina, G.,and Rodrigues, M. J. Epidemiologic situation of human rabies in Latin America in 2004. *Epidemiol. Bull.* 2005; 26:2-4
123. Schnell, M. J. & Conzelmann, K. K. Polymerase activity of in vitro mutated rabies virus L protein. *Virology* 214, 1995; 522-530.
124. Sodre MM, da Gama AR, and de Alameida MF. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. *Rev. Inst. Med . Trop. Sao Paulo* 2010; 52:75-81.
125. Sokol, F., D. Stancek y H. Kropowksi. Structural proteins of rabies virus. *Journal of Virology.* 1971; 7: 241-249.
126. Takamatsu, F., N. Asakawa, K. Morimoto, K. Takeuchi, Y. Eriguchi, H. Toriumi y A. Kawai. Studies on rabies virus RNA polymerase: 2. possible relationships between the two forms of the non-catalytic subunit (P protein). *Microbiology and Immunology.* 1998; 42: 761-771.
127. Teeling, E. C., Springer, M. S., Madsen, O., Bates, P., O'Brien S, J. & Murphy, W. J. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science* 2005; 307, 580-584.
128. Tordo, N., O. Poch, A. Ermine, G. Keith y F. Rougeon. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proceedings in the Natural Academy of Sciences.* 1986; 83: 3914-3918.

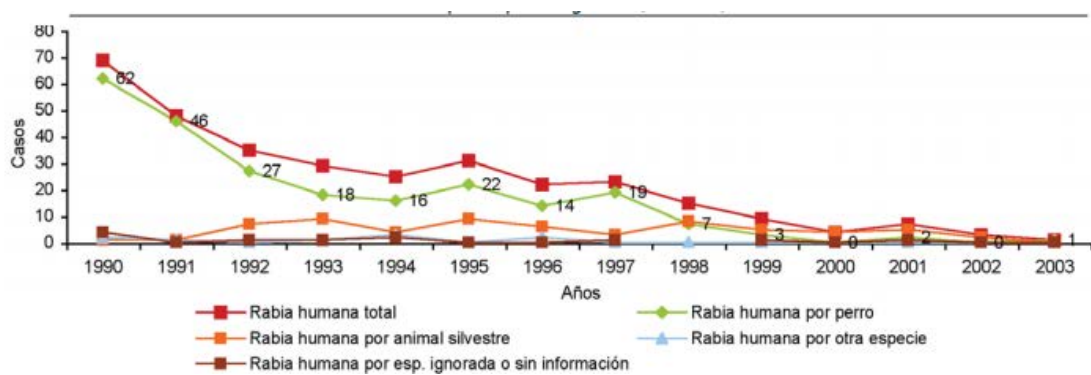
129. Tordo N., Badrane H., Bourhy H. and Sacramento D. Molecular epidemiology of
- a. Lyssaviruses: focus on the glycoprotein and pseudogenes. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 1993; 60: 3 15 -3 23.
  - b. *Veterinary Research* 1993; 60: 3 15 -3 23.
130. Tordo, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: MESLIN, F.
- a. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). *Laboratory techniques in rabies*. 4. ed.
  - b. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 28-51.
131. Tordo, N.; Charlton, K.; Wanderler, A. Rhabdoviruses: rabies. In: COLLIER, L.H.. *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*. London: Arnold Press, 1998; p. 666-692.
132. Tuffereau, C., J. Benejean, D. Blonde, B. Kieffer y A. Flamand. Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO Journal*. 1998; 17: 7250-7259.
133. Tuffereau, C., J. Benejean, A-M.R. Alfonso, A. Flamand y M.C. Fishman. Neuronal cell surface molecules mediate specific binding to rabies virus glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus on the surfaces of lepidopteran cells. *Journal of Virology*. 1998; 72: 1085-1091.
134. Tuffereau, C., E. Desmezieres, J. Benejean, C. Jallet, A. Flammand, N. Tordo y P. Perrin. Interaction of lyssaviruses with low-affinity nerve-growth factor receptor p75NTR. *Journal of General Virology*. 2001; 82: 2861-2867.,
135. Turmelle, A. S., Jackson, F. R., Green, D., McCracken, G. F. & Rupprecht, C. E. Host immunity to repeated rabies virus infection in big brown bats. *J Gen Virol* 2010; 91, 2360-2366.
136. Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L. & other authors (2000). *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses*. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press edn. San Diego: Elsevier Inc.
137. Velasco-Villa A., M. Gómez-Sierra., G. Hernández-Rodríguez, V. Juárez-Islas, A. Meléndez-Félix, F. Vargas-Pino, O. Velásquez -Monroy y A. Flisser. Antigenic Diversity and Distribution of Rabies Virus in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40 (3): 951-958.
138. Velasco-Villa A, Orciari LA, Juárez IV, Gómez SM, Padilla MI, Flisser A, Souza V, Castillo A, Franka R, Escalante MM, Sauri GI y Rupprecht. Molecular Diversity of Rabies Viruses Associated with Bats in Mexico and Other Countries of the Americas. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44 (5): 1697-1710.
139. Wilkinson, L.: Understanding the nature of rabies: An historical perspective. In: Campbell JB, Charlton KM (eds). *Rabies*. Kluwer Ac. Publ. Boston.1988; pp. 1-10.



140. Wimsott WA. Biology of bats, Division of Biological Science Cornell University. Academic Press. Reino Unido, 1970.
141. Warrell MJ, Warrell DA, The Lancet. Vol 363. Nuffield Department of Clinical Medicine, John Radcliffe Hospital. 2004.
142. World Health Organ (WHO). Rabies Facts in short. Geneva; 2006. [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/zoonotic/en/index4.html#vaccine](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/zoonotic/en/index4.html#vaccine)
143. <http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/vp/rabia-sit.htm>
144. WHO (2011). Rabies Information System of the WHO Collaboration Centre for Rabies Surveillance and Research: [en línea] Rabies-Bulletin-Europe. Disponible en Web: <http://www.who-rabies-bulletin.org>.
145. Winkler, W. G., Fashinell, T. R., Leffingwell, L., Howard, P. & Conomy, P. (1973). Airborne rabies transmission in a laboratory worker. *Jama* 226, 1219-1221.

## ÁPENDICE

Apéndice 1. Tendencia de la rabia humana por especie agresora, México, 1990-2003 OPS

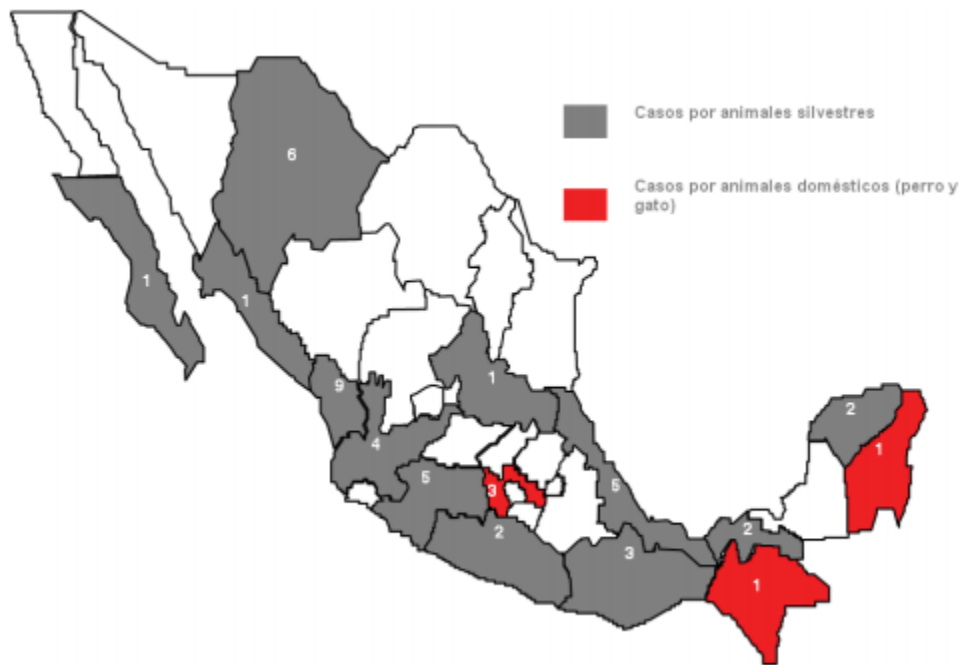


**Apéndice 2. Casos de rabia humana transmitida por cualquier especie, periodo 2006-2012 (CENAPRECE 2013)**

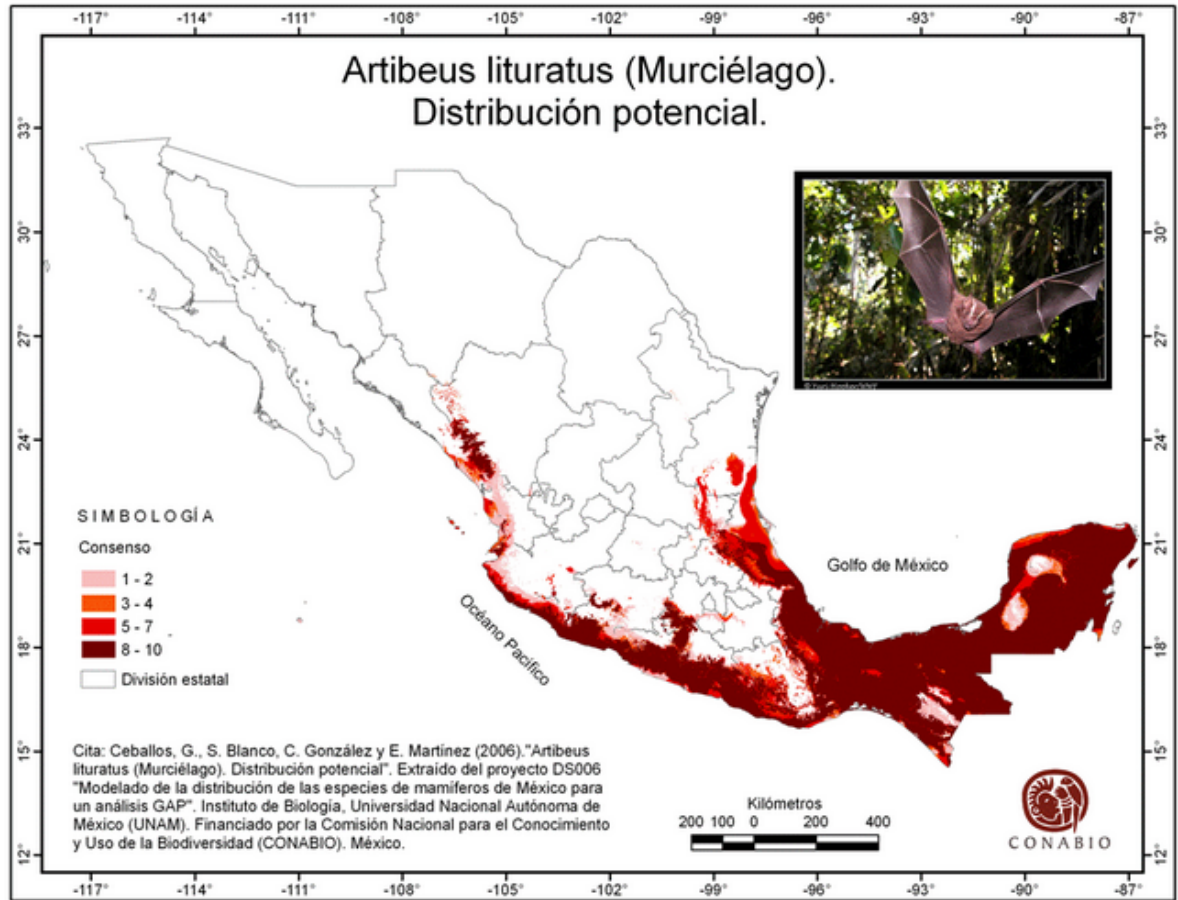
	Entidad	Jurisdicción	Municipio	Fecha de agresión	Fecha de defunción	Especie agresora
<b>2006</b>	1 Guerrero	Centro	Tlacoapa	15/06	12/08	Murciélago hematófago
<b>2007</b>	1 Veracruz	Jalapa	Chiconquiaco	28/03	5/05	Zorro
	2 Michoacán	Lázaro Cárdenas	Arteaga	14/04	11/05	Murciélago hematófago
	3 Michoacán	Lázaro Cárdenas	Arteaga	16/04	22/05	Murciélago hematófago
	4 Oaxaca	Valles centrales	San Coatlán Vicente	26/12	18/03	Zorro
<b>2008</b>	1 Jalisco	Puerto Vallarta	San Sebastián de Oeste	9/12	2/01	Murciélago hematófago
	2 Nayarit	Tepic	La Yesca	12/10	10/11	Vampiro
	3 Nayarit	Tepic	La Yesca	12/10	17/11	Vampiro
<b>2009</b>	1 Chihuahua	Creel	Nonoava	21/01	22/03	Zorrillo
	2 Chihuahua	Creel	Batopilas	01/04	01/05	Zorrillo
	3 Jalisco	Ameca	Hostotipaquillo	No hubo	17/05	Bovino
	4 Michoacán	Zitácuaro	Susupuato	21/05	26/06	Murciélago hematófago
<b>2010</b>	1 Nayarit	Tepic	El Nayar	04/03	19/04	Murciélago hematófago
	2 Michoacán	Zitácuaro	Huetamo	08/07	20/08	Murciélago hematófago
	3 Michoacán	Zitácuaro	San Lucas	15/07	22/08	Murciélago hematófago

	4	Guerrero	Costa chica	Ometepec	18/08	27/10	Murciélago hematófago
		<b>Entidad</b>	<b>Jurisdicción</b>	<b>Municipio</b>	<b>Fecha de agresión</b>	<b>Fecha de defunción</b>	<b>Especie agresora</b>
<b>2011</b>	1	Chihuahua	El Fuerte	Urique	10/01	14/02	Zorrillo
	2	Nayarit	Tuxpan	Huajicori	01/08	11/09	Murciélago hematófago
	3	Veracruz	Poza Rica	Cazones	09/09	02/10	Murciélago hematófago
<b>2012</b>	1	Nayarit	Tuxpan	Ruiz	05/12	12/12	Murciélago hematófago

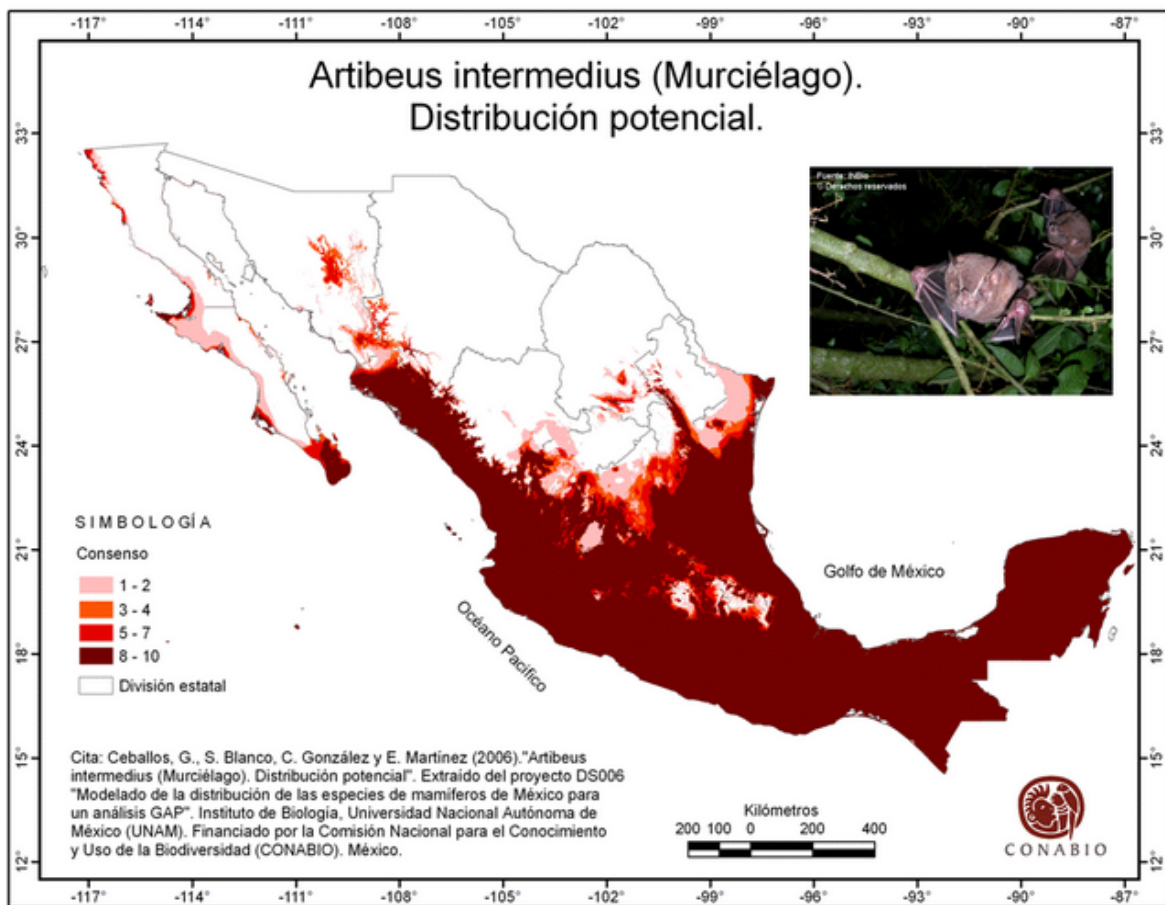
Apéndice 3. Mapa de los casos de rabia humana transmitida por cualquier especie, periodo 2006-2012 (CENAPRECE 2013)



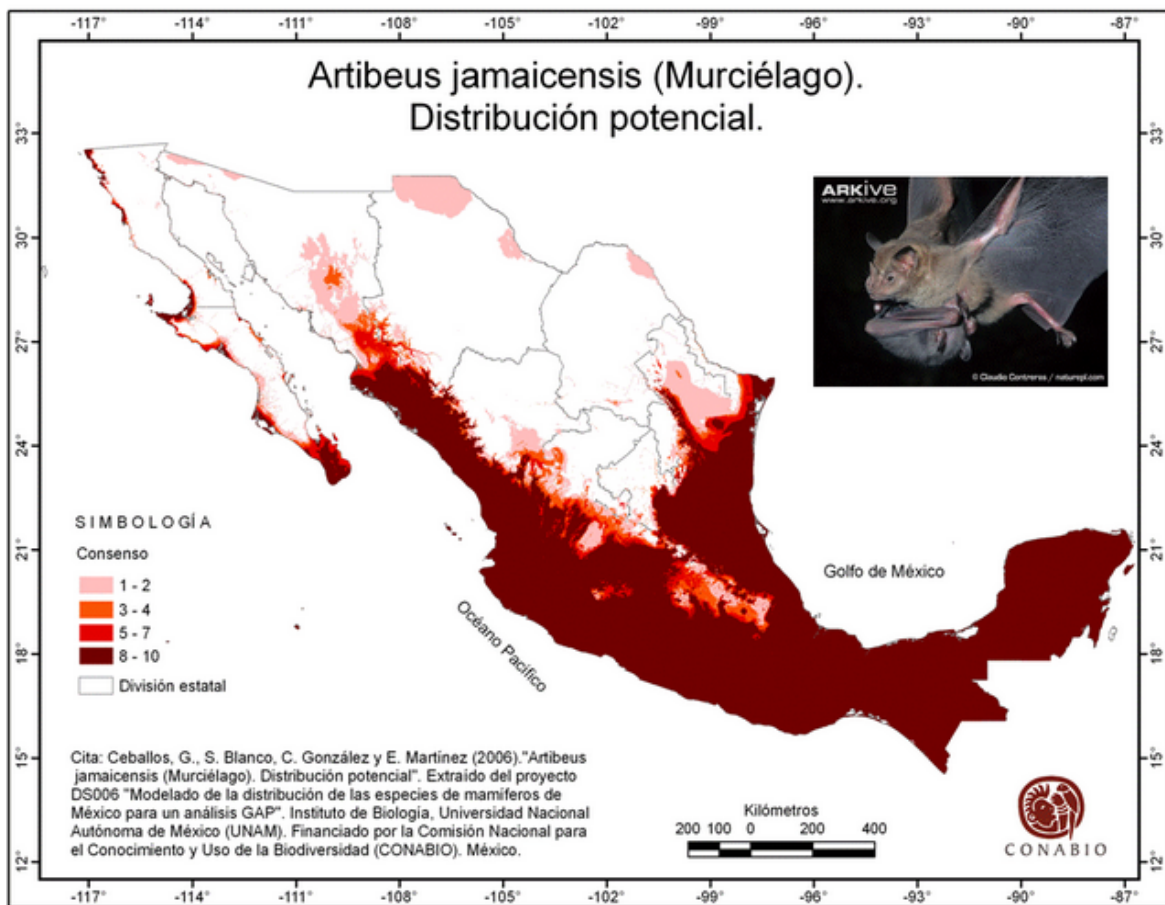
#### Apéndice 4. Distribución de *Artibeus lituratus* en México



## Apéndice 5. Distribución de *Artibeus intermedius* en México



## Apéndice 6. Distribución de *Artibeus jamaicensis* en México





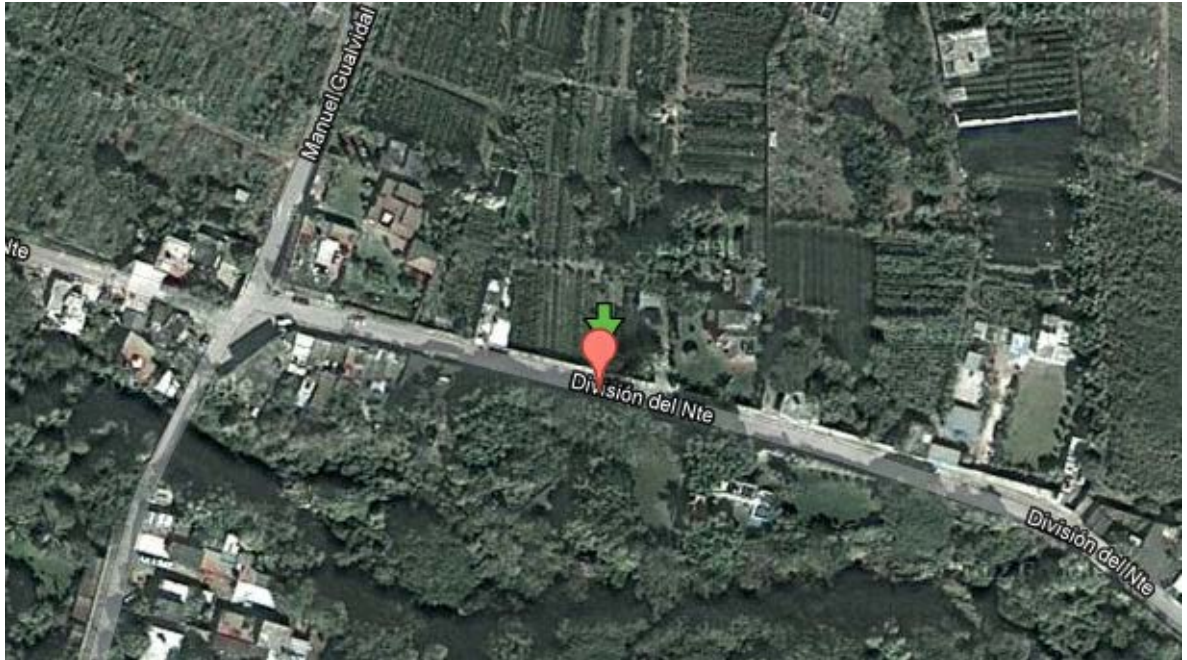
**Apéndice 7. Ficha técnica de la cepa 5020 variante 3 utilizada en este trabajo  
(CENAPRECE)**

<b>Estado</b>	<b>Guerrero</b>
<b>Jurisdicción sanitaria</b>	Centro
<b>a) Localidad del caso</b>	2006
<b>Año</b>	Tlacoapa
<b>Municipio</b>	San José Lagunas
<b>Localidad</b>	
<b>b) Fechas de</b>	
<b>La agresión</b>	15/07/2006
<b>Defunción</b>	12/08/2006
<b>c) Especie agresora</b>	
<b>perro</b>	No
<b>otro</b>	No
<b>cuál</b>	Murciélago hematófago
<b>d) Técnicas utilizadas y fecha de reporte</b>	Si
<b>IFD</b>	LESP Guerrero
<b>Nombre del laboratorio</b>	16/08/2006
<b>Fecha de reporte</b>	
<b>ACMO</b>	Si
<b>Variante antígeno</b>	Mab V-3 Quiróptero
<b>Fecha de reporte</b>	09/06/2006
<b>InDRE</b>	Si
<b>CDC</b>	No
<b>PCR</b>	No
<b>Secuencia</b>	S/INF
<b>Fecha de reporte</b>	S/INF
<b>InDRE</b>	No
<b>CDC</b>	No
<b>Solo evidencia clínico epidemiológica</b>	
<b>Por qué</b>	Es un niño de 6 años de edad que fue agredido por un murciélago en el rostro y quinto dedo de la mano derecha en la noche cuando dormía. Su casa se ubica en un área dispersa en el monte y corresponde a condiciones de marginación y pobreza extrema.
<b>Observaciones</b>	

Apéndice 8. Sitio en donde se realizó la colecta y mapa de la ubicación.

Cocoyoc Morelos

Cordenadas: 18.889612-98.977654



### Apéndice 9. Buffer de lisis

	X1	X50	X100	X500
Tiocianato de Guanidinio	<b>160 µl</b>	<b>8000 µl</b>	<b>16000 µl</b>	<b>80000 µl</b>
Citrato Sódico pH 7.0 1M	<b>5 µl</b>	<b>250 µl</b>	<b>500 µl</b>	<b>2500 µl</b>
DTT, 1M	<b>0.2 µl</b>	<b>10 µl</b>	<b>20 µl</b>	<b>100 µl</b>
Sarkosyl, 3%	<b>33.3 µl</b>	<b>1665 µl</b>	<b>3330 µl</b>	<b>16650 µl</b>
Glicógeno, 20mg/ml	<b>1 µl</b>	<b>50 µl</b>	<b>100 µl</b>	<b>500 µl</b>
Control Positivo RNA (Kit Promega)	<b>0.02 µl</b>	<b>1µl</b>	<b>2µl</b>	<b>10 µl</b>
H2O nucleasa free	<b>0.48 µl</b>	<b>24 µl</b>	<b>48 µl</b>	<b>240 µl</b>
TOTAL	<b>200 µl</b>	<b>10 ml</b>	<b>20 ml</b>	<b>100 ml</b>

Alicuotar a 5 ml en tubos de vial. Almacenar congelado a -20°C.

Identificar fecha de preparación en el tubo.

Apéndice 10. Detalles experimentales y resultados de laboratorio de la infección con la cepa 5020 experimento 1

Murciélago	VNA <sub>b</sub> 07/11/11	Pe_g_13/12/11	VNA 13/12/11	Pe_g_27/12/11	VNA 27/12/11	Pe_g_11/01/12	Pe_g_19/01/12	VNA 19/01/12	Inmunofluorescencia	PCR/Cerebro
15	negativo	44	0.28 UI	58	0.925 UI	46	44	0.91	Dudoso	Negativo
17	negativo	62	5.58 UI	66	21.89 UI	64	66	0.96	Negativo	Negativo
23	negativo	50	0.32 UI	56	Negativo	52	54	0.75	Dudoso	Negativo
3	negativo	46	1.65 UI	44	0.98 UI	***	***	***	Negativo	Negativo
20	negativo	48	23.5 UI	56	6.23 UI	48	50	0.75	Dudoso	Negativo
22	negativo	46	0.749 UI	50	1.028 UI	48	50	0.78	Negativo	Negativo
19	negativo	34	0.85 UI	34	4.08 UI	***	***	***	Negativo	Negativo
21	negativo	46	0.45 UI	48	10.05 UI	48	48	7.84	Negativo	Negativo
24	negativo	50	0.52 UI	54	0.76 UI	54	56	0.48	Negativo	Negativo
1	negativo	30	Negativo	30	3.4 UI	***	***	***	Negativo	Negativo
9	negativo	50	23 UI	50	21.89 UI	52	54		Negativo	Negativo
25	negativo	46	3.4 UI	48	4.81 UI	48	50	1.71	Negativo	Negativo
C1	negativo	50	Negativo	54	Negativo	54	54	0.84	Negativo	Negativo
C2	negativo	40	Negativo	40	Negativo	44	42	Negativo	Negativo	Negativo

Murciélago	Grupo	Sexo	Género	Especie	Estado reproductivo	AB <sub>mm</sub>	Captura y muestreo	Día de inoculación	Muerte	Pe_g_01/11/11	VNA <sub>b</sub> 07/11/11
15	Dosis baja SC	Hembra	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Adulta	60	18-sep-11	29-nov-12	19-ene-12	48	negativo
17	Dosis baja SC	Hembra	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Adulta	69	18-sep-11	29-nov-12	19-ene-12	72	negativo
23	Dosis baja SC	Hembra	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Adulta	68	18-sep-11	29-nov-12	19-ene-12	54	negativo
3	Dosis alta SC	Macho	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Adulto	65	18-sep-11	29-nov-12	02-dic-11	56	negativo
20	Dosis alta SC	Hembra	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Adulta	60	18-sep-11	29-nov-12	19-ene-12	54	negativo
22	Dosis alta SC	Hembra	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Adulta	66	18-sep-11	29-nov-12	19-ene-12	54	negativo
19	Dosis baja IM	Hembra	<i>Artibeus</i>	<i>jamicensis</i>	Juvenil	60	18-sep-11	29-nov-12	02-ene-12	38	negativo
21	Dosis baja	Hembra	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Adulta	63	18-sep-11	29-nov-12	19-ene-12	54	negativo

Murciélagos	VNA 07/11/11	Pe_g_13/12/11	VNA 13/12/11	Pe_g_27/12/11	VNA 27/12/11	Pe_g_11/01/12	Pe_g_19/01/12	VNA 19/01/12	Inmunofluorescencia	PCR/Cerebro
15	negativo	44	0.28 UI	58	0.925 UI	46	44	0.91	Dudoso	Negativo
17	negativo	62	5.58 UI	66	21.89 UI	64	66	0.96	Negativo	Negativo
23	negativo	50	0.32 UI	56	Negativo	52	54	0.75	Dudoso	Negativo
3	negativo	46	1.65 UI	44	0.98 UI	***	***	***	Negativo	Negativo
20	negativo	48	23.5 UI	56	6.23 UI	48	50	0.75	Dudoso	Negativo
22	negativo	46	0.749 UI	50	1.028 UI	48	50	0.78	Negativo	Negativo
19	negativo	34	0.85 UI	34	4.08 UI	***	***	***	Negativo	Negativo
21	negativo	46	0.45 UI	48	10.05 UI	48	48	7.84	Negativo	Negativo
24	negativo	50	0.52 UI	54	0.76 UI	54	56	0.48	Negativo	Negativo
1	negativo	30	Negativo	30	3.4 UI	***	***	***	Negativo	Negativo
9	negativo	50	23 UI	50	21.89 UI	52	54		Negativo	Negativo
25	negativo	46	3.4 UI	48	4.81 UI	48	50	1.71	Negativo	Negativo
C1	negativo	50	Negativo	54	Negativo	54	54	0.84	Negativo	Negativo
C2	negativo	40	Negativo	40	Negativo	44	42	Negativo	Negativo	Negativo

Murciélagos	PCR/Intestino	PCRa/Intestino	PCR/Hígado	PCRa/Hígado	PCR/Pulmón	PCRa/Pulmón
15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
17	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
23	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
21	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
24	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
25	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
C1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo



Apéndice 13. Detalles experimentales y resultados de laboratorio e la infección con la cepa 5020 experimento 3

Murciélago	Grupo	Sexo	Género	Estado reproductivo	AB_mm	Captura y muestreo	Día de inoculación	Muerte	Pe_g_02/10/12
1	Control	Macho	<u>Artibeus</u>	Adulto	63	02-sep-12	02-oct-12	05-oct-12	48
5	Control	Hembra	<u>Artibeus</u>	Adulta	58.8	02-sep-12	02-oct-12	04-dic-12	36
8	Control	Macho	<u>Artibeus</u>	Adulto	59	02-sep-12	02-oct-12	04-dic-12	48
2	<u>Intracerebral</u>	Macho	<u>Artibeus</u>	Adulto	64	02-sep-12	02-oct-12	22-oct-12	58
3	<u>Intracerebral</u>	Hembra	<u>Artibeus</u>	Adulta	64	02-sep-12	02-oct-12	16-oct-12	48
4	<u>Intracerebral</u>	Hembra	<u>Artibeus</u>	Adulta	64	02-sep-12	02-oct-12	04-oct-12	56
6	Macetero	Hembra	<u>Artibeus</u>	Adulta	65	02-sep-12	02-oct-12	04-dic-12	52
7	Macetero	Hembra	<u>Artibeus</u>	Adulta	68.5	02-sep-12	02-oct-12	04-dic-12	50
9	Macetero	Hembra	<u>Artibeus</u>	Adulta	68.5	02-sep-12	02-oct-12	04-dic-12	54
10	Subcutánea	Hembra	<u>Artibeus</u>	Adulta	66	02-sep-12	02-oct-12	04-dic-12	50
11	Subcutánea	Hembra	<u>Artibeus</u>	Adulta	67	02-sep-12	02-oct-12	04-dic-12	56
12	Subcutánea	Macho	<u>Artibeus</u>	Adulto	64	02-sep-12	02-oct-12	04-dic-12	54
									Pe_g_22/10/12
13	<u>Intracerebral</u>	Macho	<u>Artibeus</u>	Adulto	64	02-sep-12	22-oct-12	24-oct-12	44
14	<u>Intracerebral</u>	Macho	<u>Artibeus</u>	Adulto	64	02-sep-12	22-oct-12	28-oct-12	50
15	<u>Intracerebral</u>	Macho	<u>Artibeus</u>	Adulto	62	02-sep-12	22-oct-12	04-dic-12	52



Murciélago	Pe_g_04/12/12	Inmunofluorescencia	PCR/Cerebro	PCRa/Cerebro	PCR/Estómago	PCRa/Estómago	PCR/Corazón	PCRa/Corazón	PCR/Riñón	PCRa/Riñón
1	***	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
5	38	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	42	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	***	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	***	Positiva	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
4	***	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
6	58	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
7	56	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9	56	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10	52	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
11	48	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12	56	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
13	***	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
14	***	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15	52	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

□

Murciélago	PCR/Bazo	PCRa/Bazo	PCR/Intestino	PCRa/Intestino	PCR/Hígado	PCRa/Hígado	PCR/Pulmón	PCRa/Pulmón
1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
13	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
14	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo