



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**“Caracterización molecular del virus de la rabia
en coatíes (*Nasua narica*) de la Península de
Yucatán”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Médica Veterinaria Zootecnista

Presenta

Karla Paola Puebla Rodríguez

Asesora: Doctora Susana Mendoza Elvira

Co-asesora: Doctora Nidia Guadalupe Aréchiga Ceballos

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

"Caracterización molecular del virus de la rabia en coatis (Nasua narica) de la Península de Yucatán".

Que presenta la pasante: **Karla Paola Puebla Rodríguez**

Con número de cuenta: **311018259** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate	
VOCAL	M.V.Z. Rodolfo Córdova Ponce	
SECRETARIO	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
1er. SUPLENTE	Dra. Samantha Jardon Xicotencatl	
2do. SUPLENTE	Dra. Marcela Autran Martínez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/javg

Agradecimientos

Primero que nada, quiero agradecer a Dios, a la Diosa y al universo por mi vida y todas las bendiciones con las que me colman cada día de mi vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma mater, quien me acogió desde mis años de preparatoria. Siempre había sido un sueño para mí pertenecer a esta gran institución a la cual siempre llevaré en mi corazón con mucho cariño por todo el conocimiento que adquirí estos años, por permitirme formarme en una de mis pasiones desde pequeña: la Medicina Veterinaria y que además me dio algunos de los mejores años que he tenido hasta ahora en mi vida.

A mis padres, que este logro es tan mío como lo es de ustedes, porque sin el apoyo que me brindaron a lo largo de estos años hubiera sido imposible lograr este objetivo anhelado. Gracias por su amor, su tiempo, esfuerzo y por formarme como la persona que soy ahora. Gracias por enseñarme a ser valiente y no rendirme nunca, de dar lo mejor de mí en cada cosa que hago poniendo mi mayor esfuerzo y siempre con la mejor actitud posible.

A mi hermana Karina por estar presente a lo largo de toda mi vida, acompañándome y por el apoyo moral que me brinda a lo largo de cada etapa.

A mis abuelitos Adán y Justina, que siempre estuvieron conmigo cuidándome y no dudaron de mí. Siempre me ofrecieron su cariño incondicional. Siempre van a estar en mi corazón.

A mis tías de quienes aprendí mis primeras lecciones de feminismo y empoderamiento, porque siempre han sido un ejemplo para mí de superación como mujeres y como profesionistas. En especial a mis tías Rosa María, Margarita y Malena por siempre escucharme y apoyarme en cualquier momento.

A la Doctora Nidia Aréchiga, con la que estoy muy agradecida porque fue la primera que creyó en mí dándome la oportunidad de empezar esta experiencia y orientándome en la investigación. Gracias por que siempre me ha brindado todo su apoyo y ha resuelto mis dudas con paciencia. Compartiendo conmigo su experiencia y conocimiento. Por ser una motivación y modelo a seguir en mi desarrollo profesional y personal. Gracias de igual manera por su amistad y confianza para conmigo.

A la IBT Susana Chávez quien ha compartido su conocimiento conmigo, que siempre atendió todas mis dudas con paciencia y cariño. Quien para mí es un modelo a seguir. Por su sincera amistad y todas las pláticas y consejos.

Al Lic. Albert Sandoval que siempre me ofreció todo su apoyo en mi estancia en InDRE brindándome su amistad, ayuda y siempre teniendo un buen consejo que ofrecerme.

A Mauricio Gómez de quien he aprendido mucho, quien compartió su conocimiento y siempre resolvió todas las preguntas que hacía.

A la Maestra Cenia Almazán, quien me ofreció su amistad desde el momento en que la conocí, quien me ha enseñado prácticamente todo lo que se dé bioinformática. Quien con paciencia me mostro cada paso del proceso de la realización del análisis filogenético.

Al Biólogo Enrique Díaz, que a pesar de la distancia siempre ha sido un gran amigo y apoyo. Quien escucho atento cualquier problema y me ofreció su consejo para resolverlo.

A mi amiga y colega Martha Plascencia quien fue mi compañera durante toda la trayectoria universitaria, compartiendo conmigo cada clase, apoyándonos y trabajando en equipo. Y por todos los momentos de diversión que guardo en mi memoria con mucho cariño.

A todos ustedes quiero agradecerles desde el fondo de mi corazón por su ayuda y buena voluntad para la realización de este trabajo, mi formación como persona y mi desarrollo profesional. Sin dudas la vida me ha regalado y bendecido con personas increíbles que atesorare siempre.

Y desde luego a mis fieles perritos Puchi y Kivito quienes me acompañaron en todas las noches de desvelo siempre esperándome para ir a dormir no importara que tan tarde era.

Gracias, gracias, gracias.



EL COMITE DIRECTIVO INTERNACIONAL
DE RABIA EN LAS AMÉRICAS (RITA)
OTORGA ESTE RECONOCIMIENTO A

Paola Puebla-Rodríguez

Como expositora del Premio al Investigador Latino Americano
George M. Baer durante las sesiones orales, con el trabajo:

*Characterization of two rabies virus variants in white-nosed coatis
(Nasua narica) from Yucatan and Quintana Roo (2007-2020): Are coatis
emergent reservoirs of rabies virus in Mexico?*

Presentado durante la 31^a Reunión Internacional de Rabia en las
Américas RITA 2020 realizada de manera virtual desde la CDMX, del 28 al
30 de octubre de 2020.


Dra. Christine Fehlner-Gardiner
Presidenta, RITA
CFIA, Ottawa, Canadá


Dra. Veronica Gutiérrez Cedillo
Vicepresidenta, RITA
CENAPRECE, Ciudad de México, México

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INDICE DE ABREVIATURAS	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. La Rabia.	4
1.2. Virus de la Rabia.	6
1.3. Caracterización del Virus de la Rabia.	13
1.4. Evolución del Virus.	14
1.5. Patogenia.	17
1.6. El Coatí de nariz blanca (<i>Nasua narica</i>).	21
2. ANTECEDENTES	28
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. OBJETIVO	33
4.1. Objetivo general.	33
4.2. Objetivos particulares.	33
5. MATERIAL Y MÉTODOS	35
5.1. Muestras.	35
5.2. Preparación de suspensión viral.	36
5.3. Prueba Biológica en ratones destetados.	37
5.4. Aislamiento del virus de rabia en células de Neuroblastoma Murino CCL-131.	38
5.5. Prueba de Inmunofluorescencia directa (IFD) para la detección del Virus Rábico.	40
5.6. Caracterización antigénica del virus rábico con dos paneles de anticuerpos monoclonales (AcMo).	42
5.7. Extracción de RNA.	43
5.8. Retrotranscripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).	45

5.9.	Visualización de los Productos de RT-PCR.	47
5.10.	Secuenciación.	48
5.11.	Análisis de Secuencias.	51
6.	RESULTADOS	52
7.	DISCUSIÓN	61
8.	CONCLUSIÓN	70
9.	BIBLIOGRFÍA	71
10.	ANEXOS	83
11.	ÍNDICE DE FIGURAS	90
12.	ÍNDICE DE CUADROS	91

RESUMEN

El virus de la rabia es un virus RNA de cadena negativa perteneciente al género *Lyssavirus*. Los virus RNA presentan una tasa de mutación muy elevada y pueden llegar a presentar casos de “*spillovers*” (brincos a otras especies) o “*host switching*” (cambio de hospedero). En México, la transmisión de rabia de perro al humano se ha visto controlada gracias a las campañas de vacunación masiva. Actualmente, el principal problema es la transmisión de rabia vinculada a fauna silvestre a humanos y fauna doméstica. Caracterizar los virus involucrados en los brotes es de gran relevancia para la vigilancia epidemiológica y el establecimiento de las medidas de control necesarias. Los reportes de rabia en coatíes de nariz blanca (*Nasua narica*) en México son escasos y esporádicos. En 2008, se reportaron tres casos de rabia en coatíes en Quintana Roo, el virus involucrado se trataba de una nueva variante relacionada con murciélagos insectívoros. En este trabajo se analizaron siete muestras de coatí provenientes de dos estados de la Península de Yucatán, Quintana Roo (=3) y Yucatán (=4). Las 3 muestras de Quintana Roo fueron caracterizadas antigénicamente usando el panel de Anticuerpos Monoclonales (AcMos) (CDC) como “V9-Coati” y las 4 de Yucatán como “Variante Atípica”. Posteriormente, el gen que codifica para la nucleoproteína viral se amplificó mediante RT-PCR y se secuenció por el método Sanger. Se realizó un análisis Bayesiano para la reconstrucción filogenética, en este se observó que las muestras provenientes de Yucatán se agrupaban dentro del ciclo terrestre en el linaje que se ha denominado “Yucatán silvestre” del que los zorillos parecen ser los transmisores activos. Las muestras V9 se agruparon en el ciclo de rabia aéreo junto secuencias del linaje “V9-coati”. En conclusión, existen dos variantes independientes del virus de la rabia en coatíes de nariz blanca

de la Península de Yucatán, hasta el momento ambas solo se han registrado en un área geográfica restringida.

ABSTRACT

Rabies is a negative-strand RNA virus belonging to the *Lyssavirus* genus. RNA viruses have a high mutation rate and can present cases of “spillovers” (jumps or to other species) or “host switching” (change of host). In Mexico, rabies transmission from dogs to humans has been controlled by means of massive vaccination campaigns. Currently, the main problem is the transmission of rabies from wild fauna to humans and domestic fauna. Characterize the viruses involved in the outbreaks is relevant for epidemiological surveillance and the establishment of control measures. Reports of rabies in white-nosed coatis (*Nasua narica*) in Mexico are scarce and sporadic. In 2008, an outbreak with three cases in coatis was reported in Quintana Roo; the virus involved was a new variant related to insectivorous bats. In this work, we analyzed seven samples of coati from two states of the Yucatan Peninsula: Quintana Roo (=3) and Yucatán (=4). The 3 samples from Quintana Roo were antigenically characterized with Monoclonal Antybodyst test (CDC) as "V9-Coati" and the 4 from Yucatan as "Atypical Variant". The gene that encodes for the viral nucleoprotein was amplified by RT-PCR and sequenced by the Sanger method. A Bayesian analysis was performed for the phylogenetic reconstruction, in which it was observed that the samples from Yucatan were clustered within the terrestrial cycle within the lineage that has been called “Yucatan Sylvatic” , skunks seem to be the active transmitters of this variant. The three samples from Quintana Roo were grouped in the aerial rabies cycle along with sequences from the "V9-coati" lineage. In conclusion, there are two independent variants of the rabies virus

in white-nosed coatis of the Yucatan Peninsula. So far, both have a restricted geographic distribution.

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST. Basic Local Alignment Search Tool

CDC. Centers for Disease Control and Prevention

CENAPRECE. Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades

CONABIO. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad

IFD. Inmunofluorescencia directa

InDRE. Instituto De Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos

OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal

OMS. Organización Mundial de la Salud

OPS. Organización Panamericana de La Salud

PBS. Solución amortiguadora de fosfatos

RABV. Virus de la rabia

RNA. Ácido Ribonucleico

RNP. Ribonucleoproteína

RT-PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa

SNC. Sistema Nervioso Central

SSA. Secretaría de Salud

UICN. International Union for Conservation of Nature

VAg. Variante Antigénica

1.INTRODUCCIÓN

1.1. LA RABIA.

La rabia es una enfermedad zoonótica infecciosa que afecta el Sistema Nervioso Central (SNC) causando encefalomielitis (Velasco-Villa *et al.*, 2000), cuyos signos y síntomas varían según el individuo y la especie considerada. En consecuencia, el diagnóstico diferencial con otras encefalitis virales de etiología distinta es frecuentemente difícil o imposible (Bourhy y Sureau, 1993). Esta enfermedad es una de las principales zoonosis, en la que el ser humano no es el eslabón de la cadena que asegura la conservación y transmisión del virus en la naturaleza, es más bien considerado un hospedero accidental, que en la mayoría de los casos es el hospedero terminal (Carrada-Bravo, 2004). La rabia encuentra en todos los continentes (**Figura 1**) excepto en la Antártida; se ha registrado su existencia en 106 países, siendo el perro el transmisor principal (Carrada-Bravo, 2004).

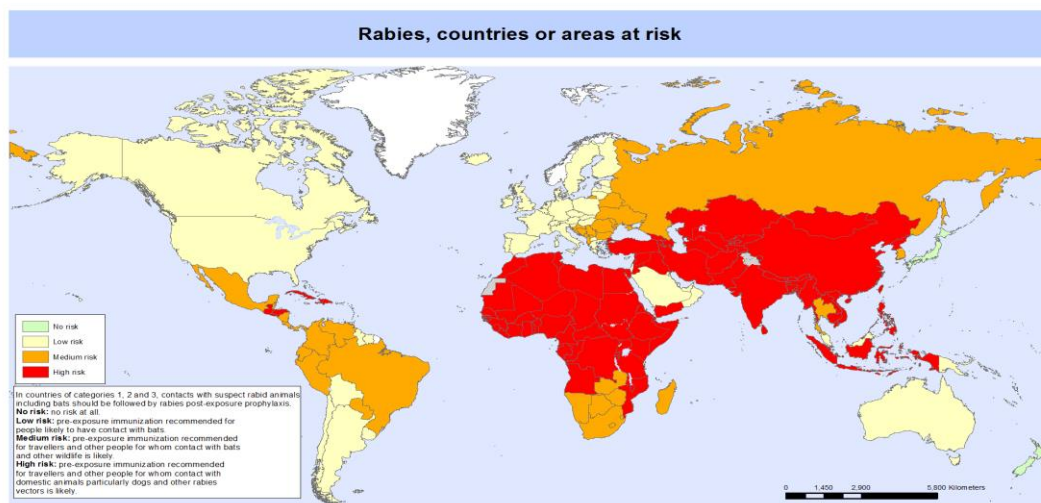


Figura 1. Distribución de la rabia. (OMS, 2013).

En países en donde el ciclo urbano de transmisión, es decir de perro a humano, ha sido eliminado, la transmisión es principalmente por fauna silvestre siendo los murciélagos los principales transmisores (OMS, 2013).

Actualmente, esta enfermedad continúa siendo la causa de aproximadamente 60,000 muertes al año en el mundo, aunque son África y Asia los dos continentes en donde se presentan más del 95% de los casos, y los niños representan un gran porcentaje de éstos (Davis *et al.*, 2015). A pesar de que es una enfermedad totalmente prevenible por vacunación y tratamiento profiláctico con inmunoglobulinas, que en el ser humano son altamente eficaces, en ocasiones las personas que las necesitan no tienen fácil acceso a ellas, ya que las poblaciones afectadas principalmente se encuentran en un nivel socioeconómico bajo y se localizan en zonas rurales remotas (OMS, 2019) o carecen de conocimientos de esta enfermedad y no acuden a recibir tratamiento.

Por su parte, el control y eliminación de rabia transmitida por perro se ha demostrado que es factible mediante programas de vacunación canina (OMS, 2013) tal como se ha llevado a cabo en México en donde se destaca la eliminación de los casos de rabia humana de origen canino y la reducción significativa en los perros, lo cual se ha logrado al aplicarse las actividades descritas en la NOM-011-SSA2-2011 “Para la prevención y control de la rabia humana y en los perros y gatos” y sus guías correspondientes.

La rabia sigue siendo un problema de salud pública y sin duda se trata de una zoonosis que se debe combatir con el modelo de gestión “Una sola salud”, donde diversos profesionistas de las áreas biológicas y sociales incluyendo, médicos humanos, médicos veterinarios, la población en general y los gobiernos deben trabajar en conjunto para la eliminación de esta enfermedad (Frantchez y Medina, 2018).

1.2. VIRUS DE LA RABIA.

El virus de la rabia (RV) pertenece al orden Mononegavirales dentro de la familia Rhabdoviridae llamado así por el característico virión de Rhabdovirus en forma de varilla o bala (Davis *et al.*, 2015). Dentro de esta familia, los géneros más estudiados son el *Vesiculovirus* representado por el virus de la estomatitis vesicular (VSV) y los *Lyssavirus*. Los miembros de este último se caracterizan por estar envueltos y tener genomas de RNA de cadena sencilla, de sentido negativo y no segmentado (Wunner y Conzelmann, 2013). La partícula viral mide de 100-300 nm de largo y 75 nm de diámetro, contiene una molécula de RNA constituida por aproximadamente 12 kb (Davis *et al.*, 2015). Se compone de dos unidades estructurales y funcionales: una nucleocápside helicoidal interna y una envoltura externa (OMS, 2013). El RV está formado por cinco proteínas estructurales (**Figura 2**) que incluyen N (nucleoproteína), P (fosfoproteína), M (proteína de matriz), G (glicoproteína) y L (proteína grande o RNA-polimerasa dependiente de RNA). El virus no tolera el pH debajo de 3 ni arriba de 11, se inactiva a la exposición de luz ultravioleta, la luz solar, la desecación, formaldehidos, tripsina, β -propionolactona y los detergentes (Carrada-Bravo, 2004).

Cada proteína viral es multifuncional y significativa para la patogenicidad (Kuzmin *et al.*, 2012; Wunner, 2007). Las proteínas L, N y P comprenden la ribonucleoproteína o el complejo RNP, junto con el RNA viral. Estos se agregan en el citoplasma de las neuronas infectadas por virus y componen los cuerpos de Negri, que se conoce como la lesión característica de la infección por el virus de la rabia. Mientras que las proteínas M y G están asociadas con la envoltura lipídica (Rupprecht, 1996).

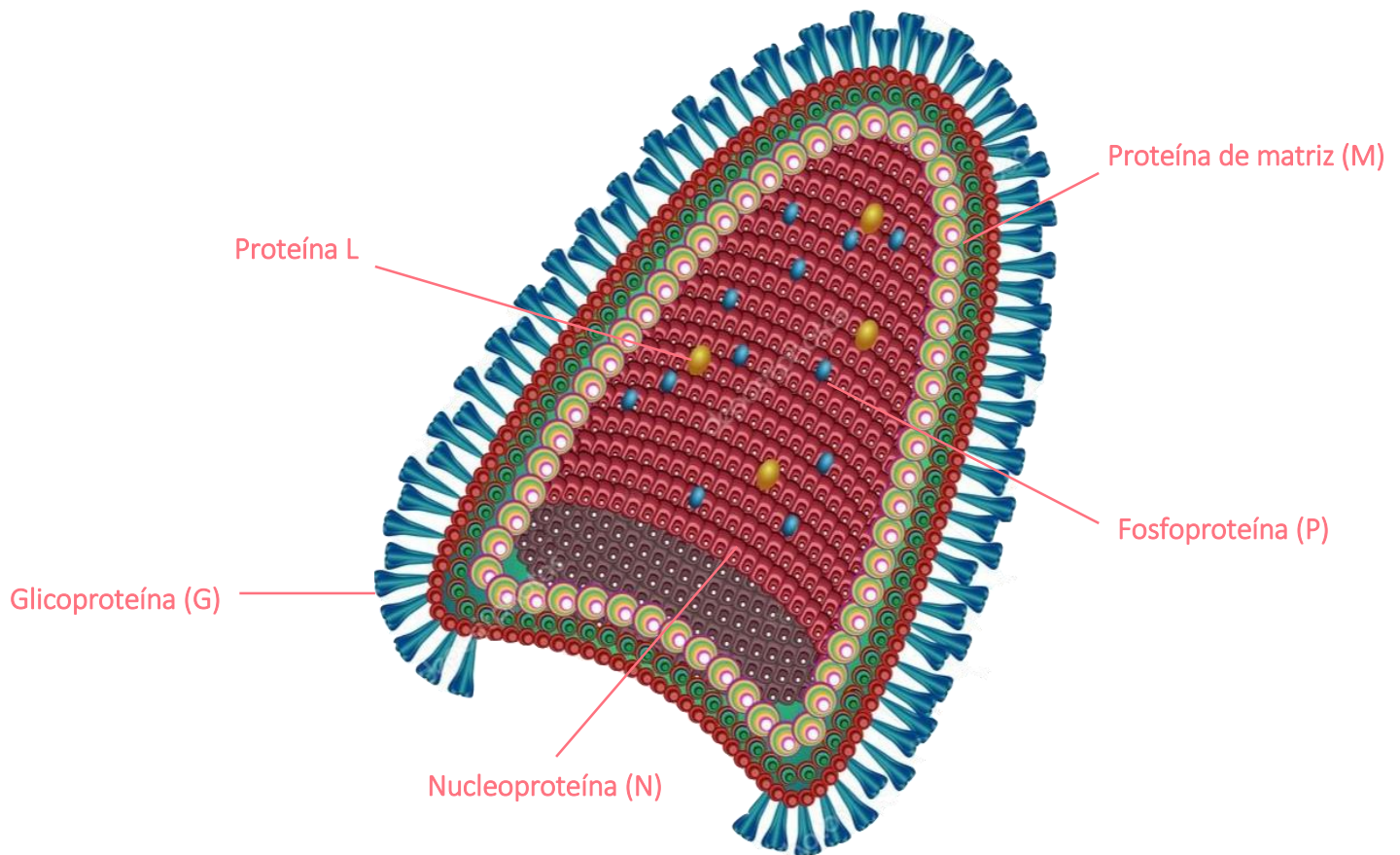


Figura 2. Partícula viral y las partes que lo componen. Tomada y modificada de:

<https://www.dreamstime.com/stock-images-diagram-rabies-virus-particle-structure-file-eps-format-image36842874>

Nucleoproteína N

La proteína más abundante en el núcleo del virus es la proteína N con 1325 a 1800 copias (Flamand, *et al.*, 1993; Madore e England, 1977), es la de mayor importancia diagnóstica al detectar su antígeno. Esta proteína encapsida al RNA viral de manera eficiente y específica para la correcta formación del complejo RNP (Martínez *et al.*, 2006) que sirve como molde para la transcripción (formación de los RNAm para la síntesis de las proteínas virales) y replicación del RNA (multiplicación del RNA viral) además de que

protege al RNA que recién se sintetizó de ataques efectuados por enzimas y también le confiere estabilidad funcional (Montano y Mata, 1996).

La nucleoproteína N presenta pocas variaciones entre las diferentes cepas (Wunner, *et al.*, 1988) esto la convierte en la proteína ideal para ser detectada en la prueba diagnóstica de oro: la Inmunofluorescencia directa (IFD) (Montano y Mata, 1996).

Por otro lado, existen diferencias de aminoácidos que proporcionan epítomos únicos y específicos de cada genotipo de esta proteína y que definen las relaciones antigénicas entre las cepas del virus y entre los genotipos en función de sus patrones de reactividad (antigenicidad) determinada con un panel de anticuerpos monoclonales (Dietzschold *et al.*, 1987; Flamand, Wiktor y Koprowski, 1980a, 1980b).

Proteína P

La proteína P contiene 297 aminoácidos y es la menos conservada de las cinco proteínas contenidas en el virus de la rabia. Se trata de una fosfoproteína, que no solo es de importancia para la transcripción y la replicación (Rupprecht *et al.*, 2002); si no que además se dice que es una proteína multifuncional y multifacética ya que interactúa con la proteína N para formar los complejos de NP, "vigila" a la proteína N que recién se haya sintetizado para evitar su auto polimerización (autoensamblaje) y la unión no específica al RNA celular (Mavrakis *et al.*, 2003).

La proteína P es responsable de inhibir la activación del factor regulador de interferón (IRF-3), el factor que se encarga de dar inicio a la respuesta de los interferones (IFNs) (Honda y Taniguchi, 2006).

Proteína M

La proteína de matriz, es la más pequeña de las proteínas viriónicas con 202 aminoácidos (Tordo *et al.*, 1988), y existe en dos isoformas: Ma y M β

(Ameyama *et al.*, 2003) que representa alrededor del 30% de las proteínas totales del virión (Montano y Mata, 1996).

Una función importante que lleva a cabo la proteína M es unirse y condensar al núcleo nascente en un complejo de proteína RNP-M helicoidal, para inmediatamente después formar una vaina muy enrollada alrededor del núcleo que produce la estructura característica del virus en forma de bala (Mebatsion *et al.*, 1999). También se encarga de mediar la unión de la estructura del núcleo viral a la membrana de la célula que infecta y es en este punto es donde da inicio la gemación del virus (Mebatsion *et al.*, 1999).

Glicoproteína G

La glicoproteína G contiene 524 aminoácidos, forma las protuberancias que cubren la superficie externa de la envoltura del virus, representa la proteína principal de la superficie del virión (WHO, 2011) y además esta proteína del RV que induce anticuerpos neutralizantes que son los principales efectores inmunes en la protección contra la infección viral (Rupprecht *et al.*, 2002; WHO, 2011).

Esta proteína es responsable de la interacción con los receptores de la célula, lo que la convierte en un factor clave para la patogénesis viral al apuntar a las células apropiadas para la infección (Sissoeff *et al.*, 2005).

Proteína L

Esta proteína es la de mayor tamaño y debe a su nombre del inglés “*large*” contiene 2,142 aminoácidos y constituye más de la mitad de las proteínas del virus de la rabia (54% aproximadamente) (Wunner y Conzelmann, 2013), es la más conservada de todas las proteínas de los virus RNA monocatenarios de polaridad negativa (Tordo, Poch, Ermine y Keith, 1988). Esta proteína es responsable de la mayoría de las actividades enzimáticas involucradas en la transcripción y replicación (Wunner y Conzelmann 2013).

Ningún anticuerpo monoclonal específico de la proteína L del virus rábico ha sido obtenido hasta hoy, lo que refleja el carácter universal de los motivos antigénicos que la proteína posee (Montano y Mata, 1996).

Estas cinco proteínas estructurales del virus están dispuestas en orden (3'-N-P-M-G-L-5') (**Figura 3**) (Wunner y Conzelmann, 2013).

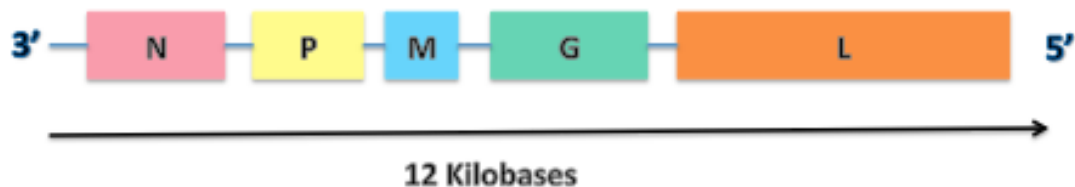


Figura 3. Genoma del virus de la rabia. Tomado y modificado de: CDC, 2019.

Actualmente se cuenta con el registro de 16 especies de *Lyssavirus* oficialmente reconocidas por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV del inglés: *International Committee on Taxonomy of Viruses*): Rabies lyssavirus (RABV), Lagos bat lyssavirus (LBV), Mokola lyssavirus (MOKV), Duvenhage lyssavirus (DUVV), European bat 1 lyssavirus (EBLV-1), European bat 2 lyssavirus (EBLV-2), Australian bat lyssavirus (ABLV), Aravan lyssavirus (ARAV), Khujand lyssavirus (KHUV), Irkut lyssavirus (IRKV), Shimoni bat lyssavirus (SHIBV), Bokeloh bat lyssavirus (BBLV), West Caucasian bat lyssavirus (WCBV), Ikoma lyssavirus (IKOV), Lleida bat lyssavirus (LLEBV) y Gannoruwa bat lyssavirus (GBLV) (ICTV, 2020).

Trece de las dieciséis especies de *Lyssavirus* se han logrado dividir al menos en dos filogrupos y posiblemente sean más, basándose en las distancias genéticas, en la reactividad serológica cruzada y su patogenicidad (Badrane *et al.*, 2001; Fooks, 2004).

- El filogrupo I comprende las especies: Rabies lyssavirus (RABV), European bat 1 lyssavirus (EBLV-1), European bat 2 lyssavirus (EBLV-2), Duvenhage lyssavirus (DUVV), Australian bat Lyssavirus (ABLV), Aravan lyssavirus (ARAV), Khujand lyssavirus (KHUV), Bokeloh bat lyssavirus (BBLV), Irkut lyssavirus (IRKV) y Gannoruwa bat lyssavirus (GBLV).
- El filogrupo II comprende las especies: Lagos bat lyssavirus (LBV), Mokola lyssavirus (MOKV) y Shimoni bat lyssavirus (SHIBV).
- Un posible filogrupo III comprendería a la especie: West Caucasian Bat virus (WCBV) una de las más divergentes del género, por lo que podría representar un nuevo filogrupo (Kuzmin *et al.*, 2005; Kuzmin *et al.*, 2008).

El resto de las especies del género *Ikoma lyssavirus* (IKOV) y *Lleida bat lyssavirus* (LLEBV), no han podido incluirse aún en ninguno de estos filogrupos, por lo tanto, se sugiere que debe considerarse representativo de uno o tal vez más filogrupos independientes (OMS, 2013).

Todas estas especies de *Lyssavirus* son capaces de provocar encefalitis, pero no todas tienen la misma capacidad de transmisión entre especies y tanto su distribución geográfica, como en reservorios se encuentran restringidas (Calisher y Ellison, 2012). Por lo que el RABV sigue siendo el de mayor importancia en Salud Pública ya que es el que cuenta con una distribución mundial y el que causa la mayor parte de decesos por encefalitis rábica.

El virus de la rabia es mantenido y transmitido por varias especies de animales que sirven como vectores y se dividen en dos grupos principales:

1. Carnívoros como: perros (*Canis lupus familiaris*), zorros (*Vulpes vulpes*), coyotes (*Canis latrans*), mapaches (*Procyon*) y zorrillos (*Mephitidae*).
2. Quirópteros como: murciélagos vampiros (*Desmodus rotundus*), insectívoros y frugívoros.

Si bien existen otras especies, como los rumiantes, equinos o humanos, que, aunque son susceptibles a la infección por el virus, no tienen un papel realmente importante en la propagación de dicha enfermedad (Loza-Rubio *et al.*, 1999). Los felinos son un caso especial ya que son vectores muy efectivos en la transmisión, pero no se ha comprobado que los gatos domésticos ni los salvajes funcionen como buenos reservorios (Rupprecht *et al.*, 2002).

Los ciclos de la rabia también se pueden dividir en urbana y silvestre. En el ciclo de la rabia urbana, que a pesar de su nombre incluye casos rurales, los perros domésticos son el transmisor principal. La rabia silvestre por su parte parece tener por el momento poco impacto en los países donde no se ha tenido un control adecuado a la urbana transmitida por el perro (Toro y Raad, 1997). De acuerdo con esta división de especies de vectores animales en las que circula el virus de la rabia y estudios genómicos de RNA viral, el virus de la rabia se subdivide en dos ciclos terrestre y aéreo (Loza-Rubio *et al.*, 1999).

En México los vectores terrestres urbanos están representados por perros y gatos, mientras que zorros, coyotes, lince (*Lynx*) y zorrillos son vectores terrestres del ciclo silvestre. El vector aéreo más importante es el murciélago vampiro (Loza-Rubio *et al.*, 1999). México cuenta con áreas tropicales y subtropicales, donde se pueden desarrollar ambos ciclos terrestres y aéreos, porque estos nichos ecológicos son compartidos por murciélagos vampiros y hospederos terrestres, por lo que es importante considerar esto para estudios epidemiológicos (Smith y Baer, 1988).

Sin duda el perro sigue siendo el mayor reservorio y vector de rabia en el mundo provocando, solo esta especie, aproximadamente 35,000 muertes en humanos cada año (Rupprecht *et al.*, 2002).

1.5 PATOGENIA.

El virus de la rabia es un virus altamente neurotrópico, debido a que se propaga a lo largo de los nervios e invade el sistema nervioso central (SNC), donde causa una infección (Jackson y Fu, 2013). La ruta más común y natural de exposición al virus de la rabia y la transmisión es a través de la saliva por una mordedura, rasguño o por la entrada de saliva infectada en las heridas abiertas o en mucosas, como la de la boca, la cavidad nasal o los ojos (OMS, 2013; OIE, 2014) aunque la contaminación de heridas frescas y abiertas con material infeccioso es otro medio de exposición al virus de la rabia, particularmente por ejemplo, si las heridas han sido infligidas por el animal a través de garras contaminadas con saliva (Manning *et al.*, 2008). Otra vía de transmisión es la ruta aérea, se ha demostrado que los murciélagos infectados naturalmente con RABV tienen virus en la mucosa nasal, lo que lleva a suponer que es posible la transmisión horizontal de RABV en el aire entre murciélagos que viven en áreas cerradas (Constantine *et al.*, 1972) pero se desconoce el mecanismo de transmisión del virus a través de la ruta aérea y la carga viral que se requiere para la dispersión (Winkler, 1975). Además, existe la posibilidad de exposición a través del tracto respiratorio en huéspedes susceptibles que ingresan a un área infectada (Atanasiu, 1965). Algunos estudios describen la infección tras la inhalación de una gran cantidad de aerosoles presentes en refugios donde existe una densa población de murciélagos (Constantine *et al.*, 1968; Johnson *et al.*, 2006) o los aerosoles generados por equipos de laboratorio durante los procesos de producción de vacunas (Winkler *et al.*, 1973). Excepcionalmente se han reportado casos de infección al ser trasplantado

un órgano de un paciente enfermo a uno sano (Toro y Raad, 1997; Zhang *et al.*, 2018).

El período de incubación es muy variable, regularmente suele ser entre 20 y 90 días, aunque existen casos en los que pueden tardar pocos días y otros casos en los que se tarda más de un año (Smith, 1991). La variación que presenta en su tiempo de incubación depende del tiempo que tarda el virus en viajar a lo largo de los nervios periféricos del sitio de inoculación al SNC (Baer y Cleary, 1972).

El virus de la rabia tiene afinidad casi exclusiva por el sistema nervioso y es gracias a la glicoproteína, que le da al virus la capacidad de unirse a receptores neuroespecíficos. Se han descrito tres receptores para el virus de la rabia: Receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), Receptor de la molécula de adhesión de células neurales (NCAM) y Receptor de neurotropina p75 de baja afinidad, de los cuales el más estudiado ha sido el primero. Estos receptores tienen un papel en la función celular normal y son secuestrados por el virus para ingresar a las células (Jackson y Fu, 2013).

- Receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR)

El primer receptor que se identificó fue el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) (presentes en neuronas y células de naturaleza no neuronal como queratinocitos, astrocitos, linfocitos, microglía, monocitos y macrófagos). El virus de la rabia se une a este receptor en la unión neuromuscular. En esta unión se localiza y concentra el virus en las células postsinápticas que hará más fácil la posterior absorción y transferencia de virus a nervios motores periféricos (Lentz *et al.*, 1982).

- Receptor de la molécula de adhesión de células neurales (NCAM)
El receptor NCAM (presente en neuronas, células de la glía y células del musculo esquelético), que es una glicoproteína de adhesión celular se ha identificado como receptor del virus de la rabia ya que no se encontró en la superficie de las células de líneas resistentes (Thoulouze *et al.*, 1998).
- Receptor de neurotropina p75 de baja afinidad
Es el receptor menos estudiado; este receptor se sugiere que es para el virus de la rabia del ciclo urbano (Tuffereau *et al.*, 1998).

La replicación del virus de la rabia se puede dividir en tres etapas. La primera etapa, o fase temprana, se trata de la unión del virus a los receptores de la célula blanco (Wunner y Conzelmann, 2013) y el inicio de su entrada al citoplasma por un proceso celular denominado "viropexis" o "mecanismo fagocítico" (Weiner y Fleming, 1984), enseguida el virus libera a la ribonucleoproteína (RNP) helicoidal en el citoplasma. La segunda, o fase media, incluye la transcripción y replicación del genoma viral y la síntesis de proteínas virales. Por último, la tercera o fase tardía incluye el ensamblaje del virus y la salida de la célula infectada (Wunner y Conzelmann, 2013).

El siguiente paso es el transporte del virus desde el sitio de inoculación periférica al SNC por transposición axonal rápida y en dirección retrógrada (Tsiang, Ceccaldi y Lycke, 1991) a una velocidad de 3 mm/hora, 5 cm/día aproximadamente (Jiménez *et al.*, 1996; Maton *et al.*, 1976). Una vez que llega al SNC la infección viral se realiza de forma rápida de neurona a neurona y principalmente en neuronas del hipocampo (Johnson, 1982). En el cerebro produce una polioencefalomielitis, es decir, una enfermedad inflamatoria que afecta predominantemente a la materia gris del cerebro y la médula espinal, (Love y Wiley 2002) es en este momento en donde inician

los signos clínicos y la diseminación centrífuga del SNC a sitios periféricos a lo largo de las rutas neuronales (Rossiter y Jackson, 2013). El sistema serotoninérgico también se ve afectado en los núcleos mesencefálicos en donde es secretada la serotonina, lo que resulta en un comportamiento agresivo en los animales, pero con la función cognitiva y motora adecuada para ejecutar una transmisión viral exitosa al morder (Smart y Charlton, 1992).

A pesar de los signos neurológicos clínicos dramáticos y severos que causa la rabia, los hallazgos histopatológicos suelen ser leves (Sarmiento *et al.*, 2005). El virus de la rabia no causa daño estructural notorio al SNC, el daño que causa se enfoca más a la función de las neuronas (Tsiang, 1982).

- Cambios Macroscópicos.

El virus de la rabia no causa lesiones macroscópicas notables en el cerebro, en algunas ocasiones se puede observar edema cerebral leve, congestión leptomeníngea y parenquimatosa (Lowenberg, 1928; Tangchai *et al.*, 1970). Pero no existe ninguna lesión macroscópica que sea clave para el diagnóstico de rabia.

- Cambios Microscópicos.

Al examen histopatológico, se puede observar en el SNC algunas lesiones que generalmente son muy leves, como la aparición de infiltraciones de células inflamatorias en las leptomeninges, aunque en diversos grados, también se llegan a observar manguitos perivasculares, activación microglial con formación de "nódulos de Babes" (Love y Wiley, 2002) y neuronofagia. Aunque se debe tener presente que ninguno de estos cambios es exclusivo ni representativos del virus de la rabia y se pueden observar en una amplia variedad de otras encefalitis causadas por virus (Love y Wiley, 2002).

En algunos casos se pueden observar en las neuronas infectadas, inclusiones intracitoplasmáticas neuronales (Negri, 1903 a, b) eosinofílicas, que es la lesión exclusiva de la rabia (Jackson y Fu, 2013).

1.3. CARACTERIZACIÓN DEL VIRUS DE LA RABIA.

El virus de la rabia clásica es el más distribuido en todo el mundo y tiene más importancia epidemiológica debido a su asociación con un número mayor de casos clínicos de rabia (Velasco-Villa *et al.*, 2002), este virus cuenta con variantes antigénicas (VAg) y esto se confirmó gracias a que se comenzó a usar la técnica con paneles de anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína N, con esta técnica se han identificado diferentes variantes de virus de la rabia en Europa, África, Asia y América, asimismo, se ha comprobado una variación genética del virus que depende de la especie animal a partir de la cual se hace el aislamiento y de la procedencia geográfica de esta, a esta técnica se le denomina caracterización antigénica (Germano *et al.*, 1990).

De las 11 VAg que existen en América, nueve se han encontrado en México, empleando un panel reducido de 8 anticuerpos monoclonales creado por el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*). VAg4, VAg7, VAg8, VAg9, VAg10 y VAg11, que han sido aislados de reservorios silvestres naturales; VAg1 aislado de perros; y VAg3 y VAg5 se ha aislado de hospederos no reservorios, en los que, por lo general, se observó más de una VAg (Velasco-Villa *et al.*, 2002).

La caracterización molecular se lleva a cabo mediante secuenciación genética y análisis filogenéticos; es importante porque facilita comprender mejor la relación entre las especies reservorios, regiones geográficas

relacionadas a cada reservorio y la posible transmisión del virus a nuevas especies, incluido el humano (Albas *et al.*, 2011); Ofreciendo así, una alternativa más específica y sensible para la tipificación del virus (Favoretto *et al.*, 2005).

1.4. EVOLUCION DEL VIRUS.

Existen cinco fuerzas de cambio evolutivo: Mutación, Recombinación, Selección Natural, Deriva Genética y Migración (Flujo Genético). Para los virus RNA se tiene más estudiado tres de estos cinco cambios: Mutación, Selección Natural y Migración (Moya *et al.*, 2014).

Cuatro propiedades básicas de la mayoría de las poblaciones de los virus RNA influyen en esto; **1.** Las poblaciones de estos virus tienden a tener un tamaño bastante grande; **2.** La forma en que llevan a cabo la replicación es muy rápida; **3.** La falta de actividad de revisión por parte de la polimerasa provoca que estos virus tengan la tasa de mutación más alta entre cualquier otro grupo de organismos, **4.** El tamaño que presentan los virus RNA en su genoma es pequeño (Moya *et al.*, 2014). Estas propiedades provocan que los virus RNA generen mutaciones en cada ciclo de replicación y algunas de ellas provocan que la progenie viral no pueda dividirse haciendo que el tamaño poblacional disminuya tanto, incluso pudiendo llegar a la extinción (Eigen, 1971; Maynard y Szathmáry, 1995). Sin embargo, en algunas ocasiones estos virus son capaces de producir mutaciones que favorecen su adaptabilidad en las especies reservorio y les facilita su establecimiento en nuevas especies de hospederos.

El virus de la rabia tiene diversos linajes filogenéticos que están asociados a especies hospederas, aunque se acepta la teoría que este virus evolucionó originalmente en los quirópteros y se introdujo en las poblaciones de carnívoros (Kuzmin *et al.*, 2012). Sin embargo, no todos los carnívoros y

murciélagos son reservorios, y ocasionalmente aparecen reservorios potenciales fuera de estos órdenes (Mollentze *et al.*, 2014).

Un "*host switching*" o cambio de hospedero sugiere un establecimiento del virus en una nueva especie hospedero (Badrane y Tordo, 2001), en donde la ecología y la genética son factores importantes para determinar si este virus puede cruzar con éxito los límites entre las especies (Morse, 1995; Daszak, Cunningham y Hyatt, 2000). Sobre los factores genéticos que influyen en la capacidad de los virus para cambiar de hospedero no se conoce mucho, pero se sabe que los virus RNA son mejores adaptándose a nuevos hospederos y se atribuye esta capacidad a la alta tasa de mutación que presentan. En el caso de RABV se ha descrito una tasa de 2.44×10^{-4} por nucleótido por año (Troupin *et al.*, 2016), pero no todos los virus RNA presentan esta capacidad tan desarrollada (Elena, 2002; Holmes, 2003).

El cambio de hospedero del virus podría ser explicado por etapas (**Figura 4**). La primera etapa se trata de la exposición del nuevo hospedero al patógeno; la segunda requiere que éste patógeno sea capaz de infectar al nuevo receptor y la tercera implica que el nuevo receptor, ya infectado, pueda transmitir posteriormente la enfermedad a coespecíficos así como que dicha transmisión se mantenga, siendo esta la cuarta etapa. La importancia del estudio de estos cambios es vital para la conservación de la vida silvestre por la aparición y propagación de enfermedades emergentes y de igual modo, el riesgo que implican para la exposición humana es de importancia en salud pública (Kuzmin *et al.*, 2012, Mollentze *et al.*, 2014).

	ETAPA	FACTORES ECOLÓGICOS	FACTORES DE EVOLUCION VIRAL
	I Exposición	- Contacto entre especies.	
	II Infección	-Transferencia del patógeno. -Numero de hospederos receptores.	-Relación filogenética del donante y del receptor. -Disponibilidad y densidad del receptor. -Suprime la respuesta inmune innata.
	III Transmisión	-Densidad del nuevo hospedero -Estructura social del nuevo hospedero	-Modificación del comportamiento del hospedero. -Eficiencia de replicación y transmisión viral.
	IV Establecimiento	- Crecimiento de la población del nuevo hospedero. - Velocidad de crecimiento de esta.	-La replicación y la transmisión viral se mantienen.

Figura 4. Modificado de Mollenteze *et al.*, 2014

1.6 EL COATÍ NARIZ BLANCA (*Nasua narica*).

La diversidad biológica de México ha sido reconocida ampliamente, la cantidad de mamíferos silvestres con los que cuenta nuestro país se estima en 564 especies (CONABIO, 2020) y aunque no existe una compilación actualizada sobre el número de mamíferos de todos los países del mundo, México se encuentra en el tercer lugar de países más diversos en cuanto a mamíferos se refiere (Ceballos y Arrollo- Cabrales, 2012; CONABIO, 2020).

Dentro de los mamíferos se encuentra el orden Carnívoro que está compuesto por 11 familias y subdividida en dos subordenes: Caniformia y Feliformia. (Eisenberg, 1989; Flynn y Nedbal 1998) Dentro del suborden Caniformia se deriva la familia Procyonidae que incluye especies pequeñas y medianas (**Figura 5**). Cuenta con 5 géneros y 14 especies (Wozencraft, 2005; Aranda Sanchez, 2012) (**Cuadro 1 y Figura 6**), se trata de una familia de amplia distribución en las Américas, en hábitats boscosos templados y tropicales y, ocasionalmente en desiertos y sabanas (Gompper, 1995). Incluye especies frugívoras arborícolas como los olingos (*Bassaricyon spp.*), los de cola prensil como las Martuchas (*Potos flavus*), omnívoros terrestres y arbóreos encontrados a través de diversos hábitats como cacomiztles (*Bassariscus spp*), Coatíes (*Nasua spp.*) y mapaches (*Procyon spp.*) (Zaveloff 2002). Cuentan con una fórmula dentaria de I 3/3, C 1/1, P 3-4/4 y M 1-2/1-2 (Aranda Sánchez, 2012).

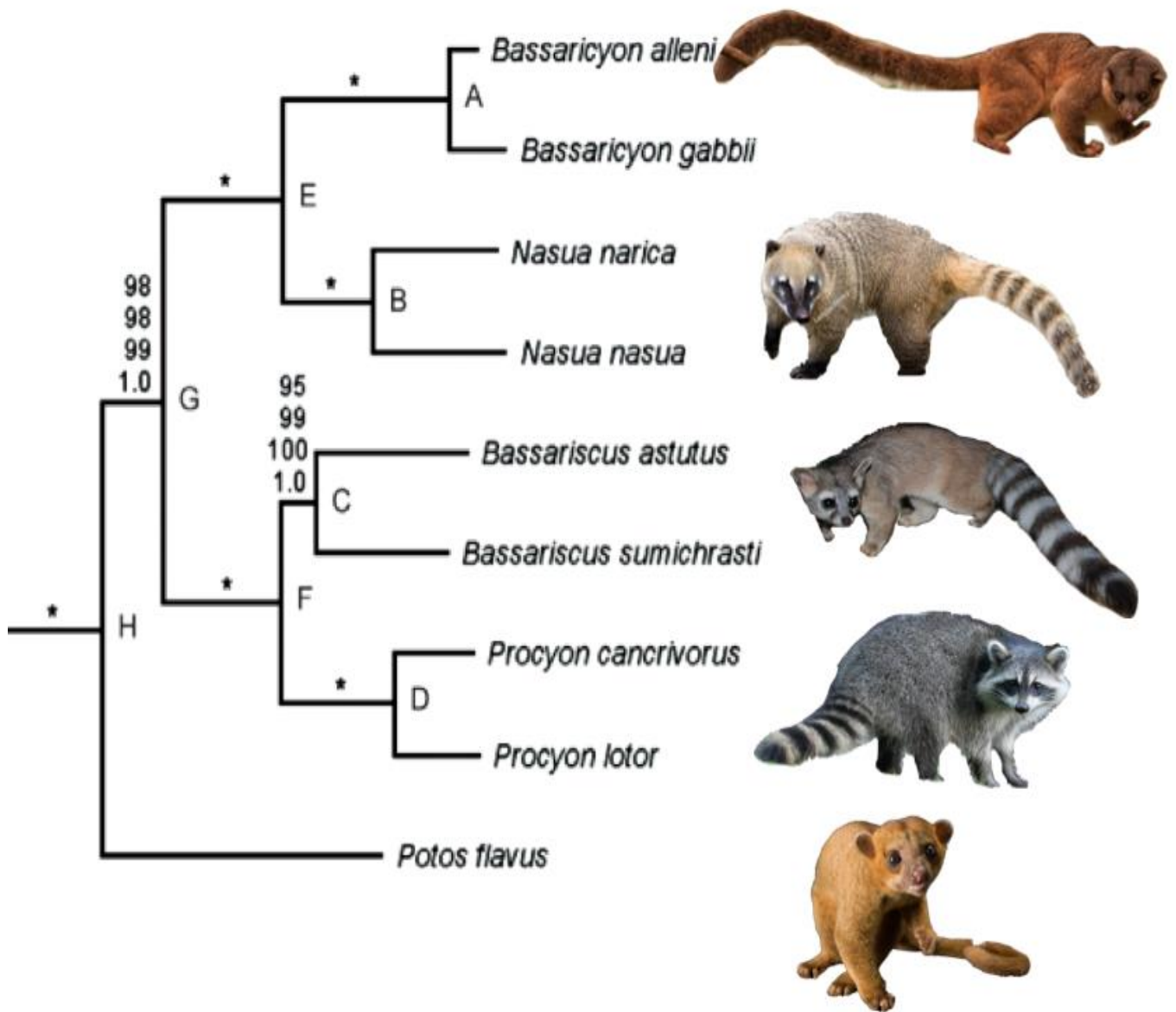


Figura 5. Filogenia evolutiva de la familia Procyonidae (Koepfli *et al.* 2007).

Cuadro 1. Nombre científico y común de todas las especies pertenecientes a la familia Procyinodae. Tomado y editado de Glatston, A.,1994.

Género: <i>Procyon</i>	
<i>Procyon lotor</i> *	Mapache común u osito lavador
<i>Procyon insularis</i> *	Mapache de las Tres Marías
<i>Procyon cancrivorus</i> *	Mapache cangrejero
<i>Procyon pygmaeus</i> *	Mapache enano de Cozumel
Género: <i>Nasua</i>	
<i>Nasua nasua</i> *	Coatí de cola anillada o sudamericano
<i>Nasua narica</i>	Coatí nariz blanca, centroamericano o mexicano
<i>Nasua nelsoni</i> (Subespecie)*	Coatí de la isla de Cozumel
Género: <i>Bassariscus</i>	
<i>Bassariscus astutus</i> *	Cacomiztle o gato de cola anillada
<i>Bassariscus sumichrasti</i> *	Cacomiztle centroamericano
Género: <i>Potos</i>	
<i>Potos flavus</i> *	Martucha, kinkayú
Género: <i>Bassaricyon</i>	
<i>Bassaricyon gabbii</i>	Olingo común o de cola espesa
<i>Bassaricyon alleni</i>	Olingo leonado o de Allen
<i>Bassaricyon beddardi</i>	Olingo de Guayana o de Pock
<i>Bassaricyon lasius</i>	Olingo costarricense o de Harry
<i>Bassaricyon pauli</i>	Olingo chiriqui

* Especies presentes en México

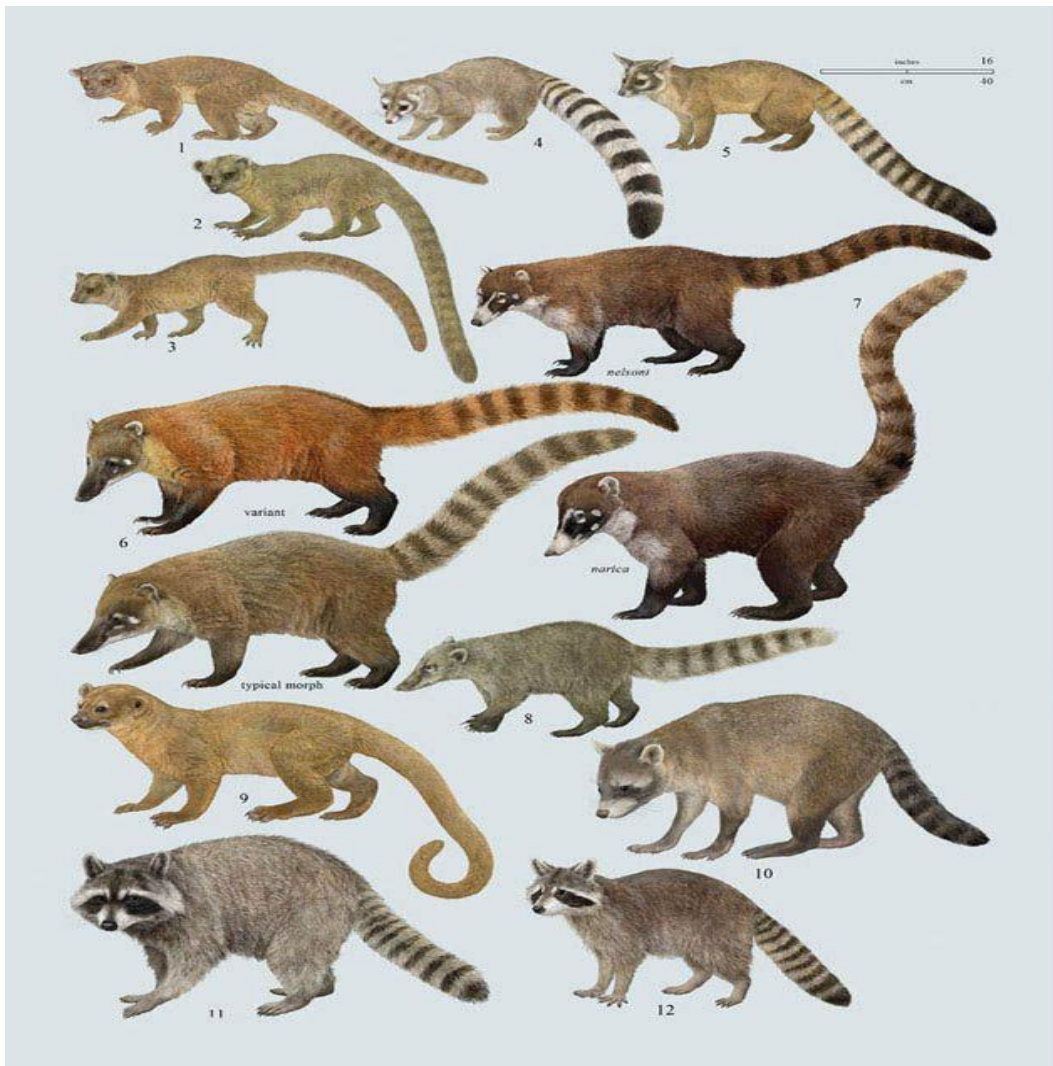


Figura 6. Especies pertenecientes a la familia Procyonidae. Tomada de: Handbook of the Mammals of the World – Volume 1.

En México existen seis especies diferentes de prociónidos, una de ellas es el Coatí de nariz blanca, pizote o tejón (*Nasua narica*) (**Figura 7**) (Valenzuela, 2005). La palabra *Nasua* proviene del latín *nasus*, nariz, y el epíteto *narica* se deriva de dos palabras del latín *naris* ventana de la nariz e *-ica* sufijo que significa pertenece a, que hace referencia a la larga y flexible nariz que caracteriza a estos animales (Tirira, 2004).

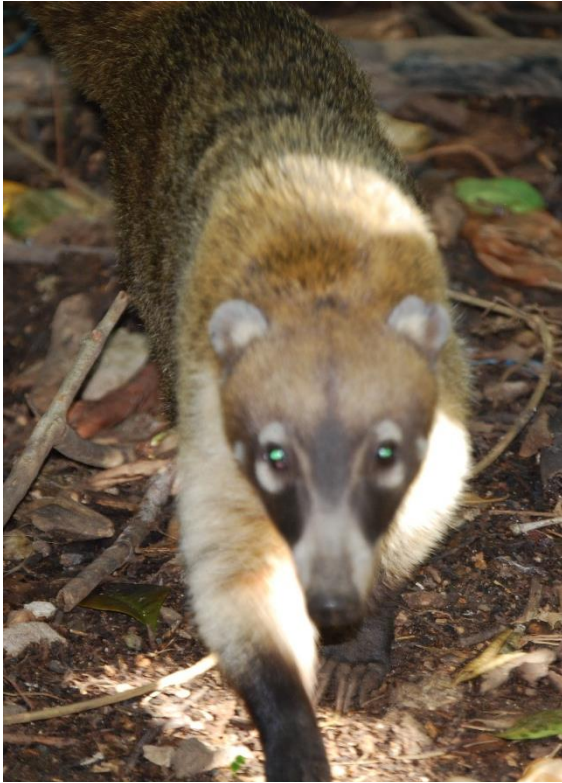


Figura 7. *Nasua narica* Fotografía:
Nidia Aréchiga

Los coatíes son animales de talla mediana. Su cuerpo es largo y esbelto (Figura 8). La cabeza es de forma alargada, tienen un hocico largo y móvil, la nariz está levemente dirigida hacia arriba. Las orejas son pequeñas, redondeadas cubiertas por completo de pelo, las extremidades cortas y la cola es larga pudiendo alcanzar el 75% de la longitud de la cabeza y cuerpo juntos, densamente peluda y con la punta de color marrón oscuro y puede llegar a presentar anillos que son poco contrastantes en la cola (Gompper, 1995). El color del dorso varía de tonos castaños-oscuros y castaños-rojizos hasta castaño-dorado; en el cuello y los hombros tienden a ser castaños-rojizos. El pelo que recubre las áreas del borde de las orejas, garganta, barbillas, alrededor de los ojos y punta del hocico tiene una coloración blanquecina o amarillenta mucho más clara que el resto del cuerpo. Alrededor de los ojos, tienen una mancha en tonos café oscuros a manera de antifaz (Valenzuela, 2005). Presenta unas garras bastante largas y rígidas en las patas anteriores y cortas, curvas y fuertes en las posteriores (Kays, 2009). Los animales adultos pesan entre 3 a 6 kilos (Aranda Sánchez, 2012). Su forma de caminar es plantígrada y llegan a alcanzar velocidades de 27 kilómetros por hora, también son buenos nadadores, aunque solo entran al agua si es extremadamente necesario (Valenzuela, 2005).

Los coatíes son animales de talla mediana. Su cuerpo es largo y esbelto (Figura 8). La cabeza es de forma alargada, tienen un hocico largo y móvil, la nariz está levemente dirigida hacia arriba. Las orejas son pequeñas, redondeadas cubiertas por completo de pelo, las extremidades cortas y la cola es larga pudiendo alcanzar el 75% de la longitud de la cabeza y cuerpo juntos, densamente peluda y con la punta de color marrón oscuro y puede llegar a presentar anillos que son poco contrastantes en la cola (Gompper, 1995). El color del dorso varía de tonos castaños-oscuros y

Son animales de hábitos gregarios, sociales, diurnos y activos en el suelo como en los árboles (Aranda Sánchez, 2012). Tienen el sentido del olfato muy bien desarrollado es por esto que para la búsqueda de alimento lo ocupan más que la vista (Vallejo, 2019). Aunque su clasificación taxonómica los ubica dentro los carnívoros, su alimentación es omnívora, consumen principalmente frutas e insectos y en menor cantidad vertebrados pequeños (Valenzuela, 1998).

Las bandas están compuestas por hembras adultas con sus crías, mientras que los machos adultos solo son aceptados durante la época de apareamiento y poco antes de que nazcan las crías son alejados por las hembras y estos hacen vida solitaria (Valenzuela, 2005).



Figura 8. Morfología del Coatí. Fotografía: Nidia Aréchiga

La época de apareamiento es aproximadamente de dos semanas entre enero y marzo, el número de crías por camada varía de 1 a 7 crías con un periodo de gestación que oscila alrededor de los 70 días (Valenzuela, 1998). En vida libre se han registrado coatíes de hasta 7 años de vida y en cautiverio coatíes de hasta 17 años de vida (Valenzuela, 2005).

Tienen comportamiento social, que incluye acicalamiento, cuidado, vigilancia, y comportamientos anti predadores (Kaufmann, 1962; Smith, 1980). Esta especie es muy vocal, tienen vocalizaciones específicas para agresión, apaciguamiento, alarma y para mantener contacto entre individuos (Gompper, 1995). Las vocalizaciones consisten en chillidos de

frecuencias ultrasónicas que van de 30 a 55 kHz (Maurello *et al.*, 2000). Los coatíes son importantes para el hábitat ya que son dispersores de algunas semillas de los frutos que consumen (Russell 1982; Sáenz 1994) y forman parte de la dieta de los grandes depredadores tropicales como el jaguar (Núñez *et al.*, 2000). Los sitios de descanso nocturnos son cuevas, grietas, huecos o ramas altas de los árboles (Valenzuela, 2005).

El rango de distribución del coatí de nariz blanca se extiende en la región Neártica y Neotropical, en el Continente Americano se localiza desde el Norte de Colombia hasta el suroeste de los Estados Unidos. Habitan todos los tipos de bosque tropical, incluyendo manglar, bosque mesófilo de montaña, bosques mixtos de coníferas y encinos (Aranda Sánchez, 2012), desde el nivel del mar hasta 3,500 msnm (Gompper 1995). En la República Mexicana, la especie se encuentra en todo el país, excepto en Baja California y parte del centro y norte del país, y es más común en las laderas costeras del Océano Pacífico y el Golfo de México (**Figura 9**) (Aranda Sanchez, 2012).

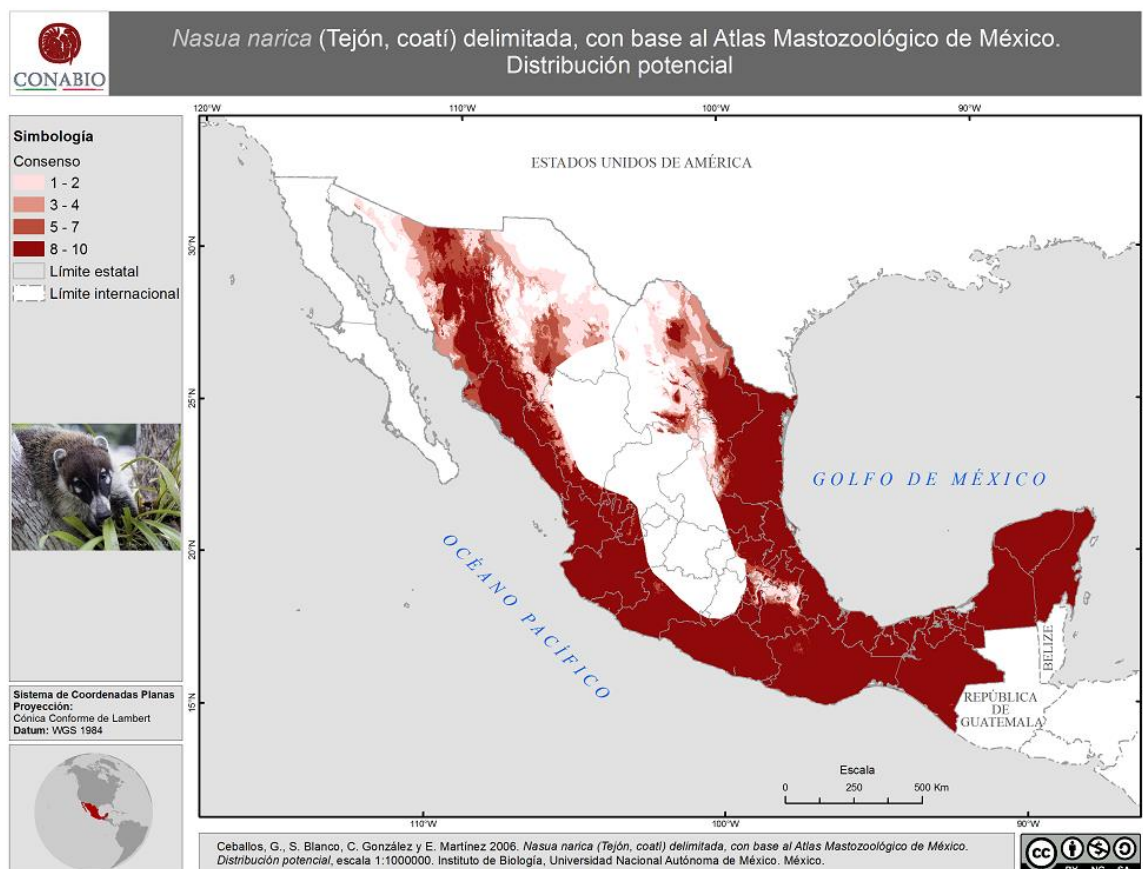


Figura 9. Se observa en color rojo el rango de distribución del Coatí de nariz blanca en la República Mexicana (CONABIO,2020).

Dentro de La Lista Roja de la UICN de especies amenazadas “*The IUCN Red List Of Threatened Species*” que publica la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) “*International Union for Conservation of Nature*” al coatí de nariz blanca se le considera como preocupación menor, aunque el número exacto de esta especie es desconocido y las estimaciones de población varían de raras a comunes. En las poblaciones de coatíes, dentro de México, se han visto severamente reducidas e incluso extirpadas de algunas regiones (Valenzuela y Ceballos, 2000). Las densidades de población muestran fluctuaciones de año a año en el tamaño de la población como resultado de enfermedades o la disponibilidad de alimentos (Wright *et al.*, 1999, Wright y Duber, 2001).

A pesar de esta situación en México no se tiene al coatí de nariz blanca en una situación especial de conservación ya que en algunos lugares se le considera un animal abundante y no se cuenta con registros exactos del estado de sus poblaciones (Ceballos y Arrollo- Cabrales, 2012).

2. ANTECEDENTES

La primera epizootia de rabia que se tiene registrada en México se remonta al año de 1709 que no solo afectó a perros, también se vieron involucrados ganado y seres humanos. Desde entonces el perro callejero representaba un problema de salud pública severo y el panorama epidemiológico no era muy alentador ya que se seguían presentando cientos de caso de rabia humana y canina en todo el país (SSA, 2001).

En los años sesenta, la decisión de disminuir y eliminar esta enfermedad dentro de México, llevó a tomar medidas para lograr este fin; es por esto que en el año de 1968 se realizó la primera campaña masiva de vacunación antirrábica en perros y gatos, dentro del Distrito Federal, con un biológico de alta calidad y además de ofrecer atención oportuna a pacientes expuestos. Trayendo resultados positivos, ya que la incidencia tanto en los casos humanos y caninos disminuyeron notablemente (SSA, 2001 y 2015).

Desde entonces, hasta el día de hoy, las acciones tomadas por el sector salud como el ofrecer información educativa en función de una vigilancia epidemiológica eficaz, atención médica oportuna y adecuada, vacunación antirrábica canina y control tanto de la población canina como la del murciélago hematófago (vampiro) y vacunación de otras especies domésticas susceptibles, han logrado mantener controlados estos casos, tanto que para el año de 2006 se registró el último caso de rabia humana transmitida por perro (SSA, 2015), razón por la cual en 2019, México se convirtió en el primer país con el reconocimiento de "País libre de rabia humana transmitida por el perro como problema de salud pública" otorgado por la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) (OPS, 2019).

México es un país con una amplia biodiversidad en el que a través de los años se han detectado la presencia de diferentes ciclos enzoóticos de rabia, además de que, reservorios silvestres han cambiado la distribución geográfica, lo que provoca que esta enfermedad siga siendo de interés en salud pública y nos mantenga en un panorama en donde es difícil de erradicar, por lo que la vigilancia y el control son puntos importantes.

Entre los años de 2007 al 2020, dentro del Boletín Epidemiológico emitido por la Secretaría de Salud, se tienen registrados más de 120 mil casos de personas atacadas por mamíferos silvestres en todo el país (**Figura 10**). En este mismo periodo de tiempo los animales silvestres que se analizaron con más frecuencia fueron: Quirópteros, Zorrillos, Zorros y Coatíes.

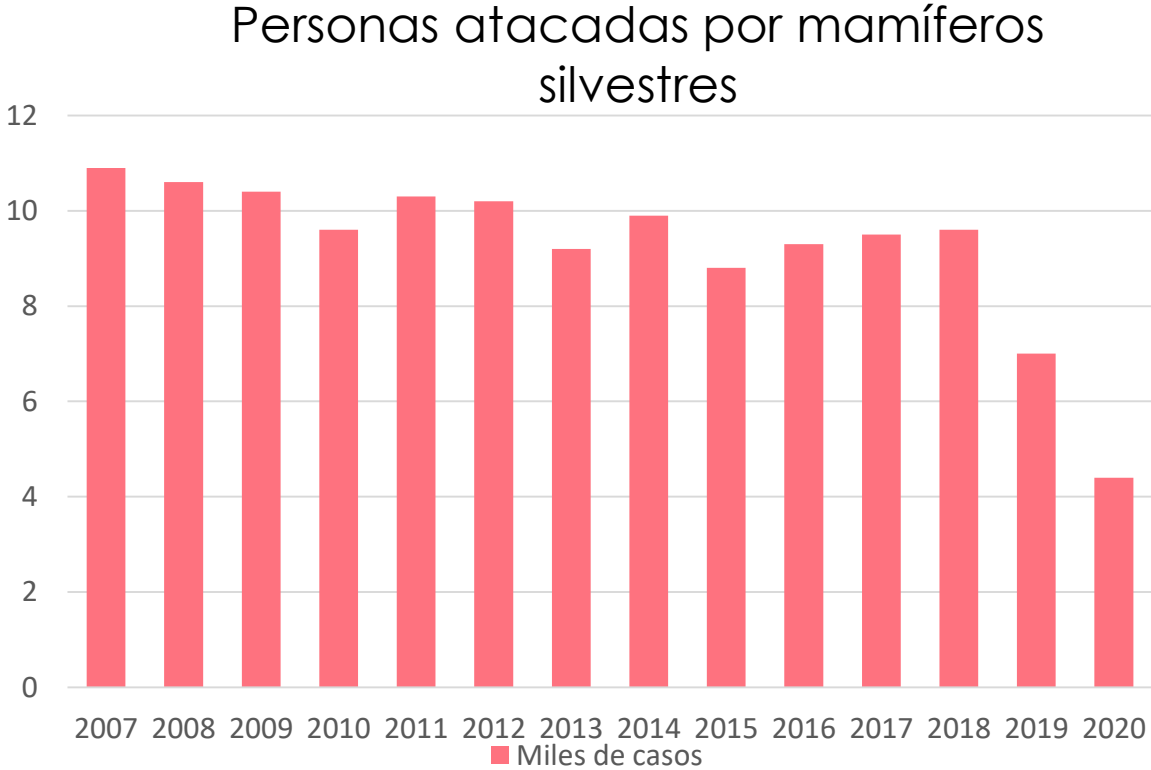


Figura 10. Personas atacadas por mamíferos silvestres al año en México.
Fuente: Boletín Epidemiológico. Dirección General de Epidemiología.

En México, existen diversos estudios de agentes patógenos en coatíes de nariz blanca, entre ellos, ectoparásitos tal como *Notoedres cati* (Valenzuela et al., 2000), hemoparásitos como *Trypanosoma cruzi* (Martínez-Hernández et al., 2014), endoparásitos (Helmintos y Protozoarios) (Rendon-Franco et al., 2019), bacterias como *Salmonella* (De-la-Rosa-Aranda et al., 2016) y en virus como *Orthopoxvirus* (Gallardo-Romero et al., 2016) y rabia (Aréchiga-Ceballos et al., 2010).

Sin embargo, los reportes de rabia en coatíes en México son escasos y el antecedente más antiguo se diagnosticó en el Laboratorio de Rabia del InDRE en 1993 al cual no se le realizó ninguna caracterización posterior y del cual ya no se cuenta con material biológico para realizar estudios posteriores.

En 2008 se presentó un brote de rabia con tres casos en coatíes del Parque Nacional Kabah en Cancún en el estado de Quintana Roo, México. La prueba que se utilizó para confirmar el diagnóstico fue la Inmunofluorescencia Directa (IFD) y los individuos se identificaron infectados con la variante 9, asociada a murciélagos *Tadarida brasiliensis mexicana* en México y Estados Unidos. Mediante análisis filogenéticos se propuso que este virus de la rabia, evolucionó y ahora se presenta como variante independiente a pesar de compartir ancestro en común con la variante 9 del murciélago lo que sugiere un evento de "host switching" (Aréchiga-Ceballos et al., 2010).

Si ha habido reportes de interacción entre coatíes y humanos, entre el año 2018 al 2020, en el estado de Yucatán se tiene registro de un total de 37 ataques de coatíes a humanos.

Más evidencias del virus de la rabia encontrado en coatíes, de especies diferentes, pero del mismo género, se reportan en Brasil. En la ciudad de Sao

Pablo, entre los años de 1994 y 1997, de los 170 casos de rabia registrados en animales silvestres, dos fueron en coatíes de cola anillada (*Nasua nasua*) (Almeida *et al.*, 2001). Al año siguiente se reportó como positivo por la prueba de IFD a un coatí el cual también se caracterizó con anticuerpos monoclonales (Favoretto *et al.*, 2002). Para el año de 2010 se reportó el ataque de un coatí a dos niños en donde las causas que motivaron al coatí a atacar se desconocen, pero se les aplicó el esquema profiláctico de rabia correspondiente a los pacientes (Bittner *et al.*, 2010). Mientras que para el año 2014 en un estudio de detección de anticuerpos contra rabia en mamíferos salvajes terrestres en la selva de la costa Norte en Sao Paulo, dos coatíes resultaron positivos (Araujo *et al.*, 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

En México el problema de rabia humana transmitida por perro ha sido controlado gracias a las exitosas campañas de vacunación masiva, sin embargo, la rabia se mantiene como un problema de salud pública debido a la gran diversidad de reservorios silvestres, lo cual ha hecho que su prevención y control sean un problema complejo.

Para tratar de clarificar problemas complicados como lo es el ciclo silvestre de la rabia los estudios de epidemiología molecular son herramientas útiles en la identificación de los reservorios animales responsables de los brotes de rabia contribuyendo a que se establezcan las medidas de control adecuadas.

Actualmente, la caracterización antigénica y molecular de cepas de rabia, ha permitido identificar las relaciones entre los distintos reservorios, los patrones de transmisión y diseminación, así como la evolución del virus (Badrane *et al.*, 2001; Velasco *et al.*, 2002; Velasco *et al.*, 2005). A pesar del avance que se ha logrado hasta ahora, aún quedan huecos en el conocimiento sobre las variantes de rabia que pueden provocar fallas en el control de esta enfermedad de esta manera la caracterización molecular de las variantes que circulan en México, y el mundo, es una pieza clave para entender la enfermedad de la rabia y en su caso prevenirla.

Esta información es gran importancia ya que proporciona un mejor conocimiento de la historia natural y la evolución de la enfermedad lo que resulta de gran utilidad en el momento de planear las campañas de control y protección de animales de vida silvestre.

La organización de las campañas de medicina preventiva requiere de la correcta identificación de las variantes del virus que circulan en los brotes y de las especies involucradas, así como de los movimientos interespecíficos e intraespecíficos del virus para poder determinar las medidas sanitarias apropiadas.

Esperando que este trabajo sea de referencia para la toma oportuna de decisiones ante la problemática que puede desencadenar dicha enfermedad en los coatíes que pueda tener impacto negativo tanto en la fauna silvestre como en la vida humana.



4.OBJETIVOS

4.1 Objetivo General.

Realizar la secuenciación genética de muestras obtenidas de casos de rabia en coatíes de la Península de Yucatán para esclarecer el origen del virus, de manera que se pueda determinar si la variante de coatí descrita en Quintana Roo se ha establecido de forma enzoótica en las poblaciones de coatíes y se puede considerar como un fenómeno de cambio de hospedero (*host switching*) o se trata de infecciones independientes (*spillovers*) repetidas a lo largo del tiempo en esta especie.

4.2 Objetivos Particulares.

1. Realizar una búsqueda en el banco de muestras del Laboratorio de Rabia del InDRE de casos de coatíes positivos a rabia pertenecientes a la Península de Yucatán (Estados de Yucatán y Quintana Roo).
2. Aislar el virus en ratones de la cepa Balb/c y en cultivos celulares (células de neuroblastoma murino, MNA CCL-131).
3. Realizar la caracterización antigénica mediante los paneles de 8 y 20 anticuerpos monoclonales.
4. Extraer el ácido ribonucleico de las muestras seleccionadas positivas a rabia provenientes de los estados de Yucatán y Quintana Roo.
5. Amplificar por RT-PCR un fragmento de aproximadamente 900 pb del gen de la nucleoproteína del virus de la rabia de las muestras seleccionadas.
6. Secuenciar por el método de Sanger el fragmento del gen de la nucleoproteína amplificado.
7. Realizar los análisis bioinformáticos y genéticos de las secuencias obtenidas.

8. Generar el árbol filogenético (método Bayesiano y *Neighbor joining*) de las secuencias obtenidas de las muestras de coafíes.



5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Muestras.

Las muestras que se utilizaron fueron encéfalos que forman parte del banco de muestras del Laboratorio de Rabia del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) en donde se encuentran conservadas en ultracongeladores a -70°C (**Cuadro 2**). Las muestras provenientes del banco de muestras del Laboratorio de Mérida del Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Yucatán S.C.P. fueron parte de un convenio establecido entre ambas instituciones, para fines de este estudio. Estas muestras fueron seleccionadas después de una búsqueda en la base de datos interna de ambos laboratorios, en donde los criterios de búsqueda fueron muestras provenientes de la Península de Yucatán (**Figura 11**) de coatíes, zorrillos o murciélagos.

Cuadro 2. Muestras utilizadas para este proyecto.

Numero de caso	Especie	Fecha	Estado	Municipio
3202	Zorrillo sin identificar	27/08/2002	Yucatán	Sin información
9021	<i>Nasua narica</i>	20/12/2007	Quintana Roo	Benito Juárez
9022	<i>Nasua narica</i>	20/12/2007	Quintana Roo	Benito Juárez
1767	<i>Nasua narica</i>	06/03/2008	Quintana Roo	Benito Juárez
1441	<i>Nasua narica</i>	2015	Yucatán	Mérida
1442	<i>Nasua narica</i>	2015	Yucatán	Sinanché
1443	<i>Nasua narica</i>	2017	Yucatán	Tekax
25	<i>Nasua narica</i>	2020	Yucatán	Chablekal

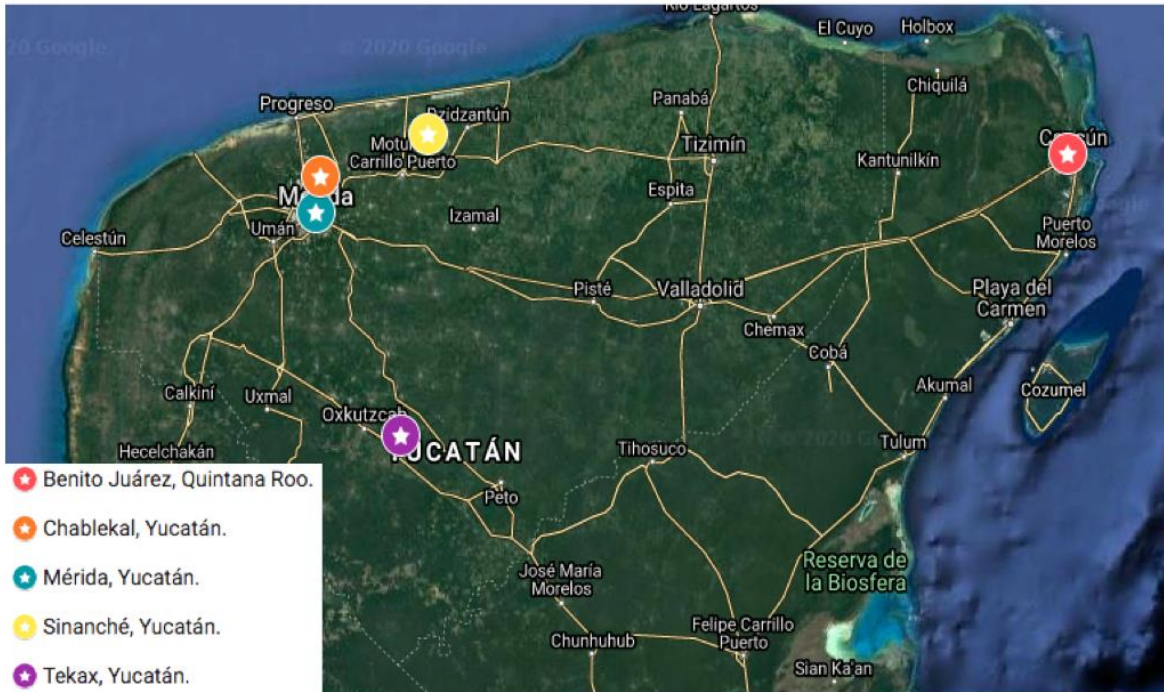


Figura 11. Mapa de localización de las muestras trabajadas en este proyecto.

5.2 Preparación de suspensión viral.

Con las muestras de encéfalo se prepararon suspensiones de cada una, la metodología para este proceso fue la siguiente:

1. Se identificaron los tubos de polipropileno con el número correspondiente a cada muestra.
2. Con ayuda de un aplicador de madera se tomaron aproximadamente 5 gramos de tejido junto con 1.5 mL de albúmina sérica bovina al 3% y se homogenizó.
3. Se centrifugación durante 15 min a 2,500 rpm a 5° C.
4. El sobrenadante se separó en un tubo Eppendorf ® limpio y estéril, el resto se guardó en ultracongelación a -70° C.

5.3 Prueba biológica en ratones destetados.

Con esta técnica se buscó la confirmación y aislamiento del virus de la rabia, así como la obtención de una muestra con alto título de partículas virales que permitan su caracterización o su uso en otras técnicas. El procedimiento involucra la inoculación de ratones por vía intracerebral (Kroposwki, 1996). Para este proyecto se ocuparon ratones hembra destetadas de la cepa balb/c de 21 días de edad, se les inocularon 30 μ L de suspensión viral por vía intracerebral, 3 ratones por muestra. Una vez inoculados se mantuvieron en observación, se llevó una bitácora en donde se registraron por día los cambios que se observaron en los ratones, los signos de mayor interés fueron: temblores, debilidad, pelo hirsuto, encorvamiento y baja de peso y parálisis parcial o total.

Llenado de las jeringas.

1. Se cargaron jeringas insulínicas, con la suspensión viral correspondiente.
2. Cuidadosamente se colocó en la aguja un algodón mojado con cloruro de benzalconio para sacar las burbujas de aire que se pudieran haber formado en la jeringa.

Inoculación intracerebral del ratón.

1. Se sujetó al ratón por la base de la cola y por detrás de las orejas inmovilizando la cabeza y el cuello, haciendo uso de la tapa de la jaula como apoyo y con la mano libre se sostuvo la jeringa manteniendo el bisel hacia arriba.
2. La inoculación se realizó en el punto medio de una línea imaginaria trazada mentalmente del ojo a la oreja del ratón.
3. La aguja se introdujo en el cráneo en ángulo recto, entre la mitad y la base de este. Se inocularon 30 μ L de suspensión por ratón.

5.4 Aislamiento del virus de rabia en células de Neuroblastoma Murino (ATCC: CCL-131).

Mediante el aislamiento viral a partir de cultivos de células de Neuroblastoma Murino (MNA), estas células son muy susceptibles a la infección y el resultado se puede obtener desde las primeras 48 horas post inoculación (Webster *et al.*, 1996). Se trabajó con una línea celular de Neuroblastoma Murino (CCL-131) que se preservó en una solución de mantenimiento de DMEM que contiene glutamina, suero fetal bovino, bicarbonato de sodio, HEPES 1M, antibiótico-antimicótico, vitaminas y agua.

Mantenimiento de la línea celular.

1. Con pipetas de 10 mL se retiró todo el medio de la botella y se desechó.
2. Se colocaron 2 mL de tripsina y se retiraron de inmediato.
3. Se colocaron 2 mL de tripsina y se dejaron reposar por tres minutos.
4. Se retiró la tripsina, se cerró la botella y se dieron dos golpes suaves a los lados de la botella.
5. Se colocaron 4 mL de DMEM y se incubó a una temperatura de 37° C en atmósfera de CO₂ al 0.05% y un pH neutro.
6. Se monitoreó cada botella cada tercer día, buscando que formaran una monocapa con un mínimo de 75% de confluencia para posteriormente poder ser infectadas.

Preparación de la muestra problema para inocular.

1. Se rotularon con el número de la muestra correspondiente tubos para crioconservación de 5 mL.
2. Se les añadieron 4 mL de medio DMEM al 10% a cada tubo.
3. Se colocó un fragmento del tejido infectado y se disgregó con ayuda de 2 aplicadores de madera.

4. Los tubos se colocaron en la centrífuga a 2,500 r.p.m. durante 15 minutos a 4° C.
5. Con jeringas de 5 mL (80 mm) se recogió cuidadosamente el sobrenadante.

Inoculación de la muestra.

1. El sobrenadante, de la suspensión viral, se hizo pasar a través de un filtro perinola de 0.22 micras de diámetro del poro del filtro.
2. Se tomaron las botellas con línea celular limpia (sin infección previa) que preliminarmente se prepararon y se colocó todo el sobrenadante ya filtrado.
3. Las botellas se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 0.5% durante 72 hrs.
4. Se tomó registro del monitoreo cada tercer día, como se describe a continuación.

Monitoreo de Infección viral.

1. Se rotularon laminillas teflonadas con el número de la muestra y la fecha de realización del proceso.
2. Con pipetas de 10 mL se retiró todo el medio a cada botella y se desechó.
3. Se le colocaron 2 mL de tripsina y se les retiró de inmediato.
4. Se le colocaron 2 mL de tripsina y se dejó reposar por 3 minutos.
5. Se les retiró la tripsina, se cerraron las botellas y se les dio dos golpes suaves a los lados de cada botella.
6. Se colocaron a cada uno 7 mL de DMEM y se homogeneizaron suavemente.
7. Se retiraron de cada botella 3 mL y se colocaron en un tubo de crioconservación de 5 mL marcado con el número de cada botella.
8. Se colocaron 80 µL en cada pozo de la laminilla.

9. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda y en la incubadora a 37° C por 2 horas.
10. Se realizaron dos lavados pozo por pozo por goteo. El primero con PBS (pH 7.4) y el siguiente con agua destilada.
11. La monocapa se fijó sumergiendo la laminilla en acetona durante 30 min. a -20° C.
12. Se retiraron las laminillas de la acetona y se secaron al aire durante diez minutos a temperatura ambiente.
13. Se realizó la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD).

Este proceso se realizó cada tercer día buscando focos fluorescentes.



5.5 Prueba de Inmunofluorescencia Directa (IFD) Para La Detección Del Virus Rábico.

La IFD es la técnica estándar de oro para el diagnóstico de la rabia, es fácil de ejecutar e interpretar además que tiene especificidad del 99% y sensibilidad del 99% (Dean *et al.*, 1996). El principio de esta técnica es la detección de antígenos rábicos en las improntas de tejido infectado por medio de anticuerpos policlonales o mezclas de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el virus de la rabia, previamente conjugados a fluoresceína (Bourhy y Sureau, 1993). Se le agrega a este conjugado una solución de Yoduro de Propidio, el cual permite visualizar los núcleos de las células (SSA-InDRE, 2017). La reacción antígeno-anticuerpo se evidencia cuando las improntas positivas se exponen a la luz ultravioleta del microscopio, el antígeno se observará como un conglomerado de color verde manzana fluorescente que puede tener diferentes formas y tamaños con ubicación intracelular o extracelular (Velasco-Villa *et al.*, 2000).

Esta técnica se realizó en las muestras originales y en los cerebros de ratones que fueron inoculados previamente, se les realizó la extracción del cerebro que se guardó en tubos de 1.5mL.

1. Con ayuda de un aplicador de madera se tomó una porción del cerebro y se colocó de manera uniforme y suave sobre laminillas teflonadas de dos pozos y rotuladas con el número de cada muestra incluyendo el testigo positivo y negativo.
2. Con papel absorbente se retiró el exceso de tejido presionando la impronta y se dejó secar al aire.
3. Las laminillas se colocaron en acetona a -20° C durante 30 minutos posteriormente se sacaron y dejaron secar al aire.
4. En cada pozo se adicionaron 15 μ L de conjugado mezclado con Yoduro de Propidio de manera que se cubriera toda la impronta.

5. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda y se incubaron 30 minutos a 37°C.
6. Las laminillas se colocaron en una rejilla y se lavaron con PBS pH 7.4 agitando manualmente por 1 minuto después se lavó de la misma manera, pero con agua destilada.
7. Se dejaron secar y se les puso una gota líquida de montaje comercial sobre cada impronta y se les colocó un cubreobjetos.
8. La lectura se realizó en un microscopio de epifluorescencia con el objetivo 40X, revisando primero el testigo positivo, donde debe observarse fluorescencia específica en un 90% de los campos, mientras que en el testigo negativo se debe observar únicamente un fondo rojizo oscuro.

5.6 Caracterización Antigénica Del Virus Rábico Con Dos Paneles De Anticuerpos Monoclonales (AcMo).

Los anticuerpos monoclonales (AcMo) son moléculas producidas por hibridomas producto de la fusión de un mieloma murino y esplenocitos de ratón hiperinmune (Rupprecht *et al.*, 1987).

El CDC en conjunto con Instituto Nacional para la Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ) de Argentina, realizaron estudios y se logró la reducción de 100 AcMo a la cantidad de 20 AcMo y así se obtuvo un panel reducido de 8 AcMo dirigidos contra los epítopes de la proteína N. Este panel determina la existencia de once variantes antigénicas del virus y su asociación específica con algunas especies en América (Velasco-Villa *et al.*, 2000).

Esta técnica se realizó con las muestras originales.

1. Se preparó 1 mL de la dilución a 1:100 de cada AcMo en tubos rotulados con el número de cada AcMo.
2. En laminillas teflonadas de 8 pozos se realizaron improntas de cada muestra para cada AcMo y se dejaron secar al aire.
3. Se dejaron fijar en acetona a -20°C durante 30 minutos.
4. Se le agregó 15 µL de cada AcMo a cada pozo de las laminillas.
5. Se metieron dentro de una cámara húmeda y a la incubadora por 30 minutos a 37° C.
6. Se realizaron dos lavados pozo por pozo por goteo. El primero con PBS, pH 7.4 y el siguiente con agua destilada.
7. Se agregaron 15 µl de conjugado antirrábico en cada pozo.
8. Se metieron dentro de una cámara húmeda a la incubadora por 30 minutos a 37° C.
9. Se realizaron dos lavados pozo por pozo por goteo. El primero con PBS pH 7.4 y el siguiente con agua destilada. Se dejaron secar al aire.

10. Se les colocó una gota de glicerina y un cubreobjetos.
11. Se observaron en el microscopio de epifluorescencia con el objetivo 40X.
12. Se tomaron como positivos aquellos pozos donde se observó fluorescencia y negativos aquellos donde no. Se interpretó conforme la **Cuadro 3**.

Cuadro 3. Patrones de reactividad de las variantes del virus de la rabia que circulan en México con el panel reducido de 8 anticuerpos monoclonales.

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

*Murciélagos insectívoros

■ Ciclo aéreo

■ Ciclo terrestre

5.7 Extracción De RNA

Antes de realizar la técnica de RT-PCR se debe obtener el RNA viral a partir de las muestras de encéfalo. Este procedimiento se realizó haciendo uso del estuche comercial "QIAamp Viral RNA" de Qiagen®.

1. Se rotularon tubos Eppendorf® de 1.5 mL.
2. Se le agregaron aproximadamente 50 mg de encéfalo en el tubo con 300 µL de Buffer de lisis (NP40) y con ayuda de un aplicador de madera se maceró fuertemente.
3. Se agitó en vortex por tres minutos.
4. Se colocaron en la centrífuga por 5 minutos a 10,000 rpm a 4°C.
5. Se tomaron 140 µL del sobrenadante y se colocó en otro tubo Eppendorf®.
6. Del estuche comercial de Qiagen® se adicionaron 560 µL del buffer AVL preparado con acarreador de RNA a cada tubo.
7. Se mezcló en el vortex por 20 segundos y se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Se añadieron 560 µL de etanol absoluto grado molecular a los tubos y se mezcló en el vortex por 15 segundos.
9. Se rotuló una columna por muestra.
10. Se agregaron 630 µL de muestra a la columna correspondiente.
11. Se centrifugó a 8,000 rpm por minuto, la columna se transfirió a un tubo colector nuevo.
12. Se colocaron 500 µL de buffer AW1 y se centrifugó a 8,000 rpm por un minuto. El sobrenadante se descartó.
13. La columna se transfirió a un tubo colector nuevo, después se colocaron 500 µL de buffer AW2 y se centrifugó a 14,000 rpm por un minuto. El sobrenadante se descartó.

14. Se transfirió la columna a un tubo colector nuevo y se centrifugó a 14,000 rpm por un minuto para eliminar el exceso de buffer AW2. El sobrenadante se eliminó.
15. Se colocó la columna dentro de un tubo Eppendorf ® y se le agregaron 40 µL de buffer de elución (AVE), se dejó incubar por un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 8,000 rpm por un minuto.
16. Se colocó la columna dentro de un tubo Eppendorf ® y se le agregaron 20 µL de buffer de elución (AVE), se dejó incubar por un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 8,000 rpm por un minuto.
17. La columna se desechó y el RNA obtenido se almacenó a -80°C hasta su uso.

5.8 Retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Esta técnica se llevó a cabo haciendo uso del estuche comercial “SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq” de Invitrogen®.

1. Se limpió con etanol al 70% y RNase AWAY (Fisher Scientific Invitrogen™) la cabina de seguridad en donde se trabajó.
2. Los reactivos se dejaron a temperatura ambiente: 2x Reaction Mix, RT/Platinum® Taq Mix, Primer Fw 550, Primer Rv 304 y agua grado molecular, que previamente se encontraban a -20°C.
3. Se rotularon tubos Eppendorf® de 200 µL con el número de muestra correspondiente.
4. El Master Mix se preparó para el número de muestras que se trabajó más el control positivo Rabies *Challenge Virus Strain* (CVS) y control negativo, de acuerdo al **Cuadro 4**. Los iniciadores diseñados específicamente para amplificar el gen de la nucleoproteína utilizados en este proyecto se ilustran en el **Cuadro 5** (Trimarchi y Smith, 2002).

Cuadro 4. Master mix para RT-PCR.

REACTIVO	Volumen/reacción
2x Reaction Mix	25 µL
RT/Platinum® Taq Mix	1 µL
Primer fw 550 (20 pmol/µL)	2 µL
Primer rv 304 (20 pmol/ µL)	2 µL
Agua grado PCR	14 µL
RNasa	1 µL

Cuadro 5. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para amplificar el gen que codifica para la nucleoproteína.

Oligo	Secuencia	Sentido	Región
550 FW	5' ATG TGY GCT AAY TGG AGY AC 3'	Forward	647-666
304 RV	5' TTG ACG AAG ATC TTG CTC AT 3'	Reverse	1514-1533

5. En cada uno de los tubos Eppendorf® se colocaron 45 µL del master mix.
6. Se le agregó respectivamente 5 µL del templado de RNA a cada tubo.
7. Se programó el termociclador y se ejecutó la corrida como se indica en el **Cuadro 6**.

Cuadro 6. Programa usado para termociclador.

Termociclador	Applied Biosystem
Programa	Superscript Platinum
1 ciclo	30 min a 50°C
1 ciclo	2 min a 94°C
35 ciclos	15 seg a 94°C
35 ciclos	30 seg a 55°C
35 ciclos	60 seg a 72°C
1 ciclo	10 min a 72°C
∞	4°C

8. Una vez terminada la corrida se retiraron los tubos del termociclador y se mantuvieron en ultracongelación a -80°C hasta que se realizó la visualización de los productos.

5.9 Visualización De Los Productos De RT-PCR

Este proceso se llevó a cabo mediante el equipo "Bioanalyzer 2100 Agilent", con el uso de este equipo se agiliza el proceso y ya no se realiza la electroforesis en gel de agarosa. Se realizó con el estuche de reactivos de Agilent "High Sensitivity DNA Chip 7500" y siguiendo la metodología de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

1. Los reactivos se dejaron a temperatura ambiente (aproximadamente 21°C) por 30 minutos.
2. Se encendieron el bioanalizador y la computadora que lo controla y se inició el programa Agilent 2100 Expert software.
3. Se tomó un chip del kit y se colocó dentro de la "Chip priming station", se cerró y se bajó el émbolo de la jeringa hasta el seguro de la estación. Se dejó por 10 segundos.
4. Cuando el émbolo pasó la marca de 0.3 mL de la jeringa se liberó el seguro y se jaló el émbolo hasta la marca de 1 mL.
5. En el pozo marcado con la letra G, que está dentro de un círculo, se depositaron 9 μ L del gel-colorante.
6. La estación se cerró y el émbolo de la jeringa se empujó hasta el seguro de la estación y se cronometró un minuto.
7. Se liberó el seguro de la estación y una vez que el émbolo paso la marca de 0.8 mL se jaló el embolo hasta la marca de 1 mL.
8. Se depositaron 9 μ L del gel-colorante en los dos pozos restantes marcados con la letra G.
9. En los 13 pozos restantes, se colocaron 5 μ L del referente de peso molecular "Ladder".
10. En el pozo marcado con una escalera se depositó 1 μ l del marcador de peso molecular.

11. En los 12 pozos restantes, se depositó 1 μL de cada muestra, un pozo por muestra.
12. Se colocó el chip en el agitador IKA durante 60 segundos a 2,250 rpm.
13. El chip se colocó en el bioanalizador, y se verificó que se detectara.
14. Se programó y verificó que el Assay Class fuera de 7500 y se comenzó la corrida.
15. Al terminar la corrida, se retiró el chip y se colocó el chip de limpieza durante un minuto, los resultados de la corrida se guardaron en una USB.

5.10 Secuenciación.

El primer paso para llevar a cabo la secuenciación fue la purificación de los productos de la RT-PCR para eliminar el exceso de reactivos de amplificación que puedan interferir en la reacción de secuencia por lo cual se hizo uso del reactivo EXOSAP-IT® de USB.

1. Se rotularon los tubos de PCR con el número de cada muestra.
2. Se colocaron 10 μL del producto amplificado de acuerdo al DNA total [$\text{ng}/\mu\text{L}$] en el tubo correspondiente marcado con su número.
3. Se colocaron 0.5 μL de EXOSAP-IT®.
4. Los tubos se colocaron en el termociclador usando el programa "Exosap" que son 15 minutos a 37°C y después 15 minutos a 80°C.
5. Se retiraron los tubos del termociclador para seguir con la reacción de secuenciación.

Previamente a la secuenciación automática se realizó la reacción de secuencia para la cual se hizo uso de del estuche BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit de Applied Biosystems.

1. Siguiendo las instrucciones del fabricante se preparó el volumen de mezcla necesario para las muestras y de acuerdo al Vol. DNA Rxn/sec (μL), del estuche y se guardó a 4°C , evitando exponerla a la luz.
2. Se rotularon los tubos con el número de la muestra, para secuenciar uno para el primer Fw y para el primer Rv.
3. En cada tubo se colocó $1 \mu\text{L}$ del primer correspondiente (Fw o Rv).
4. Se le agregó $1 \mu\text{L}$ de la muestra purificada con Exosap a cada uno de los tubos con los primers (Fw o Rv).
5. Se llevó el volumen de cada tubo a $20 \mu\text{L}$ con el Mix que se había preparado previamente.
6. Se colocaron los tubos en el termociclador seleccionando el programa "BigDye" con una duración aproximada de 4 horas.
7. Una vez que terminó el programa en el termociclador, los tubos se mantuvieron protegidos de la luz a 4°C .
8. Se hizo uso de las columnas de "Quiagen Dye Ex2.0", una por muestra, las cuales fueron agitadas vigorosamente en el vortex para nivelar el gel y la solución que contenían.
9. Se colocó cada columna en un tubo colector y se centrifugó cinco minutos a $5,000 \text{ rpm}$.
10. Se rotularon tubos Eppendorf® de 1 mL para cada muestra y una vez que terminó la centrifugación se colocó cada columna en el tubo marcado con su número correspondiente.
11. Se sacaron las muestras (inciso 7) y se le colocó al tubo correspondiente $20 \mu\text{L}$ de cada muestra.
12. Se centrifugaron durante 10 minutos a $4,000 \text{ rpm}$. Se retiraron de la centrífuga.

Finalmente, las muestras se colocaron en el secuenciador ABI 3130XL que trabaja de manera totalmente automática inyectando cada muestra en un capilar previamente cargado con un polímero que permite la separación de fragmentos de DNA de cadena sencilla que se diferencia en una única base. A una altura determinada el láser del dispositivo detecta la fluorescencia emitida por cada cadena sencilla de DNA fluorescente y traduce dicha emisión en la secuencia correspondiente.



5.11 Análisis de Secuencias.

Una vez obtenidos los resultados, se procedió con la edición de las secuencias obtenidas y la corrección manual haciendo uso del programa Bioedit y el alineamiento con MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) usando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). Posteriormente se realizó un análisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1990) del NCBI.

El análisis filogenético se realizó con secuencias de variantes de mamíferos que forman parte tanto del ciclo aéreo como el ciclo terrestre en Norte y Centroamérica. El alineamiento múltiple de todas las secuencias se realizó con el programa Mesquite (Maddison y Maddison, 2016) usando el algoritmo MUSCLE. Enseguida se determinó el modelo evolutivo con el programa jModelTest 2.1.4 (Posada, 2006), se obtuvo que el mejor modelo era Kimura 2P+G. La construcción del árbol filogenético se llevó a cabo haciendo uso del programa BEAST 1.8.4 (Suchar. *et al.*, 2018) con el método Bayesiano con 10 millones de generaciones y un burn in de 25%.

La visualización del árbol resultante se hizo con Figtree 1.4.3. (Rambaut & Drummond, 2010) y la edición se llevó a cabo con Inkscape.

6. RESULTADOS

Prueba Biológica

El virus se logró recuperar de los ratones inoculados a partir de las muestras de coaúes de Yucatán y Quintana Roo. El virus se utilizó en las pruebas subsecuentes de este estudio para evitar agotar la muestra original. Excepto en la muestra 3202 (zorrillo sin identificar), la cual los ratones tuvieron que ser sacrificados (día 28 post inoculación) y al realizarles la IFD no se encontraron campos con fluorescencia que indicara la presencia del virus de la rabia.

La interpretación gráfica de una curva de sobrevivencia de “Kaplan Meir” (**Figura 12**) permite detectar si existen tendencias o patrones en los datos obtenidos a partir de la prueba biológica. Se observan dos patrones en cuanto al periodo de incubación: en las muestras provenientes de Quintana Roo entre 13 a 15 días (cuadro en verde); las muestras de Yucatán de 19 a 20 días (cuadro en rosa). El promedio de esta prueba haciendo uso del control positivo (CVS) es de 14 días.

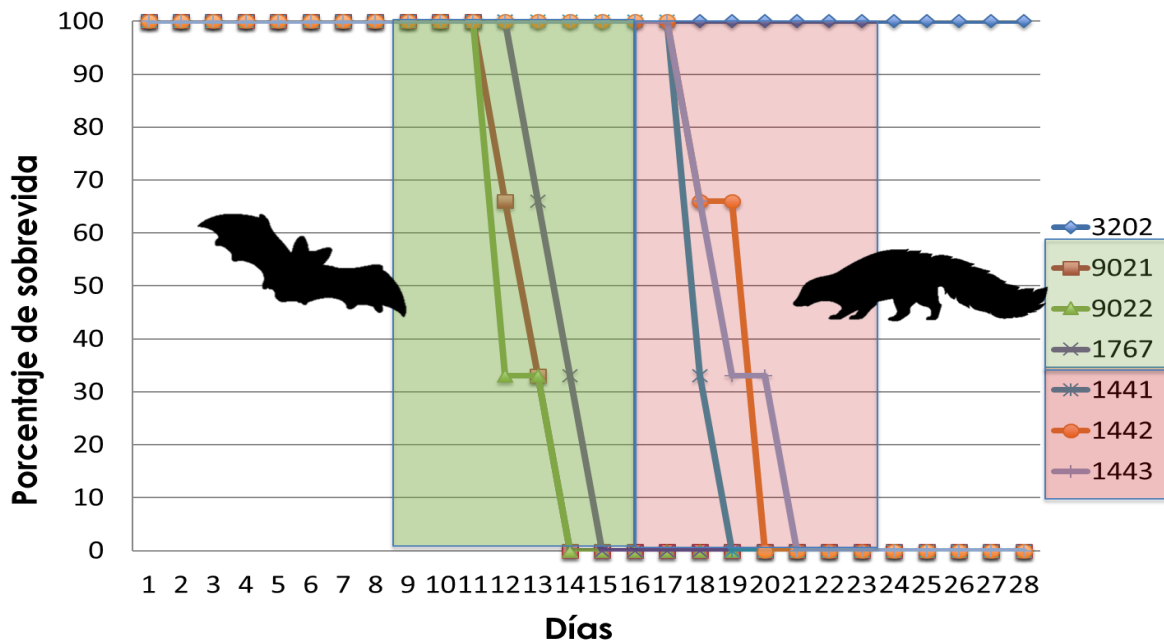


Figura 12. Gráfica de sobrevivencia Kaplan Meir donde se muestran dos patrones diferentes para el periodo de incubación de las muestras trabajadas en este proyecto.

Aislamiento del virus de rabia en células de Neuroblastoma Murino CCL-131.

Todas las muestras se pudieron aislar en la línea celular a excepción de la muestra 3202 (**Cuadro 7**), que a pesar de la búsqueda activa en todos los campos no se pudo observar ninguno positivo, se consideró negativa y se eliminó la línea celular inoculada con esta muestra.

La muestra 25 no se trabajó en prueba biológica ni aislamiento celular porque cuando se realizaron, esta muestra, aún no era referida al laboratorio de Rabia del InDRE.

Cuadro 7. Resultados del aislamiento viral en células.

Muestra	Día de inoculación	1° monitoreo 8-nov-19	2° monitoreo 12-nov-19	3° monitoreo 19-nov-19
3202	6-nov-2019	-	-	-
9021	6-nov-2019	-	+	+
9022	6-nov-2019	-	-	+
1767	6-nov-2019	-	+	+
1441	6-nov-2019	-	-	+
1442	6-nov-2019	-	-	+
1443	6-nov-2019	-	+	+
25	No se realizó	N/A	N/A	N/A

Inmunofluorescencia Directa (IFD)

Los 7 cerebros originales de coatíes y el cerebro de zorrillo resultaron positivos a la prueba de IFD, se les asignó una positividad de 1+ a 4+ dependiendo del número de campos donde se observó fluorescencia y el grado de esta (**Cuadro 8**).

Cuadro 8. Resultados de la prueba de IFD

Muestra	Resultado	Positividad
3202	+	3+
9021	+	4+
9022	+	4+
1767	+	3+
1441	+	2+
1442	+	4+
1443	+	4+
25	+	4+

En cuanto a los ratones que se inocularon para prueba biológica (3 ratones por muestra) resultaron todos positivos (**Figura 13**) excepto los que se inocularon con la muestra 3202 de zorrillo, dando resultado negativo para IFD (**Figura 14**).

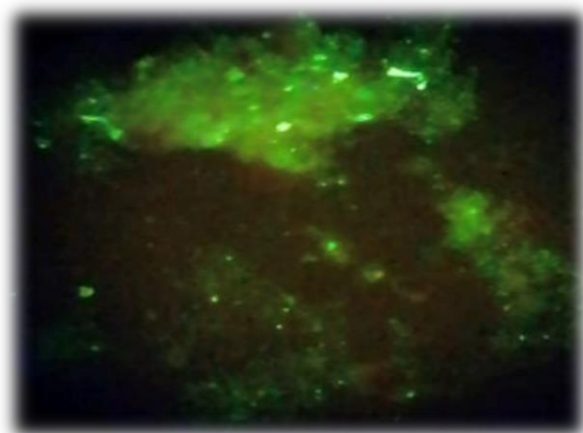


Figura 13. Muestra 3202 positiva con la prueba de IFD, positividad 3+.

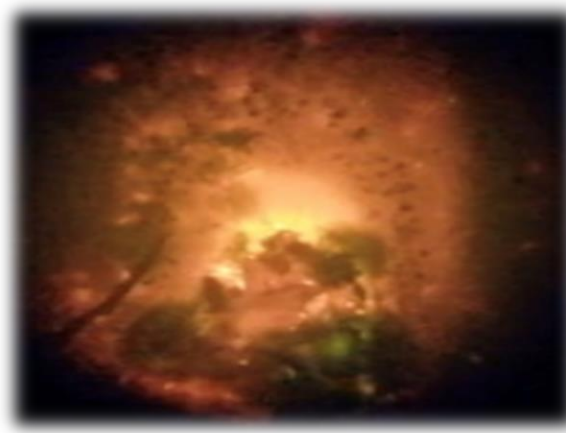


Figura 14. Muestra 3202 inoculada en cerebro de ratón negativa con la prueba de IFD.

Caracterización Antigénica Del Virus Rábico Con Dos Paneles De Anticuerpos Monoclonales (AcMo)

Tres muestras: 9021 y 9022 (2007) y 1767 (2008), dieron como resultado una variante antigénica 9, asociada a murciélago *Tadarida brasiliensis*. Mientras que todas las demás no coinciden con ningún patrón establecido por lo que se les considera variantes antigénicas atípicas (**Cuadro 9**). Con el panel ampliado se obtuvieron los mismos resultados.

Cuadro 9. Resultados de la caracterización antigénica del virus de la rabia.

Muestra	C1	C4	C9	C10	C12	C15	C18	C19	VAg
3202	+	+	+	+	-	-	-	+	Atípica
9021	+	+	+	+	+	-	-	-	V9
9022	+	+	+	+	+	-	-	-	V9
1767	+	+	+	+	+	-	-	-	V9
1441	+	+	+	+	-	+	-	+	Atípica
1442	+	+	-	+	+	+	+	+	Atípica
1443	+	+	-	+	+	+	+	+	Atípica
25	+	+	-	+	-	+	+	+	Atípica

Amplificación parcial del gen que codifica para la nucleoproteína del virus de la rabia mediante RT-PCR de punto final.

Una vez concluida la corrida en el bioanalizador, todas las muestras de Coatí fueron positivas a RT-PCR mientras que la muestra de zorrillo (3202) no. Los amplicones obtenidos se observan en la **Figura 15** así como la concentración de cada una de las muestras se detalla en el **Cuadro 10**.

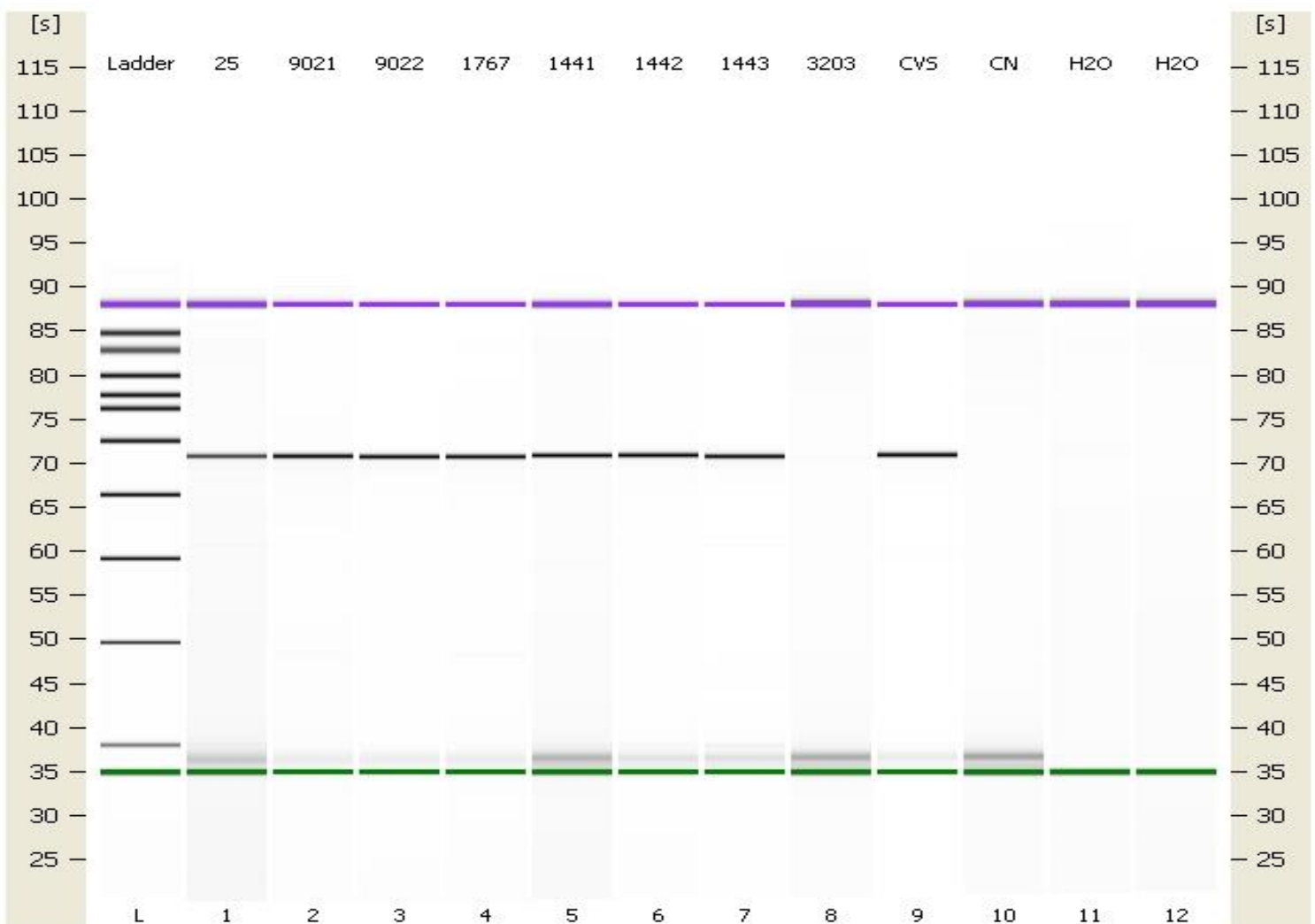


Figura 15. Visualización de los productos de RT-PCR que corresponden a un fragmento del gen que codifica para la nucleoproteína del virus de la rabia. La primera columna de izquierda a derecha corresponde al Ladder (marcador de pesos molecular), las siguientes 8 columnas corresponden a las muestras trabajadas en este proyecto que juntos a la columna CVS (Control positivo) los amplicones marcan alrededor de 915 pb. Las últimas 3 columnas representan el control negativo, donde no se observa nada y controles blancos.

Cuadro 10. Resultados de la visualización de productos de PCR

Muestra	Tamaño (pb)	Concentración (ng/μl)
3202	-	-
9021	914	11.28
9022	911	11.15
1767	913	14.16
1441	919	3.92
1442	919	10.39
1443	914	16.77
25	914	2.72
CVS	922	13.20
CN	-	-

Análisis de Secuencias.

Con base a los resultados obtenidos a partir de la secuenciación y el análisis BLAST se presentan las similitudes de las muestras trabajadas en este proyecto (**Cuadro 11**) con lo que se tenía reportado anteriormente, donde las muestras de Quintana Roo presentan similitud del 99% con coatí como especie reservorio mientras que las de Yucatán presentan similitud del 97 al 99% con perro de Yucatán.

Cuadro 11. Resultados de secuencia

Muestra	Pares de bases	Numero de acceso	Resultado del BLAST	% de similitud	Especie reservorio relacionada
9021	873	JQ685963	Rabies virus isolate Coati-3639, complete genome.	99%	Coatí
9022	877	JQ685963	Rabies virus isolate Coati-3639, complete genome.	99%	Coatí
1767	822	JQ685963	Rabies virus isolate Coati-3639, complete genome.	99%	Coatí
1441	887	KX708490	Rabies lyssavirus strain 2041MxYucgod15, complete genome.	99%	Perro de Yucatán
1442	867	KX708500	Rabies lyssavirus strain 3106MxYucdog14, complete genome.	98%	Perro de Yucatán
1443	859	KX708500	Rabies lyssavirus strain 3106MxYucdog14, complete genome.	97%	Perro de Yucatán
25	878	KX708499	Rabies lyssavirus strain 2041MxYucgod15, complete genome.	98%	Perro de Yucatán

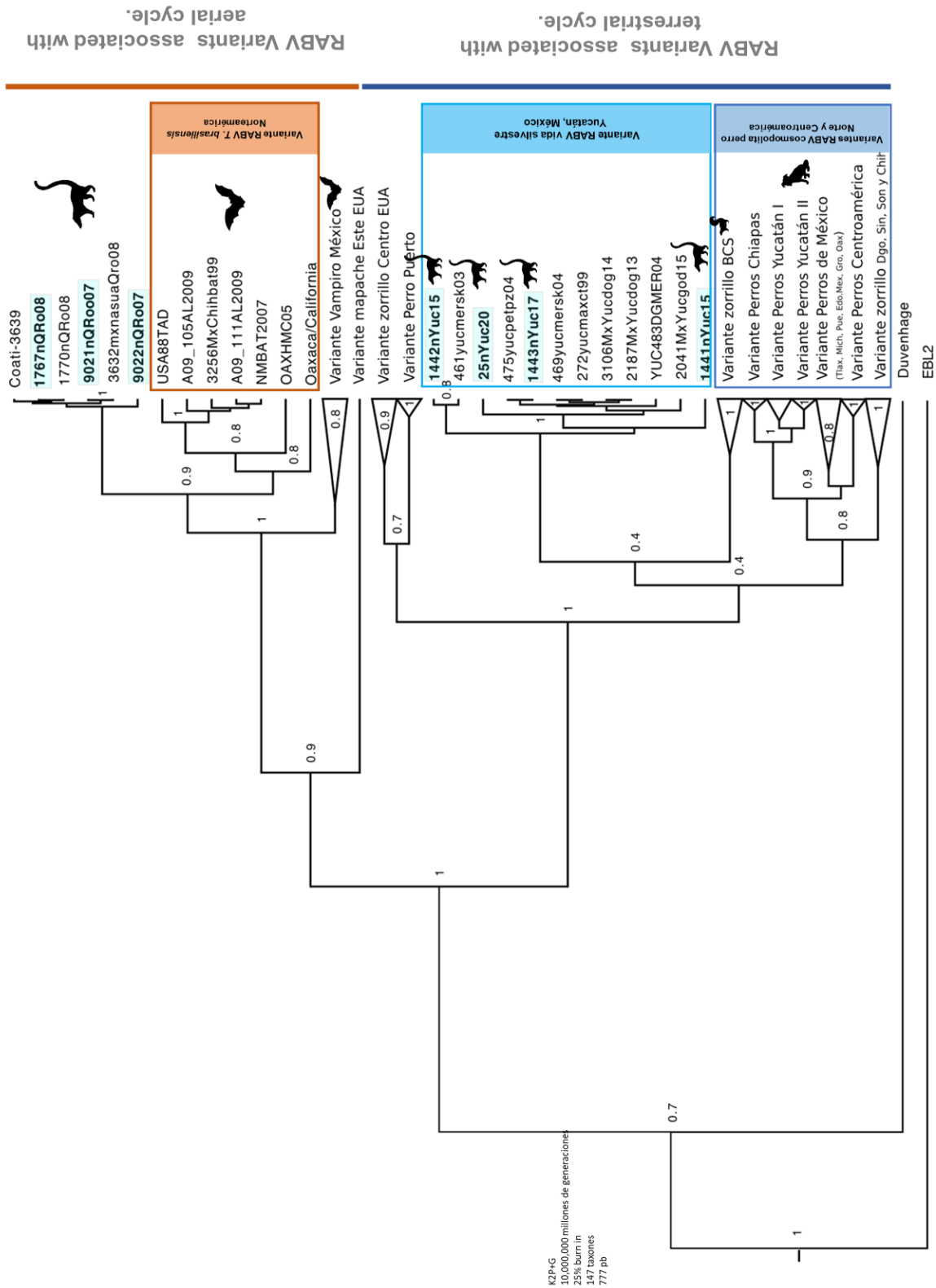
Análisis filogenético.

El análisis filogenético (**Figura 16**), generado por el Software Beast permite identificar los filogrupos que están asociados a los animales de ciclo terrestre y aéreo.

En las secuencias relacionadas con ciclo aéreo podemos observar que las secuencias 9021, 9022 y 1767 se agrupan de forma independiente a las demás secuencias.

Por su parte las secuencias 1441, 1442, 1443 y 25 se encuentran agrupadas en un clado del ciclo terrestre y se agrupan junto con las secuencias que previamente fueron descritas como "Yucatán silvestre".

Figura 16. Reconstrucción filogenética realizada por el método bayesiano empleando un fragmento de la nucleoproteína.



7. DISCUSIÓN.

La prueba de IFD, que es la prueba de oro en el diagnóstico de rabia (Velasco-Villa *et. al*, 2000), en donde se utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente a la nucleoproteína N del virus y conjugados con fluoresceína; además de esto siguiendo la recomendación del InDRE descrita en los “Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de la Rabia” (2017) se usó Yoduro de propidio como colorante de contraste. Con esta prueba se diagnosticaron las ocho muestras utilizadas en este estudio, todas mostraron fluorescencia específica, por lo cual se reportaron como positivas al virus de la rabia.

Una limitante de la IFD es que no está diseñada para detectar las variantes antigénicas ni genéticas asociada a una especie reservorio para lo cual se utilizan otras pruebas, como la “Caracterización Antigénica Del Virus Rábico Con Anticuerpos Monoclonales” así como pruebas de biología molecular para la caracterización genética.

Los resultados derivados de la caracterización antigénica fueron los siguientes: las muestras 9021, 9022 y 1767 provenientes de Quintana Roo resultaron Variante 9 (V9) y las muestras 3202, 1441, 1442, 1443 y 25 de Yucatán resultaron variante atípica (VA), es decir que su patrón de antigenicidad no concordaba con ningún patrón incluido en dicho panel. Se aprovecharon estas mismas muestras para ser trabajadas con el panel ampliado, igualmente realizado por el CDC, el cual cuenta con 20 anticuerpos monoclonales; que corroboraron los resultados obtenidos con el panel reducido. Las variantes antigénicas que se han identificado en México son las siguientes: V1 asociada a perro, actualmente está extinta en México gracias a las campañas de vacunación masivas, V3, V5 y V11

asociada a murciélagos, V4 y V9 asociadas al murciélago *Tadarida brasiliensis*, V7 asociada a zorro gris y lince, V8 y V10 asociada a zorrillo (Nadin y Loza-Rubio, 2006; Velasco-Villa *et al.*, 2002).

La muestra 3202, que pertenece al zorrillo, a pesar de que en la prueba de IFD dio resultado positivo, en el otro grupo de técnicas empleadas en este trabajo arrojó resultado negativo, incluso en el aislamiento viral en prueba biológica ya que ningún ratón inoculado con esta muestra presentó signos clínicos (pelo hirsuto, encorvamiento, parálisis parcial o total) y los ratones inoculados con esta muestra se eutanasiaron al cabo de 21 días. Estudios anteriores han reportado que, para esta prueba, las cepas relacionadas con zorrillos, como esta muestra, tienen períodos de incubación más largos e incluso menor adaptación a los ratones (Loza-Rubio *et al.*, 2012) por lo que de haber dejado a los ratones inoculados más tiempo se habría podido observar signos y que presentarían la enfermedad. Lo mismo podría suceder en el modelo *in vitro*, donde tampoco se pudo recuperar la muestra.

En la visualización de los productos de la técnica de RT-PCR, haciendo uso de la muestra original, no se observó ningún producto amplificado. La muestra se encontraba putrefacta por lo que pudo haber sido la causa de que esta misma ya no fuera viable para realizar el aislamiento viral ni técnicas moleculares, ya que el virus de la rabia es un virus RNA; este material genético pudo haberse degradado y no estar presente en la muestra por lo que en las pruebas moleculares no fuera detectable, pero sí para la prueba de IFD puesto que esta técnica es dirigida a fragmentos de la nucleoproteína viral que estuviera aun presente en la muestra.

Para la caracterización genética, se secuenció parcialmente el gen que codifica para nucleoproteína (Proteína N), previa extracción de RNA de los cerebros de los coatis infectados y después se compararon con secuencias

de otros animales positivos a rabia provenientes de México, Centro América y USA, tanto de ciclo aéreo como de ciclo terrestre.

Estos resultados generaron evidencia para demostrar que las muestras con resultado V9 están relacionadas con la especie de murciélago insectívoro de la familia Molossidae: *Tadarida brasiliensis*. Sin embargo, la distribución reportada para esta especie no incluye la península de Yucatán, ver **Anexo 1**, (Medellín *et al.*, 2008) es por esto que consideramos que el origen de este virus podría ser otra especie de murciélago perteneciente a la misma familia que si ocupe este nicho ecológico. La literatura indica que solamente siete especies de la familia Molossidae que se distribuyen en México, se encuentran en esta área: *Nyctinomops laticaudatus*, *Promops centralis*, *Eumops aripendulos*, *Eumops bonariensis*, *Eumops glaucinus*, *Molossus sinaloe* y *Molossus rufus*, los mapas de distribución se pueden observar en el **Anexo 2**.

La vigilancia epidemiológica que se realiza en México para el virus de la rabia en hospederos del ciclo aéreo solo incluye al murciélago *Desmodus rotundus*, pero la diversidad de especies que habitan en este país, aproximadamente 140 especies (Medellín *et al.*, 2008) y el tamaño de población con la que cuentan algunos de ellos hacen como prioridad la necesidad de realizar estudios epidemiológicos en murciélagos no hematófagos para poder identificar las especies quirópteros responsables de las transmisión del virus en los estados de Yucatán y Quintana Roo y de igual manera mantener activa la vigilancia de RABV que permita detectar cuando haya una modificación de los ciclos y como consecuencia surjan nuevos linajes.

Todos las especies de murciélagos son parte de un linaje monofilético que ha evolucionado dentro del superorden *Laurasiatheria* (Van Den Bussche y Hooper, 2004; O'Leary *et al.* 2013), el cual incluye también otros órdenes

como el orden carnívora (O'Leary *et al.*, 2013), por lo cual ambos órdenes están estrechamente relacionados hablando filogenéticamente, a pesar que los murciélagos han sido distintos durante más de 52 mil millones de años, comparten parte de su historia evolutiva con los órdenes que forman la superorden *Laurasiatheria*, que no comparten con otras especies de mamíferos y entonces esto podría ser clave para facilitar la circulación del virus entre estos quirópteros y carnívoros (Moratelli, R. y Calisher, C. H.,2015).

Al comparar las secuencias mediante la herramienta "BLAST" del NCBI se obtuvo como resultado un 99% de similitud con "Coati-3639" con clave de acceso: JQ685963 reportado por Kuzmin y colaboradores en el año 2012 y descrito previamente por Aréchiga-Ceballos y colaboradores en el año 2010, en un estudio en el que se reporta un brote de rabia con tres casos en el año 2008 en el parque Kabah en Cancún, Quintana Roo. Al igual que en este estudio, el análisis filogenético concluyó que a pesar de que compartían como ancestro en común con el murciélago insectívoro *T. brasiliensis*, el virus evolucionó en algún punto y ahora se presenta como variante independiente proponiendo un evento de "host switching" (Aréchiga-Ceballos, 2010). Como se puede observar en el árbol filogenético las secuencias de este proyecto se agrupan junto con la de "Coati-3239" por lo que se presenta más evidencia para confirmar la hipótesis del cambio de hospedero. Caso similar se tiene registrado en este mismo año 2008, donde Velasco-Villa y colaboradores describen el caso de un humano infectado con RABV que había sido agredido por un zorro en Oaxaca, México, en la caracterización antigénica resulto variante antigénica 9 (VA9) mientras que la caracterización genética y la construcción filogenética sugería una nueva variante. Aunque si bien en este caso también se identificó como el reservorio origen a un murciélago, los autores proponen el establecimiento del virus en otro reservorio (el zorro) para así dar paso al

origen de un linaje independiente. Otro caso del establecimiento exitoso del virus de la rabia de origen de quiróptero a mamíferos terrestres se ha descrito en zorrillos, de Estados Unidos en el año 2006 (Lesli *et al.*, 2006).

En consecuencia, los resultados de este proyecto apoyan la hipótesis de cambio de hospedero "*Host Switching*", en el que el virus de la rabia no solo infectó a un nuevo reservorio, sino que además tuvo la capacidad de adaptarse a los coatíes y perpetuarse en esta especie. El hecho de que el virus trabajado en este proyecto fuera anterior al brote en Kabah sugiere la presencia de este virus circulando en poblaciones de coatíes de Quintana Roo al menos un año previo a su descripción lo que es más evidencia a favor de que este evento no corresponde a un "*Spill over*". Además, que la probabilidad de que cada uno de estos coatíes haya sido infectado por un murciélago es muy baja apoyando así la probabilidad de la transmisión entre individuos de esta especie (coatíes).

Respecto al tiempo, esta variante se ha presentado a lo largo de varios años, lo que indica que el brote reportado en 2008 no fue solo un evento aislado, lo que nos da otro punto clave para considerarla como una enzootia en los coatíes, restringida solo al Estado de Quintana Roo, lo cual no sería un caso extraordinario puesto que precisamente en México existe otro evento similar; se trata de la variante antigénica (VA10) con distribución restringida al Estado de Baja California Sur y su hospedero, una especie de zorrillo, parece ser la única especie reservorio de esta variante (Loza-Rubio *et al.*, 2012).

Dentro de la base de datos del Laboratorio de Rabia del InDRE se contaba con el registro de más muestras con las características solicitadas para este proyecto (**Cuadro 12**), lamentablemente no se encontraban físicamente.

Cuadro 12. Muestras en base de datos del Indre no disponibles.

Número de Caso	Especie	Año	Estado
95161	Coatí	1993	Quintana Roo
3204	Coatí	2002	Yucatán

Como se puede observar en el árbol filogenético generado en el programa Beast, existe una división clara entre las variantes propias del ciclo aéreo en donde están agrupadas las secuencias previamente descritas y las del ciclo terrestre que se presentan a continuación. Las muestras: 1441, 1442, 1443 y 25 que con la técnica de caracterización antigénica resultaron Variante Atípica, y en la caracterización genética, al ser comparada en "BLAST" se obtuvo como resultado una similitud de 97% a: 3106MxYucdog14 con clave de acceso: KX708500 y 2041MxYucgod15 con clave de acceso: KX708499.

En el árbol filogenético, las secuencias de este estudio se agruparon junto con 3106MxYucdog14 y 2041MxYucgod15; ambas reportadas por Garcés-Ayala y colaboradores en el año 2017 esta última según las bases de datos del CENAPRECE corresponde a una muestra de canino agredido por un zorrillo. Estos autores concluyen la existencia de un nuevo linaje que proponen llamar "Yucatán Silvestre" circulante en vida silvestre de Yucatán. A diferencia de otras variantes de zorrillo descritas, en el sur de México las variantes que son transmitidas por los zorillos están relacionadas con el ciclo terrestre, teniendo en ciertos casos origen canino (Gárces-Ayala *et al.*, 2017).

Los zorillos pertenecen a la familia Mephitidae y en México existen siete especies de las cuales solamente dos tienen dentro de su distribución la Península de Yucatán: *Conepatus semistriatus* y *Spilogale gracilis* (Ceballos y Oliva, 2005). Los mapas de distribución de ambas especies se encuentran en el **Anexo 2**.

En este sentido es muy probable que la circulación de esta nueva variante sea transmitida por más de una sola especie (Garcés-Ayala *et al.*, 2017). Al comparar estas evidencias con los resultados de este proyecto se infiere que esta nueva variante "Yucatán Silvestre" también circula de manera enzoótica en coatíes del estado de Yucatán o tiene eventos continuos de "Spill over" de zorrillos a coatíes, en tal caso deberá ser prioritario acciones futuras para conocer el hospedero de esta variante atípica.

Cabe destacar que el virus de origen canino cuya secuencia tiene en número de acceso 2041MxYucgod15 en el Gen Bank, se registró en el año 2015 al igual que las secuencias 1441 y 1442 de este proyecto que provienen de coatíes, mientras que las secuencias 1443 en el año 2017 y 25 del año 2020, de este modo se infiere que esta variante ha mantenido su transmisión continua durante este tiempo presentándose varios brotes en coatíes y otras especies, en la mayoría de los casos, se reporta que el virus fue transmitido por alguna especie de zorrillo. En el acervo de América del Norte, se tiene registro de múltiples brotes independientes del virus de la rabia que se adaptaron exitosamente a carnívoros terrestres tales como los zorros y los mapaches de reservorios cánidos y quirópteros (Badrane y Tordo, 2001; Nadin-Davis *et al.*, 2001).

Los casos de Yucatán como los casos de Quintana Roo, se tratan de enzootias provocadas por variantes recientemente identificadas, que claramente son independientes una de la otra, aun cuando están infectando a la misma especie animal (el coatí) no están relacionadas filogenéticamente.

En cuanto a la distribución geográfica se refiere, ambos linajes no se sobrelapan y parecen estar restringidos al estado en el cual se han descrito respectivamente, pero la búsqueda activa y futura podrá resolver esta

cuestión. Ambas variantes cuentan con diferencias significativas, que se explican en el **Cuadro 13**.

Cuadro 13. Diferencias significativas entre ambas

Características	YUCATÁN	QUINTANA ROO
Linaje	“Yucatán Silvestre”	“V9-Coati”
Periodo de incubación *	19-20 días	13-15 días
Distribución	Yucatán	Quintana Roo
Ciclo	Terrestre	Aéreo
Anticuerpos	Sin registros	1 ♂ (1.3 UI) **
Frecuencia	Casos esporádicos	3 ♀ en el brote del parque Kabah **

*. Periodo de incubación descrito en ratobes Balb/c.

** (Aréchiga-Ceballos *et al.*, 2010)

En México, el orden Carnivora representa el tercer lugar en especies de animales asociados con virus zoonóticos, posiblemente por la relación estrecha que tiene con los humanos (Colunga-Salas *et al.*, 2020). El coati de nariz blanca forma parte de este orden, además es un animal que habita ciertas zonas de interés turístico como lo es la isla de Cozumel o el Parque Kabah, también en zonas rurales suele ser usado como mascota o incluso para consumo humano y el aprovechamiento de la piel aun cuando esta no representa gran valor. Mantener la vigilancia epidemiológica del virus de la rabia en los coatis de nariz blanca es importante para entender la epidemiología de las dos variantes descritas, evitar la propagación de estas a otras especies silvestres, domésticas incluso humanas ya que los coatis se encuentran comúnmente en lugares ecoturísticos siendo especies sinantrópicas.

Adicionalmente, los brotes de rabia en coatíes pueden tener algún efecto en la conservación de especies con un estado de conservación más delicado, como es el caso del jaguar (*Panthera oncha*) y el puma (*Puma concolor*) cuya dieta se sabe que incluye coatíes.

También existen especies de coatíes endémicas como la de la isla Cozumel el coatí: *Nasua nasua nelsoni* o "Tejón de Cozumel" con estado de conservación "Amenazado" según la NOM-059-SEMARNAT-2010 y cuya preservación siempre se ve amenazada por la introducción de enfermedades infecciosas en la isla.

De igual forma, la información generada en este trabajo, puede ser de utilidad para la toma de decisiones y el establecimiento de acciones para el control de la rabia silvestre en México al identificar una nueva especie como portadora de dos variantes antigénicas pertenecientes a dos ciclos independientes del virus de la rabia en la Península de Yucatán.

8. CONCLUSIONES

- En México existen dos procesos enzooticos independientes en la especie *Nasua narica*. Una es la variante “Yucatán Silvestre” y la otra “V9 Coatí” ambas parecen tener distribución geográfica limitada y no se cuenta con evidencia de que se sobrelapen.
- Ambos virus tienen un origen y propiedades biológicas diferentes, como el período de incubación en ratones.
- El de Quintana Roo está relacionado con murciélagos insectívoros emparentados con *Tadarida brasiliensis* (familia *Molossidae*), es posible que esto represente un hospedador que cambia de murciélagos a coatíes.
- El de Yucatán está relacionado con la variante atípica del ciclo selvático de la rabia, donde los zorrillos parecen ser los transmisores más activos, pero aún no se detecta el reservorio natural.
- La variante de coatí de Quintana Roo ha estado presente en poblaciones de coatí en este estado desde hace varios años, lo que podría indicar que el coatí puede ser el reservorio natural de esta variante.
- Con este trabajo se pone en evidencia la importancia de contar con estudios epidemiológicos en murciélagos no hematófagos en todo el país, lo que nos permitiría un mejor entendimiento sobre la evolución de este virus en México.

- La megadiversidad de mamíferos con la que cuenta México lo predispone a la aparición de brotes de rabia en hospederos silvestres, por lo que la vigilancia y el monitoreo de las poblaciones silvestres son de gran impacto para la eliminación de esta enfermedad a nivel mundial a la vez que contribuye a evitar pérdidas especies silvestres que pudieran ser particularmente sensibles al virus de la rabia
- Es importante que en nuestro país se mantenga la vigilancia de la rabia en animales domésticos, así como continuar con la campaña de vacunación antirrábica, siendo la estrategia más efectiva para evitar la reintroducción del virus de la rabia en perros.



9. REFERENCIAS

1. Albas, A., Campos, A. C. D. A., Araujo, D. B., Rodrigues, C. S., Sodré, M. M., Durigon, E. L., & Favoretto, S. R. (2011). Molecular characterization of rabies virus isolated from non-haematophagous bats in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(6), 678-683.
2. Almeida, M. F., Massad, E., Aguiar, E. A., Martorelli, L. F., & Joppert, A. M. (2001). Neutralizing antirabies antibodies in urban terrestrial wildlife in Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(2), 394-398.
3. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. & Lipman D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
4. Ameyama, S., Toriumi, H., Takahashi, T., Shimura, Y., Nakahara, T., Honda, Y., ... & Kawai, A. (2003). Monoclonal Antibody# 3-9-16 Recognizes One of the Two Isoforms of Rabies Virus Matrix Protein That Exposes Its N-Terminus on the Virion Surface. *Microbiology and immunology*, 47(9), 639-651.
5. Aranda Sánchez, J. M. (2012). *Manual para el rastreo de mamíferos silvestres en México* (No. 599 A7.).
6. Aréchiga-Ceballos, N., Velasco-Villa, A., Shi, M., Flores-Chávez, S., Barrón, B., Cuevas-Domínguez, E., ... & Aguilar-Setién, A. (2010). New rabies virus variant found during an epizootic in white-nosed coatis from the Yucatan Peninsula. *Epidemiology & Infection*, 138(11), 1586-1589.
7. Aréchiga-Ceballos N., Vázquez-Morón S., Berciano J., Nicolás O., Aznar-López C., Juste J., *et al.* (2013). Novel lyssavirus in bat, Spain. *Emerging infectious diseases*, 19(5), 793-795.
8. Araujo, D. B., Martorelli, L. A., Kataoka, A. P. G., Campos, A. C., Rodrigues, C. S., Sanfilippo, L. F., ... & Favoretto, S. R. (2014). Antibodies to rabies virus in terrestrial wild mammals in native rainforest on the north coast of São Paulo State, Brazil. *Journal of wildlife diseases*, 50(3), 469-477.
9. Atanasiu, P. (1965). Transmission of rabies by respiratory route to laboratory animals. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles*, 261(1), 277.

10. Badrane, H., Bahloul, C., Perrin, P., & Tordo, N. (2001). Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *Journal of virology*, 75(7), 3268-3276.
11. Badrane, H., & Tordo, N. (2001). Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *Journal of virology*, 75(17), 8096-8104.
12. Baer, G. M., & Cleary, W. F. (1972). A model in mice for the pathogenesis and treatment of rabies. *Journal of Infectious Diseases*, 125(5), 520-527.
13. Bittner, G. C., Hans, N. R., Neto, G. H., Morais, M. O., Hans Filho, G., & Haddad Jr, V. (2010). Coati (*Nasua nasua*) attacks on humans: case report. *Wilderness & environmental medicine*, 21(4), 349-352.
14. Bourhy H. & Sureau P. (1993) *Métodos de laboratorio para el diagnóstico de la rabia*. Instituto Pasteur. Paris.
15. Calisher, C. H., & Ellison, J. A. (2012). The other rabies viruses: The emergence and importance of lyssaviruses from bats and other vertebrates. *Travel medicine and infectious disease*, 10(2), 69-79.
16. Carrada-Bravo, T. (2004). Rabia: Visión nueva de un mal milenar. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 51(3), 153-166.
17. Ceballos, G. y Arrollo-Cabrales, J., (2012), Lista actualizada de los mamíferos de México 2012. *Revista Mexicana de Mastozoología Nueva época* 2:27-80
18. Ceballos, G., & Oliva, G. (2005). *Los mamíferos silvestres de México* (Vol. 986). México: Fondo de Cultura Económica.
19. Constantine, D. G., Tierkel, E. S., Kleckner, M. D., & Hawkins, D. M. (1968). Rabies in New Mexico cavern bats. *Public Health Reports*, 83(4), 303.
20. Colunga-Salas, P., Sánchez-Montes, S., Grostieta, E., Verde-Arregoitia, L. D., Cabrera-Garrido, M. Y., Becker, I., & León-Paniagua, L. (2020). What do studies in wild mammals tell us about human emerging viral diseases in Mexico?. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(1), 33-45.
21. CONABIO, 2020: <https://www.gob.mx/conabio>
22. Constantine, D. G., Emmons, R. W., & Woodie, J. D. (1972). Rabies virus in nasal mucosa of naturally infected bats. *Science*, 175(4027), 1255-1256.

23. Davis, B. M., Rall, G. F., & Schnell, M. J. (2015). Everything you always wanted to know about rabies virus (but were afraid to ask). *Annual review of virology*, 2, 451-471.
24. Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *science*, 287(5452), 443-449.
25. Dean, DJ, Abelseh, M.K. and Atanasiu, P., Chapter 7: The Fluorescent Antibody Test. In: Meslin, F. X., Kaplan, M. M., Koprowski, H., & World Health Organization. (1996). *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: World Health Organization.
26. Dietzschold, B., Lafon, M., Wang, H., Otvos Jr, L., Celis, E., Wunner, W. H., & Koprowski, H. (1987). Localization and immunological characterization of antigenic domains of the rabies virus internal N and NS proteins. *Virus research*, 8(2), 103-125.
27. De-la-Rosa-Arana, J. L., Muñoz-García, C. I., Godínez-García, V. H., Villanueva-García, C., Gama-Campillo, L. M., Almanza-González, A., & Rendón-Franco, E. (2016). Serological survey of anti-Salmonella antibodies in coatis (*Nasua narica*) and raccoons (*Procyon lotor*) in southeast Mexico. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 48(3), 283-288.
28. Edgar R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 1792–1797.
29. Eigen, M. (1971). Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften*, 58(10), 465-523.
30. Eisenberg, J. F. (1989). An introduction to the Carnivora. In *Carnivore behavior, ecology, and evolution* (pp. 1-9). Springer, Boston, MA.
31. Elena, S. F. (2002). Restrictions to RNA virus adaptation: an experimental approach. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 135-142.
32. Favoretto, S. R., Alves Martorelli, L. F., Elkhoury, M. R., Zargo, A. M., & Durigon, E. L. (2005). Rabies virus detection and phylogenetic studies in samples from an exhumed human. *Clinical infectious diseases*, 41(3), 413-414.
33. Favoretto, S. R., Carrieri, M. L., Cunha, E. M. S., Aguiar, E. A., Silva, L. H. Q., SodrÉ, M. M., ... & Kotait, I. (2002). Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44(2), 91-95.
34. Flamand, A., Raux, H., Gaudin, Y., & Ruigrok, R. W. (1993). Mechanisms of rabies virus neutralization. *Virology*, 194(1), 302-313.

35. Flamand, A., Wiktor, T. J., & Koprowski, H. (1980a). 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*, 48(1), 97-104.
36. Flamand, A., Wiktor, T. J., & Koprowski, H. (1980b). Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies related virus Proteins. 2. The Glycoprotein. *Journal of General Virology*, 48, 105–109.
37. Frantchez, V., & Medina, J. (2018). Rabia: 99, 9% mortal, 100% prevenible. *Revista Médica del Uruguay*, 34(3), 86-107.
38. Flynn, J. J., & Nedbal, M. A. (1998). Phylogeny of the Clivora (Mammalia): congruence vs incompatibility among multiple data sets. *Molecular phylogenetics and evolution*, 9(3), 414-426.
39. Fooks, A. (2004). The challenge of new and emerging Lyssaviruses. *Expert Review of Vaccines*. 3(4): 333-336.
40. Gallardo-Romero, N. F., Aréchiga-Ceballos, N., Emerson, G. L., Martínez-Martínez, F. O., Doty, J. B., Nakazawa, Y. J., ... & Gama-Campillo, L. M. (2016). Endemic orthopoxvirus circulating in procyonids in Mexico. *Journal of wildlife diseases*, 52(3), 609-615.
41. Garcés-Ayala, F., Aréchiga-Ceballos, N., Ortiz-Alcántara, J. M., González-Durán, E., Pérez-Agüeros, S. I., Méndez-Tenorio, A., ... & Ramírez-González, J. E. (2017). Molecular characterization of atypical antigenic variants of canine rabies virus reveals its reintroduction by wildlife vectors in southeastern Mexico. *Archives of virology*, 162(12), 3629-3637.
42. Germano, P. M., Silva, E. V., Silva, E. V., Miguel, O., & Sureau, P. (1990). Variantes antigénicas del virus de la rabia aisladas en el nordeste y sudeste del Brasil: Estudio preliminar. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)*; 108 (1), ene. 1990.
43. Glatston, A. R. (1994). The red panda, olingos, coatis, raccoons, and their relatives: status survey and conservation action plan for procyonids and ailurids. IUCN.
44. Gompper, M. (1995). *Nasua narica*. *Mammalian Species in The American Society of Mammalogist* 487:1-10.
45. Holmes, E. C. (2003). Error thresholds and the constraints to RNA virus evolution. *Trends in microbiology*, 11(12), 543-546.

46. Honda, K., & Taniguchi, T. (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature Reviews Immunology*, 6(9), 644-658.
47. ICTV. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/mononegavirales/w/rhabdoviridae/795/genus-lyssavirus
acceso: 09/Enero/2020.
48. Koepfli, K. P., Gompper, M. E., Eizirik, E., Ho, C. C., Linden, L., Maldonado, J. E., & Wayne, R. K. (2007). Phylogeny of the Procyonidae (Mammalia: Carnivora): molecules, morphology and the great American interchange. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(3), 1076-1095.
49. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C & Tamura K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549
50. Jackson A. & Fu Z., (2013), Pathogenesis In: Rabies., Jackson AC. (editor), 3rd edition. Academic Press. 299-349.
51. Johnson, N., Phillipotts, R., & Fooks, A. R. (2006). Airborne transmission of lyssaviruses. *Journal of medical microbiology*, 55(6), 785-790.
52. Jiménez A, Torres JL y López S. (1996), Situación epidemiológica de la rabia a nivel mundial y en México. *Enfermedades infecciosas y microbiología*. 16(1): 29-38.
53. Johnson R. (1982), *Viral infections of the nervous system*. N.Y.: Raven Press; Cap. 7, 159-68.
54. Kaufmann, J. H. (1962), Ecology and the social behavior of the coati, *Nasua narica*, on Barro Colorado Island, Panamá. University of California. Publication in Zoology 60: 95-222.
55. Kays, R. (2009), Family Procyonidae (Racoons). En: Wilson, D. E. y R. A. Mittermeier (Eds.). *Handbook of the Mammals of the World. Vol. 1. Carnivores*. Lynx Ediciones, Barcelona, 504-531.
56. Kroposwki, H., Chapter 6: The Mouse Inoculation Test. In: Meslin, F. X., Kaplan, M. M., Koprowski, H., & World Health Organization. (1996). *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: World Health Organization.
57. Kuzmin, I. V., Hughes, G. J., Botvinkin, A. D., Orciari, L. A., & Rupprecht, C. E. (2005). 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*, 111(1), 28-43.
58. Kuzmin, I. V., Wu, X., Tordo, N., & Rupprecht, C. E. (2008). Complete genomes of Aravan, Khujand, Irkut and West Caucasian bat viruses, with special attention to the polymerase gene and non-coding regions. *Virus research*, 136(1-2), 81-90.
 59. Kuzmin, I. V., Shi, M., Orciari, L. A., Yager, P. A., Velasco-Villa, A., Kuzmina, N. A., ... & Rupprecht, C. E. (2012). Molecular inferences suggest multiple host shifts of rabies viruses from bats to mesocarnivores in Arizona during 2001–2009. *PLoS pathogens*, 8(6).
 60. Lentz, T. L., Burrage, T. G., Smith, A. L., Crick, J., & Tignor, G. H. (1982). Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor?. *Science*, 215(4529), 182-184.
 61. Leslie, M. J., Messenger, S., Rohde, R. E., Smith, J., Cheshier, R., Hanlon, C., & Rupprecht, C. E. (2006). Bat-associated rabies virus in skunks. *Emerging infectious diseases*, 12(8), 1274.
 62. Love S. & Wiley C., (2002). Viral diseases. In D. I. Graham & P. L. Lantos (Eds.), *Greenfield's neuropathology*, London. 1-105.
 63. Lowenberg, K. (1928). Rabies in man. Microscopic observations. *Archives of Neurology and Psychiatry*, 19, 638-646.
 64. Loza-Rubio, E., Aguilar-Setién, A., Bahloul, C., Brochier, B., Pastoret, P. P., & Tordo, N. (1999). Discrimination between epidemiological cycles of rabies in Mexico. *Archives of Medical Research*, 30(2), 144-149.
 65. Loza-Rubio, E., Nadin-Davis, S. A., & Morales Salinas, E. (2012). Caracterización molecular y biológica del virus de la Rabia que circula en zorrillos de México enfocado a la variante del gen de la fosfoproteína (P). *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 3(2), 155-170.
 66. Maddison W. P. & Maddison D. R. (2016). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.10 <http://mesquiteproject.org>
 67. Madore, H. P., & England, J. M. (1977). Rabies virus protein synthesis in infected BHK-21 cells. *Journal of virology*, 22(1), 102-112.
 68. Manning, S. E., Rupprecht, C. E., Fishbein, D., Hanlon, C. A., Lumlerdacha, B., Guerra, M., ... & Sun, B. (2008). Human rabies prevention—United States, 2008: recommendations of the advisory committee on immunization practices. *MMWR Recomm Rep*, 57(RR-3), 1-28.

69. Martínez-Hernández, F., Rendon-Franco, E., Gama-Campillo, L. M., Villanueva-García, C., Romero-Valdovinos, M., Maravilla, P., ... & Villalobos, G. (2014). Follow up of natural infection with *Trypanosoma cruzi* in two mammals species, *Nasua narica* and *Procyon lotor* (Carnivora: Procyonidae): evidence of infection control?. *Parasites & vectors*, 7(1), 1-7.
70. Martínez, M. E. M., Rosillo, G. R., Olivares, J. L. G., & Setién, Á. A. (2006). Importancia inmunológica de la proteína N en la infección por virus de la rabia. *Veterinaria México*, 37(3), 351-367.
71. Maton, P. N., Pollard, J. D., & Davis, J. N. (1976). Human rabies encephalomyelitis. *Br Med J*, 1(6017), 1038-1040.
72. Maurello, M. A., Clarke, J. A., & Ackley, R. S. (2000). Signature characteristics in contact calls of the white-nosed coati. *Journal of Mammalogy*, 81(2), 415-421.
73. Mavrakakis, M., Iseni, F., Mazza, C., Schoehn, G., Ebel, C., Gentzel, M., ... & Ruigrok, R. W. (2003). Isolation and characterisation of the rabies virus N-P complex produced in insect cells. *Virology*, 305(2), 406-414.
74. Maynard Smith, J. & Szathmáry, E. *The Major Transitions of Evolution*. (W. H. Freeman & Co., Oxford, 1995).
75. Mebatsion, T., Weiland, F., & Conzelmann, K. K. (1999). Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *Journal of virology*, 73(1), 242-250.
76. Medellín, R. A., Arita, H. T., & Sánchez, Ó. (2008). *Identificación de los murciélagos de México: clave de campo*. Instituto de Ecología, UNAM.
77. Mollentze, N., Biek, R., & Streicker, D. G. (2014). The role of viral evolution in rabies host shifts and emergence. *Current Opinion in Virology*, 8, 68-72.
78. Montano, J., & Mata, A. (1996). Estructura antigénica y mecanismos de infección del virus de la rabia. *Ciencia Veterinaria*, 7, 67-96.
79. Moratelli, R., & Calisher, C. H. (2015). Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses?. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(1), 1-22.
80. Morse, S. S. (2001). Factors in the emergence of infectious diseases. In *Plagues and politics* (pp. 8-26). Palgrave Macmillan, London.
81. Moya, A., Holmes, E. C., & González-Candelas, F. (2004). The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 2(4), 279-288.

82. Nadin-Davis, S. A., & Loza-Rubio, E. (2006). The molecular epidemiology of rabies associated with chiropteran hosts in Mexico. *Virus research*, 117(2), 215-226.
83. Negri, A. (1903a). Beitrag zum studium der aetiologie der tollwuth. *Zeitschrift Für Hygiene Und Infektionskrankheiten*, 43(1), 507-528.
84. Negri, A. (1903b). Zur aetiologie der tollwuth. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 44(1), 519-540.
85. Núñez, R., Miller, B., & Lindzey, F. (2000). Food habits of jaguars and pumas in Jalisco, Mexico. *Journal of Zoology*, 252(3), 373-379.
86. O'Leary, M. A., Bloch, J. I., Flynn, J. J., Gaudin, T. J., Giallombardo, A., Giannini, N. P., ... & Ni, X. (2013). The placental mammal ancestor and the post-K-Pg radiation of placentals. *Science*, 339(6120), 662-667.
87. OIE. (2014). Ficha Técnica de la Rabia. Recuperado de: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/RABIES_FINAL.pdf
88. Organización Mundial de la Salud (OMS), Comité de expertos de la OMS sobre la rabia. (2013) Consulta de Expertos de OMS sobre la rabia 982, Segundo Informe. Ginebra: OMS.
89. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2019) Rabies fact sheet. Geneva: WHO,. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/es/>
90. Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2019) México está libre de rabia humana transmitida por perros. Recuperado de: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=15585:mexico-is-free-from-human-rabies-transmitted-by-dogs&Itemid=1926&lang=es
91. Posada D. (2006). ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Research*, 34, 700-703.
92. Rambaut A. & Drummond A. (2010). FigTree. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
93. Rendo-Fránco, E., García, C. I. M., García, C. V., Callejas, E. R., & Campilo, L. M. G. (2019) Estudio de Caso: Efecto de las sequías sobre endoparásitos en coatís (*Nasua narica*). En: La Biodiversidad de Tabasco. Estudio de Estado. Volumen 3.
94. Rossiter T. & Jackson AC. (2013), Pathology In: Jackson AC, (editor). Rabies, 3 edition. Academic Press, 351-386.

95. Rupprecht, C. E., Glickman, L. T., Spencer, P. A., & Wiktor, T. J. (1987). Epidemiology Of Rabies Virus Variants: Differentiation Usd Monoclonal Antibodies And Discriminant Analysis. *American journal of epidemiology*, 126(2), 298-309.
96. Rupprecht C. (1996) Chapter 61 Rhabdoviruses: Rabies Virus in: Baron, S. (editor) Medical Microbiology. 4th edition., The University of Texas Medical Branch at Galveston.
97. Rupprecht, C. E., Hanlon, C. A., & Hemachudha, T. (2002). Rabies re-examined. *The Lancet infectious diseases*, 2(6), 327-343.
98. Russell J.,(1982), Timing of reproduction by coatis (*Nasua narica*) in relation to fluctuations in food resources. in The ecology of a tropical forest: seasonal rhythms and long term changes (Leihg, E., A. Rand, y D. Windsor, eds.). Smithsonian Institute. Washington, EE.UU. 413-431.
99. Sáenz J. (1994), Ecología del pizote (*Nasua narica*) y su papel como dispersador de semilla en el bosque seco tropical, Costa Rica. Tesis de Maestría, Universidad Nacional San José, Costa Rica. San José, Costa Rica.
100. Sarmiento, L., Li, X. Q., Howerth, E., Jackson, A. C., & Fu, Z. F. (2005). Glycoprotein-mediated induction of apoptosis limits the spread of attenuated rabies viruses in the central nervous system of mice. *Journal of neurovirology*, 11(6), 571-581.
101. Secretaria de Salud (SSA), (2001), Programa de Acción: Rabia.
102. Secretaria de Salud (SSA), (2015), Programa de Acción Especifica: Prevención y Control de la Rabia Humana 2013-2018.
103. Secretaria de Salud (SSA)-CENAPRECE, (2018) Rabia Canina. Recuperado de: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/zoonosis/situacion_casos_rabia.html
104. Secretaria de Salud (SSA)-Instituto de Diagnostico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), (2017). LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LA RABIA.
105. Sissoeff, L., Mousli, M., England, P., & Tuffereau, C. (2005). Stable trimerization of recombinant rabies virus glycoprotein ectodomain is required for interaction with the p75NTR receptor. *Journal of general virology*, 86(9), 2543-2552.
106. Smart, N. L., & Charlton, K. M. (1992). The distribution of challenge virus standard rabies virus versus skunk street rabies virus in the brains of

- experimentally infected rabid skunks. *Acta neuropathologica*, 84(5), 501-508.
107. Smith J, Baer GM. (1988), Epizootiology of rabies: The Americas. In: Campbell J., Charlton K., (editors). Rabies. Boston: Kluwer Academic Publishers.
 108. Smith J. (1991). Rabies serology. In Baer G.,(editor.), The natural history of rabies (2nd ed.). Boca Raton: CRC Press, 235-252.
 109. Smith, H. J. (1980), Behavior of the coati (*Nasua narica*) in captivity. *Carnivore* 2: 88-136
 110. Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus evolution*, 4(1), vey016.
 111. Tangchai, P., Yenbutr, D., & Vejajjiva, A. (1970). Central nervous system lesions in human rabies. A study of twenty-four cases. *Journal of the Medical Association*, 53(7), 471-86.
 112. Thoulouze, M. I., Lafage, M., Schachner, M., Hartmann, U., Cremer, H., & Lafon, M. (1998). The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *Journal of virology*, 72(9), 7181-7190.
 113. Tirira D. (2004). Nombres de los Mamíferos del Ecuador. Ediciones Murciélago Blanco y Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales. Publicación Especial de los Mamíferos del Ecuador 5. Quito.
 114. Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., Keith, G., & Rougeon, F. (1988). Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses. *Virology*, 165(2), 565-576.
 115. Toro, G., & Raad, J. (1997). Rabia. *Biomédica (Bogotá)*, 18-26.
 116. Troupin, C., Dacheux, L., Tanguy, M., Sabeta, C., Blanc, H., Bouchier, C., ... & Bourhy, H. (2016). Large-scale phylogenomic analysis reveals the complex evolutionary history of rabies virus in multiple carnivore hosts. *PLoS pathogens*, 12(12), e1006041.
 117. Trimarchi, C. V., y J. S. Smith. 2002. Diagnostic evaluation. p. 308–344. En: A. C. Jackson y W. H. Wunner Ed. Rabies. Academic Press, San Diego, Calif.
 118. Tsiang, H. (1982). Neuronal function impairment in rabies-infected rat brain. *Journal of General Virology*, 61(2), 277-281.
 119. Tsiang, H., Ceccaldi, P. E., & Lycke, E. (1991). Rabies virus infection and transport in human sensory dorsal root ganglia neurons. *Journal of general virology*, 72(5), 1191-1194.

120. Tuffereau, C., Benejean, J., Blondel, D., Kieffer, B., & Flamand, A. (1998). Low-affinity nervegrowth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *European Molecular Biology Organization Journal*, 17(24), 7250–7259.
121. Valenzuela D. (2005). Tejón, Coatí. *Nasua narica* (Linnaeus, 1766). en *Los Mamíferos Silvestres de México* (Ceballos, G., y G. Oliva, coords.). Fondo de Cultura Económica / CONABIO, México. 411-413.
122. Valenzuela D. (1998). Natural history of the white-nosed coati, *Nasua narica*, in a tropical dry forest of western Mexico. *Revista Mexicana de Mastozoología* 3:26-44.
123. Valenzuela, D., & Ceballos, G. (2000). Habitat selection, home range, and activity of the white-nosed coati (*Nasua narica*) in a Mexican tropical dry forest. *Journal of mammalogy*, 81(3), 810-819.
124. Valenzuela, D., Ceballos, G., & García, A. (2000). Mange epizootic in white-nosed coatis in western Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 36(1), 56-63.
125. Vallejo A., (2019), *Nasua narica* En: Brito J., Camacho M. A., Romero V. y Vallejo A. (editores). *Mamíferos del Ecuador*. Version 2018.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
126. Van Den Bussche, R. A., & Hooper, S. R. (2004). *Phylogenetic relationships among recent chiropteran families and the importance of choosing appropriate out-group taxa*. *Journal of Mammalogy*, 85(2), 321-330.
127. Velasco-Villa, A., Gómez-Sierra, M., Hernández-Rodríguez, G., Juárez-Islas, V., Meléndez-Félix, A., Vargas-Pino, F., ... & Flisser, A. (2002). Antigenic diversity and distribution of rabies virus in Mexico. *Journal of clinical microbiology*, 40(3), 951-958.
128. Velasco-Villa A., Gómez M., Juárez V., et al. (2000) Capítulo 1: Rabia. En: *Zoonosis: Manual de Procedimientos para el Diagnóstico de Laboratorio*. InDRE-Secretaría de Salud. México (DF): Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez", 7-33.
129. Webster, W. and Casey, G., Chapter 8: Virus Inolation in Neuroblastoma Cell Culture RTCIT. In: Meslin, F. X., Kaplan, M. M., Koprowski, H., & World Health Organization. (1996). *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: World Health Organization.

130. Weiner L. and Fleming J., (1984), Viral infections of the nervous system. *J Neurosurg*; 61: 207-24.
131. Winkler, W. G., Fashinell, T. R., Leffingwell, L., Howard, P., & Conomy, J. P. (1973). Airborne rabies transmission in a laboratory worker. *Jama*, 226(10), 1219-1221.
132. Winkler, W. G. (1975). Airborne rabies. In *The Natural History of Rabies*, vol. II, pp. 115–121. Edited by G. M. Baer. New York: Academic Press.
133. World Health Organization (WHO), (2011), The immunological basis for immunization series: module 17: rabies. WHO, Switzerland.
134. Wozencraft, W.C. (2005). Order Carnivora. in D.E. Wilson, D.M. Reeder (Eds.), *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*, The Johns Hopkins University Press, Baltimore pp. 279–348
135. Wright, S. J., & Duber, H. C. (2001). Poachers and forest fragmentation alter seed dispersal, seed survival, and seedling recruitment in the Palm *Attalea butyraceae*, with implications for tropical tree diversity 1. *Biotropica*, 33(4), 583-595.
136. Wright, S. J., Carrasco, C., Calderon, O., & Paton, S. (1999). The El Niño Southern Oscillation, variable fruit production, and famine in a tropical forest. *Ecology*, 80(5), 1632-1647.
137. Wunner WH. (2007), Rabies virus. In: Jackson AC, Wunner WH, editors. *Rabies*, 2nd edition. Academic Press; 23-68
138. Wunner WH. & Conzelmann K., (2013), Rabies virus In: Jackson AC, editor. *Rabies*, 3 edition. Academic Press; 17-60.
139. Wunner, W. H., Larson, J. K., Dietzschold, B., & Smith, C. L. (1988). The molecular biology of rabies viruses. *Reviews of infectious diseases*, 10(Supplement_4), S771-S784.
140. Zeveloff, S. I. (2002). *Raccoons: a natural history*. UBC Press.
141. Zhang, J., Lin, J., Tian, Y., Ma, L., Sun, W., Zhang, L., ... & Zhang, L. (2018). Transmission of rabies through solid organ transplantation: a notable problem in China. *BMC infectious diseases*, 18(1), 273.

10. ANEXOS

ANEXO 1.

Distribución del murciélago *Tadarida brasiliensis* en México.

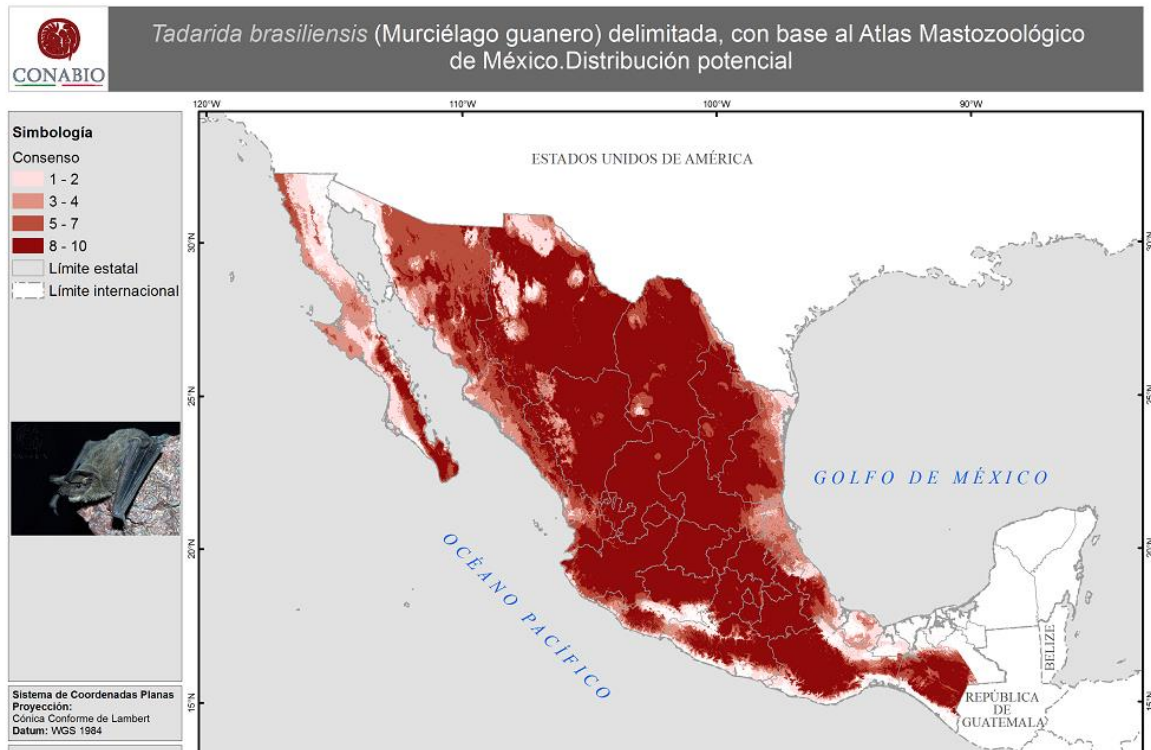


Figura 17. Distribución potencial de *Tadarida brasiliensis*. Tomada y editada de SNIB, 2020.

ANEXO 2.

Mapas de distribución potencial de murciélagos pertenecientes a la familia Molossidae en la Península de Yucatán, México.

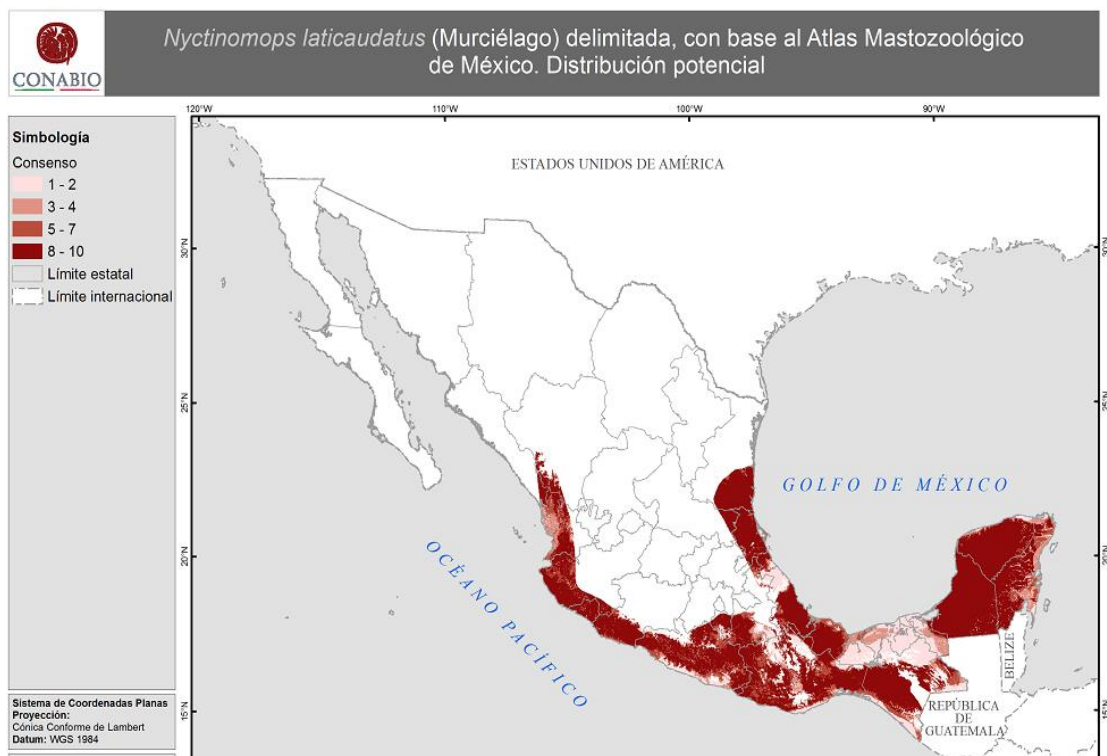


Figura 18. Distribución potencial *Nyctinomops laticaudatus*. Tomada y editada de SNIB, 2020.

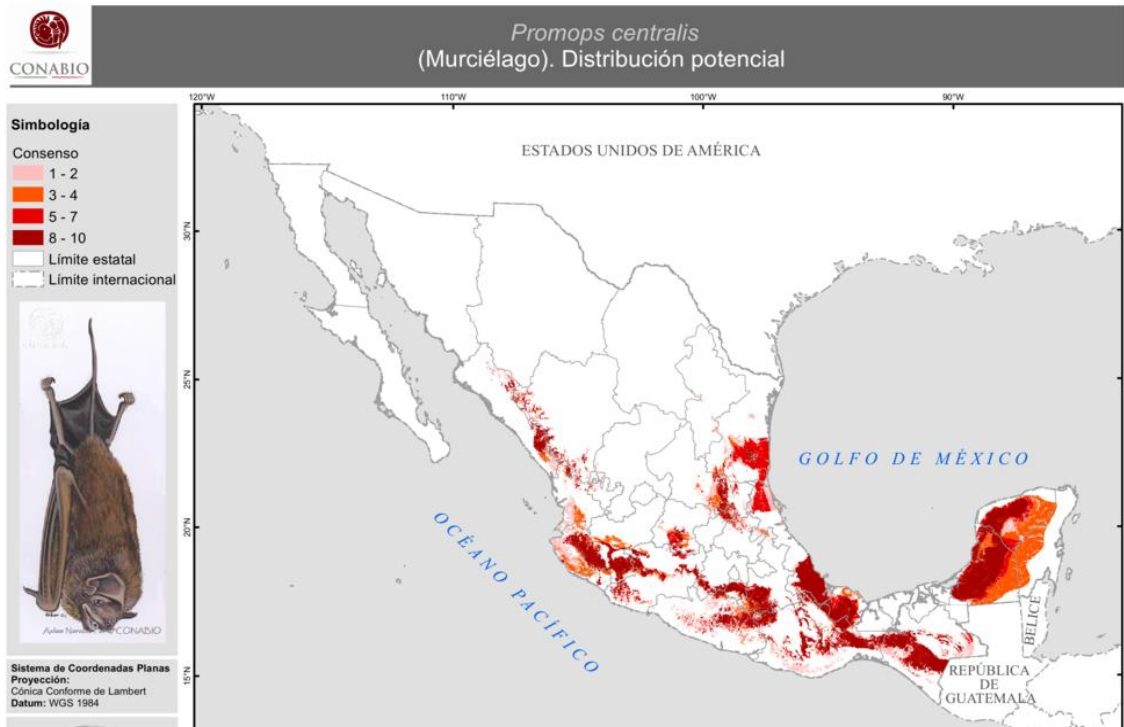


Figura 19. Distribución potencial *Promops centralis*. Tomada y editada de SNIB, 2020.



Figura 20. Distribución potencial *Eumops auripendulos*. Tomada y editada de NATURALISTA, 2020.



Figura 21. Distribución potencial *Eumops bonariensis*. Tomada y editada de SNIB, 2020.



Figura 22. Distribución potencial *Eumops glaucinus*. Tomada y editada de SNIB, 2020.



Figura 23. Distribución potencial *Molossus rufus*. Tomada y editada de SNIB, 2020.



Figura 24. Distribución potencial *Molossus sinaloae*. Tomada y editada de SNIB, 2020.

ANEXO 3.

Mapas de distribución potencial de zorrillos en la Península de Yucatán, México.

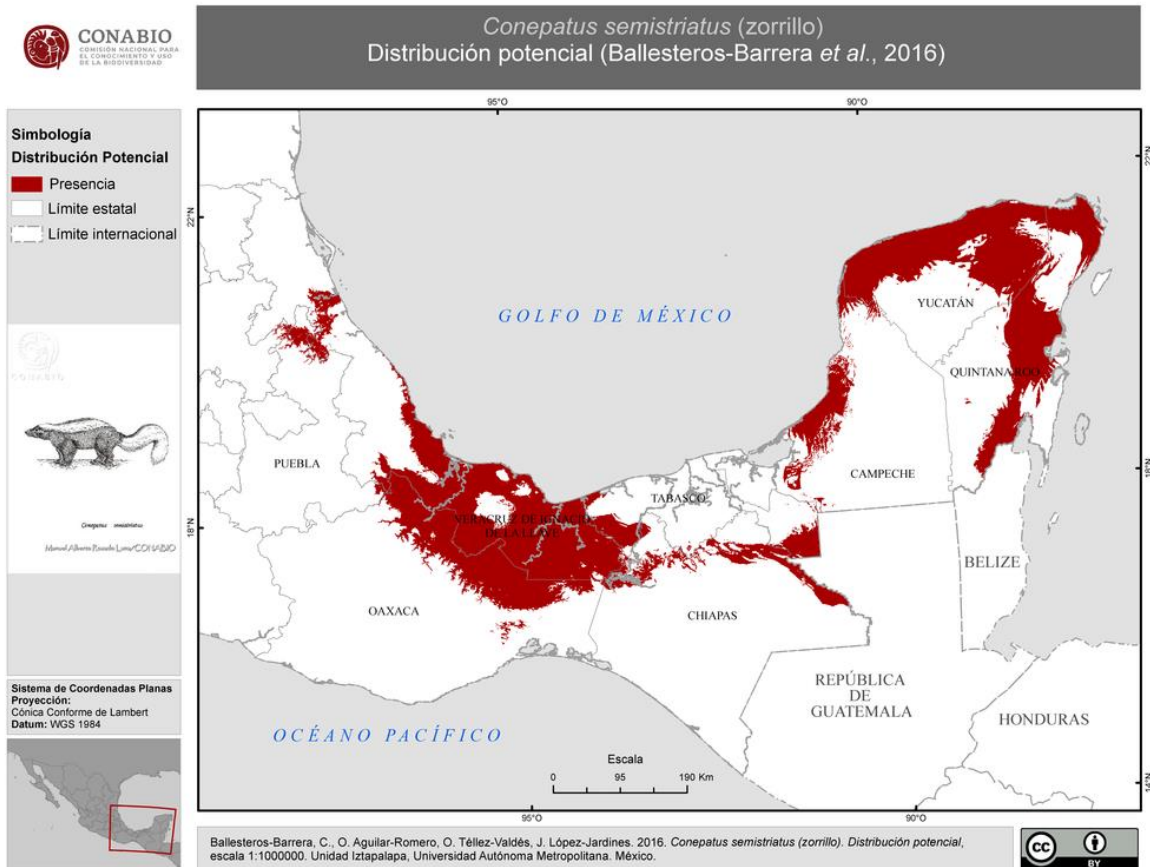


Figura 25. Distribución potencial *Conepatus semistriatus*. Tomada y editada de SNIB, 2020.

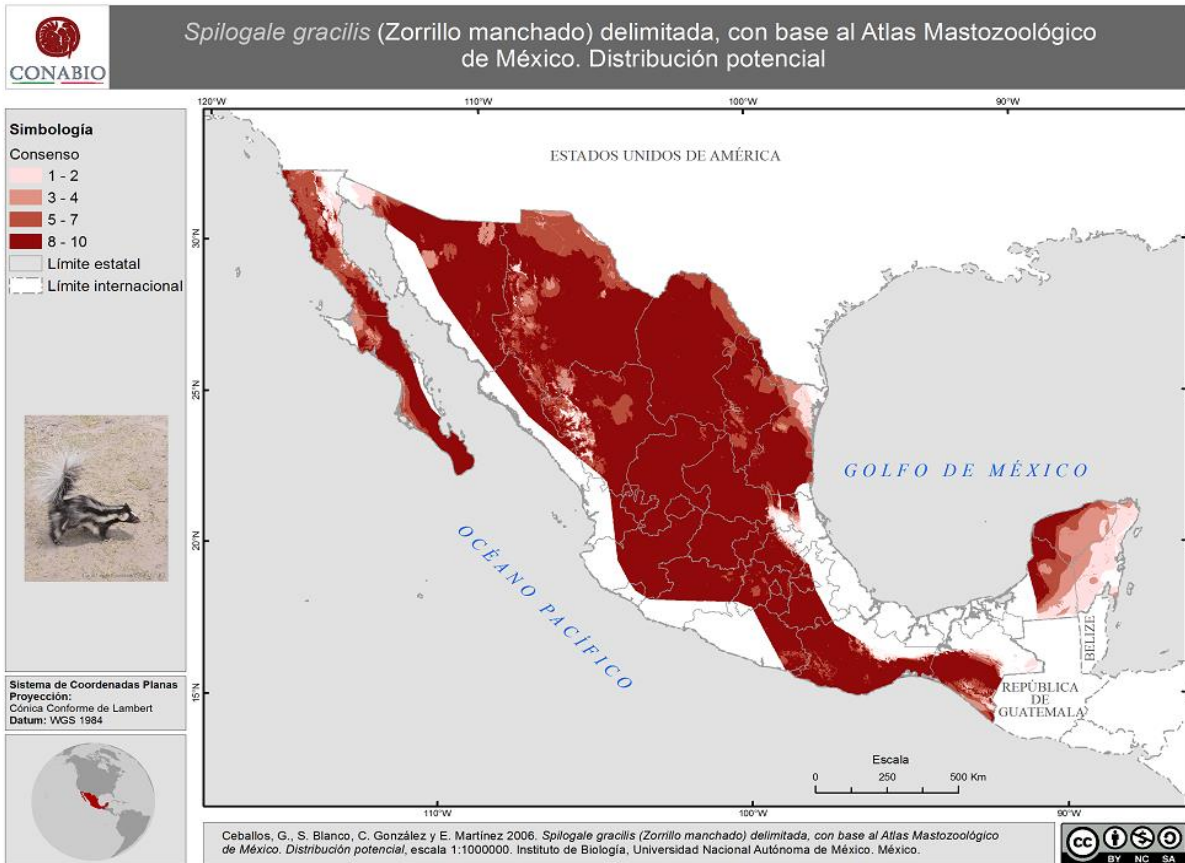


Figura 26. Distribución potencial *Spilogale gracilis*. Tomada y editada de SNIB, 2020.

11. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la rabia. (OMS, 2013).

Figura 2. Partícula Viral y las partes que lo componen. Tomada y modificada de: <https://www.dreamstime.com/stock-images-diagram-rabies-virus-particle-structure-file-eps-format-image36842874>

Figura 3. Genoma del virus de la rabia. Tomada y modificada de: CDC, 2019. https://www.cdc.gov/rabies/about.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Frabies%2Ftransmission%2Fvirus.html

Figura 4. Modificado de Mollentezen *et al.*, 2014.

Figura 5. Filogenia evolutiva de la familia procyonidae (Koepfli *et al.* 2007).

Figura 6. Especies pertenecientes a la familia Procyonidae. Tomada de: Handbook of the Mammals of the World – Volume 1

Figura 7. *Nasua narica* Fotografía: Nidia Aréchiga

Figura 8. Morfología del Coatí. Fotografía: Nidia Aréchiga

Figura 9. Se observa sombreado el rango de distribución del Coatí de nariz blanca en la República Mexicana (CONABIO,2020).

Figura 10. Personas atacadas por mamíferos silvestres al año en México. Fuente: Boletín Epidemiológico. Dirección General de Epidemiología.

Figura 11. Mapa de localización de muestras trabajadas en este proyecto.

Figura 12. Grafica de sobrevivida Kaplan-Meir resultado de la prueba biológica.

Figura 13. Muestra 3202 positiva con la prueba de IFD, positividad 3+.

Figura 14. Muestra 3202 inoculada en cerebro de ratón negativa con la prueba de IFD.

Figura 15. Visualización de los productos de RT-PCR que corresponden a un fragmento del gen que codifica para la nucleoproteína del virus de la rabia.

Figura 16. Reconstrucción filogenética realizada por el método bayesiano empleando un fragmento de la nucleoproteína.

Figura 17. Distribución potencial de *Tadarida brasiliensis*. Tomada y editada de SNIB, 2020.

Figura 18. Distribución potencial *Nyctinomops laticaudatus*. Tomada y editada de SNIB, 2020.

Figura 19. Distribución potencial *Promops centralis*. Tomada y editada de SNIB, 2020.

Figura 20. Distribución potencial *Eumops auripendulos*. Tomada y editada de NATURALISTA, 2020.

Figura 21. Distribución potencial *Eumops bonariensis*. Tomada y editada de SNIB, 2020.

Figura 22. Distribución potencial *Eumops glaucinus*. Tomada y editada de SNIB, 2020.

Figura 23. Distribución potencial *Molossus rufus*. Tomada y editada de SNIB, 2020.

Figura 24. Distribución potencial *Molossus sinaloe*. Tomada y editada de SNIB, 2020.

Figura 25. Distribución potencial *Conepatus semistriatus*. Tomada y editada de SNIB, 2020.

Figura 26. Distribución potencial *Spilogale gracilis*. Tomada y editada de SNIB, 2020.

12. ÍNDICE DE CUADRO

Cuadro 1. Nombre científico y común de todas las especies pertenecientes a la familia Procyinodae. Tomado y editado de Glatston, A., 1994.

Cuadro 2. Muestras utilizadas para este proyecto.

Cuadro 3. Patrones de reactividad de las variantes del virus de la rabia que circulan en México con el panel reducido de 8 anticuerpos monoclonales.

Cuadro 4. Master mix para RT-PCR.

Cuadro 5. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para amplificar el gen que codifica para la nucleoproteína.

Cuadro 6. Programa usado para termociclador.

Cuadro 7. Resultados del aislamiento viral en células.

Cuadro 8. Resultados de la prueba de IFD.

Cuadro 9. Resultados de la caracterización antigénica del virus de la rabia.

Cuadro 10. Resultados de la visualización de productos de PCR.

Cuadro 11. Resultados de secuencia.

Cuadro 12. Muestras en base de datos del Indre no disponibles.

Cuadro 13. Diferencias significativas entre ambas variantes.



shutterstock.com • 207809535