

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

DETECCIÓN DEL VIRUS DE RABIA EN
MURCIÉLAGOS HEMATÓFAGOS *Desmodus rotundus*
DE CUEVAS EN PAISAJES MODIFICADOS DEL MUNICIPIO
DE HUEYTAMALCO, PUEBLA, MÉXICO

PRESENTA

BRENDA CORTÉS TORRES

ASESORES

Dr. GERARDO SUZÁN AZPIRI

Dra. ELIZABETH LOZA-RUBIO

MÉXICO, D.F.

2009



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.

A MI HERMANA

A MI MADRE

A MI PADRE

A MIS NENES

AGRADECIMIENTOS

A Dios. A mi hermana y a mi familia por su apoyo, por todo su amor y cariño.

A mis amigas y amigos que han estado conmigo en todo momento. Que me han dado alegría y ánimos para seguir adelante en cada paso de mi vida.

A mi asesor, el Dr. Gerardo Suzán Azpiri, de quien recibí ayuda y apoyo en todo momento. Por mostrarme una perspectiva distinta de la fauna silvestre y de la medicina veterinaria.

A mi asesora, la Dra. Elizabeth Loza-Rubio, por brindarme su ayuda, confianza y paciencia. Por su gran apoyo, que fue determinante para concretar este estudio.

Agradezco al Laboratorio de Ecología y Conservación de Vertebrados Terrestres, en especial al Dr. Rodrigo Medellín, a la M. en C. Osiris Gaona por todas las facilidades brindadas para la elaboración de este estudio; a Angélica Menchaca y a Guillermo Lacy por su ayuda en el trabajo de campo, pues su apoyo fue imprescindible en esta tesis.

A todo el personal del Campo Experimental “Las Margaritas” del INIFAP, por su ayuda y hospitalidad durante la realización de los muestreos.

Al Departamento de Biotecnología, en el CENID-Microbiología del INIFAP, por su apoyo y amabilidad en mi estancia durante el trabajo de diagnóstico.

Agradezco el apoyo brindado por el área de Diagnóstico de Rabia del Laboratorio de Referencia CENASA en Tecámac, Estado de México, a los MVZ Raymundo Iturbe y José Manuel Saavedra del Departamento de Virología de la FMVZ-UNAM, a la MVZ Alma Huesca de la SAGARPA por otorgarme datos significativos.

A Emilio Rendón y Claudia Muñoz por la ayuda y compañía brindada durante los muestreos. Grandes ejemplos en mi formación.

A Roberto Carrasco, por su apoyo y por compartir sus ideas y conocimientos para la elaboración de esta tesis.

Una mención especial para Edith Rojas Anaya, por su amistad y apoyo en mi trabajo de laboratorio. Por su paciencia, por no desesperar, por aguantarme en mi estancia en el laboratorio. Por su sencillez, calidez y amabilidad. Sin su ayuda, este trabajo no hubiera sido posible.

A Oscar Rico, por su amistad y apoyo tanto en campo como para la realización de la tesis.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS PARTICULARES	7
METODOLOGÍA	8
ÁREA DE ESTUDIO	8
IDENTIFICACIÓN DEL REFUGIO Y USO DE SUELO	9
MUESTREO	12
TOMA DE MUESTRAS	14
TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	15
<i>Detección de anti-cuerpos antirrábicos</i>	15
<i>Inmunofluorescencia directa</i>	16
<i>Prueba biológica</i>	16
ANÁLISIS DE RESULTADOS	17

<u>RESULTADOS</u>	<u>18</u>
<u> USO DE SUELO</u>	<u>18</u>
<u> ESTRUCTURA POBLACIONAL</u>	<u>21</u>
<u> DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA RABIA</u>	<u>23</u>
<u> DETECCIÓN DE RABIA EN CEREBROS</u>	<u>25</u>
<u> PRUEBA BIOLÓGICA</u>	<u>25</u>
<u>USO DE SUELO Y ABUNDANCIA DE <i>Desmodus rotundus</i></u>	<u>26</u>
<u>USO DE SUELO Y SEROPOSITIVIDAD CONTRA RABIA</u>	<u>26</u>
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>27</u>
<u>ANEXO I: Registro de murciélagos hematófagos <i>Desmodus rotundus</i></u>	<u>29</u>
<u>ANEXO II: Reactivos utilizados en las técnicas de diagnóstico de rabia</u>	<u>32</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>36</u>

RESUMEN

CORTÉS TORRES BRENDA.

Detección del virus de rabia en murciélagos hematófagos

***Desmodus rotundus* de cuevas en paisajes modificados**

del municipio de Hueytamalco, Puebla, México.

Asesores: Dr. Gerardo Suzán Azpiri y Dra. Elizabeth Loza-Rubio.

Para encontrar una relación entre las alteraciones humanas con la frecuencia de rabia en el Municipio de Hueytamalco en Puebla, México, se seleccionaron cuatro refugios de murciélagos hematófagos *Desmodus rotundus* con diferentes grados de intensidad en el uso de suelo en los alrededores. Se obtuvieron imágenes del satélite Landsat del año 2005 en las que se encuentran incluidos los sitios muestreados. Se clasificó el uso de suelo en un área de dos kilómetros alrededor de los cuatro refugios: cuerpo de agua, área inundada, área desmontada, vegetación escasa y vegetación conservada. Se clasificó la estructura poblacional de los individuos muestreados por sexo, edad y estado reproductivo, donde se presentó una mayoría de hembras adultas poslactantes. Para la detección del virus de rabia se analizaron ochenta y dos muestras de cerebros mediante Inmunofluorescencia directa (IFD) donde no se detectó la presencia del virus. A las muestras sospechosas se les realizó la prueba biológica sin resultados positivos. Se realizó la técnica ELISA (Eli-Rab®) a veintiún muestras de suero donde se obtuvieron once sueros positivos, lo que representó una frecuencia de rabia de 52.38%. La abundancia de *Desmodus rotundus* no se relacionó con la

seroprevalencia de rabia, sin embargo, la mayor seroprevalencia se encontró asociada al refugio “Las Vegas” que presenta una vegetación escasa con mayor grado de perturbación antropogénica. No se encontró una diferencia significativa entre las frecuencias de las cuevas. Los resultados sugieren que en lugares más conservados los *Desmodus rotundus* podrían tener menor seroprevalencia y menos probabilidades de mantener la infección.

INTRODUCCIÓN

Las actividades del ser humano han causado cambios en el medio ambiente que afectan severamente a la biodiversidad, perdiéndose elementos fundamentales en el funcionamiento de los ecosistemas. Dentro de éstas, las más importantes son la agricultura, la ganadería y la deforestación, ocasionando pérdida de hábitat ¹⁻⁶. Una de las consecuencias de la modificación del hábitat es el cambio en los patrones de dispersión, colonización, alimentación ^{7, 8}, distribución de reservorios, vectores y cambios en la dinámica de enfermedades ⁹. Estas alteraciones aumentan el contacto de especies silvestres con especies domésticas y el humano ¹⁰, favoreciendo la emergencia y reemergencia de diferentes enfermedades ^{2, 11, 12}, que pueden afectar tanto animales domésticos como de vida silvestre e inclusive al hombre ^{13, 14}.

Desafortunadamente las tasas de deforestación y pérdida de la diversidad biológica aumentan significativamente, disminuyendo la capacidad del ecosistema de proveer un hábitat apropiado para las especies ¹⁵⁻¹⁸. Recientemente, se ha considerado que las actividades antropogénicas y el desarrollo de las sociedades modernas pueden favorecer el brote de diferentes infecciones a través de distintos mecanismos ¹⁸, dispersándose entre los mamíferos directa o indirectamente, como el caso del virus de la rabia.

Las acciones del humano no sólo afectan los espacios abiertos, sino también logran alterar sitios de refugio de diversas especies, entre ellas los murciélagos.

Para las distintas especies de murciélagos su refugio consta de minas abandonadas, casas abandonadas, árboles, troncos huecos, puentes, alcantarillas o cuevas ¹⁹ que presenten los requerimientos adecuados de temperatura y humedad, entre otros. Estos sitios logran reunir una gran cantidad de especies de murciélagos, que cada vez se ven más afectadas por la interrupción del hombre al modificar el paisaje alrededor y dentro de estos refugios, como lo son las actividades agropecuarias y eliminación de vectores ²⁰ que provocan cambios de sitio, migraciones y tasas de mortalidad ²¹. Las actividades agropecuarias obligan a los murciélagos a buscar otros métodos de alimentación, utilizando los recursos que les brindan los humanos como los cultivos, y en el caso de los murciélagos hematófagos se alimentan del ganado que introduce el hombre.

De las enfermedades emergentes, el 60% son zoonosis y la mayoría de ellas proviene de animales silvestres ¹. Los murciélagos son considerados portadores-reservorios de muchas enfermedades zoonóticas reemergentes, incluyendo la rabia ²² y los brotes de enfermedades originadas de murciélagos se relacionan con actividades antropogénicas ¹². Por lo que se deben tomar en cuenta los factores de riesgo para prevenir enfermedades zoonóticas y realizar acciones de control.

La rabia es una zoonosis causada por un Lyssavirus, se manifiesta como una encefalomielitis aguda casi siempre mortal ²³, presente en numerosas especies que son reservorios de la infección. El murciélago hematófago se considera un huésped importante de la rabia, especialmente en áreas tropicales y subtropicales del continente americano ²⁴. En los últimos años, éste se ha convertido en el transmisor principal de la rabia en México, afectando así al ganado y también a

seres humanos ^{23, 25}. La distribución de brotes de rabia ha cambiado, probablemente pueda asociarse al incremento en la ganadería y otras actividades antropogénicas, lo que favorecería la presencia de poblaciones de murciélagos portadores del virus ²⁶⁻²⁸.

El *Desmodus rotundus* es una especie que vive en colonias, presenta una alta densidad y una alta tasa de contacto donde puede ocurrir intercambio de distintos agentes infecciosos ^{24, 28}. Se han encontrado anticuerpos neutralizantes en el suero de los animales, sugiriendo que los portadores pueden desarrollar esta inmunidad al ser expuestos a repetidas infecciones subletales ²⁹⁻³⁰.

Por otro lado, en México, según datos de la SAGARPA, desde el 2000 la zona enzoótica de rabia parálitica bovina comprende los estados de Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco, Veracruz y Yucatán. De forma parcial los estados de Chihuahua, Durango, Hidalgo, México, Puebla, San Luís Potosí, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas presentan esta enfermedad. Recientemente en Querétaro se reportaron ataques de murciélagos al ganado. En agosto de 2006 se presentó un brote de rabia parálitica bovina en Guerrero, en 2007 en Veracruz, en 2008 al norte del país y a principios de 2009 en Guanajuato³¹.

El Estado de Puebla, que posee condiciones ambientales y microambientales con variedad de hábitats y de formas de vida ^{15, 16}, presenta una gran cantidad de áreas fragmentadas de selva alta y bosques de montaña, y gran parte del territorio del municipio de Hueytamalco está destinado a actividades agropecuarias ³². Las

características climáticas y geográficas del estado pueden favorecer la presencia del murciélago hematófago que se puede asociar con el virus de la rabia. En 2005 y 2006 se reportaron en Puebla ocho casos de rabia bovina por año respectivamente en distintos municipios. El municipio de Hueytamalco reportó un caso en 2006, según datos de SAGARPA.

Los murciélagos hematófagos habitan en refugios que se encuentran cerca o dentro de las explotaciones agropecuarias del municipio, principalmente en cuevas donde hay mayores tasas de contacto, incrementando la posibilidad de transmisión interespecífica ^{16, 32-36} con especies no hematófagas ^{16, 33} que pueden infectarse con el virus de la rabia ³⁴⁻³⁸, por especies migratorias que se encuentren en el mismo refugio ³³.

En algunos de los ambientes modificados de las zonas tropicales de México se sabe de la coexistencia de distintas especies de murciélagos en diferentes cuevas. En el municipio de Hueytamalco está reportado que existen hasta once especies diferentes de murciélagos en una sola cueva ³⁹ que se encuentra en un sitio perturbado. Factores como las altas densidades población de algunos murciélagos en las cuevas, la inmunidad de los mismos, la calidad del refugio y los efectos del paisaje de los alrededores pueden determinar la prevalencia de la infección ⁴⁰.

HIPÓTESIS

Las cuevas con mayor abundancia de *Desmodus rotundus* se encontrarán asociadas a paisajes con vegetación escasa y áreas más desmontadas.

En las cuevas donde existe mayor grado de modificación del paisaje por actividades antropogénicas, se encontrará mayor frecuencia del virus de rabia en *Desmodus rotundus*.

OBJETIVO GENERAL

Detectar la presencia del virus de rabia y anticuerpos antirrábicos en muestras de sueros y cerebros de *D. rotundus*, para relacionar la frecuencia del virus de rabia con la estructura poblacional y con el uso de suelo alrededor de las cuevas.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar el uso de suelo presente alrededor de las cuevas muestreadas y su relación con la presencia del virus de rabia.
2. Comparar la estructura poblacional de *D. rotundus* de las cuevas muestreadas y su relación con la presencia del virus de rabia.
3. Detectar anticuerpos antirrábicos en sueros provenientes de *D. rotundus*.
4. Detectar el virus de rabia activo en cerebros provenientes de *D. rotundus*.

METODOLOGÍA

ÁREA DE ESTUDIO

El Estado de Puebla, específicamente el Municipio de Hueytamalco, cuenta con características idóneas como su clima, geografía y áreas perturbadas que pueden favorecer la presencia y conservación de murciélagos. Hueytamalco se encuentra en los paralelos $19^{\circ} 51' 03''$ y $20^{\circ} 12' 42''$ de latitud Norte y los meridianos $97^{\circ} 12' 48''$ y $97^{\circ} 22' 42''$ de longitud Occidental, su superficie es de 242.38 km^2 . y su altura oscila entre 250 y 1,700 msnm ³² (Fig. 1).



Figura 1. Localización geográfica del área de estudio Municipio de Hueytamalco, Puebla.

Mapa obtenido de Enciclopedia de los Municipios de México ³².

El estudio se realizó en el municipio de Hueytamalco, Puebla, donde se seleccionaron cuatro cuevas debido a que se encuentran en áreas con influencia antropogénica.

Las capturas se efectuaron próximas al Campo Experimental “Las Margaritas” del INIFAP (Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria), donde se presenta alto grado de fragmentación de hábitat con áreas extensas de agricultura y ganadería, así como la presencia de asentamientos humanos.

Los refugios estudiados en este trabajo son cuevas que habitan murciélagos hematófagos *Desmodus rotundus*, donde se presentan áreas con actividad humana a sus alrededores:

“La Cascada” (N 20°04'026", W 97°30'765'), “Las Vegas” (N 20°08'910', W 97°24'646'), “Los Anayos” (N 20°02'730', W 97°15'754') y “San José” (N 20°08,195', W 97°12,958).

IDENTIFICACIÓN DE USO DE SUELO

Los muestreos se realizaron en cuevas que presentan distintos usos de suelo alrededor, se encuentran cerca de asentamientos humanos, sitios alterados por poblaciones cercanas, ganadería, agricultura y deforestación.

El uso de suelo alrededor de los refugios se determinó en base al Índice Diferencial de Vegetación Normalizado (NDVI) ⁴¹⁻⁴³ presente en cada pixel dentro de un radio de dos kilómetros alrededor de las cuevas.

Se utilizaron imágenes del satélite Landsat del año 2005 ⁴⁴, de las cuales se cortó un área circular de 2km. de radio alrededor de cada cueva, que se aprecian en color verde en la Figura 2.

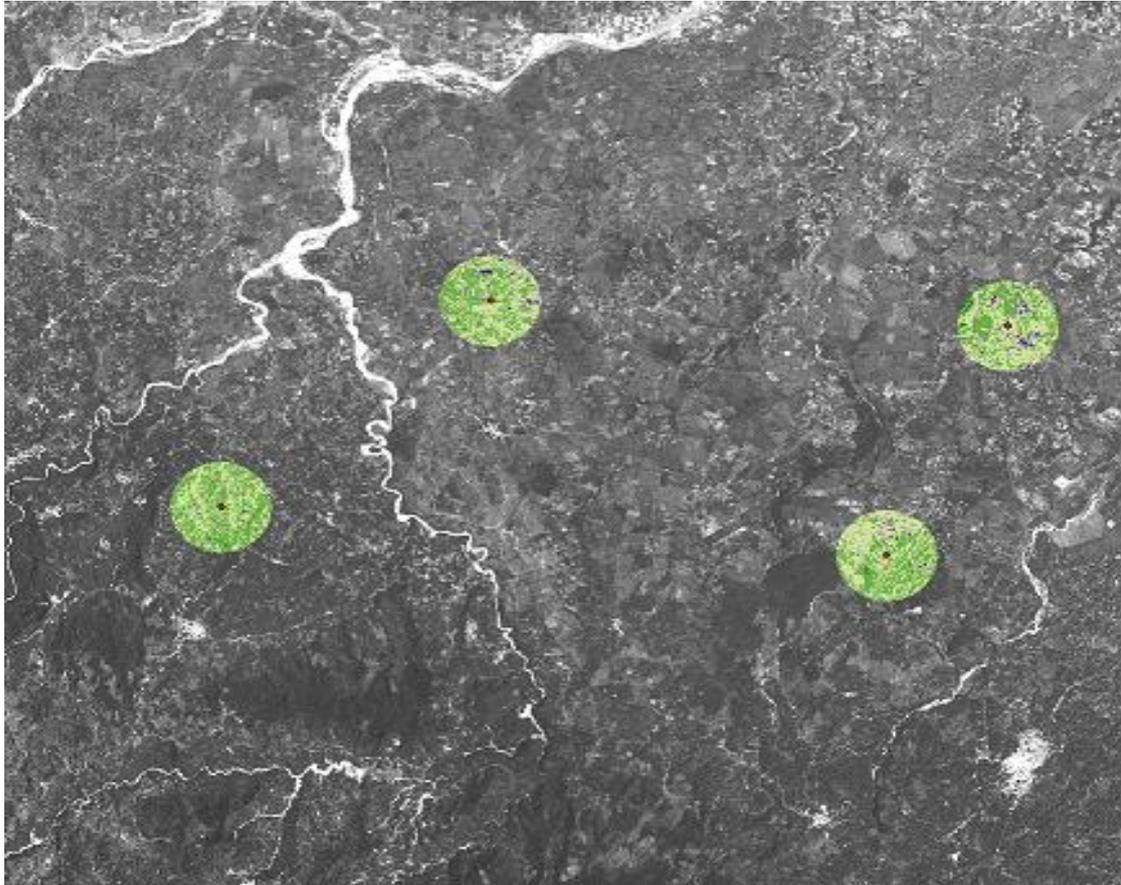


Figura 2. Índice de vegetación alrededor de las cuevas muestreadas

Se cuantificó la proporción de píxeles que corresponden a cada clase dentro de los círculos de 2 Km de radio. Se realizaron histogramas de las clases de uso de suelo construidas a partir del NDVI en un área circular de 2km de radio alrededor de las cuevas (Fig. 3).

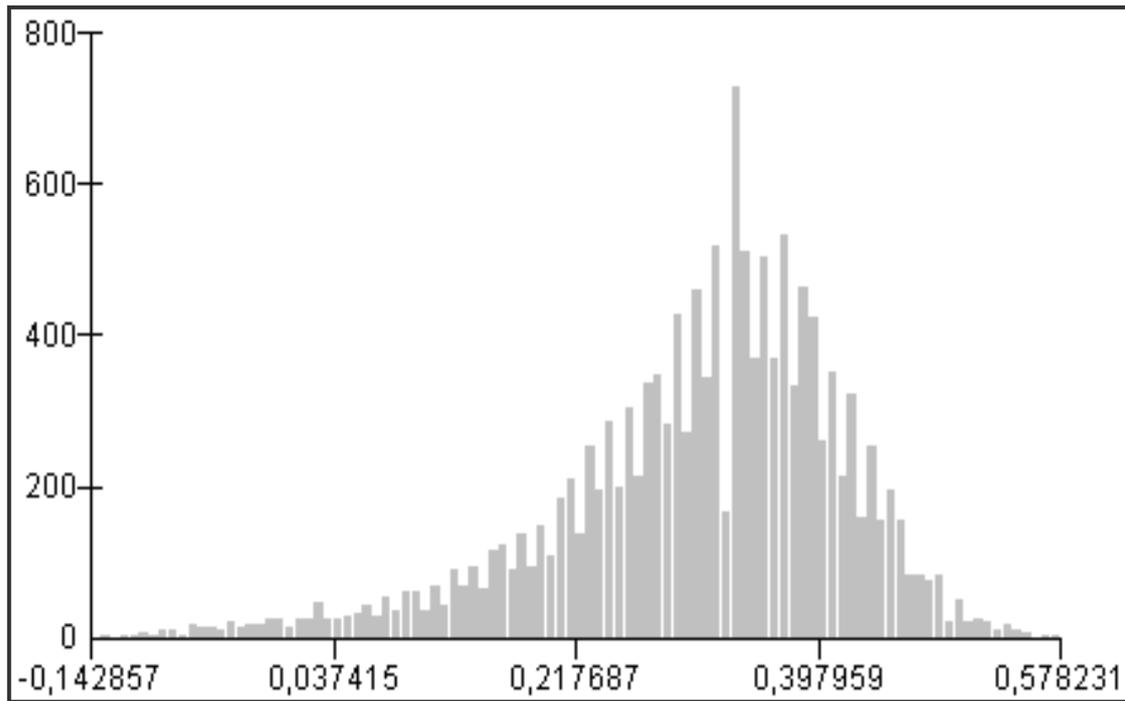


Figura 3. Histograma de frecuencias del NDVI en toda la imagen que abarca las cuatro cuevas.

Se clasificó cada pixel de la imagen en función del índice de vegetación con base en valores con un significado en cuanto a uso de suelo (Tab. 1).

Clase de uso de suelo	NDVI
1. Cuerpo de agua	-0.92 a -0.13
2. Área inundada	-0.13 a 0
3. Área desmontada	0 a 0.12
4. Vegetación escasa	0.12 a 0.36
5. Vegetación conservada	0.36 a 0.7

Tabla 1. Clasificación del uso de suelo alrededor de las cuevas muestreadas.

Se realizaron histogramas clasificados de toda la imagen de satélite que abarca a las cuatro cuevas (Fig. 4).

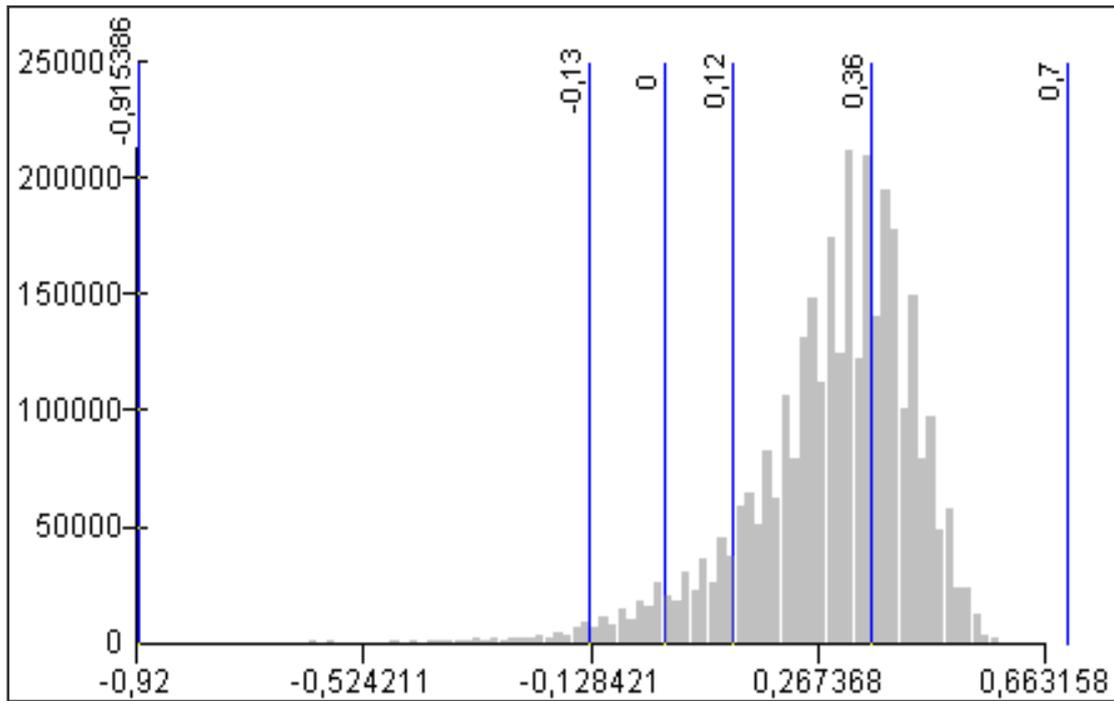


Figura 4. Histograma clasificado de toda la imagen de satélite que abarca a las cuatro cuevas.

MUESTREO

En este estudio se trabajaron muestras de sueros y cerebros de murciélagos hematófagos *Desmodus rotundus* que se colectaron en cuatro diferentes cuevas en zonas perturbadas. Los muestreos se realizaron cada dos meses a partir de julio de 2007 hasta julio de 2008.

Las capturas de los *D. rotundus* se realizaron estimando visualmente las poblaciones en cada refugio en los lugares de percha, y se muestreó al tres por ciento de los individuos capturados para no afectar la población de la cueva.

Para la captura de murciélagos, se utilizaron redes de golpe y redes de niebla que fueron ubicadas dentro y fuera de las cuevas dependiendo del tamaño y la accesibilidad a los refugios. Los muestreos se realizaron a las primeras horas del día o al anochecer. Las redes de niebla se revisaron cada quince minutos, durante una hora aproximadamente, para evitar que los murciélagos se enredaran demasiado o llegaran a romper la red.

El método de captura fue de la manera siguiente. Se utilizaron guantes de carnaza para liberar a los vampiros de las redes, se sujetaron del cuerpo con una mano y con la otra cuidadosamente se desenredaron poco a poco hasta liberarlos completamente, los murciélagos no hematófagos se liberaron dentro del mismo refugio. En casos en que no se lograron tomar las muestras en el sitio de captura, se colocaron los vampiros en sacos de tela individuales para su manejo o transporte, humedeciéndolos en la parte de abajo del saco para evitar sofocamiento de los individuos. Estos procedimientos se realizaron con base en la guía de uso de mamíferos silvestres (Guidelines of the American Society of Mammalogists for the Use of Wild Mammals in Research) ⁴⁵.

El registro de los individuos se recabó en hojas de campo que contienen los siguientes datos: fecha de captura, nombre de la cueva, coordenadas de localización de la cueva, identificación del individuo (serie en números arábigos). La caracterización individual de los *D. rotundus* fue en base a las medidas somáticas siguientes: largo de oreja (O), largo de pata (Pt), largo de antebrazo (Ab), largo total (LT), peso (P), sexo (S), edad (E), estado reproductivo (ER) ⁴⁶ (Anexo I).

Las medidas somáticas de los *Desmodus rotundus* oscilan de: la Oreja entre 15 a 20 milímetros (mm), Pata: 13 a 20mm, Antebrazo: 52 a 63mm, Largo Total: 69 a 90mm, Peso: 25 a 40 gramos (g) ¹⁹.

La edad de los murciélagos se pudo estimar al observar a contraluz las articulaciones de las falanges. Cuando el cartílago se notó transparente, los individuos eran juveniles, mientras que los que se vieron ya osificados, eran adultos. Para determinar el estado reproductivo de las hembras se revisó la vulva, cuando se observó cerrada eran inactivas. En las hembras gestantes el feto fue evidente. Las hembras lactantes presentaron las glándulas mamarias muy desarrolladas. Las hembras poslactantes mostraron las glándulas mamarias medianas. En el caso de los machos, son juveniles cuando los testículos todavía se encuentran en el abdomen, y se diferencian de las hembras por la distancia del ano hacia el pene, ya que en las hembras es más corta del ano a la vulva ⁴⁶.

TOMA DE MUESTRAS

Para la toma de muestras se utilizó equipo de disección, guantes de látex y cubre bocas para la protección del personal. Se obtuvieron muestras sanguíneas por punción intracardiaca previa anestesia de los individuos con Xilacina a una dosis de 2 mg/kg ⁴⁵ y se tomaron 0.3 ml. de sangre. Se obtuvo el suero centrifugando las muestras a 3000 rpm por 20 minutos. Se congelaron las muestras para su transporte. Para la obtención del encéfalo, los individuos fueron eutanasiados con Pentobarbital sódico a una dosis de 6 mg/kg ⁴⁵ vía intraperitoneal. La conservación

de los cerebros se realizó mediante congelación. El personal que realizó las capturas y toma de muestras cuenta con la vacunación antirrábica (vacuna tipo Vero) que proporciona la SSA, a través de sus Centros Antirrábicos.

Se obtuvieron muestras de encéfalo en las cuatro cuevas muestreadas, mientras que el suero sólo se obtuvo de dos (“Las Vegas” y “Los Anayos”).

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Las muestras obtenidas de los murciélagos se procesaron en el Departamento de Biotecnología en el CENID-Microbiología del INIFAP Ciudad de México y se trabajaron de la siguiente manera:

Detección de anticuerpos antirrábicos

Ésta se llevó a cabo en veintiún muestras de suero mediante la prueba de ELISA directa Eli-Rab® (CENID-Microbiología, INIFAP) para detectar la presencia de anticuerpos contra rabia. Cada muestra se trabajó por duplicado y el ensayo se realizó dos veces. Brevemente, una placa para ELISA de 96 pozos fue sensibilizada con proteína G del virus de rabia expresada en Baculovirus (datos sin publicar)⁴⁷; esta fue diluida en buffer de carbonatos pH 9.6. La placa se incubó durante toda la noche a 4°C y fue lavada con buffer PBS-Tween 0.05%. Posteriormente se agregó solución bloqueadora al 1% y se incubó una hora a 37°C. A continuación se agregaron los sueros problema, repitiendo la incubación. Como segundo anticuerpo, se utilizó un conjugado de proteína G-peroxidasa (Bio-

Rad ®). La placa se incubó con el conjugado una hora a 37°C y fue lavada. Finalmente se le adicionó el sustrato de revelado con peróxido de hidrógeno, y la lectura de la placa se realizó a 450nm (Bio-Rad ®).

Inmunofluorescencia directa

La detección de la presencia del virus de rabia en las muestras de los ochenta y dos cerebros colectados, se realizó mediante IFD ^{48, 49}. Consistió en realizar una impronta de un fragmento del cerebro problema, fijándolo en acetona durante cuarenta minutos a -20°C, posteriormente se incubó con un conjugado contra el virus de rabia (Laboratorios Baer, México), durante treinta minutos a 37°C. Pasado ese tiempo, se lavó la muestra. La lectura de la impronta se realizó en un microscopio de fluorescencia de Laboratorios Leica® para detectar la presencia del virus (Anexo II). Cuando se obtuvo una muestra sospechosa, se repitió el procedimiento para confirmar el resultado. Adicionalmente a estas muestras se les realizó la prueba biológica ⁴⁸⁻⁵¹.

Prueba biológica

A las muestras que se observaron sospechosas en la prueba de IFD, se les realizó la prueba biológica. Ésta radicó en realizar una suspensión de la muestra, y se inoculó de forma intracerebral a ratones lactantes, donde se espera que presenten signos del virus rábico a partir de los siete días de la inoculación con el virus utilizado en los laboratorios, y doce días con virus de rabia de campo.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se clasificó y comparó el uso de suelo y la presencia de fragmentación del paisaje alrededor de cada una de las cuevas muestreadas y su relación con la frecuencia del virus de rabia.

Se describió la estructura poblacional de los murciélagos hematófagos *D. rotundus* de cada una de las cuevas muestreadas, por sexo, edad y estado reproductivo, y se comparó con las otras cuevas y su relación con la frecuencia del virus de rabia.

RESULTADOS

En este estudio se capturaron en total ochenta y dos *D. rotundus* en cuatro cuevas con diferentes alteraciones de suelo alrededor de 2 km.

USO DE SUELO

A través de la imagen satelital, alrededor de cada refugio se registraron dos clases de suelo con más presencia: vegetación escasa y vegetación conservada.

En los histogramas de frecuencias del NDVI se pueden comparar las curvas indicando la presencia de vegetación alrededor de cada cueva (Fig.5).

Conforme la curva del histograma se desplaza hacia la derecha, significa que un mayor número de píxeles que rodean a cada cueva tienen altos índices de vegetación.

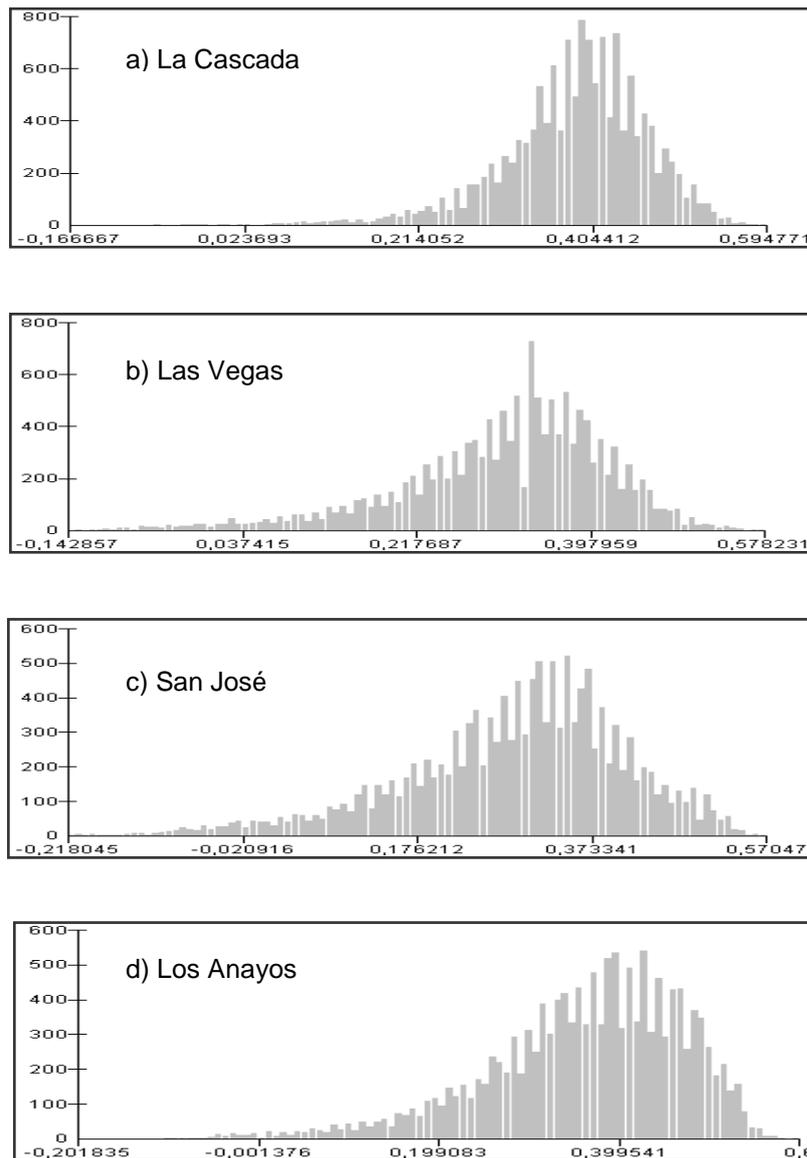


Figura 5. Comparación de curvas indicando la presencia de la vegetación alrededor de cada cueva muestreada: a) La Cascada b) Las Vegas c) San José A. d) Los Anayos.

El eje “Y” indica el número de píxeles, el eje “X” indica el valor del índice de vegetación. Entre más próximo hacia la derecha, indica mayor vegetación.

Se realizaron histogramas de las cuatro clases de uso de suelo que se describen en la figura 4, construidas a partir del NDVI en un área circular de 2km de radio alrededor de cada cueva (Fig. 6).

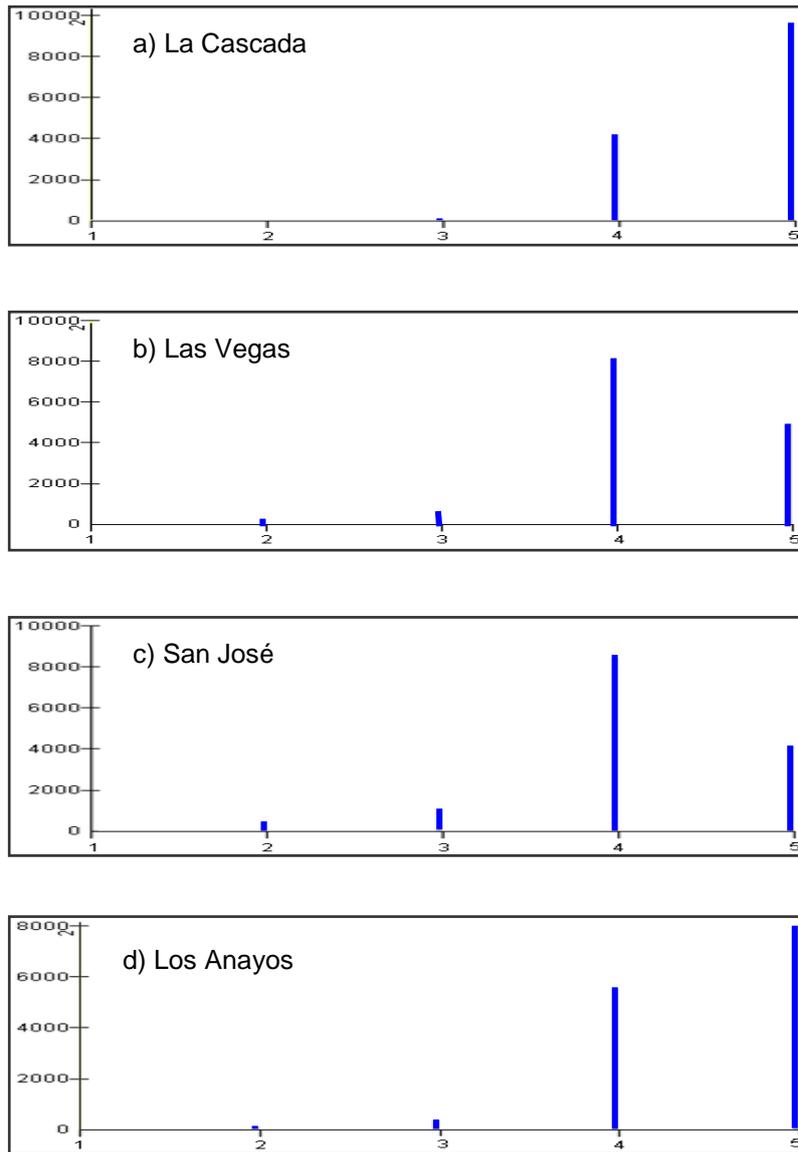


Figura 6. Comparación de clases de uso de suelo alrededor de cada cueva muestreada:
 a) La Cascada b) Las Vegas c) San José A. d) Los Anayos.

El eje “Y” indica el número de píxeles, el eje “X” indica las clases construidas a partir del índice de vegetación (Tabla 1).

Los histogramas de las clases indican que las cuevas “La Cascada” y “Los Anayos” están rodeadas por una mayor proporción de sitios con vegetación escasa a conservada.

ESTRUCTURA POBLACIONAL

De los 82 individuos muestreados, el 63% eran hembras (52) y el 37% eran machos (30), de diferentes edades (crías, juveniles y adultos) y distintas etapas reproductivas (hembras inactivas, gestantes lactantes, poslactantes) (Fig. 7 a 9).

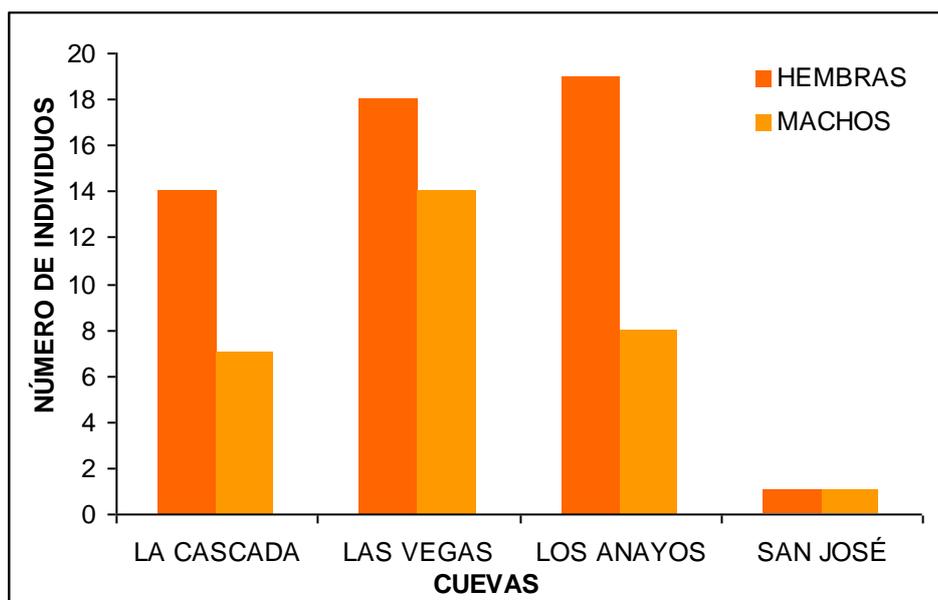


Figura 7. Estructura poblacional por sexo en las cuatro cuevas muestreadas.

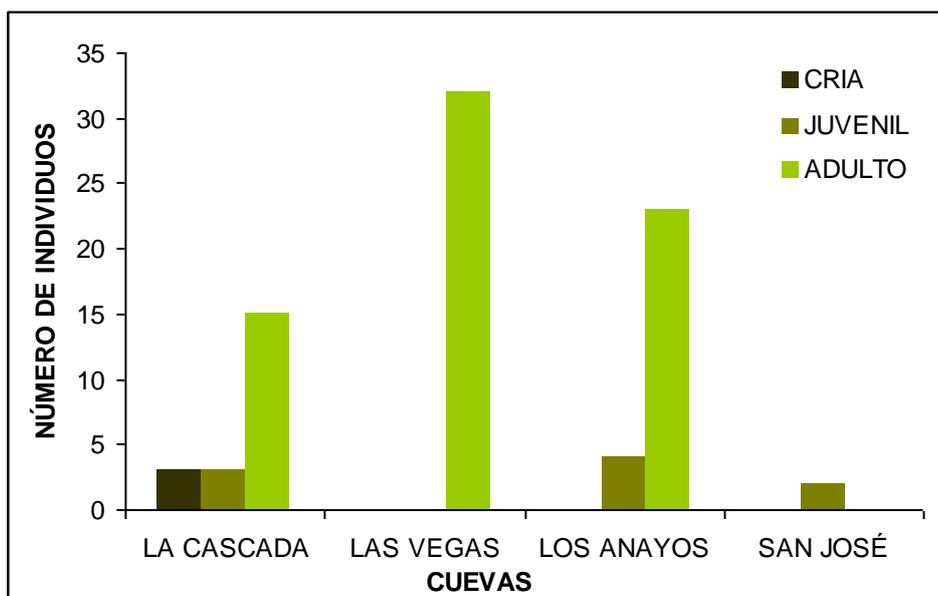


Figura 8. Estructura poblacional por edades en las cuatro cuevas muestreadas.

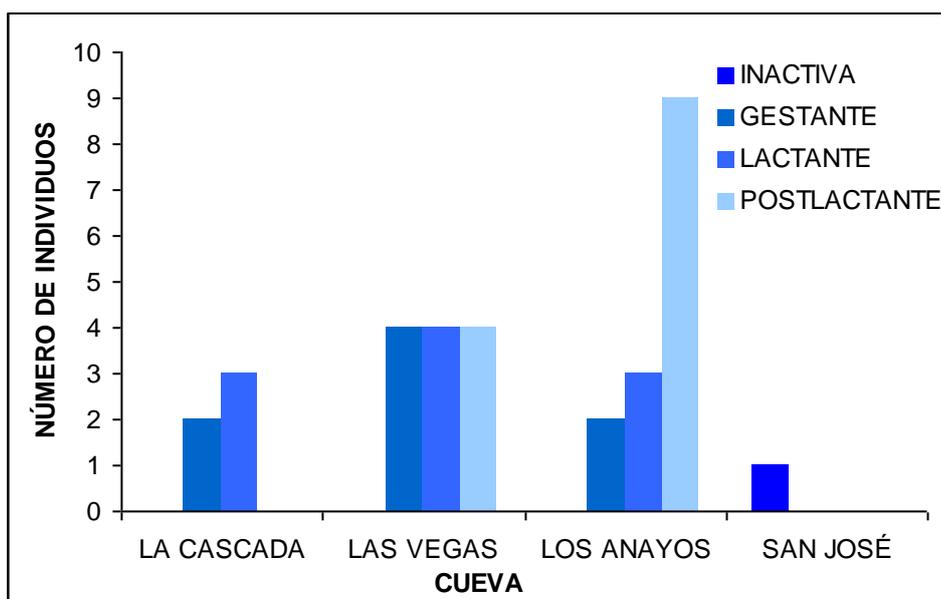


Figura 9. Estructura poblacional por estado reproductivo en las cuatro cuevas muestreadas.

En la cueva “La Cascada” el 3.7% (3) lo representaron hembras juveniles. Se encontraron crías que representan el 3.7% (3) de la población total, se capturaron 15 adultos que constituyen el 18.3% de la población (Fig. 7 a 9).

De la cueva “Las Vegas” se capturó a la mayoría de los machos adultos con un 17% (14). Las hembras adultas representaron el 22% (18). Aquí sólo se encontraron individuos de esta edad. Las hembras capturadas, se encontraron en todas las etapas reproductivas; las inactivas, con 6 individuos, representaron el 7.3%; las hembras preñadas (4) constaron el 4.9%, y las lactantes con 4 individuos también representaron el porcentaje de 4.9%. A pesar del estado reproductivo de las hembras, no se encontraron a las crías (Fig. 7 a 9).

En la cueva “Los Anayos” se recolectaron ocho machos que representaron el 9.8% del total de los capturados. El porcentaje de juveniles fue de un 4.9% que

constaron la mayoría de juveniles capturados con 4 individuos. En este mismo refugio fueron capturados, entre machos y hembras, un total de 28%, es decir, 23 adultos. La mayoría de las hembras capturadas en este refugio fueron las poslactantes, con un 11% de la población total (Fig. 7 a 9).

Sólo dos individuos juveniles se capturaron en la cueva de “San José”, una hembra y un macho inactivos, que representaron un 2.43% (Fig. 7 a 9).

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA RABIA

Se obtuvieron veintiún muestras de suero de *D. rotundus*. De la cueva “Las Vegas” se tomaron dieciséis muestras: siete hembras y nueve machos adultos; mientras que en “Los Anayos” se muestrearon cinco vampiros, dos hembras y tres machos adultos.

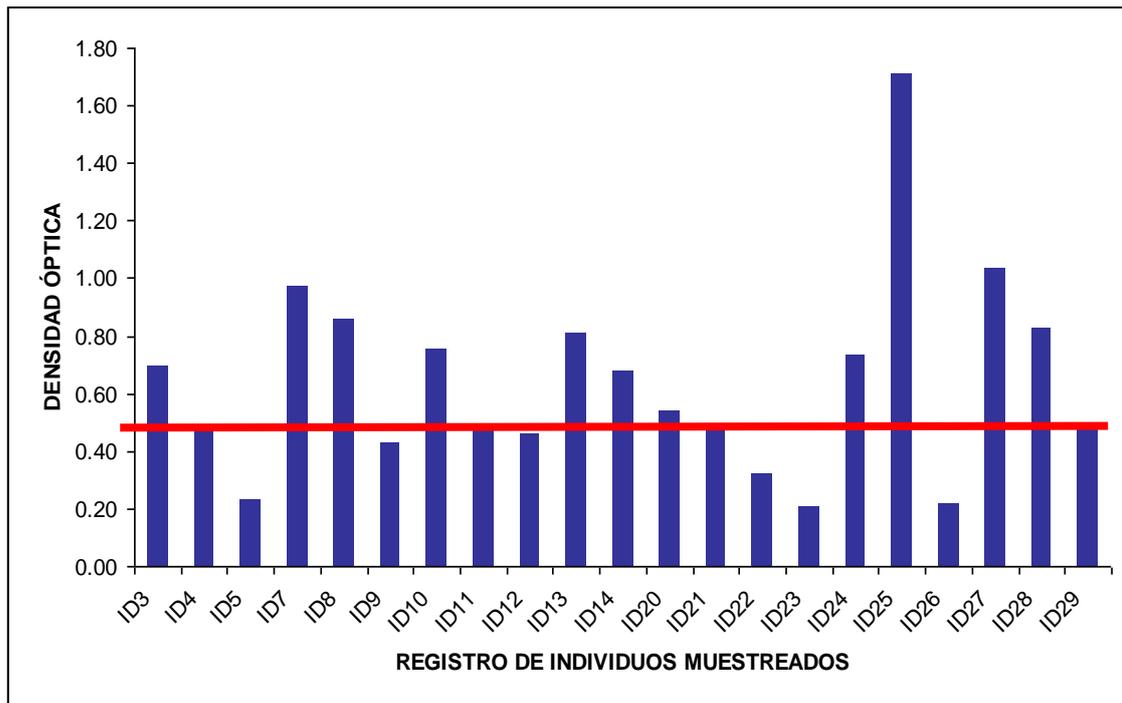


Figura 10. Detección de anticuerpos antirrábicos mediante ELISA.

Para la detección de anticuerpos antirrábicos se realizó la prueba de ELI-Rab® (Fig. 10). La línea horizontal muestra el punto de corte obtenido en este ensayo (DO=0.44). Las barras indican a cada uno de los individuos muestreados. La numeración no es consecutiva, ya que el resto pertenecía a otra especie.

De las veintiún muestras de suero, se detectaron anticuerpos contra rabia en nueve individuos de la cueva “Las Vegas” que representaron el 43%. De la cueva “Los Anayos” se encontraron dos individuos con anticuerpos contra el virus, que constituyeron el 10%.

La frecuencia de anticuerpos contra rabia en la estructura poblacional de “Las Vegas” en las hembras fue de 14% (3) y en los machos de 29% (6); mientras que en “Los Anayos” en las hembras fue de cero y en los machos de 9.5% (2).

La frecuencia de anticuerpos contra rabia de las veintiún muestras tomadas en los dos refugios fue de 52% (once individuos positivos).

DETECCIÓN DE RABIA EN CEREBROS

Durante el muestreo se capturaron ochenta y dos individuos de las cuatro diferentes cuevas en paisajes modificados. A los cerebros colectados se les realizó el diagnóstico de rabia mediante la prueba de Inmunofluorescencia directa. Se obtuvieron dos muestras sospechosas, a las cuales se les repitió la prueba y posteriormente se les realizó la prueba biológica. Todos los cerebros resultaron negativos a esta prueba.

PRUEBA BIOLÓGICA

Los ratones inoculados con la suspensión de las muestras sospechosas no presentaron ninguna signología después de los doce días de la inoculación; por lo que se determinó que el virus no se encontraba activo en la zona de muestreo.

USO DE SUELO Y ABUNDANCIA DE *Desmodus rotundus*

No se encontró relación entre la abundancia de *D. rotundus* y el uso de suelo por el escaso número de individuos capturados, sin embargo, el mayor número de *D. rotundus* capturados fue en las cuevas “Las Vegas” que tiene áreas inundadas y vegetación escasa, y “Los Anayos” que muestra una vegetación conservada. Ambos refugios presentan áreas desmontadas y alteraciones humanas. El mayor número de individuos capturados en éstos refugios pudo deberse a un mayor esfuerzo de captura. En la cueva “La Cascada” predominó una vegetación abundante, en “San José Acateno” se presentaron áreas inundadas, áreas desmontadas y vegetación escasa.

USO DE SUELO Y SEROPOSITIVIDAD CONTRA RABIA

No se realizaron análisis estadísticos por el pequeño número de muestras de suero y de cerebro. Sin embargo, sí se encontró una relación entre el tipo de suelo y la seroprevalencia. La mayor seroprevalencia (56%) se encontró en “Las Vegas”, sitio con áreas desmontadas y con vegetación escasa. Se encontró menor seroprevalencia (40%) en la cueva “Los Anayos” donde hay mayor cantidad de vegetación conservada con pocas áreas desmontadas.

Sólo se realizó la prueba estadística X^2 , donde ($X^2 = 0.40$, $gl = 1$, $p = 0.524$), mostrando que no hay diferencia significativa entre las frecuencias de las cuevas.

DISCUSIÓN

En México encontramos zonas donde, por acciones de los seres humanos, hay alteraciones de paisajes y se han perdido hábitats, obligando a los animales de vida silvestre a tener más contacto con los domésticos y con los mismos humanos, al migrar en busca de alimento y refugio; y al mismo tiempo, la posibilidad de entrar en contacto con los agentes patógenos interespecies.

En el Municipio de Hueytamalco, en el área de muestreo, existen paisajes con pequeñas partes de bosque que se encuentran alterados por actividades humanas como agricultura, ganadería y deforestación.

De veintiún muestras de vampiros, con la técnica de diagnóstico ELISA ⁵⁰⁻⁵⁵ se encontraron anticuerpos antirrábicos en once individuos, donde la frecuencia es de 52%. Se repitió el análisis y ambos resultados mostraron una concordancia del 95%. Con éstos resultados se puede determinar que la presencia de la rabia entre las comunidades de murciélagos hematófagos presenta una tendencia de edad, ya que los individuos que presentaron anticuerpos antirrábicos eran adultos. Con referencia al sexo, se encontró variación, pues de once individuos con serología positiva, tres fueron hembras y ocho eran machos seropositivos.

Estos resultados sugieren que los *D. rotundus* pueden tener contacto con el virus de rabia y no desarrollar la enfermedad o que pueden llegar a recuperarse, ya que

en los animales positivos no se encontró la forma activa del virus. Esto puede deberse a la baja cantidad de vampiros muestreados.

Mediante la prueba IFD ⁴⁸⁻⁵¹ no se detectó la presencia del virus de rabia en los cerebros de los murciélagos muestreados, a pesar de que éstos fueron capturados en zonas perturbadas y donde está presente el hombre y algunas actividades agrícolas y ganaderas. En algunos estudios llevados a cabo, por ejemplo en Brasil, indican que la rabia del ganado resulta de una distribución geográfica que está relacionada con las poblaciones de vampiros ⁵³.

En este trabajo se encontró que los individuos seropositivos estaban asociados a zonas con actividades antropogénicas, como la ganadería y la agricultura. Sin embargo, por la poca cantidad de muestras y por la escala espacial utilizada, no se puede precisar con más detalle la relación entre la ganadería y la distribución del murciélago y la rabia. No se pudo demostrar la relación entre la abundancia de *D. rotundus* con el grado de perturbación y modificación del hábitat, sin embargo, se identificó mayor número de individuos y mayor seroprevalencia de rabia en zonas con mayor grado de alteración.

En el Municipio de Hueytamalco, la enfermedad de la rabia no ha aparecido en el ganado desde 2006, ni se tienen reportes de la presencia de rabia en otras especies ³¹. Los resultados negativos en cerebros obtenidos en este estudio sugieren que el virus no se encuentra activo en la zona.

ANEXO I

REGISTRO DE MURCIÉLAGOS HEMATÓFAGOS *Desmodus rotundus*

Fecha	Cueva	Coordenadas	Serie	O	Pt	Ab	LT	P	S	E	ER			
01-Jul-07	Cascada	N 20°04,026' W 97°30,765'	3	17.4	15.8	64.2	75.2	35	♂	adulto	t. abd / inactiv			
			5	17.4	15.7	57	69.6	26	♂	adulto	15,3*7,7			
			8	19.4	15	62.5	86.1	42	♀	adulto	lactante			
			9	18.7	14.9	56.9	84.5	35	♂	adulto	t. abd / inactiv			
			10	18.7	14.3	61.8	84.7	36	♀	adulto	lactante			
			11	18.6	13.6	59.3	73.6	28	♀	adulto	inactiva			
			12	19.1	14.4	62.5	84.1	34	♀	adulto	inactiva			
			13	17.8	14	57.7	82.1	31	♂	adulto	t. abd / inactiv			
			14	18.2	15	54.4	72.9	23	♀	adulto	inactiva			
			15	17.1	13.4	56.5	76.8	30	♂	adulto	t. abd / inactiv			
			16	18.5	14.2	62.4	78.1	40	♀	adulto	gestante			
			17	19.2	15.1	62.6	80.5	39	♀	adulto	inactiva			
			18	16.6	14.7	58.1	80.1	33	♂	adulto	t. abd / inactiv			
			19	17.4	14	61.1	82	47	♀	adulto	gestante			
			20	17.5	13.6	45.5	59.6	11	♀	cría	...			
			22	18.1	14.1	63	87.1	42	♀	adulto	lactante			
			23	16.1	15.1	36.4	59.8	14	♂	cría	..			
			25	18.1	14.8	57.1	69	26	♀	juvenil	...			
			26	15.5	15.5	49.3	64	18	♀	juvenil	...			
			28	17.7	15.5	51.9	66.4	19	♀	juvenil	...			
			29	16.8	14.1	48.5	61.1	18	♀	cría	...			
			02-Jul-07	Las Vegas	N 20°08,910' W 97°24,646'	31	18.8	12.1	57.3	78.8	31	♂	adulto	5,9*5,4
			02-Jul-07	San José A	N 20°08,195' W 97°12,958'	32	16.3	15.4	59.1	72.4	28	♀	juvenil	..
						33	16.5	14.8	57.6	76.3	26	♂	juvenil	t. abd / inactiv

Fecha	Cueva	Coordenadas	Serie	O	Pt	Ab	LT	P	S	E	ER
25-Sep-07	Las Vegas	N 20°08,910' W 97°24,646'	49	15.5	15.2	61.3	78.5	39	♀	adulto	postlactante
			50	13.6	15.1	58.6	70.3	37	♀	adulto	inactiva
			51	14.5	17.1	62.4	74	37	♀	adulto	postlactante
			52	12.5	16	59.5	61.5	32	♀	adulto	inactiva
			53	14.8	17	63	76.5	47	♀	adulto	postlactante
			54	13.7	16.8	65.1	77.6	45	♀	adulto	postlactante
			55	14.2	17.6	57.6	64.1	37	♂	adulto	7,7*4,8
			56	12	15.5	55.4	65.2	37	♂	adulto	t. abd
			57	14.6	15.9	57.8	72	34	♂	adulto	t. abd
			58	16.9	17.8	60.2	69	25	♀	adulto	inactiva
			59	16.9	18.5	60	79.1	31	♀	adulto	lactante
60	17	16.2	58.2	66.7	23	♂	adulto	7*5,5			
61	15	17.3	55.3	70.3	21	♂	adulto	6,1*5,5			
26-Sep-07	Los Anayos	N 20°02,730' W 97°15,754'	68	13.5	16.5	59.3	71.6	32	♂	adulto	t. abd
			69	16.2	15.3	63.2	76	46.5	♀	adulto	gestante
			70	14.9	15.6	63.5	74.5	35	♀	adulto	postlactante
			71	10	16.5	69	72	28	♂	adulto	t. abd
			72	14.9	14.1	56.4	60.7	28	♂	adulto	t. abd
26-Sep-07	Las Vegas	N 20°08,910' W 97°24,646'	73	14.3	15.4	57	71	30	♂	adulto	t. abd
			74	14.8	14.6	54.7	74.9	28	♂	adulto	5,3*3,7
			75	13.7	16	58.8	73.5	28	♂	adulto	t. abd
			76	15.8	16.4	62.8	79.3	37	♀	adulto	Gestante
			77	12.6	15.2	58.8	73.9	27	♂	adulto	t. abd
15-Nov-07	Los Anayos	N 20°02,730' W 97°15,754'	99	17	16.8	61.2	74.3	40	♀	adulto	lactante
			100	15.1	17.6	56	60.8	22	♂	juvenil	inactivo
			101	16.9	16.6	62.7	76.8	37	♀	adulto	postlactante
			102	16.8	16.6	66	73	32	♀	adulto	postlactante
			103	16.6	16.7	65	79	31	♀	adulto	postlactante
			104	16.6	17.4	56.5	78.3	38	♀	adulto	postlactante
			105	16.4	17	57.9	67.8	25	♀	juvenil	Inactivo
			106	16.2	16.9	55.6	56.8	20	♂	adulto	postlactante
			107	16.6	16.7	55	64.3	21	♀	adulto	postlactante
			108	16.5	16.8	65	74	33	♀	adulto	postlactante

Fecha	Cueva	Coordenadas	Serie	O	Pt	Ab	LT	P	S	E	ER
16-Dic-07	Los Anayos	N 20°02,730' W 97°15,754'	111	18.5	16.9	63	91	44	♂	juvenil	t. Abd
			112	14.1	14.8	60.9	87.7	39.5	♀	juvenil	
			113	16.9	15.9	61.4	85.1	37.5	♀	adulto	postlactante
			114	16.9	17.1	59	72.6	32.5	♀	adulto	Inactiva
			115	15.8	16.7	62.7	80.3	41.5	♀	adulto	Inactiva
			116	16.7	17.5	63.3	77	37	♀	adulto	Inactiva
			117	15.7	17.7	62.6	73.6	35	♀	adulto	postlactante
			118	15.4	18.7	64.9	73.5	38	♀	adulto	Lactante
			119	17.2	17.3	60.2	77.1	39	♀	adulto	Lactante
			120	16.4	17.2	61	78.1	40	♀	adulto	gestante
24-Mar-08	Las Vegas	N 20°08,910' W 97°24,646'	146	16.8	16.4	59	70	39	♂	adulto	8.3*6
			147	17.9	16.9	58.7	73.5	38	♂	adulto	6*3.5
			148	16	17.5	61.9	69.2	33	♀	adulto	Inactiva
			149	15.1	17.8	62.5	76.8	44	♀	adulto	gestante
			150	15.6	17.4	61.5	77.1	46	♀	adulto	gestante
25-Mar-08	Los Anayos	N 20°02,730' W 97°15,754'	160	16.1	15.9	59.5	74.5	33	♂	adulto	5.9*4
			161	16.9	17.1	59.8	75.6	36	♂	adulto	t. abd / inactiv
25-Mar-08	Las Vegas	N 20°08,910' W 97°24,646'	162	16.2	17	60-3	72.8	37	♀	adulto	Lactante
			163	17.7	17.2	58.2	66.5	31	♂	adulto	6.5*5.2
			164	15.6	16.8	62.6	75.9	37	♀	adulto	Lactante
			165	15.5	17.2	61	74.6	31	♀	adulto	Inactiva
			166	16.8	17.4	62.2	70.2	34	♀	adulto	Inactiva
26-Mar-08	Las Vegas	N 20°08,910' W 97°24,646'	167	14.7	14.7	60.6	75.3	37	♀	adulto	gestante
			169	15.6	17.5	61.2	75.5	37	♀	adulto	Lactante
			170	16.6	16.2	57.8	70	33	♂	adulto	5.1*4.4

ANEXO II

REACTIVOS UTILIZADOS EN LAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE RABIA

ELISA

- ∅ Buffer de carbonatos 0.1m pH 9.6
 - Carbonato de sodio.....1.5g.
 - Bicarbonato de sodio.....2.93g.
 - Agua destilada (aforar).....900ml.

- ∅ Buffer salina fosfatos (PBS) 0.1m pH 7.4
 - Cloruro de sodio.....8g.
 - Fosfato de potasio.....0.2g.
 - Fosfato de sodio.....2.9g.
 - Cloruro de potasio.....0.2g.
 - Agua destilada (aforar).....1000ml.

- ∅ Buffer de lavado
 - PBS – Tween 0.05%
 - PBS.....1000ml.
 - Tween 20.....0.5ml.

⊗ Solución bloqueadora

PBS –Tween.....100ml.

Leche descremada en polvo.....3g.

⊗ Buffer de revelado

1) Buffer de citratos pH5.0

Ácido cítrico.....10.5g.

Fosfato de sodio.....14.19g.

Agua destilada (aforar).....500ml.

2) Sustrato de revelado

Buffer de citratos pH 5.0.....12.5ml.

Peróxido de hidrógeno 30%.....5ml.

Ortofenildiamina.....5mg.

⊗ Solución para detener la reacción de revelado

Ácido sulfúrico 3%

INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

∞ Alcohol ácido

Ácido clorhídrico.....3ml.

Alcohol.....97ml.

∞ CVS

Virus Estándar de Desafío

∞ Acetona 100%

∞ PBS Células esterilizado pH 7.2 – 7.4

Cloruro de sodio.....8g.

Cloruro de potasio.....0.2g.

Fosfato de potasio.....0.2g.

Fosfato disódico dodecahidratado.....2.89g.

Agua destilada.....1lt.

∞ Glicerina fosfatada 50%

Glicerina.....50%

Solución de trabajo PBS salina.....50%

Ω Solución de trabajo PBS salina pH 7.6 – 7.8

Solución 1.....91.5ml.

Solución 2.....8.5ml.

Solución 3.....100ml.

Agua destilada.....800ml.

Ω Solución 1

Fosfato de sodio dibásico anhidra.....14.2g.

Agua destilada.....1000ml.

Ω Solución 2

Fosfato de sodio monobásico monohidratado.....13.8g.

Agua destilada.....1000ml.

Ω Solución 3

Cloruro de sodio.....85g.

Agua destilada.....1000ml.

BIBLIOGRAFÍA

1. Farmer P. Desigualdades sociales y enfermedades infecciosas. *Rev Fac Nac Sal Púb* 2001; 19(2): 111-126.
2. De Mattos CC, De Mattos CA, Loza-Rubio E, Aguilar-Setien A, Orciari LA, Smith JS. Molecular characterization of rabies virus isolates from Mexico: Implications for transmission dynamics and human risk. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(4), 587–597.
3. Quine CP, Watts K. Successful de-fragmentation of woodland by planning in an agricultural landscape? An assessment based on landscape indicators. *J Env Man* 2007; 27-30.
4. Grainger A. Dificulte is in tracking the long-term global trend in tropical forest area. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(2):818-23.
5. Odum EO, Sarmiento FO. *Ecología. El puente entre ciencia y sociedad*. McGraw-Hill Interamericana, México 2001; 9-15.
6. Brown JH. *Macroecología*. Fondo Cultura Económica 2003; 302-309.
7. Primack R. *Fundamentos de Biología. Conservación y perspectivas latinoamericanas*. Fondo Cultura Económica 2006; 40-45.
8. De Freitas CM, Schütz GE, De Oliveira. Environmental sustainability and human well-being indicators from the ecosystem perspective in the Middle Paraiba Region, Rio de Janeiro State, Brazil. *Cad Sau Pub* 2007; 23 (4):S513-28.
9. Suzán G, Galindo F, Ceballos G. La importancia del estudio de enfermedades en la conservación de fauna silvestre. *Vet Méx* 2000; 223-230.

10. Martinez-Burnes J, Lopez A, Medellin J, Haines D, Loza-Rubio E, Martinez M. An outbreak of vampire bat-transmitted rabies in cattle in northeastern Mexico. *Can Vet J* 1997; 38:175-177.
11. Ewers RM, Dirham RK. Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2006; 80-89
12. Nadin-Davis SA, Loza-Rubio E. The molecular epidemiology of rabies associated with chiropteran hosts in Mexico. *Vir Res* 2006; 215–226.
13. Velasco-Villa A, Orciari LA, Juárez-Islas V, Gómez-Sierra M, Padilla-Medina I, Flisser A *et al.* Molecular diversity of rabies viruses associated with bats in Mexico and other countries of the Americas. *Clin Microbiol* 2006; 1697–1710.
14. Daszak P, Cunningham A, Hyatt D. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Div & Dis* 2003; 141-150.
15. Benkman CW, Siepielski AM, Parchman TL. The local introduction of strongly interacting species and the loss of geographic variation in species and species interactions. *Mol Ecol* 2008; 17(1):395-404.
16. Strauss SY, Lau JA, Carroll SP. Evolutionary responses of natives to introduced species: what do introductions tell us about natural communities? *Ecol Lett* 2006; 9(3):357-74.
17. Kremen C, Ostfeld RS. A call to ecologists: measuring, analyzing, and managing ecosystem services. *Front Ecol Env* 2005; 3(10):540–548.
18. Ostfeld RS, LoGiudice K. Community disassembly, biodiversity loss, and the erosion of an ecosystem service. *Ecol* 2003; 84(6):1421–1427.
19. Ceballos G, Oliva G. Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la biodiversidad. FCE México 2005; 193-194.

20. Mohr CE. The status of threatened species of Cave-Dwelling Bats [Bull]. Natl Speleol Soc. 1972; 34(2):33-37.
21. Martin WK, Puckette LW, Hensley LS, Leslie MD Jr. Internal cave gating as a means of protecting cave-dwelling bat populations in Eastern Oklahoma. Proc Okla Acad Sci 2000; 80:133-137.
22. Genné D. Bad bats? Rev Med Suisse 2007; 3(128):2273-4, 2276-7.
23. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. Organización Panamericana de la Salud 1992; 538.
24. Bennett M. Bats and human emerging diseases. Epid & Infect 2006; 134:905-907.
25. Loza-Rubio E., Rojas AE, Banda RVM, Nadin-Davis SA, Cortez GB. Detection of multiple strains of rabies virus RNA using primers designed to target Mexican vampire bat variants. Epidemiol Infect 2005; 133:927–934.
26. Smith JS. Rabies virus epitopic variation: use in ecologic studies. Adv Virus Res 1989; 36:215–253.
27. Smith JS. New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis, and prevention of the disease in the United States. Clin Microbiol Rev 1996; 9:166–176.
28. Calisher CH, Childs JE, Field HE, Colmes KV, Schountz T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. Clin Microbiol Rev 2006; 531–545.
29. http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies/Bats_%26_Rabies/bats_sp.htm
30. Flores CR. La rabia, los murciélagos y el control de los hematófagos. Programa de control de vectores. Ciencia Vet 1978; 38-67.
31. <http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/czoo/Doc466/>

32. Enciclopedia de los Municipios de México. Puebla. ©2005. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Gobierno del Estado de Puebla. <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/puebla/Mpios/21076a.htm>
33. Ceballos G, Arroyo CJ, Medellín RA. *Oc.Pap.Mus.Tex.Tech.Univ.* 2002; 218, 1-27.
34. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2ª ed. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud, 1986.
35. Baer GM. Historia natural de la rabia, México. La Prensa Médica Mexicana, 1982.
36. Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud sobre la rabia. Ginebra: Organización Mundial de la Salud 1992. Serie de Informes Técnicos.
37. Fujita MS, Tuttle MD. Flying foxes (*Chiroptera: Pteropodidae*): threatened animals of key ecological and economic importance. *Cons Biol* 1991; 5:455-63.
38. Wilkinson G. Food sharing in vampire bats. *Sci Ame* 1990; 64-70.
39. Brunet AK, Medellín RA. The species-area relationship in bat assemblages of tropical caves. *J. of Mammal* 2001; 82(4):1114-1122.
40. Carey AB, McLean RG. The ecology of rabies: Evidence of co-adaptation. *The J of Appl Ecol* 1983; 20(3):777-800.
41. Terradas J. Ecología de la vegetación. De la ecofisiología de las plantas a la dinámica de comunidades y paisajes. Ed. Omega, Barcelona 2001; 69-75.
42. Molles MC. Ecología. Conceptos y aplicaciones. 3ª. Ed. McGraw-Hill Interamericana 2005; 592-594.
43. Zunino M, Zullini A. Biogeografía. La dimensión espacial de la evolución. FCE México 2003; 295.
44. <http://glcfapp.umiacs.umd.edu:8080/esdi/index.jsp>

45. Gannon WL, Sikes RS. The Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the Use of Wild Mammals in Research. *J of Mammal* 2007; 88(3):809–823.
46. Romero-Almaraz ML, Sánchez-Hernández C, García-Estrada Carlos, Owen Robert D. Mamíferos pequeños. Manual de técnicas de captura, preparación, preservación y estudio. Ed. Espiral. Facultad de Ciencias, Instituto de Biología-UNAM2000, Centro de Investigaciones Biológicas-UAEM; 23-30.
47. Téllez-Girón F. Expresión de la proteína G del virus de la rabia en un Baculovirus, para estandarización en un ensayo inmunoenzimático de ELISA con fines diagnósticos. Tesis Maestría, UNAM 2008.
48. Loza-Rubio E. Técnicas para el diagnóstico de rabia. Folleto técnico No.3. Diciembre 2006. ISBN: 970-43-01-20-0; 1-16.
49. Koprowski H, Kaplan MM. Laboratory techniques in rabies. 4th Ed. World Health Organization 1996; 80-87.
50. Dean DJ, Abelseth MK. The fluorescent antibody test. In: Kaplan MM, Koprowski H Eds. Laboratory techniques in rabies 3rd ed. Geneva, World Health Organization, 1973. (WHO monographic series No. 23): 73-84.
51. Xiong CL, Hao ZY, Lu SQ, Li MH, Wang HF, Sun JW et al. Analysis on the isolation and characterization of canine rabies virus isolates in Henan Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi 2007; 28(3):261-7.
52. Sun LJ, Xu GL, Wang HL, Wu J, Hu ZH, Zhou YW. Application of immunofluorescence and sandwich ELISA with double-antibodies in detection of human rabies. *Fa Yi Xue Za Zhi* 2007; 23(6):411-3.

53. Kobayashi Y, Ogawa A, Sato G, Sato T, Itou T, Samara SI et al. Geographical distribution of vampire bat-related cattle rabies in Brazil. *J Vet Med Sci* 2006; 68(10):1097-100.
54. Salas-Rojas M, Sanchez-Hernandez C, Romero-Almaraz MA, Schnell G, Schmid R, Aguilar-Setien A. Prevalence of rabies and LPM paramyxovirus antibody in non-hematophagous bats captured in the Central Pacific coast of Mexico. *Tran of the Roy Soc of Trop Med and Hyg* (2004) 98, 577-584.
55. Arguin PM, Murray-Lillibridge K, Miranda MEG, Smith JS, Calaor AB, Rupprecht CE. Serologic evidence of lyssavirus infections among bats, the Philippines. *Emerg Infect Dis* 2002; 8(3): 258-262.