



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TÍTULO DE LA TESIS

“Determinación de la dieta de dos especies de murciélagos vampiros (*Desmodus rotundus* y *Diphylla ecaudata*), utilizando un método no invasivo, del Noreste de Puebla, México”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANGÉLICA MENCHACA RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. RODRIGO A. MEDELLIN LEGORRETA

2010





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TABLA DE CONTENIDOS

Agradecimientos	i
Índice	ii – iii
Resumen	iv

1. Introducción

<i>1.1 Consideraciones taxonómicas y distribución de los murciélagos hematófagos</i>	1 - 3
<i>1.2 Registro fósil</i>	4 - 5
<i>1.3 Adaptaciones fisiológicas y morfológicas para una dieta líquida</i>	5 - 9
<i>1.4 Comportamiento alimenticio</i>	9 - 11
<i>1.5 Impacto económico</i>	12 - 13
<i>1.6 Uso de técnicas moleculares y métodos no invasivos para analizar la dieta</i>	13 - 14

2. Objetivos

<i>2.1 Objetivo general</i>	14
<i>2.2 Objetivos específicos</i>	14

3. Hipótesis 15 - 16

4. Metodología

<i>4.1 Sitio de estudio</i>	16 - 18
<i>4.2 Cuevas visitadas</i>	19 - 20

<i>4.3 Captura de murciélagos</i>	21
<i>4.4 Colecta de muestras</i>	21 - 22
<i>4.5 Extracción y amplificación de ADN</i>	22 - 24
<i>4.6 Análisis de fragmentos del gen Cyt b</i>	25
5. Resultados	26 - 28
6. Discusión	29 - 31
7. Conclusiones	31 - 32
8. Implicaciones	33 - 36
9. Bibliografía	37 - 43

Resumen

Los murciélagos vampiros comprenden un grupo monofilético con tres especies; cada una de ellas ha sido asociada a distintas fuentes alimenticias (Greenhall & Schmidt, 1988). A partir de la introducción de grandes hatos de ganado y aves de corral, los murciélagos vampiros han tenido una constante disponibilidad de alimento. Algunas poblaciones, especialmente las de murciélagos vampiros de patas pelonas (*Desmodus rotundus*), han aumentado dramáticamente y han sido consideradas plaga. Dada la especialización al tipo de dieta que consiste en sangre de mamíferos y aves, los murciélagos vampiros han sido asociados en la transmisión de enfermedades como la rabia; en el murciélago vampiro de patas pelonas este virus es una variante antigénica específica que se ha asociado a brotes de rabia en ganado bovino de importancia económica. Evaluar y entender el comportamiento alimenticio de los murciélagos vampiros será una importante aportación para predecir brotes epizooticos que pudieran ocurrir a lo largo del año. Los métodos tradicionales para describir la dieta por medio de muestras fecales no son efectivas en el estudio de la composición de la dieta de los murciélagos vampiros; los métodos de análisis de contenido estomacal son invasivos y los inmuno ensayos no son específicos a nivel de especie. Una metodología alternativa es amplificar ADN de la presa contenida en las heces de los vampiros por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). El presente estudio describe la dieta de dos especies de murciélagos vampiros (*Desmodus rotundus* y *Diphylla ecaudata*) por medio de la técnica de PCR aplicada a las heces. Se utilizaron marcadores universales para la amplificación del gen del *citocromo b* (*Cyt b*). El presente estudio se realizó en una área perturbada del noreste de Puebla, México; se analizaron 96 muestras (18 de *D. ecaudata* y 78 de *D. rotundus*). Identificamos siete posibles especies de mamíferos como presas (*Bos taurus*, *Equus caballus*, *Sus scrofa*, *Equus asinus*, *Capra hircus*, *Ovis aries* y *Canis familiaris*). Por medio de esta técnica fue posible identificar exitosamente una única fuente de alimento en ambas especies de murciélagos. Esta técnica no invasiva fue exitosa para amplificar ADN altamente degradado e identificarlo a nivel de especie. Se logró obtener información de la presa de 96 de las muestras colectadas; mis resultados muestran que el 100% de las muestras analizadas de los vampiros muestreados de ambas especies se alimentan de sangre vaca. Este es el primer informe que reporta el consumo de sangre de un mamífero por *D. ecaudata* en condiciones naturales.

Abstract

Vampire bats comprise a monophyletic group with three species; each has been reported to feed on different blood sources (Greenhall & Schmidt, 1988). Since the introductions of cattle and poultry, vampire bats have had a constant availability of food sources, some populations, especially those of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*), have increased dramatically and have been considered a plague. Due to their specialized diet, vampire bats have been associated in the transmission of diseases as rabies; in the common vampire bat this virus is a specific antigenic variant that has been associated to rabies outbreaks in cattle of economic importance. The importance of evaluating and understanding the feeding habits of vampire bats will serve as a powerful tool to predict epizootic outbreaks that occur throughout the year. Traditional methods to identify dietary items, by means of faeces content in bats fail when studying the diet of vampire bats, alternative methods as analysis of stomach content are invasive and immune assays are not species specific. An alternative methodology is to amplify mitochondrial host DNA with the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Here we present the description of the diet of two species of vampire bats (*D. rotundus* and *D. ecaudata*) by means of the PCR technique. Universal molecular markers were used for PCR amplification of a mitochondrial *cytochrome b* gene region using DNA extracted from bat's faeces. The study took place in a disturbed area of North Eastern Puebla, Mexico; 96 samples were analysed (18 of *D. ecaudata* and 78 of *D. rotundus*). We identified seven possible mammalian hosts including cow, horse, pig, donkey, goat, sheep and dog. With the use of this technique we were able to successfully identify the main blood sources in the diet of *D. rotundus* and *D. ecaudata*. This non-invasive technique was successful in amplifying highly degraded DNA and hosts were identified to species level. 100% of the samples were successfully analysed, showing that the cow is the only mammal species consumed by both *D. rotundus* and *D. ecaudata*. This is the first report that confirms the use of mammalian blood by *D. ecaudata* under natural conditions.



1. Introducción

1.1 Consideraciones taxonómicas y distribución de los murciélagos hematófagos

Los murciélagos hematófagos (Phyllostomidae: Desmodontidae) comprenden tres géneros monoespecíficos que se distribuyen en las regiones cálidas del Neotrópico (Fig. 4); su dieta depende estrictamente de sangre de aves y mamíferos. Existen numerosos registros históricos acerca de su existencia; después del descubrimiento de América en 1492, en Europa circulaban historias acerca de la existencia de murciélagos chupadores de sangre (Brown, 1994); y cuando los españoles llegaron a Veracruz, existen relatos sobre murciélagos hematófagos alimentándose de la sangre de los caballos de los conquistadores (Díaz del Castillo, 1955); sin embargo, no fue sino hasta 1769 cuando el naturalista Félix de Azara, en sus viajes por Sudamérica, identificó un murciélago responsable de las mordeduras en animales de granja. En 1810 Étienne Geoffroy Saint-Hilaire, un naturalista francés, describió formalmente al vampiro común o de patas pelonas (*Desmodus rotundus*). Las otras dos especies de murciélagos hematófagos fueron descritas varios años después; en 1823 Johann Baptist von Spix describió, a partir de un espécimen colectado en Brasil, al vampiro de patas peludas (*Diphylla ecaudata*); en 1893 la tercer especie de murciélago hematófago o vampiro de alas blancas (*Diaemus youngi*) fue colectada en la Guyana, pero ésta no fue separada de *Desmodus* si no hasta 1906 por Miller (Greenhall y Schmidt, 1988).

Desmodus rotundus (Fig. 1) es conocido comúnmente como el vampiro común o de patas pelonas, su nombre científico quiere decir dientes fusionados y cuerpo redondo (*Desmos =*



unido o fusionado; *odus* del griego odontos o diente; y *rotundus* del latín redondo o esférico). Dicho nombre viene del hecho que los grandes incisivos superiores y caninos parecen estar unidos en sus bases y que cuando se alimenta se hincha y su cuerpo adquiere una forma esférica (Greenhall, *et al*, 1983, Brown, 1994). *D. rotundus* es considerada la especie de vampiro más común y puede ser encontrado en México, América Central y América del Sur. Su distribución abarca desde el norte de Tamaulipas y norte de Sonora, hasta el sur con la costa del Pacífico en Chile, Argentina y la costa del Atlántico en Uruguay (Suzán, 2005). También se ha encontrado en las islas Trinidad y Margarita frente a la costa norte de Venezuela (Goodwin y Greenhall, 1961; Fig. 4).



Figura 1. Individuo adulto de *Desmodus rotundus*; Foto: Angélica Menchaca.

Diphylla ecaudata (Fig. 2) es considerada una especie rara y comúnmente se conoce como vampiro de patas peludas o de doble escudo, (*Diphylla*: del latín “doble hoja o escudo” y



ecaudata: del latín “sin cola”). Su distribución comprende el sur de Texas, a través del este de México, y la mayor parte de América central y Sudamérica, al menos hasta Perú y sur de Brasil (Greenhall, Schmidt y Joermann, 1984; Fig. 4).



Figura 2. Individuo adulto de *Diphylla ecaudata*. Foto: Angélica Menchaca R.

Diaemus youngi (Fig. 3) también conocido como murciélago vampiro de alas blancas porque los bordes de las alas son blancos, y la membrana entre el segundo y tercer dedo es principalmente blanco, es la especie menos abundante de vampiro en México (Koopman, 1988). Esta especie está ampliamente distribuida en las tierras bajas de la región Neotropical de Tamaulipas, oeste de Colombia, y sobre las tierras bajas de la región oriental de los Andes del norte de Argentina, Paraguay y este de Brasil hacia el norte de las Guyanas y Venezuela (Fig. 4).



Figura 3. Individuo adulto de *Diaemus youngi*. Foto: Gerald Carter

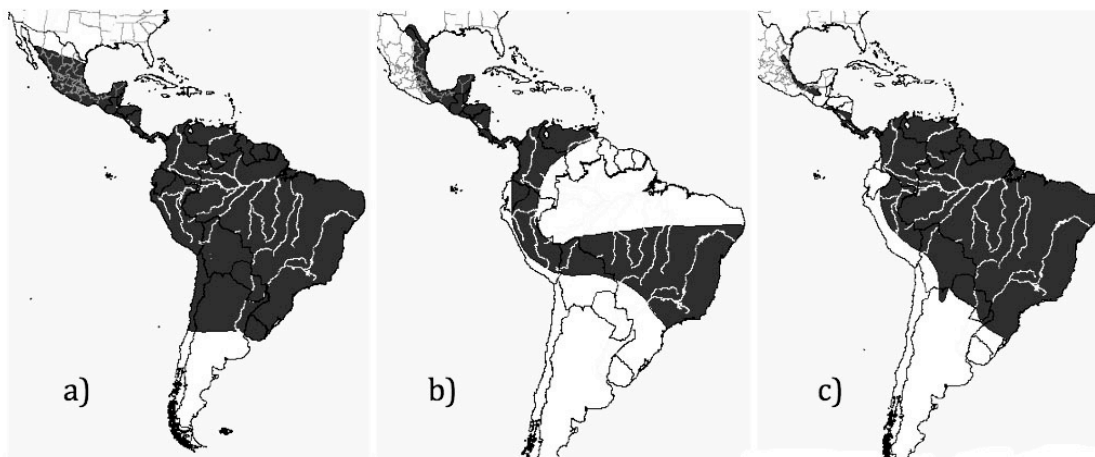


Figura 4 Distribución de las tres especies de murciélagos vampiros. (modificado de Patterson *et al*, 2005). a) *Desmodus rotundus*, b) *Diphylla ecaudata*, c) *Diaemus youngi*.



1.2 Historia Natural de los Murciélagos Vampiros

A excepción de las limitaciones climáticas, los murciélagos vampiros no están restringidos a un solo tipo de hábitat ni de refugio, se les puede encontrar desde zonas áridas como Sonora, hasta bosques tropicales como la selva Amazónica. En el caso de *D. ecaudata* y de *D. youngi* las preferencias de hábitat están más marcadas que en el caso de *D. rotundus*, pero son bastante heterogéneas (Greenhall & Schutt, 1996). Los murciélagos vampiros se han incluso beneficiado de la destrucción de su hábitat natural y la introducción de grandes hatos de ganado desde la época pre-colombina.

La disponibilidad de refugios parece ser mas importante que el tipo de vegetación que los rodea. Se pueden encontrar en cuevas húmedas, minas abandonadas, pozos o edificios. En localidades mas secas y frías se pueden encontrar en refugios subterráneos. Los refugios diurnos les proveen aislamiento y protección del medio externo y la temperatura. A falta de cuevas o minas, se pueden refugiar en árboles huecos o grietas entre las piedras, menos común en *D. ecaudata* (Dalquest, 1955). La disponibilidad de refugios y presas son los principales factores que determinan cuantos vampiros pueden existir en una área dada (Brown, 1994).

El área de influencia de los murciélagos vampiros es relativamente pequeña comparada con otros miembros de la misma familia, evitan distancias largas y se ha calculado que en México tienen un área de influencia de 8 Km., por lo que la mayoría de los vampiros cazan en un área cercana al refugio y rara vez se sobrelapan con otros grupos de murciélagos vampiros. Se han documentado movimientos en distancias mucho mayores pero son esencialmente animales no migratorios (Brown, 1994).



D. rotundus forma colonias de cientos o incluso miles de murciélagos. En las colonias existen subgrupos que consisten en machos reproductores con alrededor de 20 hembras y sus crías. Dedicar bastante tiempo durante acicalándose e interactuando socialmente. *D. ecaudata* no tiende a formar grupos grandes, se trata de animales mas bien solitarios, pero en una misma cueva se puedan encontrar varios individuos (Dalquest, 1955). *D. youngi* es una especie gregaria al igual que *D. rotundus* pero en México no forma colonias tan numerosas. En las tres especies se ha reportado comportamiento altruista (Elizalde-Arellano et al, 2007; Denault et al, 1995; Wilkinson, 1990).

La acelerada tasa metabólica de los murciélagos vampiros contribuye a la rápida pérdida de agua y de peso. La tasa de pérdida de agua en un vampiro es mayor que en cualquier otro mamífero y explica parcialmente porque estos animales buscan refugios diurnos húmedos. La tasa de pérdida de peso tan alta que sin alimentarse un animal pierde cerca del 20% de su peso en un solo día; dos horas de actividad de forrajeo sin éxito causan la pérdida de otro 11% lo cual resulta devastador ya que un individuo no se puede recuperar de una pérdida mayor a un 25% de su peso. En días fríos, su tasa metabólica y requerimientos alimenticios se incrementan aun más. Si no se consume sangre fresca se puede alcanzar un nivel crítico en alrededor de 60 o 70 horas; por lo que un vampiro no sobrevive mas de dos noches sin comer (Brown, 1994).

1.3 Hematofagia

Alimentarse de la sangre de animales de sangre caliente es probablemente una de los hábitos alimenticios mas extraordinarios del mundo animal (Hill & Smith, 1984) que



se restringe a solo tres murciélagos confinados a las regiones tropicales y subtropicales del continente Americano.

Los murciélagos vampiros durante mucho tiempo han sido los principales candidatos a la superstición y folklore, sine embargo, desde hace relativamente poco tiempo han sido objeto de profunda investigación científica en la cual se han hecho descubrimientos sorprendentes sobre sus adaptaciones a la hematofagia. *D. rotundus* ha sido objeto de estudio de la mayor parte de los trabajos de investigación sobre los hábitos alimenticios y adaptaciones en los murciélagos vampiros puesto que es la especie mas numerosa de vampiro que se puede encontrar en México, Centroamérica y América del Sur; además, se ha mantenido exitosamente en cautiverio durante más de 70 años, con algunos individuos que han sobrevivido hasta veinte años en cautiverio (Schutt, 2008).

En comparación, *D. ecaudata* y *D. youngi* han sido menos estudiadas probablemente debido a la mayor dificultad de encontrarlos en vida silvestre y a mantenerlos en cautiverio. Como resultado, los trabajos de investigación sobre los murciélagos vampiros se basan principalmente en las observaciones realizadas en *D. rotundus* y hasta recientemente se han ido estableciendo con mas detalle las diferencias entre estas tres especies, lo cual deja la puerta abierta a nuevos descubrimientos como el que presento en este trabajo.

Las adaptaciones morfológicas para alimentarse exclusivamente de sangre son numerosas; los dientes, por ejemplo, han evolucionado de tal forma que los molares desaparecen casi por completo y solamente afilados incisivos y caninos están involucrados en la mordida.



Hay diferentes tipos de mordidas, en todos los casos las presas primero son olisqueadas y el área donde se hará la mordida es lamida. Los incisivos inferiores aseguran un agarre firme a la piel, mientras que los superiores hacen el primer corte, y dada su forma cóncava, remueven un pedacito de piel, produciendo una herida en forma de cráter o “V” de 3 a 4 mm de ancho por 5 mm de longitud y alrededor de 1 mm de profundidad (Dalquest, 1955). Otro tipo de herida se hace con un rasguño con la punta de los incisivos superiores. Un tercer tipo de herida se hace raspando con la punta y los lados de la lengua, pero es mas doloroso. (Greenhall, 1988).

Las mordidas se hacen en regiones donde hay numerosos capilares superficiales que son localizados gracias a termorreceptores en la nariz de los murciélagos (Bahlman, 2007); los animales de gran tamaño son usualmente atacados en los talones, cuello, vulva, oreja. También son comunes las mordidas en nariz o en el caso de los búfalos dentro de las narinas y en las tetillas de los cerdos. Las aves son atacadas principalmente en las patas, cloaca, cresta y cuello. Una vez que la herida ha sido hecha, puede ser utilizada por varios animales y durante varias noches. El tiempo en que tarda en alimentarse varía de 10 a 40 minutos, pero usualmente 20 (Brown, 1994).

El consumo exclusivo de sangre constituye una dieta alta en proteínas por lo que se mantiene una condición azotémica (concentración de urea 27-57mmol/l). La ingesta acelerada de sangre ocasiona que el peso corporal se incremente en un 30-40% del peso normal, lo que puede interferir en la habilidad para volar. La manera en que los murciélagos vampiros se han adaptado a dicha alimentación incluye la capacidad de orinar casi instantáneamente después de alimentarse y alcanzar picos de eliminación de urea 30 minutos después de comenzar a alimentarse, seguido por una fase de almacenamiento de agua, la cual es necesaria ya que los vampiros no toman agua libre (Singer, 2001).



Otra de las adaptaciones fisiológicas de gran importancia en la alimentación de los vampiros es la habilidad de impedir que la sangre de su presa se coagule. Los seres vivos tienen una proteína llamada activador del plasminógeno (PA). Dicha proteína ayuda a disolver coágulos y se encuentra normalmente en las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos, al ser una enzima, cataliza la conversión del plasminógeno a plasmina, la enzima responsable de disolver coágulos. Los murciélagos vampiros tienen además dicho activador del plasminógeno en la saliva (Tellgren-Roth., et al, 2009).

El tiempo que pueden pasar sin alimentarse es muy bajo. En 2 o 3 noches de privación de alimento los individuos mueren, debido principalmente a declinación de glucosa en sangre por la poca contribución de glicogenólisis hepática, así como una baja capacidad de almacenamiento de alimentos en diversos tejidos, y de movilización de reservas cuando la comida escasea (Freitas et al 2003). Los individuos forrajean una vez en las primeras horas de la noche, por unas dos horas. Sin embargo pueden utilizar una misma herida, varias noches seguidas, e incluso varios individuos pueden aprovechar una herida hechas por otro individuo (Turner, 1975; Hill & Smith, 1984).

1.3 Dieta

Los reportes que existen sobre los hábitos alimenticios de los vampiros en vida silvestre, son relativamente escasos y la mayoría son de *D. rotundus* alimentándose de ganado (Greenhall et al., 1970; Turner, 1975; Sazima, 1978; Cardoso, 1995; Voigt, 2006). Moojen (1939) y Ruschi (1951) fueron los primeros en reportar los hábitos de *D. ecaudata*, quien se alimentaba de aves de corral. Sobre *D. youngi* se sabe poco y todos los reportes concuerdan con que tienen preferencia por sangre de aves de corral como gallinas



y pavos (Gardner, 1977; Sazima, 1980; Carter, 2006). Algunos experimentos en cautiverio realizados por Uieda et al (1992) reportan la forma en que se alimentan *D. ecaudata* y *D. youngi* de aves de corral como *Columba livia*, *Streptopelia decaocto*, y *Gallus gallus*. Más recientemente, Carter et al (2006) logró aislar ADN de gallina a partir de heces de *D. youngi* en estado silvestre.

Cardoso (1995) identificó a través de la prueba de la precipitina que machos de *D. rotundus* se alimentan principalmente de bovinos y presas no identificadas, y las hembras de bovinos y equinos. Voigt (2006) identificó a través de la prueba de isótopos estables de carbono, que *D. rotundus* se alimentaba de sangre de animales domésticos, como la vaca.

Existen observaciones históricas de los hábitos alimenticios de los murciélagos hematófagos tanto en condiciones naturales como en cautiverio. Mann (1951) observó en islas desiertas de Chile a *D. rotundus* alimentándose de leones marinos (*Otaria flavescens*) que mordían en las orejas; también se observaron alimentándose de aves marinas como pelícanos y cormoranes. En los llanos de Apuré, Venezuela, Azcárate (1980) e Ibáñez (1981) observaron a *D. rotundus* alimentándose del hombro de un capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*; en Greenhall & Smith, 1988), Carranza (1982) observó un vampiro alimentándose de la pata de un capibara. En México, Villa y López-Forment (1966) observaron mordidas típicas en la región cervical de una serpiente ratonera (*Elaphe flavirufa*). En Argentina, Lord et al., 1973 (en Greenhall y Schmidt, 1988), vieron a un murciélago frugívoro (*Sturnira lilium*) con heridas identificadas como mordidas de vampiro producto de alimentación y no de agresión. Lord (1986) observó a *D. rotundus* en las ruinas de Machu Picchu, Perú, que probablemente se alimentaban de llamas (en Greenhall y Schmidt, 1988).

Estudios de laboratorio realizados en cautiverio en México (1972) registraron fotográficamente a *D. rotundus* alimentándose de varios animales como *Didelphis*



virginiana, *Procyon lotor*, *Nasua narica*, *Mephitis sp.*, *Leopardus wiedii*, *Buteo sp.*, pero eventualmente el cazador se convertía en presa. Una observación curiosa es que los cacomixtles no hacían el intento de agarrar a los vampiros y los vampiros no hacían el intento por morderlos. (Greenhall y Schmidt, 1988).

Un armadillo fue mordido en la cola, entre sus placas y en una pata, un puercoespín fue mordido en la parte de la cola sin espinas. Una rata (*Neotoma sp.*) fue atacada inmediatamente en cola, pata trasera, nariz, oreja y finalmente murió; también se observaron murciélagos frugívoros (*Artibeus jamaicensis*) con heridas en la muñeca de donde se habían alimentado y heridas superficiales en cara y orejas (Greenhall y Schmidt, 1988).

Una serpiente ratonera (*Elaphe sp.*) fue mordida exitosamente en la escama rostral después de atacar al vampiro y que éste la evadiera con gran destreza, así mismo una serpiente del género *Leptophis* fue mordida cerca de la cola. Un sapo (*Bufo marinus*), conocido por tener un veneno altamente tóxico, fue mordido en cuello y cerca de la glándula parotoidea, el murciélago no presentó señales de intoxicación (Greenhall y Schmidt, 1988).

Los hábitos alimenticios de *Diaemus youngi*, en comparación con *D. rotundus*, han sido poco estudiados. Se han observado murciélagos cerca de ranchos ganaderos (Greenhall y Schmidt, 1988). En cautiverio, individuos de esta especie se han alimentado de sangre de *Capra hircus*, *Equus asinus*, *Cavia porcellus*, pero no de bovinos; sin embargo Greenhall (1970) identificó anticuerpos de *Bos taurus*, *Sus scrofa* y otros mamíferos no identificados, así como anticuerpos de aves en su estudio de análisis de contenido estomacal por medio de la técnica de la precipitina. Greenhall y Schmidt (1988) reportan heridas en gallinas y guajolotes. Buchanan (1969) realizó experimentos en una jaula de vuelo poniendo representantes de varias familias de aves como Columbidae, Pisttacidæ, Picidae, Dendrocolaptidae, Pipridæ, Tyrannidae, Mimidae, Turdidae, Icteridae, Thraupidae y



Fringillidae. *Diaemus youngi* se alimentó exitosamente de todas. Estudios más recientes que utilizan técnicas de PCR, comprueban que *D. youngi* se alimenta de sangre de gallinas (Carter, 2006).

Los hábitos alimenticios de *Diphylla ecaudata* son aún menos conocido que los de *Diaemus youngi*. Esta especie es considerada rara (McCarthy, 1987) y comúnmente se encuentran individuos solitarios compartiendo refugios con *Desmodus rotundus*. Se le ha observado alimentándose de sangre de aves (Villa *et al* 1969; Hoyt y Altenbach, 1981; Greenhall y Schmidt, 1988). En cautiverio se han alimentado de sangre de puercos, ganado, caballos (Greenhall y Schmidt, 1988) y humanos (Obs. pers.).

Con la introducción de grandes hatos de ganado y aves de corral, desde la llegada de los europeos al continente Americano, el tamaño de las poblaciones de murciélagos hematófagos se incrementó (Gonçalves *et al*, 2002, Mayen *et al*, 2003); en este nuevo contexto, ganado y aves, se convirtieron en presas abundantes y de fácil acceso (Tabla 1), representando una fuente de alimento permanente (Greenhall y Schmidt, 1988).

Especies de Importancia económica comúnmente atacadas por *D. rotundus* en Mexico

Especie presa	Sitio predilectos de mordida
<i>Bos taurus</i>	Cuello, orejas
<i>Sus scrofa</i>	Tetillas, nariz
<i>Capra hircus</i>	Patas, orejas
<i>Equus caballus</i>	Cuello, orejas
<i>Equus asinus</i>	Cuello, orejas
<i>Ovis aries</i>	Patas, orejas



<i>Canis familiaris</i>	Nariz
<i>Gallus gallus</i>	Cloaca, patas
<i>Meleagris gallopavo</i>	Cloaca, patas

Tabla 1. Especies de importancia económica atacadas comúnmente por *D. rotundus* y los sitios predilectos de mordida para regiones de México (Greenhall et al, 1971; Turner, 1975; Dalquest, 1955).

Una gran variedad de factores podría influenciar la preferencia por tipo de presa en los murciélagos vampiros incluyendo la disponibilidad, accesibilidad y abundancia de recursos (Thompson *et al*, 1982; Voigt y Kelm, 2006). Lord (1992) propone que *D. rotundus* depende más de la disponibilidad de refugios adecuados que de la abundancia de alimento. Esta preferencia podría resultar en variaciones entre las poblaciones e incluso entre individuos de una misma población (Uieda, 1994)

El conocimiento de las preferencias alimenticias de los vampiros en estado silvestre puede ayudar en el control e incluso indicar qué animales están relacionados con la epizootiología de la rabia parálitica bovina (Greenhall, 1970). Las observaciones de campo son el primer método para determinar las presas de los vampiros. El uso de diferentes técnicas de laboratorio ha facilitado la identificación de las presas, sin embargo, el grado de especificidad de dichas técnicas es muy variable; por ejemplo el uso de la prueba de la precipitina es capaz de determinar, a partir de muestras de contenido estomacal, si la sangre consumida proviene de mamíferos o aves a partir de precipitados de antisueros de una especie determinada y la muestra (Cardoso, 1995).

1.4 Conocimientos acumulados sobre la dieta de los murciélagos vampiros



Especie	Localidad	Técnica	n	Sangre de			Referencia
				Mamífero	Ave	Reptil	
<i>D. rotundus</i>	Brasil	Técnica de PCR-RFLP	48	<i>S. scrofa</i> , <i>C. L. familiaris</i> , <i>B. taurus</i> , <i>H. sapiens</i>	<i>G. gallus</i>	--	Dineli, 2008
<i>D. youngi</i>			4	<i>S. scrofa</i>	<i>G. gallus</i>		
<i>D. rotundus</i>	Costa Rica	Medición del radio de isótopos estables de CO ₂	10	Bovidae	--	--	Voigt et al, 2008
<i>D. youngi</i>	Trinidad	PCR del gen nuclear RAG-1	4	--	<i>G. gallus</i>	--	Carter et al, 2006
<i>D. rotundus</i>	Brasil	Prueba de precipitina	--	Bovidae, Equidae y presas no identificadas	--	--	Cardoso, 1995
--	Mexico	Heridas típicas de vampiro	--	--	Gallinas, guajolotes	--	Greenhall & Smith, 1988
<i>D. rotundus</i>	Perú	Heridas típicas de vampiro	--	Llamas	--	--	Lord, 1986
<i>D. rotundus</i>	Venezuela	Observaciones de campo	--	Capibara	--	--	Azcarte, 1980
							Uieda, 1990
<i>D. ecaudata</i>	Brasil	Observaciones de campo	--	--	Gallina criolla	--	Sazima, 1980
<i>D. youngi</i>		Análisis de contenido estomacal					
<i>D. rotundus</i>							
<i>D. youngi</i>	Brasil	Observaciones de campo	--	--	Gallinas criollas, gallinas de	--	Sazima & Uieda, 1980



					guinea, pavos		
<i>D. youngi</i>	Brasil	Observaciones de campo	--	--	Gallinas y pavos	--	Gardner, 1977
<i>D. rotundus</i>	Costa Rica	Observaciones de campo	--	Ganado	--	--	Turner, 1975
--	Argentina	Heridas típicas de vampiro	--	<i>Sturnira lilium</i>	--	--	Lord et al, 1973
<i>D. rotundus</i>	México	Prueba de precipitina	--	Ganado y otras presas no identificadas	--	--	Greenhall, 1970
<i>D. youngi</i>	México	Prueba de precipitina	--	Bovidae Suidae Otras presas no identificadas	--	--	Greenhall, 1970
<i>D. ecaudata</i>	México	Observaciones de campo	--	--	Aves domesticas	--	Villa et al, 1969
--	México	Heridas típicas de vampiro	--	--	--	<i>Elaphe</i> sp.	Villa & López Forment, 1966
<i>D. rotundus</i>	Costas peruanas y Chilenas	Observación de campo	--	Leones marinos	Pelícanos, cormoranes	--	Mann, 1951
<i>D. ecaudata</i>	Brasil	Observación de campo	--	--	Aves domesticas	--	Ruschi, 1951
<i>D. ecaudata</i>	Brasil	Observación de campo	--	--	Aves domesticas	--	Moojen, 1939

Tabla . Se muestran los trabajos que se han realizado sobre observaciones de la dieta de los murciélagos vampiros en vida silvestre.



1.5 Uso de técnicas moleculares y métodos no invasivos para analizar la dieta

Los murciélagos vampiros, en especial *D. rotundus*, han sido objeto de estudio debido a la cantidad de adaptaciones morfológicas, fisiológicas, de comportamiento e importancia socioeconómica, involucradas en su tipo de alimentación (Gonçalvez *et al*, 2002; Ratcliffe, 2003; Bhatnagar, 2008; Almeida *et al*, 2008; Martins *et al*, 2009). Sin embargo, son pocos los estudios que describen la dieta de las tres especies que comprende la Familia Desmodontidae; y la mayoría se limita a mencionar que pueden incluir sangre de mamíferos o aves (Villa *et al* 1969; Hoyt y Altenbach, 1981; Greenhall *et al.*, 1983; Greenhall y Schmidt, 1988; Voigt y Kelm, 2006).

Los avances en Biología Molecular, en las últimas décadas, han permitido el uso de técnicas basadas en ADN para identificar tanto a los depredadores como a sus presas; estudios basados en ADN obtenido a partir de muestras fecales se han utilizado para conocer la distribución geográfica de una especie, la estructura de una población y la dieta de un individuo (Farrell *et al.*, 2000, Adams *et al.*, 2003, Dallas *et al.*, 2003). El análisis de ADN a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha resultado una herramienta muy poderosa cuando se quiere conocer la dieta de un organismo, ésta técnica resulta altamente efectiva incluso cuando el ADN se encuentra altamente degradado consecuencia del procedo digestivo (Symondson, 2002, Shepphard *et al.* 2004). Así, los métodos moleculares basados en el análisis de ADN a partir de muestras fecales se han convertido en un recurso valioso para el análisis de los hábitos e interacciones entre los depredadores y sus presas (Zaidi *et al.* 1999; Morin *et al.* 2001; Agustí *et al.*, 2005). Por



otro lado, la colecta de muestras con un método no invasivo disminuye el riesgo de lastimar a un animal durante las capturas, lo cual es especialmente importante si se trabaja con especies amenazadas (Kohn et al, 1999; de Hung et al., 2004).

Los métodos tradicionales para identificar la dieta de los murciélagos, por medio del contenido de las heces, no son efectivos cuando se estudia la dieta de los vampiros dada su condición hematófaga. Métodos alternativos como el análisis de contenido estomacal es invasivo, y los inmuno ensayos o análisis de carbono no son especie – específicos (Cardoso, 1995; Voigt *et al* 2006). Un método alternativo es el uso de una técnica molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Carter *et al*, 2008). El análisis de la secuencia del *citocromo b* (cyt b) ha sido aplicado a la identificación de especies de vertebrados a partir de muestras de tejidos, sangre, contenido estomacal y heces (Bataille *et al*, 1999; Kitano *et al*, 2007; Tobe y Linacre, 2008). Este método ha sido efectivo para identificar el origen biológico de una muestra a nivel de especie, arrojando una mayor cantidad de información en comparación con el análisis de anticuerpos o inmuno ensayos (Parson *et al*, 2000). La secuencia de nucleótidos del *citocromo b* contiene información especie-específica y se ha utilizado en estudios filogenéticos, así como en investigaciones forenses (Parson *et al*, 2000; Verma y Singh, 2003; Rastogi *et al*, 2007; Carter *et al*, 2008; Tobe y Linacre, 2008).

El *citocromo b* se localiza en el DNA mitocondrial que es una molécula circular pequeña (15-20kb) compuesta de alrededor de 37 genes que codifican para 22 tRNAs, 2 rRNAs y 13 mRNAs (Kent y Norris, 2005). Como marcador molecular, el DNA mitocondrial tiene muchas ventajas: diferentes regiones de su genoma evolucionan a diferentes tasas (Saccone *et al.*, 1991) lo que permite que se utilice para responder diferentes interrogantes; se hereda por vía materna en la mayoría de las especies (con excepciones en “fugas”



paternales en los ratones, Gyllensten *et al.*, 1991; herencia biparental en mejillones, Sutherland *et al.*, 1998).

El *Citocromo b* es el único citocromo codificado en la mitocondria, formando parte de la cadena transportadora de electrones de la respiración. Se considera como medida universal en estudios comparativos, lo suficientemente variable para hacer comparaciones en poblaciones y suficientemente conservado para determinar relaciones filogenéticas. Actualmente es la fuente más utilizada para estudios de secuencias de aves y las secuencias del citocromo b se han utilizado exitosamente para identificar grupos taxonómicos hasta nivel de subespecie (Parson *et al*, 2000; Kent y Norris, 2005; Ono *et al* 2007; Rastogi *et al*, 2007).

La identificación de especies por medio de la Reacción en Cadena de la (PCR) tiene algunas ventajas, debido a que: (1) el equipo necesario para realizar un PCR es relativamente sencillo (2) el método es relativamente simple y no se requiere de habilidades muy específicas, y (3) la sensibilidad es alta dado que se amplifica un fragmento específico de ADN (Ono et al, 2007).

1.6 Rabia e Impacto económico

Los murciélagos en general se han catalogado como importantes reservorios de virus emergentes, entre ellos el virus rábico (Greenhall, 1970; Brown, 1994; Calisher *et al*, 2006; Schneider *et al* 2009). En el mundo hoy se conocen 7 diferentes genotipos del virus



de la rabia, que a su vez presentan diferentes variantes antigénicas (AgV); en América solamente se ha registrado el Genotipo 1, el cual ha sido asociado a diferentes especies de carnívoros terrestres y murciélagos (Velasco-Villa, et al., 2006; tabla 2); sin embargo, no todos los taxa en estos dos órdenes de mamíferos desempeñar un papel equivalente en el mantenimiento de la enfermedad dentro de zonas geográficamente discretas (Velasco-Villa, et al., 2006).

Variantes antigénicas del virus de la rabia en América

Variante Antigénica	Reservorio	Cita
AgV 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	De Mattos et al. 1999
AgV 2	<i>Canis lupus familiaris</i>	Favoretto et al, 2002
AgV 3	<i>Desmodus rotundus</i>	De Mattos et al. 1999, Nadin-Davis et al. 2006.
AgV 4	<i>Tadarida brasiliensis</i> y otros murciélagos insectívoros	Nadin-Davis et al. 2006, Favoretto et al, 2002, Velasco-Villa et al. 2002
AgV 5	No reservorios, pero donde se ha encontrado: humanos, ganado - caballos, ovejas, cabras, vacas, perros y zorro	Velasco-Villa et al. 2002 Favoretto et al. 2002 .



	(<i>Cerdocyon thous</i>)	
AgV 6	<i>Lasiurus cinereus</i>	Favoretto et al, 2002
AgV 7	<i>Vulpes macrotis</i>	De Mattos et al. 1999, Velasco-Villa et al. 2002
AgV 8	<i>Spilogale putorius</i> y <i>Conepatus mesoleucus</i>	Nadin-Davis et al. 2006, Velasco-Villa et al. 2002
AgV 9	<i>Tadarida brasiliensis</i>	De Mattos et al. 1999, Loza- Rubio et al. 2000, Nadin- Davis et al. 2006, Velasco- Villa et al. 2002
AgV 10	Zorrillo	De Mattos et al. 1999
AgV 11	<i>Desmodus rotundus</i>	De Mattos et al. 1999. Nadin- Davis et al. 2006. Velasco- Villa et al. 2002

Tabla 2. Variantes antigénicas (AgV) del Genotipo 1 (G1) del virus rábico, presentes en América.

Dentro de cada zona, el virus de la rabia puede ser transmitido a otros mamíferos terrestres ocasionando un brote epidemiológico, pero de los 11 AgV diferentes, solamente dos (AgV 3 y AgV 11) se han asociado a *D. rotundus* (Velasco-Villa, et al., 2002, Nadin-Davis et al., 2006).



Los casos de ataques a humanos por murciélagos vampiros (Fig. 5) han reportaron los picos mas altos en América Latina en 2004 (con 46 casos) y 2005 (55 casos), dichos ataques ocurrieron principalmente en la región amazónica de Brasil y Perú y en algunas comunidades remotas de Colombia (Schnider, et al., 2009). Estos altos picos se pueden deber a que muchas de las áreas considerados de alto riesgo son tierras invadidas por seres humanos en búsqueda de un objetivo económico; además, el proceso de la enfermedad puede estar influenciado por el medio ambiente y por cambios físicos y ecológicos (Schnider, et al., 2009).

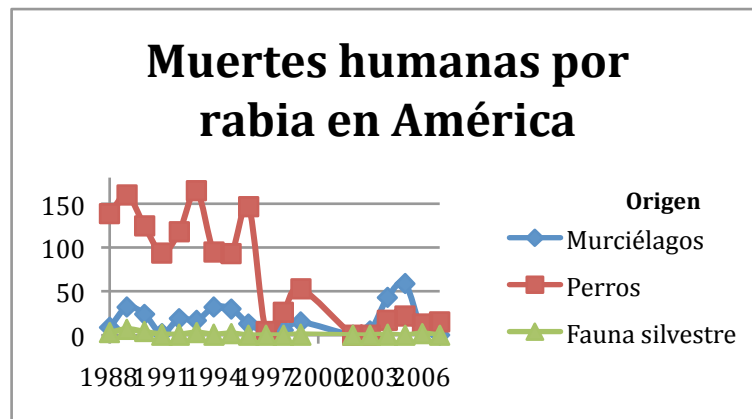


Figura 5. Número de casos registrados de muerte humana por rabia en el periodo 1988-2007. Modificado del Sistema interactivo de información en línea RabNet Version2

La rabia paralítica bovina tiene un impacto negativo en la producción pecuaria ya los individuos afectados sufren alteraciones que conducen siempre a parálisis del sistema respiratorio y la muerte (Mayen, 2003; Calisher *et al*, 2006). Esto representa un factor limitante en el desarrollo de la ganadería en países latinoamericanos y se refleja en grandes pérdidas económicas (Velasco-Villa, 2002); por ejemplo, para el período comprendido



entre 1995-2000, se reportaron 23,758 casos en América latina y el Caribe, (Belotto 2002; Sota, FAO).

Desde la identificación de los murciélagos como un vector de rabia, los agricultores se han quejado de la pérdidas de ganado (Schneider *et al*, 2009); sin embargo, es difícil estimar el impacto real que representa el murciélago vampiro sobre el ganado vacuno cuando existen brotes rábicos (FAO; Fig. 6) y solamente mediante pruebas de laboratorio especializadas se puede determinar la variante antigénica a la que esta asociada (Loza-Rubio *et al*. 2000; Velasco-Villa *et al*, 2002; Calisher *et al*, 2006; Kobayashi, 2008).

El estudio de la historia natural de los murciélagos y su importancia como reservorio de virus zoonóticos ha sido insuficiente y la mayoría se han realizado para determinar el papel que juegan en el mantenimiento y transmisión del virus rábico (Loza Rubio, *et al.*, 2005; Calisher *et al.*, 2006). A pesar del continuo desarrollo de la vacuna antirrábica desde 1884, la enfermedad sigue siendo un problema de salud pública en varios países debido a la gran diversidad de reservorios, el que siga siendo un problema se debe en gran medida a que no entendemos su ecología ni los factores que determinan los brotes, lo cual ha hecho la prevención y el control de la enfermedad bastante complejos (Velasco-Villa *et al*, 2002).

En general, los murciélagos representan un factor potencial muy importante en la transmisión de la rabia; al ser individuos voladores, tienen un potencial de movimiento alto por amplias zonas, así como de dispersión rápida con una gran capacidad de expansión, formación de colonias e intercambio de individuos, compartiendo refugios con otras especies, etc., por lo que la ocurrencia, transmisión y permanencia de enfermedades e infecciones es mayor que en el resto de los mamíferos (Messenger *et al*. en Kunz, 2003).

Los reportes de rabia transmitida por murciélagos se han mantenido relativamente bajos, en comparación con los casos de rabia por otros vectores (Fig. 5); sin embargo, se observa



una tendencia de incremento. Los murciélagos hematófagos, en particular *D. rotundus*, ha sido uno de los principales murciélagos involucrados en la transmisión del virus rábico, ya que dada su preferencia alimenticia y el desequilibrio ecológico de su hábitat, se han creado las condiciones perfectas que desencadenaron que sus poblaciones crecieran aceleradamente por la introducción de grandes hatos de ganado en áreas de su distribución original, lo que representó una fuente de alimento constante. Cuando una población aumenta debido a una abundante suministro de alimentos y se reduce el número de depredadores naturales, la población enfrenta un estrés que puede conducir a la perturbación del equilibrio interno de la microbiota necesaria para lidiar contra las enfermedades infecciosas, lo cual facilita la transmisión viral (Warrel, 2004; Kahn, 2006). El hecho de que el riesgo de contagio en humanos y otros animales dependa del estado en el que se encuentre la población de murciélagos es ignorada por la opinión pública y solo mencionada recientemente como un rasgo importante (Gonçalves *et al*, 2002).

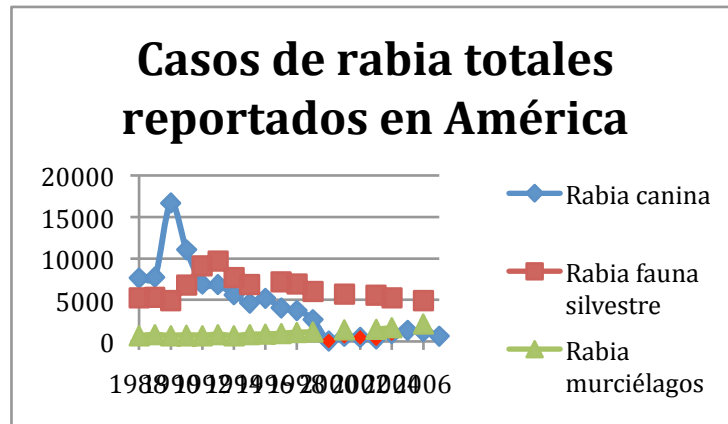


Figura 6. Casos de rabia reportados a la OMS en el periodo 1988-2007. Se puede observar una clara disminución de los casos de rabia canina, mientras que para la rabia en murciélagos parece existir una tendencia de incremento. En los registros de rabia canina del periodo 2000-2004 (en rojo), menos de $\frac{1}{4}$ de los países de América



emitieron un reporte, por lo que los datos no son confiables para seguir una tendencia en el periodo.

El conocimiento de la prevalencia de cualquier enfermedad infecciosa en una población es fundamental para entender la ecología de dicha enfermedad y su relación con la ecología poblacional (Messenger et al., en Kunz, 2003). Aunque los murciélagos hematófagos pueden representar un riesgo sanitario para los seres humanos y un problema económico para la industria ganadera, la información sobre datos básicos a cerca de la dieta de dichos animales en el medio silvestre es aún muy escasa (Voigt y Kelm, 2006).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

- Identificar el origen de la sangre que ingieren *D. rotundus* y *D. ecaudata* a nivel especie a lo largo de un año

2.2 Objetivos específicos



- Documentar la dieta de *Desmodus rotundus* y *Diphylla ecaudata* a partir de la determinación de marcadores específicos de ADN para siete posibles especies de presas (vaca, cerdo, caballo, burro, perro, borrego y cabra) de importancia económica y un animal domestico abundante en el noreste de Puebla.
- Utilizar el método de *Citocromo b* para determinar la dieta de *D. rotundus* y *D. ecaudata* utilizando el ADN extraído de muestras fecales.

3. Hipótesis

- La dieta de *D. rotundus* estará dominada por sangre de vaca pero de cualquier manera incluirá sangre de otras especies de mamíferos
- La dieta de *D. ecaudata* no incluirá sangre de mamíferos.
- No habrá diferencias estacionales en la composición de la dieta de *D. rotundus* y *D. ecaudata*.



4. Metodología

4.1 Sitio de estudio

El área de donde se obtuvieron las muestras (Fig. 7) incluye los municipios de Hueytamalco y Tenampulco en la Sierra Nororiental del Estado de Puebla, México. Esta área posee una altitud promedio de 500 msnm, clima subtropical húmedo, con precipitación media anual de 3000 mm, temperatura media anual de 21°C. y suelo cárstico y arenoso. El tipo de suelo del área de estudio fomenta la formación de cuevas. Particularmente, la cueva “Las Vegas” alberga 14 especies de murciélagos lo que la hace una de las cuevas de mayor diversidad de México (Brunet y Medellín, 2001). El municipio de Hueytamalco se localiza en la parte noreste del estado de Puebla. Sus coordenadas geográficas son los paralelos 19° 51' 03" y 20° 12' 42" de latitud Norte y los meridianos 97° 12' 48" y 97° 22' 42" de longitud Occidental. Colinda al Norte: con el Estado de Veracruz, al Este: con el municipio de San José Acateno y el Estado de Veracruz, al Sur: con Teziutlán y al Oeste: con los municipios Tenampulco y Ayotoxco de Guerrero (Enciclopedia de los Municipios de México en: www.emexico.gob.mx).

La mayor parte del municipio pertenece a la región geomorfológica de la vertiente del Golfo de México, solo el extremo Sur, a partir de la costa 1,000 pertenece a la Sierra Norte. La vertiente del Golfo es la vertiente septentrional de la Sierra Norte hacia la llanura costera del Golfo de México que se caracteriza por sus numerosas chimeneas



volcánicas y lomas aisladas; en tanto que la Sierra Norte o Sierra de Puebla está formada por sierras más o menos individuales y paralelas, comprimidas las unas a las otras y que suelen formar altiplanicies intermontanas grandes o pequeñas que frecuentemente aparecen escalonadas hacia la costa. La característica orográfica del municipio es un descenso constante e irregular en dirección norte-sur, bastante marcado en la parte austral y que se va suavizando conforme se avanza al Norte, donde ya pierde la característica montañosa inicial; la altura del municipio oscila entre 250 y 1,700 metros sobre el nivel del mar.

Dentro del municipio se presenta la transición de los climas templados de la Sierra Norte, a los cálidos de la vertiente del Golfo, identificándose dos climas, semicálido subhúmedo con lluvia todo el año; el clima predominante en la zona sur del Municipio y clima cálido húmedo, con abundante lluvia en Verano; en la zona norte del Municipio.

La mayor parte del territorio del municipio está destinado a actividades agropecuarias; existen grandes extensiones de pastizales cultivado de estrella africana (*Buffel sp.*), al centro y norte; pastizal inducido, sólo cuenta con áreas reducidas de selva alta perennifolia con vegetación secundaria arbustiva a lo largo del río Cedro Viejo y bosques mesófilos (Enciclopedia de los Municipios de México en: www.emexico.gob.mx).

El municipio de Tenampulco, se localiza en la parte noroeste del estado de Puebla. Sus coordenadas son los paralelos 10° 08' 30" y 20° 14' 54" de latitud Norte y los meridianos 97° 20' 00" y 97° 30' 00" de longitud Occidental. La topografía del municipio es plana en las zonas colindantes al río Apulco en tanto que el resto del territorio es más bien irregular con numerosos cerros y lomas aisladas que se levantan más de 100 metros sobre el nivel del terreno. La altura del territorio oscila entre 80 y 360 metros sobre el nivel del mar, y muestra una tendencia a declinar en dirección noreste-sureste. El municipio se localiza en la zona de los climas cálidos, del declive del Golfo; presentando un sólo clima: cálido-



húmedo con abundantes lluvias en el verano; la mayor parte del municipio está cubierta por pastizal cultivado de estrella africana (*Cynodon sp.*; Calderón et al 2008), existen pequeñas áreas dedicadas a áreas cafetaleras así como zonas reducidas de selva alta perennifolia asociada a la vegetación secundaria arbustiva (Enciclopedia de los Municipios de México en: www.emexico.gob.mx).



Figura 7. Localización del sitio de estudio.

En rojo: Municipio de Tenampulco. En verde: Municipio de Hueytamalco

4.2 Cuevas visitadas



Se visitaron 4 cuevas (Tabla 3) presentes en esta área (Figura 8), que fueron seleccionadas debido a que en estudios previos se detectó la presencia de poblaciones grandes y constantes de *D. rotundus* y *D. ecaudata* a lo largo del año. Estas cuevas fueron visitadas durante 9 meses (Julio, Agosto, Septiembre, Noviembre y Diciembre de 2007 y Febrero, Marzo, Mayo y Junio de 2008). Cada visita al área fue de 4 ó 5 días y se hicieron capturas de ambas especies en cada cueva

Cuevas visitadas y especies de murciélagos que albergan.

Nombre de la Cueva	Municipio	Coordenadas	Especies
Las Vegas	Tenampulco	N 20°08,910' W 97°15,754'	Familia Emballonuridae <i>Mormops megalophylla</i> <i>Pteronotus parnellii</i> Familia Phyllostomidae <i>Desmodus rotundus</i> <i>Diphylla ecaudata</i> <i>Glossophaga leachii</i> <i>Glossophaga soricina</i> <i>Artibeus lituratus</i>



			<p><i>Artibeus jamaicensis</i></p> <p><i>Carollia sowelli</i></p> <p><i>Carollia perspicillata</i></p> <p>Familia Natalidae</p> <p><i>Natalus stramineus</i></p> <p>Familia Vespertilionidae</p> <p><i>Myotis keaysi</i></p> <p><i>Myotis nigricans</i></p>
La Cascada *	Hueytamalco	<p>N 20°04,026'</p> <p>W 97°30,765</p>	<p>Familia Phyllostomidae</p> <p><i>Desmodus rotundus</i></p>
Los Anayos	Hueytamalco	<p>N 20°02,730'</p> <p>W 97°15,754'</p>	<p>Familia Phyllostomidae</p> <p><i>Desmodus rotundus</i></p> <p><i>Diphylla ecaudata</i></p> <p><i>Carollia perspicillata</i></p> <p><i>Glossophaga soricina</i></p>
Saavedra	Hueytamalco	<p>N 19° 57' 17.4</p> <p>W 97° 19' 35.5</p>	<p>Familia Phyllostomidae</p> <p><i>Desmodus rotundus</i></p> <p><i>Diphylla ecaudata</i></p> <p><i>Carollia perspicillata</i></p>



			<p><i>Glossophaga soricina</i></p> <p>Familia Vespertilionidae</p> <p><i>Myotis keaysi</i></p>
--	--	--	--

Tabla 3. Cuevas visitadas y especies de murciélagos que albergan. * La cueva “La Cascada” fue destruida a consecuencia del Huracán Dean de 2007

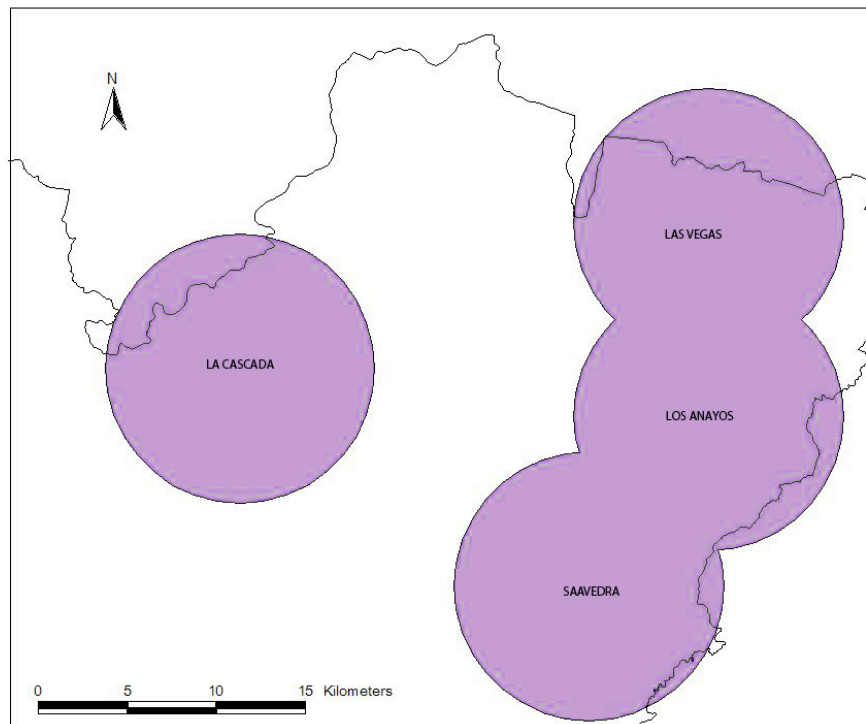


Figura 8. Ubicación de las cuevas visitadas con un buffer de 8km correspondiente al área de influencia de los murciélagos vampiros, el área total de la zona de influencia de las 4 cuevas es de 693.7 km²



4.3 Captura de Murciélagos

Se capturaron los ejemplares de las dos especies de murciélagos hematófagos con la ayuda de redes de golpeo y redes de niebla. Dentro de cada cueva se ubicaron los sitios de percha y los murciélagos fueron capturados con la ayuda de la red de golpeo en el menor número de intentos posibles. También se colocaron dos redes de niebla en las galerías de las cuevas, localizadas en lugares donde se ubicaban individuos de ambas especies. De acuerdo al comportamiento de vuelo de los vampiros (Kalko *et al*, 2008), las redes se colocaban a ras del suelo y se revisaban cada 5 minutos. La actividad de captura de los individuos dentro de la cueva se realizó entre las 7:00 – 10:00 am.

4.4 Colecta de muestras

Cada individuo colectado se colocó en un saco de tela previamente esterilizado, y se conservó por un lapso de entre 12 a 18 hrs. Este tiempo fue suficiente para que los animales defecaran y se pudieran tomar las muestras de excretas que se colocaban entonces de manera individual en crioviales. Las muestras se conservaron en alcohol al 70% y posteriormente se almacenaron en un refrigerador Revco a -20 °C. Además de la colecta de excretas se tomaron datos de especie, sexo, longitud total, longitud de pata, longitud de oreja, longitud de antebrazo, peso, sexo, edad y estado reproductivo. De algunos especímenes se colectaron tejidos de cerebro, piel y sangre para análisis de rabia



realizados por el laboratorio a cargo del Dr. Gerardo Suzán Azpiri y la Dra. Elizabeth Loza Rubio.



Figura 9. Izq. *D. ecaudata* capturado en red de niebla. En medio: Liberación de murciélagos de la red. Der. Toma de datos y muestras. Fotografos: Angélica Menchaca R.; Claudio Contreras Koob.

4.5 Extracción y amplificación de ADN

El ADN de cada muestra fue extraído utilizando un kit de Qiagen® (DNeasy Blood & Tissue Kit, México, S. de R.L de C.V). Este kit es un método rápido y fácil de purificación del ADN en columnas y placas. Se utilizó un protocolo optimizado para el tipo de muestra con la que se trabajó obteniendo una purificación de alta calidad. Este protocolo está diseñado para purificar ADN de sangre de animales (con eritrocitos nucleados o no nucleados) o de células cultivadas de animales o humanos pero resultó ser altamente efectivo con las muestras fecales de vampiro. El ADN extraído se conservó a -20 °C para después ser amplificado por medio del PCR de acuerdo a la metodología propuesta por Tobe y Linacre (2008).

La amplificación del ADN está basada en dos sets de primers que amplifican una sección, especie – específica, del *Citocromo b* para cada una de las posibles presas, dando como



resultado productos de PCR de un tamaño conocido que es único para cada especie probada.

El primer set de primers (Tabla 4 y Fig. 10) consta de 3 primers universales (5'- 3') marcados con fluorescencia; éstos se anclan a diferentes regiones del *citocromo b* de las especies de mamíferos. El segundo set de primers (Cuadro 2 y Fig. 10) corresponde a los especie- específicos (3'- 5'), y reaccionan únicamente con las especies para las cuales fueron diseñados, cada uno tiene un tamaño específico, imposible de ser confundidos unos con otros. Los primers se solicitaron a Applied Biosystems; éstos están liofilizados, por lo que se resuspenden en agua estéril a una concentración de 100 μM y se diluyen a 10 μM en volúmenes de 100 μL .

Todos los PCRs se realizaron en condiciones de esterilidad, utilizando micropipetas y puntas nuevas. Cada primer se probó en un PCR individual con muestras de origen conocido, provenientes de cada una de las presas posibles (caballo, cerdo, perro, vaca, cabra, borrego, burro). Ésto fue necesario para corroborar que los primers especie específicos funcionaban exclusivamente para cada una de las presas.

Para cada muestra, se realizaron siete PCRs. El volumen final de cada PCR fue de 20 μL y contenía 10X PCR Buffer (100mM TRIS-HCL, 15mM MgCl_2 , PH 8.0), dNTP (200 μM), 1.5 unidades de Taq (Applied biosystems), Primer Universal 1 μL , Primer especie- específico 1 μL , H₂O estéril y 40,000 copias de ADN (3 μL). El PCR se estandarizó en 40 ciclos a 95 °C por 30 seg., 60 ° por 30 seg. y 72 °C seguidos por una extensión final de 20 min. a 72°C.



Primers Universales y Especie – Específicos



Animal	Posición en <i>Cyt b</i>	5'---Secuencia---3'	Tamaño (pb)
Universal	- 50	FAM6-GACCAATGATATGAAAAACCATCGTTGT	
Universal	400	HEX-TGAGGACAAATATCATTYTGAGGRGC	
Universal	832	TET-TTTTTTTTTTTTTTCGVTCHATYCCCHAAAYAACTAGG	
<i>C. lupus familiaris</i>	99	CAAGCATACTCCTAGTAAGGATCCG	170
<i>C. hircus</i>	198	GCCATAATTTACATCTCGACAAATGTGAGTT	273
<i>S. scrofa</i>	580	CGTGCAGGAATAGGAGATGTACGGC	199
<i>B. taurus</i>	666	TAAGATGTCCTTAATGGTATAGTAG	287
<i>E. caballus</i>	705	AGAATAATACTAGAGTTAGTAGGAGCAAGATC	333
<i>O. aries</i>	906	GCTTTGATGTATGGAGGAGGGGTATAATT	98
<i>E. asinus</i>	1014	TTCTACTGGTTGGCCACCA	198

Tabla 4. Posibles especies presas de *D. rotundus* y *D. ecaudata* para las cuales fueron diseñados los primers, la posición en el *Cyt b* dada en relación al inicio del gen denominado como 1, la secuencia, y el tamaño del producto de PCR que corresponde al número de pares de bases. Modificado de Tobe y Linacre, 2008.

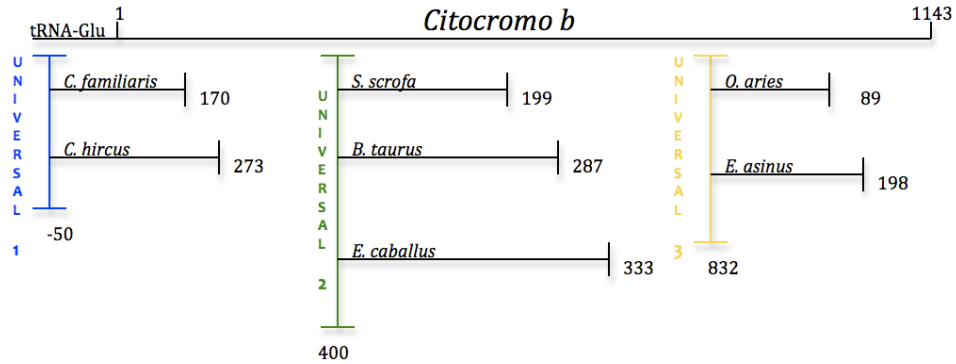


Figura 10. El final del gen tRNA-Glu y todo el gen del Citocromo b del ADN mitocondrial; se muestra la ubicación de los primers Universales y especie-específicos. Los nombres indican la especie con la cual reaccionará el primer específico. Se muestra el tamaño de pares de bases de cada fragmento. Cada primer Universal está teñido con fluorescencia: Universal 1 con FAM6 (azul); Universal 2 con HEX (verde); Universal 3 con TET (amarillo). Modificado de Tobe y Linacre, 2008.

4.6 Análisis de fragmentos del gen *Cyt b*

Cada uno de los fragmentos amplificados se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y fueron procesados para análisis de fragmentos en el Roy J. Carver Biotechnology Center en la Universidad de Illinois, Urbana-Champaign, EUA.

La lectura de los resultados se hizo con el programa *Peak Scanner* de Applied Biosystems. Cada una de las especies presa para las que fue diseñado cada primer producían el tamaño esperado de fragmento y cada fragmento podía ser distinguido de los otros fragmentos tanto por el número de pares de bases como por el color del primer Universal (Fig. 11)

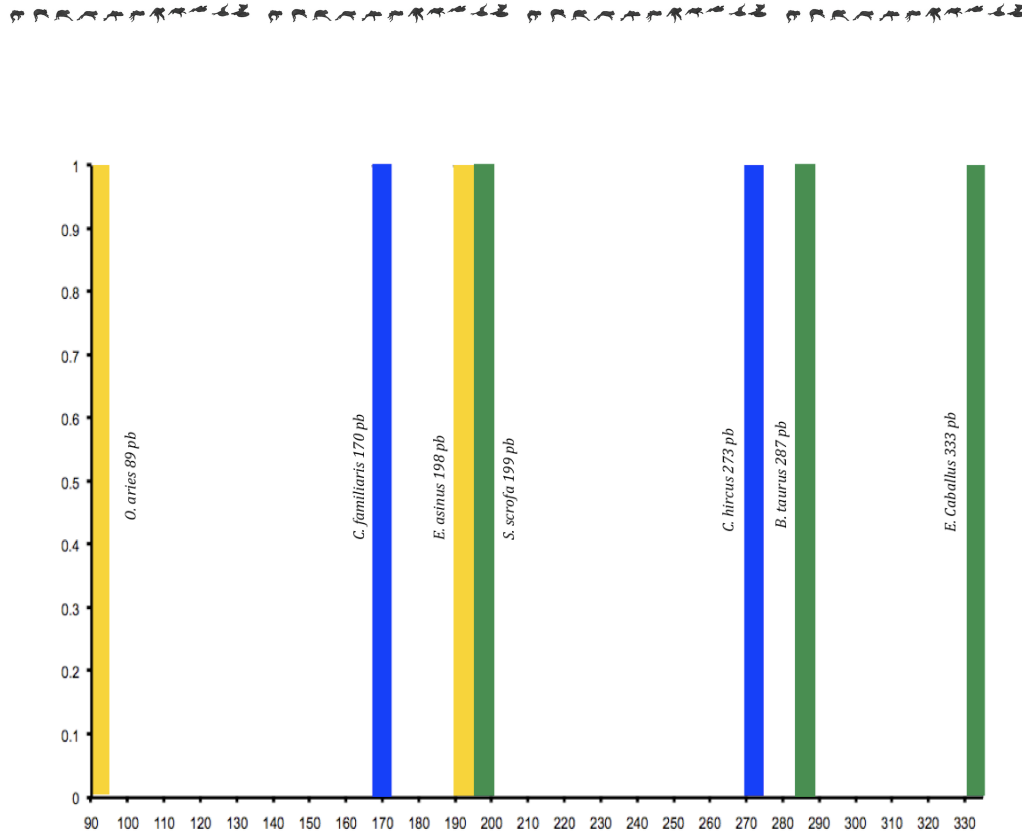


Figura 11. Aproximación de la posición de los picos correspondientes y color de cada especie, (borrego, perro, burro, cerdo, cabra, vaca y caballo) que se observan en el panel del programa *Peak Scanner*.

5. Resultados

A lo largo de un año de muestreo capturamos 133 individuos de *D. rotundus* y 44 individuos de *D. ecaudata* de 4 cuevas diferentes. Dichos individuos no fueron marcados pues solamente nos importaba registrar lo que habían comido la noche anterior sin importar si había una recaptura. De 177 individuos colectados se obtuvieron muestras fecales de 157. De éstas 157 muestras, se logró extraer ADN de 128 (Tabla 5), y para la identificación de las especies utilizadas como presa por los murciélagos, se utilizaron 18



muestras de extracto de ADN de excretas de *D. ecaudata* y 78 muestras de extracto de ADN de excretas de *D. rotundus*, las cuales corresponden a los diferentes meses de muestreo (tabla 5, Figs, 12 y 13); de estas 96 muestras fue posible obtener amplificaciones positivas de cada una de ellas.

Muestras utilizadas para extraer ADN de la presa

Fecha de colecta de la muestra	Número de muestras de <i>D. rotundus</i>	Número de muestras de <i>D. ecaudata</i>	Cueva
Julio 2007	0	1	Las Vegas
Julio 2007	14	2	La Cascada
Agosto 2007	4	0	Las Vegas
Agosto 2007	2	0	La Cascada
Agosto 2007	1	0	Saavedra
Septiembre 2007	13	3	Las Vegas
Septiembre 2007	5	3	Anayos
Noviembre 2007	6	3	Las Vegas
Noviembre 2007	12	2	Anayos
Diciembre 2007	3	1	Las Vegas
Diciembre 2007	9	2	Anayos
Diciembre 2007	0	1	Saavedra
Febrero 2008	5	7	Las Vegas
Marzo 2008	5	4	Las Vegas
Marzo 2008	1	0	Anayos
Mayo 2008	3	1	Las Vegas
Junio 2008	7	2	Las Vegas
Junio 2008	6	0	Los Anayos

Tabla 5. Se muestra la fecha en que se colectó la excreta, la especie muestreada, el número de muestras por especie y la cueva dónde se muestreó. El total de las muestras de *D. rotundus* de las que se pudo extraer ADN fueron 96 y de *D. ecaudata* 32. En total fueron 128 muestras de las cuales se escogieron 96 al azar para el análisis de la dieta.

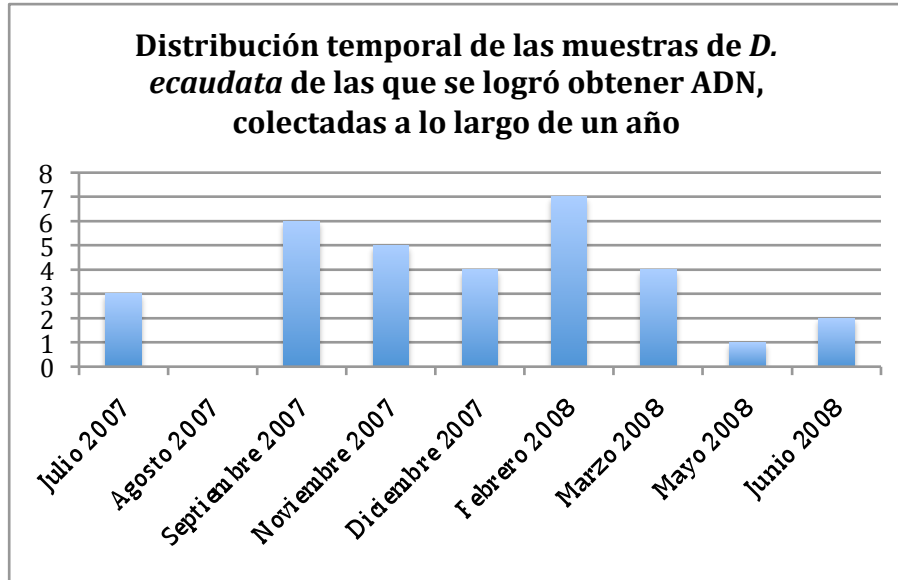


Figura 12. Se muestra el mes en que se colectaron las excretas de *D. ecaudata* y el número de muestras colectadas a lo largo de Julio del 2007 a Junio del 2008 . En total 32 muestras.

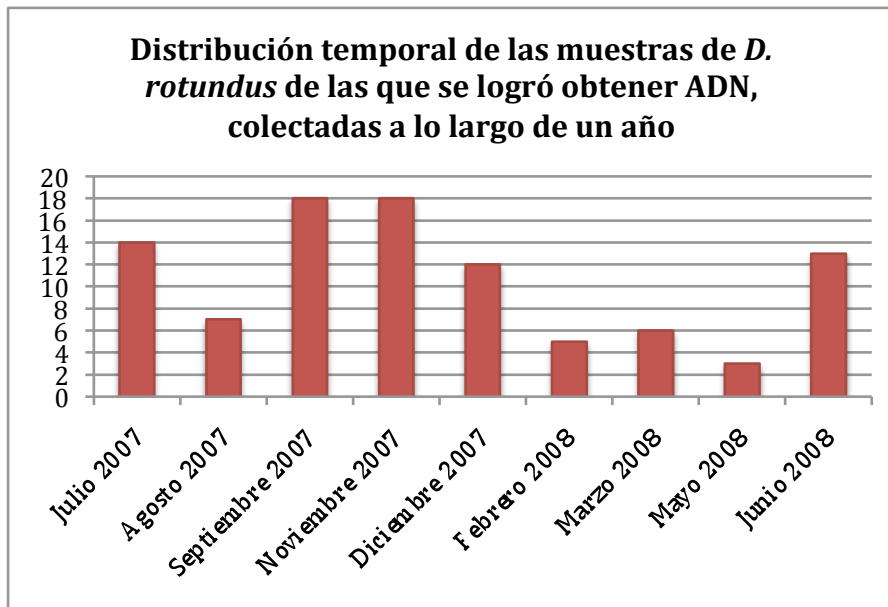


Figura 13. Se muestra el mes en que se colectaron las excretas de *D. rotundus* y el número de muestras colectadas a lo largo de Julio del 2007 a Junio del 2008 . En total 96 muestras.



La amplificación de ADN de las muestras fecales obtenidas en condiciones naturales permitió identificar el origen biológico de cada una de las muestras (Figura 14).

Todos los patrones observados a partir de la amplificación de ADN muestran la presencia de ADN de bovino (Figura 15). Ninguna de las muestras fecales fue positiva para ADN de ovino, caprino, porcino, canino o equino.

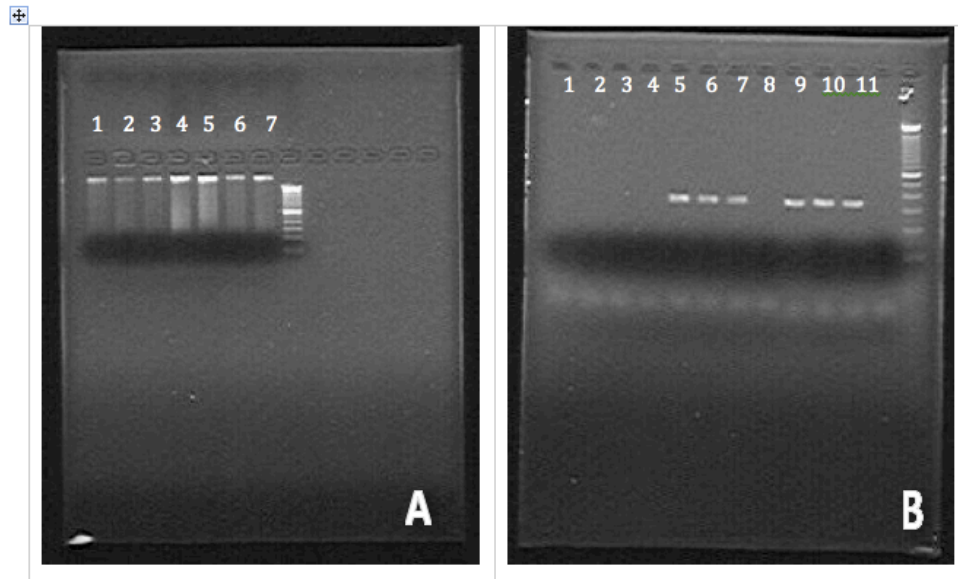
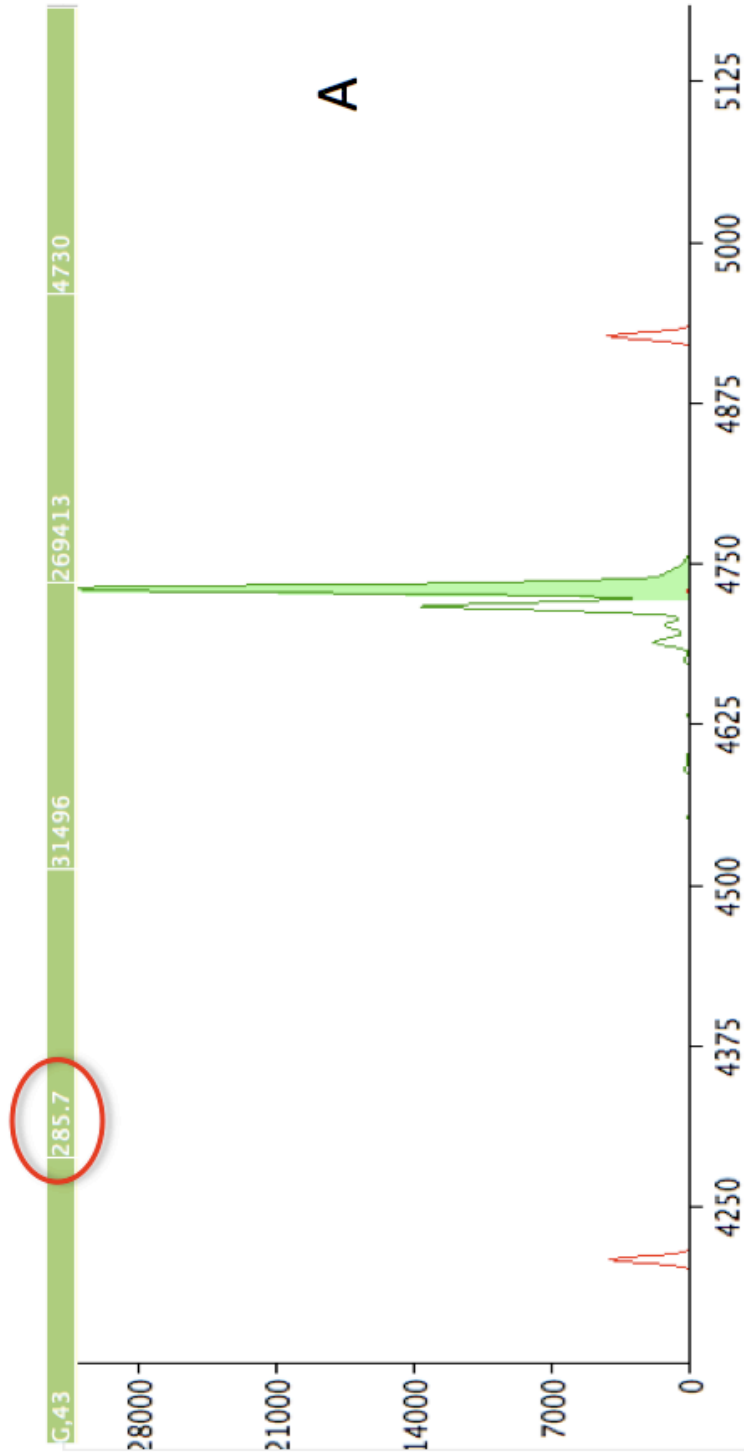
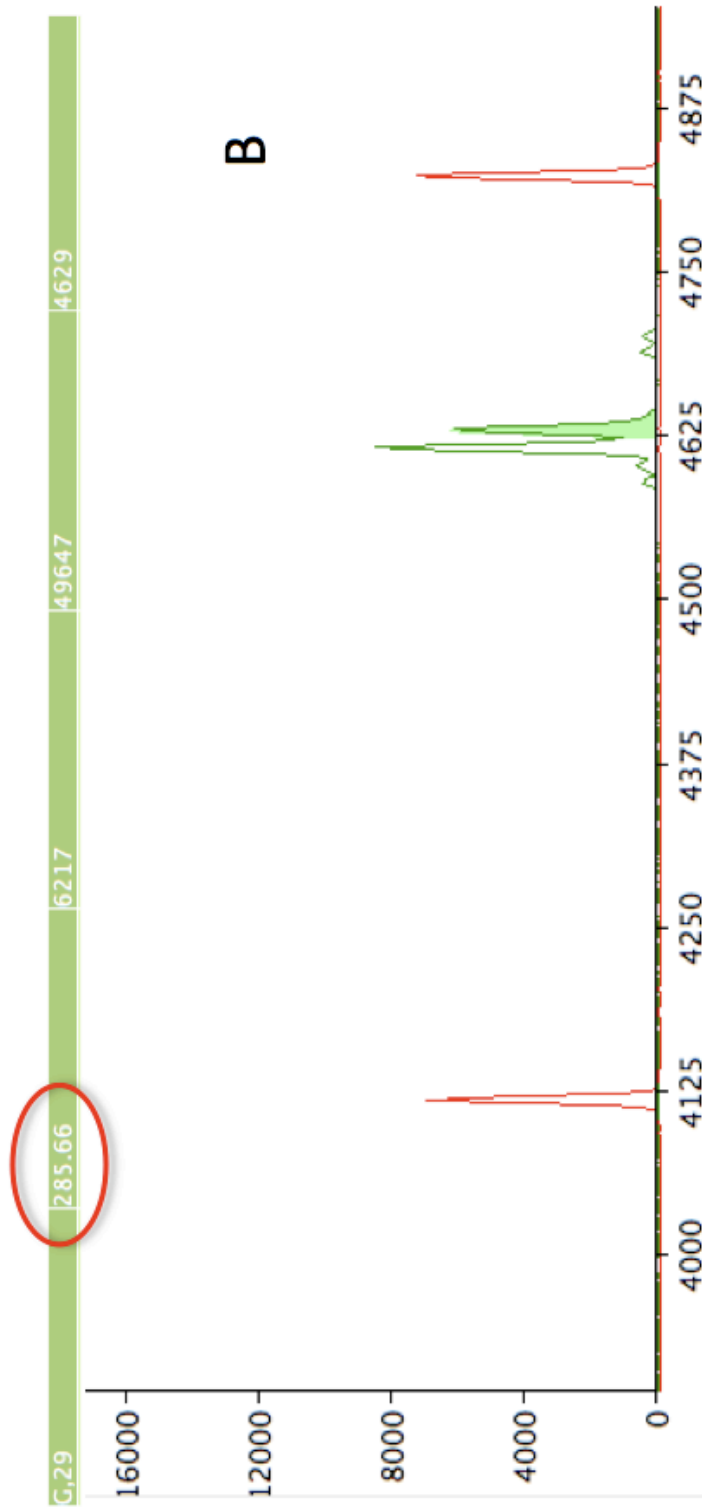


Figura 14. A. Gel de agarosa donde se observa ADN total extraído a partir de muestras fecales (1: caballo, 2: perro, 3: burro, 4: puerco, 5: cabra, 6: vaca, 7: borrego). B. Gel de agarosa donde se observan fragmentos amplificados del gen del Cyt b a partir de ADN extraído de muestras fecales de *D. rotundus*.

Figura 15. A y B: Sección del panel generado por *Peak scanner* donde se observan picos correspondientes a ADN de vaca (286 pb). El número de pares de bases observado varía ligeramente al esperado debido a la diferencia del radio de pirimidinas/purinas en los fragmentos pero es consistente. La intensidad de los picos varía dependiendo de la concentración de DNA en la muestra







La única presa registrada en la dieta tanto de *D. rotundus* como de *D. ecaudata*, a partir del análisis de fragmentos del gen del *Citocromo b* en 96 muestras, fue la vaca. Y aunque la gente reporta casos de caballos y cerdos mordidos, y gallinas desangradas, no buscamos mordidas en estos animales y ninguna de nuestras muestras indicaron la presencia de ADN de ninguna presa diferente a *Bos taurus* (Fig. 16).

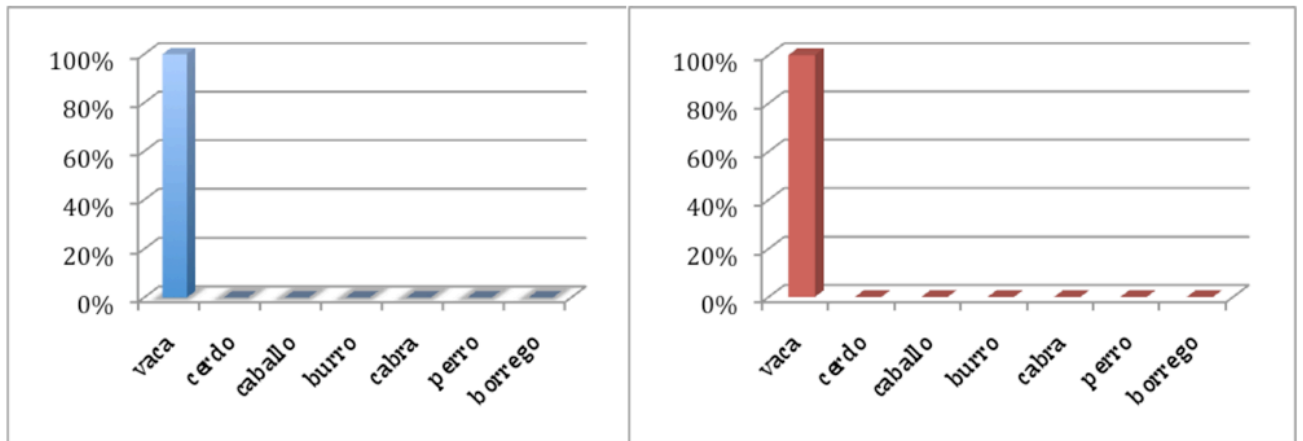


Figura 16. Gráfica que indica que la vaca fue la única presa identificada en la dieta de *D. rotundus* (a) y de *D. ecaudata* (b)



6. Discusión

Diferentes técnicas moleculares han sido utilizadas para determinar la dieta de los murciélagos hematófagos (Carter *et al.*, 2006; Voigt y Kelm, 2006; Dineli; 2008). Carter *et al* (2006), utilizando primers del gen nuclear RAG-1, exclusivo de aves, logró amplificar ADN de gallina proveniente de muestras fecales de *D. youngi* alimentados con ésta presa. Voigt y Kelm, 2006 utilizaron isótopos estables para analizar el origen biológico de la sangre ingerida por *D. rotundus*, en cuyos resultados muestran una misma marca isotópica correspondiente a ganado que consume plantas C₄, contrario a animales silvestres que se alimentan de plantas C₃. Dineli (2008), identificó 5 presas (cerdos, perros, humanos, vacas y pollos) utilizadas por *D. rotundus* en la región Amazónica Brasileña analizando enzimas de restricción con la técnica de PCR-RFLP.

Los tres trabajos anteriores utilizan técnicas no invasiva para el análisis de la dieta; sin embargo, el uso de isótopos estables no es capaz de identificar presas que también pueden estar disponibles como por ejemplo cerdos o perros y supone que todos los animales silvestres consumen únicamente plantas C₃, lo cual no es siempre cierto. El uso del gen RAG-1 arroja gran cantidad de información a nivel de especie, sin embargo es necesario secuenciar el ADN amplificado. La técnica de PCR-RFLP es exitosa en identificar diferentes presas a partir de una muestra fecal utilizando diferentes enzimas de restricción de un fragmento amplificado de *citocromo b*, sin embargo se ve restringida por la cantidad de ADN inicial en la muestra, obteniendo un 66% de éxito (Dineli, 2008).

Analizar fragmentos de ADN de un tamaño conocido y marcados con fluorescencia, a partir de la técnica de PCR, es un método mucho más simple y económico que no requiere de amplificación posterior del ADN y que es exitoso a nivel de especie, sin embargo es



necesario tener especies blanco o potenciales que deben ser escogidas cuidadosamente de acuerdo al objetivo del estudio.

La composición de la dieta de *D. rotundus* y de *D. ecaudata* se describió con base en el método desarrollado por Tobe y Linacre, 2008, obteniendo un 100% de éxito a pesar de la calidad y cantidad de ADN inicial de la muestra. El presente trabajo demuestra el nivel básico de aplicación de dicha técnica molecular como herramienta útil para describir la dieta de los murciélagos vampiros.

Mi estudio describe simultáneamente la dieta de dos especies de murciélagos hematófagos coexistiendo en el Noreste de Puebla, en un área modificada principalmente por la ganadería. A pesar de que mi estudio incluyó un total de 14 meses y 4 cuevas, con un área de influencia de 693.7 km², mis resultados indican que la única presa, de mamífero, registrada en la dieta de *D. rotundus* y de *D. ecaudata* es la vaca.

Dado el comportamiento alimenticio de los murciélagos vampiros, en donde en condiciones naturales los individuos forrajean solamente una vez en las primeras horas de la noche (Wilkinson, 1988), la ausencia de ADN de las demás presas potenciales en las heces sugiere que los murciélagos solamente se alimentan una vez cada noche, y se puede concluir que su dieta incluye solamente una presa de mamífero en la zona de estudio. Aún más, los reportes de mordidas en otros animales como burros, caballos, puercos, cabras, borregos y perros son relativamente raros, por los que es probable que el consumo de sangre de éstos animales, que también están disponibles en el sitio de estudio, sea poco frecuente.

Los reportes de *D. ecaudata* alimentándose en libertad coinciden en que su dieta se basa en sangre de aves (Greenhall *et al*, 1984; Uieda *et al*, 1992; Delpietro & Russo, 2002;); en cautiverio, esta especie ha sido manipulada para alimentarse de sangre de mamíferos (Greenhall y Schmidt, 1988) pero ningún estudio previo había demostrado que en la



naturaleza, se alimenta de sangre de mamíferos; por consiguiente, los resultados ponen en tela de juicio el nivel de especialización de *D. ecaudata* a una dieta basada solamente en sangre de aves y también sugieren la posibilidad de que *D. ecaudata* puede adaptarse a condiciones antropizadas a pesar de que esta especie no ha sido generalmente caracterizada por ser un problema a la ganadería.

La principal actividad económica dentro del área de estudio es la ganadería extensiva. La gente utiliza caballos y burros para el trabajo de campo, perros para cuidar o como mascotas, crían gallinas, guajolotes, cerdos, cabras, borregos, y otros animales. Existen reportes de animales con mordeduras de vampiro, y muchos casos de muerte por rabia parálitica. Los animales comúnmente duermen al aire libre, solamente los caballos son guardados en establos por las noches. Durante la captura pudimos observar mordidas de vampiro en vacas, mas comúnmente en cuello y orejas.

Los resultados demuestran que *D. rotundus* está alimentándose de sangre de vaca en esa área; estudios previos y observaciones de campo habían demostrado que la sangre de éstos animales es parte importante de la dieta de *D. rotundus*, sin embargo, ningún estudio había reportado que el 100% de la dieta de ésta especie se componía de sangre de vaca. De acuerdo a la teoría de forrajeo óptimo (MacArthur & Pianka, 1966), el gasto energético de la búsqueda de alimento y el tiempo dedicado a ésta actividad debe ser menor al que se obtiene de la alimentación, además supone que los elementos o especies que componen un ambiente se pueden distribuir homogéneamente de acuerdo a abundancia, por lo tanto, en un ambiente productivo el tiempo que se usa para el forrajeo se reduce uniformemente y por lo tanto la dieta óptima restringe. Los organismo que tienen radios de búsqueda de alimento relativamente pequeños, como el caso de los murciélagos vampiros, restringirían su dieta ya sea por mayor abundancia de una elemento alimenticio o por la movilidad de su presa. En el caso de *D. rotundus* y *D. ecaudata*, esto



podría estar explicando el cambio en el grado de especialización de su dieta como el número de organismos de los cuales se alimenta.

La disponibilidad de alimento a lo largo del año, ha favorecido el aumento del tamaño de las poblaciones de estos murciélagos, lo cual resalta la importancia de diseñar un plan de manejo para controlar sus poblaciones y la importancia de seguir el régimen de vacunación del ganado, a fin de que no suceda un brote por rabia paralítica bovina, y por ende grandes pérdidas económicas. El mismo estudio pero aplicado a una zona conservada donde se distribuyan *D. rotundus* y *D. ecaudata* arrojaría datos sobre su preferencia alimenticia en un medio donde presas de origen silvestre aun están disponibles; dicho estudio ayudaría a ampliar el conocimiento no solo de la dieta de los murciélagos vampiros, si no también de las presas involucradas en su alimentación que podrían estar asociadas a la epizootiología de enfermedades como la rabia.

En el caso de *Diphylla ecaudata*, es el primer reporte en vida silvestre que demuestra que no sólo se alimenta de sangre de un aves, sino que los mamíferos, en particular la vaca, puede llegar a representar el único componente en su dieta. Se ha comprobado que en cautiverio *D. ecaudata* puede modificar sus hábitos alimenticios para sobrevivir (en Greenhall & Smith, 1983); el presente trabajo demuestra lo mismo en un ambiente silvestre, lo cual nos hace pensar que su nivel de especialización por sangre de ave puede no ser tan específico como se había pensado. El hecho de que a diferencia de *D. rotundus*, el murciélago de patas peludas no se haya convertido en plaga en su zona de distribución podría entenderse cómo resultado de sus características ecológicas; por ejemplo, a diferencia de el vampiro común, el vampiro de patas pelonas no forma grupos grandes de varios individuos, su reproducción se lleva a lo largo de todo el año pero no se han reportado poblaciones tan numerosas que puedan considerarse plaga, su comportamiento no es tan agresivo como el de *D. rotundus*, lo cual podría influenciar otros aspectos como el desplazamiento de otras especies que ocupen el mismo refugio.



A pesar de que *D. ecaudata* pueda alimentarse de sangre de animales de importancia económica en el medio silvestre y que represente un posible transmisor de rabia a otros animales, no ha representado un problema como el vampiro común y es probable que otros factores intrínsecos de la especie eviten que sea un factor riesgo en un brote de rabia. Este estudio es la primera evidencia de que *D. ecaudata* puede sobrevivir de sangre de un mamífero en vida silvestre y abre la puerta a estudiar con mayor detalle lo que este hecho involucra

La identificación de la dieta de los murciélagos hematófagos en el medio silvestre es crucial para la caracterización de la preferencia de presas y para la modelación de brotes epidemiológicos. Una vez que se conoce la dieta se abre la puerta a la posibilidad de diseñar estudios para medir la preferencia, lo que sería una contribución esencial para el control de poblaciones como las de *D. rotundus*, considerada plaga en ciertas regiones de México. Greenhall (1972; 1988) especula que identificar poblaciones que solamente se alimentan de animales silvestres podría revelar el equilibrio original de las poblaciones de murciélagos hematófagos. La información de la dieta de los murciélagos hematófagos podría indicar reservorios de rabia insospechados (Greenhall 1972; 1988), y por ende modelos de interacción entre murciélagos, huéspedes y rabia (Massad *et al*; 2001). En particular en sitios donde la ganadería es la principal actividad de una familia de bajos recursos, pero también en sitios conservados donde existan presas de origen silvestre donde la epizootiología entre murciélagos y otros mamíferos ha sido poco estudiada.

La habilidad de determinar la dieta de los murciélagos hematófagos en distintas regiones del país proporciona información valiosa para los dueños del ganado y la gente que depende de ésta actividad económica, que para el caso de México, tiende a ser gente de muy bajos recurso y la pérdida de un animal a causa de rabia paralítica impacta enormemente su economía.



Entender la dieta de los murciélagos hematófagos también traerá importantes consecuencias a los demás grupos de murciélagos ya que los hábitos alimenticios de los murciélagos vampiros han sido objeto de exageración y se han asociado a leyendas como Drácula. La mala reputación de los murciélagos se debe a una combinación de mitos y miedo a las enfermedades que pueden llegar a transmitir y sobre todo al poco conocimiento que se tiene sobre los hábitos alimentarios, cómo se transmite el virus rábico en estas poblaciones y cual es la proporción real de animales positivos a anticuerpos del virus de la rabia y animales infectados que puedas transmitir la enfermedad.

El miedo a un brote epizoótico del virus de la rabia conlleva a incrementar esfuerzos por parte del gobierno y los particulares para erradicar poblaciones de vampiros en áreas donde se alimentan comúnmente de animales domesticos como vacas, caballos, cerdos, pollos, etc. Aunque el uso de vampiricidas esta permitido por el gobierno Federal, la ignorancia acerca de las funciones ecológicas de otros murciélagos, que comúnmente comparten refugio con los vampiros, ocasiona que se exterminen poblaciones de otras especies, lo que representa una acción que repercute en la desaparición de especies de murciélagos involucradas en roles importantísimos para el ecosistema como la polinización, dispersión de semillas o control de plagas de insectos.

En contraste con las poblaciones de *D. rotundus*, las poblaciones de *D. youngi* y *D. ecaudata* son raras y parecen ser afectadas negativamente por la presencia humana (Coen, 2002). El espectro de especialización de presa podría jugar un papel importante en la vulnerabilidad o abundancia de *D. youngi* y *D. ecaudata* (Carter, 2006). La caracterización de la preferencia de presas tanto domesticas como silvestres de las tres especies de murciélagos hematófagos proveerá información valiosa para el manejo y epizootiología de enfermedades transmitidas por murciélagos como la rabia paralítica tipo II.



El tener información sobre *D. ecaudata* en estado libre es un paso agigantado en el conocimiento de éstos animales, que como hemos dicho tienen importancia evolutiva en cuánto a los cambios morfológicos se refiere y tener un buen conocimiento de alimentación y presas coadyuvará a comprender los ciclos de transmisión de virus rábicos y poder erradicar o sugerir planes de manejo, tanto en el ganado como a nivel de salud pública



7. Conclusiones

- En el presente estudio se pudo identificar la dieta de *D. rotundus* y *D. ecaudata* en un área modificada por perturbaciones humanas.
- De las 96 muestras utilizadas para el análisis de la dieta, se logró identificar el ADN de la presa del 100% de éstas, mostrando que la vaca era la única especie de mamífero consumida por ambas especies de vampiros. El consumo de sangre de los otros animales disponibles en este sitio de estudio es probablemente poco frecuente.
- Este es el primer informe que confirma el uso de sangre de un mamífero por *D. ecaudata* en condiciones naturales, por lo que el nivel de especialización dicha especie se ve cuestionado.
- El método utilizado para extraer el ADN genómico total de las muestras fecales de *D. rotundus* y *D. ecaudata*, fue altamente eficiente en la obtención de ADN de buena calidad y en cantidad suficiente para amplificar por medio de PCR.



- Esta es la primera vez que la técnica de análisis de fragmentos de ADN de un tamaño conocido y marcados con fluorescencia es utilizada para determinar la dieta de dos especies de murciélagos vampiros.

- Los marcadores universales y especie – específicos, utilizados para amplificar una región del gen *citocromo b* del genoma mitocondrial, permitieron la amplificación exitosa de ADN, incluso cuando las muestras no eran de la mejor calidad, considerando la degradación del ADN durante el paso por el tracto digestivo de los murciélagos y la manipulación de las muestras hasta su almacenamiento a -20 °C.

- El análisis de fragmentos de los productos de PCR obtenidos a partir del ADN extraído de las muestras fecales demostró ser una herramienta útil y sencilla en la identificación inequívoca de las especies presas atacadas por *D. rotundus* y *D. ecaudata*.

- El uso de primers fluorescentes de tamaño específico de cada una de las especies que se querían identificar demostró ser un medio sencillo y rápido en la caracterización de la dieta de los murciélagos hematófagos, sin necesidad de secuenciar posteriormente el producto de PCR.

- La especialización de *D. ecaudata*, sobre la preferencia de sangre de ave se ve cuestionada por los resultados del presente trabajo, lo cual refleja la capacidad de adaptación de dicha especie a las modificaciones de su hábitat, que al representar



un recurso constantemente disponible probablemente ha afectado no solo su comportamiento alimenticio, si no también su demografía.

- El impacto de *D. rotundus* sobre especies de importancia económica debido a ser un vector de transmisión de la rabia parálítica bovina es un reflejo del aumento de su tamaño poblacional ocasionado por la pérdida de hábitat e introducción de animales que representan una constante fuente de alimento y que a diferencia de *D. ecaudata*, la cual no se ha reportado como plaga, las características intrínsecas de la especie le han permitido incrementar sus poblaciones.
- Estudios del comportamiento alimenticio de las tres especies de murciélagos vampiros en un medio conservado, por ejemplo la selva Lacandona o Calakmul, arrojaran nuevos datos sobre la preferencia alimenticia y la epizootiología de enfermedades como la rabia.



Bibliografía

- Adams, J. R., L. P. Waits, B. T. Kelly. 2003. Using faecal DNA sampling and GIS to monitor hybridization between red wolves (*Canis rufus*) and coyotes (*Canis latrans*). *Molecular Ecology*. 12:2175-2186.
- Agustí N, Shayler SP, Harwood JD, Vaughan IP, Symondson WOC, et al. 2003. Collembola as alternative prey sustaining spiders in arable ecosystems: Prey detection within predators using molecular markers. *Molecular Ecology*, 12:3467–3475.
- Almeida MF, Martorelli LF, Aires CC, Barros RF, Massad E. 2008. Vaccinating the vampire bat *Desmodus rotundus* against rabies. *Virus Research*. 137 (2): 275-7
- Bahlman, J.W. 2007. Use of Olfaction During Prey Location by the Common Vampire Bat (*Desmodus rotundus*). *Biotropica* 39(1): 147–149
- Barbosa da Silva, J., y Leanes, L. F. 2009. Rabies transmitted by vampire bats to humans: An emerging zoonotic disease in Latin America? *Revista Panamericana de Salud Pública*. 25 (3): 260 – 269
- Bataille, M., Crainic, K., Leterreux, M., Durigon, M., de Mazancourt, P. 1999. Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation. *Forensic Sci. Int.* 99 (3): 165-170
- Belotto, A. J. 2002. Rabia Silvestre en las Américas. Simposio Internacional de Salud Pública (Inocuidad de Alimentos, Zoonosis y Fiebre Aftosa), Protección Sanitaria y Desarrollo Agropecuario, ICA-OPS. Bogotá, Colombia.



- Bhatnagar, KP. Braz. 2008. The brain of the common vampire bat, *Desmodus rotundus murinus* (Wagner, 1840): a cytoarchitectural atlas. *J. Biol.*, 68(3): 583-599
- Brown, D. E. 1994. *Vampiro: The Vampire Bat in Fact and Fantasy*. High Lonesome Books, Silver City, New Mexico. 148 págs.
- Brown, W. M., Prager, E. M., Wang, A., Wilson, A. C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution* 18: 225–239.
- Brunet, A. K., Medellín, R. A. 2001. The Species – Area Relationship in Bat Assemblages of Tropical Caves. *Journal of Mammalogy*. 82 (4): 1114-1122.
- Calisher, C. H., Childs, J. E., Field, H. E., Holmes, K. V. & Schountz, T. 2006. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev* 19: 531–545.
- Cardoso, M. 1995. Prey-Type of the Vampire Bat *Desmodus rotundus* from Mid-Western Brazil, Revealed by Tests of Precipitin on Stomach Blood Meal. *Chiroptera Neotropical*, 1: 31–32.
- Carranza. 1982. Feeding behavior. en Greenhall, A. M. y Schmidt, U. (eds.). 1988. *Natural history of vampire bats*. CRC Press, Florida.
- Carter, G. G., Coen, C. E., Stenzler, L. M., Lovette, I. J. 2008. Avian host DNA isolated from the feces of white-winged vampire bats (*Diaemus youngi*). *Acta Chiropterologica*. 8 (1): 255-258.
- Clayton, D.A. 1984. Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Annu Rev Biochem*. 53:573–594.
- Coen, C. E. 2002. *Comparative Nutritional Ecology of Two Genera of Vampire Bats: Desmodus rotundus and Diaemus youngi*. Tesis de Doctorado, Cornell University.



Dallas JF, Coxon KE, Sykes T et al. (2003) Similar estimates of population genetic composition and sex ratio derived from carcasses and faeces of Eurasian otter *Lutra lutra*. *Molecular Ecology*, **12**, 275–282.

Dalquest, W. W., 1955 Natural history of the vampire bats of eastern Mexico. *Amer. Midland Nat.*, 53:79-87

De Mattos, C. C., De Mattos, C. A., Loza-Rubio, E., Aguilar-Setien, A., Orciari, L. A., Smith, J. S. 1999. Molecular characterization of rabies virus isolates from Mexico: implications for transmission dynamics and human risk. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 61 (4). Pp 587-597

Delpietro, V. H. A. & Russo, R. G., 2002, Observations of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) and the hairy-legged vampire bat (*Diphylla ecaudata*) in captivity. *Mammalian Biology*, 67: 65-78.

Diaz del Castillo, B. 1955. *Historia Verdadera de la Conquista de la Nueva España*. Dastin S.L. Ed., Miguel León-Portillo . 435 pp.

Dineli Bobrowiec, P. E. 2008. *Caracterização Molecular da Dieta do Morcego Hematófago *Desmodus rotundus* (Mammalia: Chiroptera) Na Amazônia Brasileira*. Tesis de Doctorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas. 101 pp.

Enciclopedia de los Municipios de México; Puebla. 1999. Centro Nacional de Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Puebla. INAFED en: http://emexico.gob.mx/work/EMM_1/Puebla/index.html



- Elizalde-Arellano, C.; López-Vidal, J., Arroyo-Cabrales, J., Medellín, R., Laundré, J. W. 2007. Food sharing behavior in the hairy-legged vampire bat *Diphylla ecaudata*. *Acta Chiropterologica*. 314–319
- Farrell LE, Roman, J., and Sunquist, M.E. 2000. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology* 9:1583-1590.
- Favoretto, S. R., Carrieri, M. L., Cunha, E. M. S., Aguiar, E. A. C., Silva, L. H. Q., Sodr , M. M., Souza, M. C., A., 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 Sao Paulo*. 44(2): 91-95.
- Freitas, M. B., Welker, A. F., Millan, S. F., Pinheiro, E. C. 2003. Metabolic responses induced by fasting in the common vampire bat (*Desmodus rotundus*). *J. Comp. Physiol., (B)* 173(8): 703-707.
- Gardner, A. L. 1977. Feeding habits. Pp. 293–350. In: R. Barker, J. Jones & D. Carter (eds) *Biology of bats of the New World family Phyllostomidae, Part II* . Special Publications, The Museum of Texas Tech University.
- Gonçalves. M. A. S., Sá-Neto, R. J., Brazil, T. K., 2002. Outbreak of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 35 (5): 461-464
- Goodwin, G.G., Greenhall, A.M. 1961. A review of the bats of Trinidad and Tobago. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 122: 187-301.
- Greenhall, A. M. 1970. The use of a precipitin test to determine host preferences of the vampire bats, *Desmodus rotundus* and *Diaemus youngi*. *Bijdragen tot de Dierkunde* 40: 36-39.



- Greenhall, A. M., Schmidt, U. (Eds.). 1988. Natural history of vampire bats. CRC Press, Florida. 246 pp.
- Greenhall, A.M. 1972. The biting and feeding habits of the vampire bat, *Desmodus rotundus*. Journal of Zoology, 168: 451-461.
- Greenhall, A.M. 1988. Anatomy. en Greenhall, A. M., Schmidt, U. (eds.). 1988. Natural history of vampire bats. CRC Press, Florida. 246 pp.
- Greenhall, A.M. 1988. Feeding behavior. en Greenhall, A. M., Schmidt, U. (eds.). 1988. Natural history of vampire bats. CRC Press, Florida. 246 pp.
- Greenhall, A.M., Joermann, G., Schmidt, U. 1983. *Desmodus rotundus*. Mammalian Species, 202: 1-6.
- Greenhall, A.M., Schmidt, U., Joermann, G. 1984. *Diphylla ecaudata*. Mammalian Species, 227: 1-3.
- Greenhall, A.M., Schutt, W. A. 1996. *Diaemus youngi*. Mammalian Species. 533: 1-7.
- Gyllensten, U., Wharton, D., Josefson, A., Wilson, A. 1991. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. Nature 352: 255-257.
- Hill, J. E. & J. D. Smith. 1984. Bats: a natural history. Austin: University of Texas Press.
- Hoyt, Reginald A.; Altenbach, J. Scott. 1981. Observations on *Diphylla ecaudata* in Captivity. Journal of Mammalogy 62:1, 215-216.
- Kahn LH. 2006 Confronting zoonoses, linking human and veterinary medicine. Emerg. Infect Dis; 12 (4): 556 – 561.



- Kalko, E. K. V., Estrada Villegas, S., Schmidt, M., Wegmann, M., Meyer, C. F. J. 2008. Flying high—assessing the use of the aerosphere by bats. *Integrative and Comparative Biology*. 1–14
- Kent, R. J., Norris, D. E. 2005. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. *Am J Trop Med Hyg*. 73 (2): 336-42.
- Kitano, T., Umetsu, K., Tian, W., Osawa, M. 2007. Two universal primer sets for species identification among vertebrates. *International Journal of Legal Medicine*. 121: 423-427.
- Kobayashi, Y., Sato, G., Mochizuki, N., Hirano, S., Itou, T., Carvalho, A., Albas, A., Santos, H. P., Hito, F., Sakai, T. 2008. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. *BMC Veterinary Research* 4:44
- Kohn MH, York EC, Kamradt DA, Haught G, Sauvajot RM, Wayne RK. 1999. Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 266:657-663.
- Koopman, K. F. 1988. Systematics and distribution, p.7-17 en A. M. Greenhall y U. Schmidt (eds.). 1988. *Natural history of vampire bats*. CRC Press, Florida.
- Kunz, T. H. & Fenton, M. B. 2003. *Bat Ecology*. The Chicago University Press. USA.
- Lord, R. D. 1992. Seasonal reproduction of vampire bats and its relation to seasonality of bovine rabies. *Journal of Wildlife Disease*. 28 (2): 292-294.
- Loza-Rubio, E., De Mattos, C. C., Aguilar-Setién, A., De Mattos, C. A. 2000. Aislamiento y caracterización molecular de un virus rábico, obtenido de un murciélago no hematófago en la ciudad de México. *Vet. Méx.* 31(2): 147-152.



- Loza-Rubio, E., Rojas-Anaya, E., Banda-Ruíz, V.M., Nadin-Davis, S. A., Cortez-García, B. 2005. Detection of multiple strains of rabies virus RNA using primers designed to target Mexican vampire bat variants. *Epidemiol. Infect.* 133 (5): 927-934
- MacArthur, R. H., and E. R. Pianka. 1966. On optimal use of a patchy environment. *The American Naturalist* 100:603-609.
- Mann. 1951. Feeding behavior. en Greenhall, A. M. y Schmidt, U. (eds.). 1988. *Natural history of vampire bats*. CRC Press, Florida.
- Martins FM, Templeton AR, Pavan AC, Kohlbach BC, Morgante JS. 2009. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): Marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. *BMC Evol. Biol*, 20(9):294.
- Massad, E., Coutinho, F. A., Burattini, M. N., Sallum, P. C., Lopez, L. F. 2001. A mixed ectoparasite–microparasite model for bat-transmitted rabies. *Theor. Popul. Biol.* 60: 265–279.
- Mayen, F. 2003. Haematophagous bats in Brazil, their role in rabies transmission, impact on public health, livestock industry and alternatives to an indiscriminate reduction of bat population. *J. Vet. Med.* 50 (10):, 469–472
- McCarthy, T. 1987. Distributional records of bats from the Caribbean lowlands of Belize and adjacent Guatemala and Mexico. *Studies in Neotropical Mammalogy*, 39: 137-162.
- Mooejn, J. 1939. Sanguivorismo de *Diphylla ecaudata* Spix en *Gallus gallus domesticus* (L.). *O Campo*, Rio de Janeiro, 114:7



- Morin PA, Chambers KE, Boesch C, Vigilant L (2001) Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology*, 10, 1835–1844.
- Nadin-Davis, S. A., Loza-Rubio, E. 2006. Molecular epidemiology of rabies associated with chiropterans hosts in Mexico. Elsevier. *Virus research* 117, 215-226.
- Ono, K., Satoh, M., Yoshida, T., Ozawa, Y., Kohara, A., Takeuchi, M., Mizusawa, H., Sawada, H. 2007. Species identification of animal cells by nested PCR targeted to mitochondrial DNA. *In Vitro Cell.Dev.Biol. Animal.* 43:168–175
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2009. <http://www.who.int/es>. Sistema interactivo de información en línea “RabNet Version2” <http://www.who.int/entity/rabies/rabnet/en/index.html>
- Parson, W., Pegoraro, K., Niederstätter, H., Föger, M. 2000. Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine.* 114:23–28
- Patterson, B. D., G. Ceballos, W. Sechrest, M. F. Tognelli, T. Brooks, L. Luna, P. Ortega, I. Salazar, B. E. Young. 2007. Digital Distribution Maps of the Mammals of the Western Hemisphere, version 3.0. NatureServe, Arlington, Virginia, USA.
- Rastogi, G., Dharne, M., Walujkar, S., Kumar, A. 2007. Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *Meat Science.* 76: 666–674
- Ratcliff, J.M., M.B. Fenton, and B.G. Galef. 2003. An exception to the rule: Common vampire bats do not learn taste aversions. *Animal Behaviour* 65(February):385–389.



- Ruschi, A. 1952. Morcegos do estado do Espirito Santo, Descrição de *Diphylla ecaudata* Spix e algumas observações a seu respeito. Bol. Mus. Biol. “Prof. Mello-Leitao” (S. Teresa, Brasil), 3:1 – 7.
- Saccone, C., Pesole, G., Sbisà, E. 1991. The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure–function model and evolutionary pattern. J. Mol. Evol. 33: 83–91.
- Sazima, I; Uieda, W. 1980. Feeding Behavior of the White-Winged Vampire Bat, *Diaemus youngii*, on Poultry. Journal of Mammalogy, 61 (1): 102-104
- Sazima, I. 1978. Aspectos do comportamento alimentar do morcego hematófago, *Desmodus rotundus*. Bol. Zool. Univ. S. Paulo, 3:97-120
- Schnider, M. C, Romijn, P. C., Uieda, W, Tamayo, H., Fernandes da Silva, D., Belotto, A., Sheppard SK, Henneman ML, Memmott J, Symondson WOC(2004) Infiltration by alien predators into invertebrate food webs in Hawaii: a molecular approach. Molecular Ecology, 13, 2077–2088.
- Singer, M. A. 2002. Vampire bat, shrew, and bear: comparative physiology and chronic renal failure. The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 282:1583-1592.
- Sota, C. A. Control of bovine paralytic rabies in Latin America and the Caribbean. FAO Regional Animal Production and Health Officer for Latin America and the Caribbean, Santiago, Chile.
- Stevens C. E., Hume, I. D. 1995. Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System. 2a ed. New York: Cambridge University Press.



- Sutherland, B.; Stewart, D; Kenchington, E. R.; y Zouros, E. 1998. The Fate of Paternal Mitochondrial DNA in Developing Female Mussels, *Mytilus edulis*: Implications for the Mechanism of Doubly Uniparental Inheritance of Mitochondrial DNA. *Genetics*, Vol. 148, 341-348,
- Suzán A. 2005. *Desmodus rotundus* pág. 193 – 194 en Ceballos, G.; Oliva, G. (eds.) 2005. Los Mamíferos Silvestres de México. Fondo de Cultura Económica. México. 986 págs.
- Symondson, W. O. C. 2002. Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology*, 11: 627–641.
- Tandler, B., Toyoshima, K., Seta, Y., Phillips, C. J. 1997. Ultrastructure of the Salivary Glands in the Midtongue of the Common Vampire Bat, *Desmodus rotundus*. *The Anatomical Record*. 246: 196-205
- Tellgren-Roth, A., Dittmar, K., Massey, S. E., Kemi, C., Tellgren-Roth, C., Savolainen. P., Lyons, L. A., Liberles, D.A. 2009. Keeping the blood flowing—plasminogen activator genes and feeding behavior in vampire bats. *Naturwissenschaften* 96:39–47
- Thompson, R.D., Elias, D.J., Shumake, S.A., Gaddis, S.E. 1982. Taste preferences of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*). *Journal of Chemical Ecology*, 8: 715.
- Tobe, S., Linacre, A. 2008. A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene. *Electrophoresis*. 29 (2): 340-347
- Turner, D. C. 1988. *Desmodus rotundus* (Vampiro, Vampire Bat). en Janzen, D. H. (eds.). *Natural history of Costa Rica*, pp. 467–468. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Turner, Dennis C (1975) *The Vampire Bat: a Field Study in Behavior and Ecology*. Baltimore, John Hopkins University Press. 145 pp.



- Uieda, W. 1986. Aspectos da morfologia lingual das tres especies de morcegos hematofagos (Chiroptera, Phyllostomidae). Rio de Janeiro R.J. Brasil Niol. 46:581-587
- Uieda, W. 1992. Período de Atividade alimentar e Tipos de Presa dos Morcegos Hematófagos (Phyllostomidae) No Sudeste do Brasil. Rev. Brasil. Biol. 52 (4): 563-573
- Uieda, W. 1994. Comportamento alimentar de morcegos hematófagos ao atacar aves, caprinos e suinos em condições de cativeiro. UNICAMP. Campinas, Tesis de Doctorado. 178p.
- Uieda, W., Buck, S., Sazima, I., 1992. Feeding behavior of the vampire bats *Diaemus youngi* and *Diphylla ecaudata* on smaller birds in captivity. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science. 44 (6): 410-412
- Velasco-Villa A., Orciari LA, Juarez-Islas V, Gómez-Sierra M, Padilla-Medina I, Flisser A, Souza V, Castillo A, Franka R, Escalante-Mañe M, Sauri-González I, y Rupprecht CE. 2006. Molecular Diversity of Rabies Viruses Associated with Bats in Mexico and Other Countries of the Americas. Journal of Clinical Microbiology. 44 (5): 1697–1710
- Velasco-Villa, A., Gómez-Sierra, M., Hernández-Rodríguez, G., Juárez-Islas, V., Meléndez-Félix, A., Vargas-Pino, F., Velázquez-Monroy, O., Flisser, A. 2002. Antigenic Diversity and Distribution of Rabies Virus in Mexico. J Clin Microbiol. 40 (3): 951-958
- Verma, S., Singh, L. 2003. Novel universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensic application. Molecular Ecology Notes. 3:28-31
- Villa-R., Moraes N., Villa-C. 1969. Estudio del contenido estomacal de los murciélagos hematófagos *Desmodus rotundus* (Geoffroy) y *Diphylla ecaudata* Spix (Phyllostomidae, Desmodinae). Anales del Instituto de Biología, UNAM 40. 291-297.



- Villa, B. y W. López-Forment. 1966. Cinco casos de depredación de pequeños vertebrados en murciélagos de Mexico. *Anales del Instituto de Biología de la Universidad de México* 37: 187-193.
- Voigt, C.C., Kelm, D.H. 2006. Host preference of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*; Chiroptera) assessed by stable isotopes. *Journal of Mammalogy* 87: 1–6.
- Warrell, D.A. 2004. Rabies and other lyssavirus diseases. *Lancet*; 363 (9413): 959 – 969.
- Wilkinson, G. S. 1988. Social organization and behavior. Pag 85–97, en Greenhall, A. M., Schmidt, U. (eds.) 1988. *Natural history of vampire bats*. CRC Press, Florida, 246 pp.
- Wilkinson, G. S. 1990. Food Sharing in Vampire Bats. *Scientific American*. 262: 76-82.
- Zaidi RH, Jaal Z, Hawkes NJ, Hemingway J, Symondson WOC (1999) Can multiple-copy sequences of prey DNA be detected amongst the gut contents of invertebrate predators? *Molecular Ecology*, 8, 2081–2087.