



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Área Académica de Medicina

Maestría en Salud Pública

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS RÁBICO EN MURCIÉLAGOS HEMATÓFAGOS (Desmodus rotundus) DE ZONAS ENDÉMICAS EN LA REGIÓN OTOMÍ-TEPEHUA, HIDALGO.

Proyecto terminal de carácter profesional

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN SALUD PÚBLICA

PRESENTA

Esbeydi Abigail Amador Martínez

Director(a) de Proyecto Terminal

Dra. Patricia Beatriz García Reyna

Comité tutorial

Codirector: M. en C. José Ignacio Olave Leyva

Asesor: Dr. Jesús Carlos Ruvalcaba Ledezma

Pachuca de Soto, Hidalgo, Septiembre 2020.



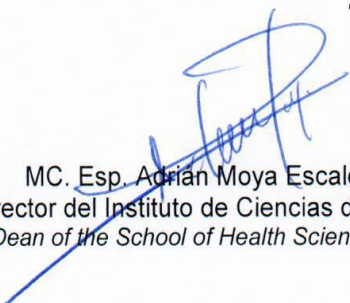
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias de la Salud
School of Health Sciences
Área Académica de Medicina
Department of Medicine
Maestría en Salud Pública
Master in Public Health

Oficio Núm. ICSa/AAM/MSP/276/2020
Asunto: Autorización de Impresión de PPT
Pachuca de Soto, Hgo., septiembre 23 del 2020

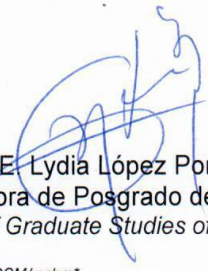
C. ESBEYDI ABIGAIL AMADOR MARTÍNEZ
ALUMNA DE LA MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA
STUDENT OF THE MASTER IN PUBLIC HEALTH

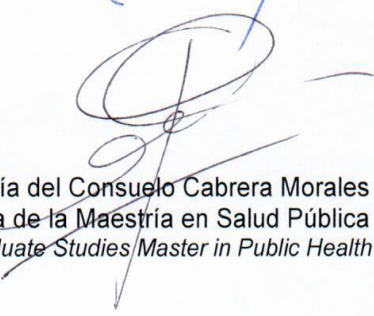
Comunicamos a usted, que el Comité Tutorial de su Proyecto de Producto Terminal denominado **“Epidemiología molecular del virus rábico en murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) de zonas endémicas en la región Otomí-Tepehua, Hidalgo”**, considera que ha sido concluido satisfactoriamente, por lo que puede proceder a la impresión de dicho trabajo.

Atentamente.
“Amor, Orden y Progreso”


MC. Esp. Adrián Moya Escalera
Director del Instituto de Ciencias de la Salud
Dean of the School of Health Sciences


MC. Esp. Luis Carlos Romero Quezada
Jefe del Área Académica de Medicina
Chair of the Department of Medicine


D. en C.E. Lydia López Pontigo
Coordinadora de Posgrado del ICSa
Director of Graduate Studies of ICSa


M. en C. María del Consuelo Cabrera Morales
Coordinadora de la Maestría en Salud Pública
Director of Graduate Studies Master in Public Health

AME/LCRQ/LLP/MCCM/mchm*



Eliseo Ramirez Ulloa Núm. 400
Col. Doctores
Pachuca de Soto, Hidalgo, C.P. 42090
Teléfono: 52(771) 71 720 00 Ext. 2366
mtria.saludpublica@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

Pachuca de Soto, Hgo., Septiembre 21 del 2020

M. en C.S. MARÍA DEL CONSUELO CABRERA MORALES
COORDINADORA DE LA MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA
Presente.

Los integrantes del Comité Tutorial de la alumna Esbeydi Abigail Amador Martínez, con número de cuenta 162591, comunicamos a usted que el Proyecto de Producto Terminal denominado **"Epidemiología molecular del virus rábico en murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) de zonas endémicas en la región Otomí-Tepehua, Hidalgo"**, ha sido concluido y se encuentra en condiciones de continuar el proceso administrativo para proceder a la autorización de su impresión.

Atentamente.
"Amor, Orden y Progreso"

D. en C. Patricia Beatriz García Reyna

Directora



M. en C. José Ignacio Olave Leyva

Codirector



D. en CSP. Jesús Carlos Ruvalcaba Ledezma

Asesor



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por bendecir mi vida, por guiarme a lo largo de mi existencia, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

A mi esposo Miguel Ángel: Por llenarme de amor e inspirarme cada día, hacerme más fuerte para cumplir mis metas, por acompañarme y escucharme sin entender a veces de lo que hablaba, por darme su apoyo incondicional. Por hacerme compañía y llenarme de motivación cada vez que las cosas se ponían difíciles.

A mi hija Alicia: Por darme todo el amor, la paciencia, apoyarme y comprender todos los sacrificios que implicó el poder concluir con este proyecto, por interesarse en el tema de investigación y ser mi pequeño motorcito que me motiva a seguir avanzando.

A mi mamá Rocío: Por creer en mí y enseñarme a ser una persona segura y fuerte. Por darme esas palabras de aliento cada que lo necesitaba. Por preocuparse por mí siempre y estar al pendiente. Por cuidar a mi hija porque de no ser así no habría podido lograr esta meta. Por mostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional.

Dra. Patricia B. García Reyna: Gracias en primer lugar por aceptarme para realizar este trabajo bajo su dirección. Por creer en mí y llenarme con sus palabras de aliento cada día. Por escucharme y compartir conmigo su conocimiento y su experiencia profesional guiándome de la mejor manera. Por gestionar y conseguir los medios para poder realizar este trabajo. Por brindarme su amistad, por aconsejarme y quedarse conmigo hasta el final.

Dr. José Ignacio Olave Leyva: Gracias por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Por confiar en mí, ha sido un honor contar con su orientación y ayuda profesional. Por aconsejarme y guiarme de la mejor manera.

Dr. Jesús Carlos Ruvalcaba Ledezma: Gracias por aceptarme para realizar este trabajo bajo su asesoramiento. Por escucharme y aconsejarme siempre, por brindarme su amistad, por compartirme su conocimiento y experiencia durante el desarrollo de este trabajo. Por su solidaridad y confianza.

M.V.Z Guillermo Hernández Mejía y M.V.Z. Adalberto Morales Fragoso: Por la confianza, guía y el apoyo que me brindaron a través del **C.E.F.P.P.E.H** para realizar el muestreo de este trabajo de investigación. Por guiarme y aconsejarme del mejor lugar para la colecta. Por acompañarme, cuidarme y compartirme su experiencia profesional.

M.V.Z. Mario Ortiz Olvera: Gracias por su disponibilidad y generosidad para compartir su experiencia y amplio conocimiento durante el muestreo. Por el surgimiento de una amistad y las palabras de apoyo y fortaleza.

Dr. Hugo B. Barrios García: Gracias por brindarme todos los recursos y herramientas que fueron necesarios para llevar a cabo este trabajo de investigación. No hubiese podido arribar a estos resultados de no haber sido por su incondicional ayuda. Por su hospitalidad y amabilidad, por su apoyo incondicional, por sus consejos y guía para el desarrollo de este trabajo. Por escucharme y brindarme su amistad.

M. en C. Raúl Saucedá Becerra: Gracias por apoyarme en el laboratorio, por su paciencia, por compartir sus conocimientos y guiarme para el desarrollo de este trabajo, por su amabilidad y brindarme su amistad. Por creer en mí, escucharme y aconsejarme en todo momento.

ÍNDICE

GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	1
ABREVIATURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
ANTECEDENTES	12
MARCO TEORICO	19
El papel de los murciélagos como principales reservorios y transmisores de virus patógenos.....	19
Aspectos biológicos del murciélago hematófago <i>Desmodus rotundus</i>	20
Reproducción.....	23
Comportamiento poblacional y alimentación.....	23
El virus de la rabia y su relación con los murciélagos	24
Aspectos moleculares del virus de la rabia	26
Ciclo del virus de la Rabia	28
Patogenia del virus de la rabia	29
Clasificación y aspectos epidemiológicos del virus de la rabia.....	29
Diagnóstico del virus de la rabia.....	32
Técnica de Inmunofluorescencia directa.....	32
Caracterización antigénica	32
Extracción y purificación del RNA.....	33
Técnica de Retro-transcripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).....	33
Prevención y control de la rabia transmitida por el murciélago hematófago en México	34
La región Otomí-Tepehua	34
Tenango de Doria	35
San Bartolo Tutotepec	35
Huehuetla	36
JUSTIFICACIÓN	37
HIPOTESIS	38
OBJETIVO GENERAL.....	38
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38

MATERIALES Y METODOS	39
Aspectos éticos	39
Material biológico	40
Determinación del tamaño de la muestra	40
Captura de murciélagos	40
Determinación del sexo y de la edad relativa de los murciélagos hematófagos (<i>Desmodus rotundus</i>)	41
Necropsia y toma de muestras	42
Diagnóstico del virus de la Rabia a través de pruebas moleculares	42
Purificación de ARN	42
Evaluación del ARN	43
Identificación del virus de la Rabia por RT-PCR	43
Identificación del virus de la rabia por PCR Anidada	44
Visualización de los productos de PCR mediante electroforesis	45
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
RESULTADOS	47
Tamaño de la muestra	47
Detección del virus de la rabia mediante la prueba molecular de RT-PCR	49
Detección del virus de la rabia mediante la prueba molecular de PCR anidada	50
Prevalencia del virus de la rabia en murciélagos hematófagos (<i>Desmodus rotundus</i>) de zonas endémicas de la región Otomí-Tepehua	50
Prevalencia de la positividad al virus de la rabia por sexo	51
Prevalencia de la positividad del virus de la rabia por edad relativa	51
Prueba de hipótesis	52
Asociación del sexo con la positividad al virus de la rabia	52
Razón de prevalencias	53
Razón de momios de la prevalencia (RMP).....	53
Asociación de la edad relativa con la positividad al virus de la rabia	53
Razón de prevalencias	54
Razón de momios de la prevalencia (RMP).....	54
Modelo de Regresión logística binaria	55
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	61
REFERENCIAS	63
ANEXO II	73

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Anticuerpos monoclonales: Son moléculas producidas por híbridos producto de la fusión de un mieloma y un esplenocito hiperinmune (Meslin, Kaplan y Koprowsky, 1996).

Ciclo epidemiológico: Es la secuencia de elementos que intervienen en la transmisión de un agente desde una fuente de infección a un huésped susceptible, o sea los pasos que sigue un agente causal, desde su hábitat natural (reservorio), hasta el hospedero susceptible (Wilkerson, 1995).

Encefalomiелitis aguda: Se caracteriza por un ataque breve pero intenso de inflamación en el cerebro y la médula espinal que lesiona la mielina, la cubierta protectora de las fibras nerviosas (Dietzschold, Li, Faber, Schnell, 2008).

Endémica: Significa que una enfermedad se presenta en una población o lugar específico (Wilkerson, 1995).

Epidemia: Es una descripción en la salud comunitaria que ocurre cuando una enfermedad infecta a un número de individuos superior al esperado en una población durante un tiempo determinado (Wilkerson, 1995).

Epidemiología molecular: es una nueva rama de la ciencia en la cual se implementan técnicas moleculares en los estudios epidemiológicos (Vargas, 2000).

Epidemiología: Es la rama de la ciencia que se dedica al estudio del origen, la distribución y el control de las enfermedades que afectan a las poblaciones (Vargas, 2000).

Fondos de saco epidemiológico: Son huéspedes en los cuales una vez que un patógeno llega a ellos resulta difícil que lo propaguen a otros (Wilkerson, 1995).

Hematófago: Que se alimenta de sangre (Téllez, 1944).

Host switching: (cambio de huésped) Es un cambio evolutivo de la especificidad del huésped de un agente patógeno (Piaggio, et al., 2017).

Huésped amplificador: Aquel en que el un agente encuentra el medio adecuado para un incremento repentino en el tamaño de su población y a partir del cual se puede transmitir en ocasiones repetidas o simultáneas (Vargas, 2000).

Huésped incidental: Es aquel que normalmente no transmite un agente infeccioso a otros animales (Vargas, 2000).

Inmune: Animal que alberga un agente infeccioso en forma natural o inducida y que independientemente de presentar manifestaciones de la enfermedad o alternativamente una infección inaparente, produce anticuerpos o inmunidad celular en niveles protectores a infecciones subsecuentes; consecuentemente se encuentra protegido (Vargas, 2000).

Inmunidad: Estado de resistencia generalmente asociado con la presencia de anticuerpos o células que poseen un actividad específica contra el microorganismo causante de una enfermedad infecciosa (Vargas, 2000).

Inmunofluorescencia directa: Es la técnica utilizada para el diagnóstico del virus de la rabia. Su principio se basa en la detección por medio de inmunofluorescencia directa epítomos de la proteína N del virus de la rabia a través de interacciones inmunoenzimáticas mediante la mezcla de anticuerpos monoclonales y la fluoresceína (Meslin, Kaplan y Koprowsky, 1996).

Patognómicos: Indicador de que se trata de un síndrome o enfermedad ya descrito y conocido, para el que se conoce algún tratamiento a seguir o una forma de abordaje (Torres y Queiroz Lima, 1935).

PCR anidada: Es una variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de iniciadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección (Meslin, Kaplan y Koprowsky, 1996).

Quiróptero: Orden de mamíferos voladores cuyos miembros anteriores, muy desarrollados y con los dedos largos, sirven de soporte a unas alas membranosas que se extienden por ambos lados del cuerpo y abarca los miembros posteriores y la cola (Blackwood et al., 2013).

Rabia paralítica: Es una enfermedad infecto-contagiosa de origen viral aguda y mortal que afecta el sistema nervioso central y es causada por un virus del género *lyssavirus*,

afecta principalmente a bovinos y a todos los mamíferos susceptibles como: ovinos, caprinos, porcinos y equinos, entre otros incluido el humano (Vargas, 2000).

Rabia: Enfermedad de origen viral que causa una encefalomiелitis de curso agudo y progresivo ocasionada por un virus neurotrópico ARN de sentido negativo, del género *Lyssavirus* perteneciente a la familia *Rhabdoviridae* del orden de los *Mononegavirales* (Wunner, 2007).

Reservorio natural: una población de animales de una misma especie, hospedadores a largo plazo de un patógeno que causa una enfermedad infecciosa zoonótica (Wilkerson, 1995).

Retro-transcripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa: Es una variante de PCR que nos permite amplificar un fragmento de la proteína N del virus de la rabia y se lleva a cabo en dos etapas (Meslin, Kaplan y Koprowsky, 1996).

Spillover: (desbordamiento, derrame) significa algo que fluye fuera de o se extiende más allá de un área, es usada con frecuencia en enfermedades infecciosas para denotar infecciones donde el agente causal surge a partir de un foco animal y se extiende o transmite al humano (Piaggio, et al., 2017).

Transmisión secundaria: Transferencia de un patógeno desde el organismo infectado a organismos adicionales (Vargas, 2000).

Virus ARN: El genoma del virus está compuesto de ARN helicoidal, de una sola cadena de polaridad negativa, con polimerasa (nucleoproteína) dependiente de ARN (Albertini, Ruigrok, Blondel, 2011).

Zoonosis: Enfermedades infecciosas transmisibles naturalmente desde animales vertebrados al ser humano (OMS, 2020).

ABREVIATURAS

AcMo: Anticuerpo monoclonal.
ADN: Ácido desoxirribonucleico.
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.
AgV: Variante antigénica.
ARN: Ácido ribonucleico.
°C: grados centígrados.
C.E.F.P.P.E.H: Comité Estatal de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Hidalgo.
CENAPRECE: Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades.
DGE: Dirección general de Epidemiología.
DEPC: Dietil pirocarbonato.
DNTP's: Desoxirribonucleótidos trifosfatos.
FITC: Isotiocianato de fluoresceína.
g: gravedades.
IC: Intervalo de confianza.
IFD: Inmunofluorescencia directa.
InDRE: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.
LESPT: Laboratorio Estatal de Salud Pública de Tamaulipas.
min: minutos.
ml: mililitros
µl: Microlitro.
nAChR: Receptor nicotínico para la acetilcolina.
NCAM: Moléculas de adhesión de células neuronales.
OIE: Organización mundial de sanidad animal.
OMS: Organización Mundial de la Salud.
OPS: Organización Panamericana de la Salud.
OR: Odds Ratio.
pb: Pares de bases
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PRONABIVE: Productora Nacional de Biológicos veterinarios.
RABV: Positividad al virus de la rabia.
RNP: Ribonucleoproteína.
RP: Razón de prevalencias.
RPM: Razón de momios de la prevalencia.
RT-PCR: Retro-transcripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.
seg: segundos
SENASICA: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
SNC: Sistema nervioso central.
UI: Unidades internacionales.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dinámica de transmisión de virus asociados a murciélagos	20
Tabla 2. Clasificación y distribución de los lyssavirus	30
Tabla 3. Programación del termociclador para la identificación del virus de la rabia por RT-PCR	44
Tabla 4. Programación del termociclador para la identificación del virus de la rabia por PCR anidada....	45
Tabla 5. Clasificación de los murciélagos según el sexo.....	47
Tabla 6. Clasificación de los murciélagos según la edad relativa	48
Tabla 7 Rango del Intervalo de confianza de la proporción del RABV.....	51
Tabla 8 Prueba de hipótesis.....	52
Tabla 9. Sexo*RABV	52
Tabla 10. Edad*RABV.....	53
Tabla 11. Resumen del modelo ^b	55
Tabla 12. Coeficientes ^a	55
Tabla 13. Pruebas ómnibus de coeficientes de modelo.....	55
Tabla 14. Resumen del modelo.....	56
Tabla 15 Clasificación ^a	56
Tabla 16. Variables en la ecuación.....	56
Tabla 17. Concentración y pureza de ARN.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 <i>Desmodus rotundus</i> adulto. Hidalgo, México.	21
Fig. 2 <i>Desmodus rotundus</i> juvenil, Hidalgo, México.....	21
Fig. 3 Organización del virus de la rabia y sus proteínas: N nucleoproteína, P fosfoproteína, M proteína matriz, G glicoproteína y L una ARN-polimerasa dependiente de ARN.....	26
Fig. 4 Ciclo del virus de la rabia. Se pueden observar varias fases: unión al receptor, endocitosis seguida de fusión de membrana y liberación de nucleocápsides, luego transcripción, replicación y finalmente ensamblaje de virus y progenie de gemación virión.....	28
Fig. 5 Cueva "Zopilote", San Bartolo Tutotepec, Hgo.	41
Fig. 6. Potrero "La periquera", Huehuetla, Hgo.	41
Fig. 7 Extracción de ARN en muestras de tejido encefálico de murciélagos (<i>D. rotundus</i>).	43
Fig. 8 A. Evaluación de la concentración y pureza de ARN. B. Lectura de la concentración y pureza de ARN.....	43
Fig. 9 Gel de agarosa al 2% mostrando productos de amplificación por RT-PCR para un segmento del gen N del virus de la rabia.....	49
Fig. 10 Gel de agarosa al 2% mostrando los productos de amplificación por PCR anidada para un segmento del gen N del virus rábico.....	50

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Representación gráfica de la proporción sexo.	47
Ilustración 2 Representación gráfica de la proporción edad relativa.....	48
Ilustración 3 Prevalencia del virus de la rabia en hembras y machos.....	51
Ilustración 4 Prevalencia del virus de la rabia por edad relativa.....	52

RESUMEN

La rabia sigue constituyendo una amenaza latente para las poblaciones humanas y animales. Actualmente México se encuentra libre de rabia humana transmitida por caninos domésticos, sin embargo en los últimos años la rabia humana transmitida por el murciélago hematófago *Desmodus rotundus* ha cobrado mayor importancia epidemiológica. Las alteraciones en el medio ambiente natural ocasionadas por la actividad humana y el cambio climático han generado desequilibrios de impacto en la ecología influenciando el movimiento de este quiróptero desde áreas naturales hacia ambientes rurales y urbanos, donde existen asentamientos humanos y presencia de animales domésticos. Los ataques por *Desmodus rotundus* a especies ganaderas son cada vez más frecuentes representando un problema de Salud Pública, porque estos casos pueden generar contactos entre los animales infectados y las personas. Los estudios de epidemiología molecular son herramientas útiles para la vigilancia epidemiológica de enfermedades virales, ya que se pueden estudiar los patrones de comportamiento del virus dentro de la región así como la identificación de sus reservorios y con ello evaluar el impacto de los programas de prevención y control de la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue determinar la epidemiología molecular del virus de la rabia en murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) en zonas endémicas de la región Otomí-Tepehua, Hidalgo. Para lo cual se realizó un estudio epidemiológico descriptivo, de corte transversal y analítico, donde el tamaño de la muestra fue de $n=80$ murciélagos hematófagos ($IC_{95\%}$, $\alpha=0.05$ y $Z=1.96$). La identificación del virus de la rabia se realizó en muestras de tejido encefálico a través de las pruebas moleculares de RT-PCR y PCR anidada. De las 80 muestras de tejido encefálico 6 muestras fueron positivas al virus de la rabia a través de PCR anidada. La prevalencia del virus en murciélagos hematófagos en zonas endémicas de la región Otomí-tepehua fue de 7.5%. Los análisis de asociación mediante la razón de prevalencia y razón de momios de la prevalencia ($IC_{95\%}(1.4-72)$, $X^2=5.43$, $p=0.020$) mostraron que el riesgo de estar infectados con el virus de la rabia es 7.9 veces mayor en el grupo de las hembras, comparado con el grupo de los machos y que existe 9.2 veces el riesgo de que las hembras estén infectadas con el virus de la rabia en comparación con el grupo de los machos. En el modelo de regresión logística binaria se obtuvo una OR de 9.2 resultado consistente con la RMP. Es importante señalar que el virus de la rabia aún se encuentra circulando en la región y que el murciélago hematófago es el principal reservorio y transmisor de la rabia a los bovinos y especies ganaderas de la zona, por ello se deben realizar esfuerzos dirigidos a limitar la propagación de la enfermedad. Por lo tanto, este escenario epidemiológico exige reexaminar las medidas de control aplicadas hasta el momento desde un abordaje multidisciplinar, así como cooperación intersectorial y participación de la comunidad.

Palabras clave: *rabia, desmodus rotundus, prevalencia, salud pública.*

Agradecimiento a El Proyecto de investigación denominado "Epidemiología molecular del virus de la rabia y monitoreo poblacional de quirópteros hematófagos (*Desmodus rotundus*) del estado de Tamaulipas" Convenio INVUAT-19-23 por el financiamiento de las pruebas moleculares.

ABSTRACT

Rabies remains a latent threat to human and animal populations. Currently Mexico is free of human rabies transmitted by domestic canines, however in recent years human rabies transmitted by the hematophagous bat *Desmodus rotundus* has gained greater epidemiological importance. The alterations in the natural environment caused by human activity and climate change have generated imbalances of impact on the ecology, influencing the movement of this chiroptera from natural areas to rural and urban environments, where there are human settlements and the presence of domestic animals. *Desmodus rotundus* attacks on livestock species are increasingly frequent, representing a Public Health problem, because these cases can generate contacts between infected animals and people. Molecular epidemiology studies are useful tools for the epidemiological surveillance of viral diseases, since it is possible to study the behavior patterns of the virus within the region as well as the identification of its reservoirs and thereby evaluate the impact of prevention and prevention programs disease control. The objective of this work was to determine the molecular epidemiology of the rabies virus in hematophagous bats (*Desmodus rotundus*) in endemic areas of the Otomí-Tepehua region, Hidalgo. For which a descriptive, cross-sectional and analytical epidemiological study was carried out, where the sample size was $n = 80$ hematophagous bats (CI=95%, $\alpha = 0.05$ and $Z = 1.96$). The identification of the rabies virus was carried out in brain tissue samples through molecular tests of RT-PCR and nested PCR. Of the 80 brain tissue samples, 6 samples were positive for rabies virus by nested PCR. The prevalence of the virus in hematophagous bats in endemic areas of the Otomí-Tepehua region was 7.5%. The association analyzes using the prevalence ratio and the odds ratio of the prevalence (95% CI (1.4-72), $X^2 = 5.43$, $p = 0.020$) showed that the risk of being infected with the rabies virus is 7.9 times higher in the group of females, compared to the group of males and that there is 9.2 times the risk that females are infected with the rabies virus compared to the group of males. In the binary logistic regression model, an OR of 9.2 was obtained. It is important to note that the rabies virus is still circulating in the region and that the hematophagous bat is the main reservoir and transmitter of rabies to cattle and livestock species in the area, therefore efforts should be made to limit the spread of the disease. Therefore, this epidemiological scenario requires a reexamination of the control measures applied to date from a multidisciplinary approach, as well as intersectoral cooperation and community participation.

Key words: *Rabies, Desmodus rotundus, prevalence, public health.*

Agradecimiento a El Proyecto de investigación denominado "Epidemiología molecular del virus de la rabia y monitoreo poblacional de quirópteros hematófagos (*Desmodus rotundus*) del estado de Tamaulipas" Convenio INVUAT-19-23 por el financiamiento de las pruebas moleculares.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud define a la rabia, como una enfermedad vírica infecciosa que acaba siendo mortal en casi todos los casos una vez que han aparecido los signos clínicos, es considerada una de las zoonosis con mayor letalidad y ampliamente generalizada en el mundo (OMS, 2020). Ésta enfermedad afecta el sistema nervioso de los mamíferos tanto domésticos como silvestres y su propagación al ser humano normalmente es por el contacto directo con la saliva de animales infectados a través de mordeduras y arañazos; o bien, vía aerosoles en condiciones de laboratorio y a través de membranas mucosas (Dietzschold, Li, Faber, Schnell, 2008).

Se trata de una encefalomiелitis de curso agudo y progresivo ocasionada por un virus neurotrópico ARN de sentido negativo, del género *Lyssavirus* perteneciente a la familia *Rhabdoviridae* del orden de los *Mononegavirales* (Wunner, 2007) .

Pese a los adelantos logrados en cuanto al método científico y herramientas de control, la rabia sigue constituyendo una amenaza latente para las poblaciones humanas y animales ya que se encuentra ampliamente extendida, desatendida y notificada por debajo de su nivel real, ocasionando la muerte de alrededor de 59,000 personas cada año en el mundo, de las cuales el 95% suceden en Asia y África; es decir una persona muere de rabia cada 15 minutos y otras 300 son expuestas (OIE, 2020; Warrell, Warrell, 2015). Esto sucede principalmente en las comunidades más pobres y vulnerables de los países en vías de desarrollo representando una carga social y económica significativa (OMS, 2020).

El virus de la rabia está presente en todos los continentes, excepto en la Antártica. Algunos países han establecido medidas de control y vigilancia y han conseguido erradicar la enfermedad, sin embargo en los países en donde la enfermedad es endémica los principales reservorios y transmisores de la rabia son los animales silvestres (OMS, 2020).

Todos los mamíferos son susceptibles al virus de la rabia y se pueden dividir en dos categorías: la primera corresponde a los reservorios o animales que mantienen el virus y lo diseminan de manera eficaz, estos animales son principalmente del orden Carnívora como perros, zorros, zorrillos, mapaches, lobos, coyotes, entre otros y del orden *Chiroptera* al que pertenecen los murciélagos. La segunda corresponde a los animales

que si bien pueden padecer la enfermedad, no la diseminan de manera tan eficaz como lo hacen los reservorios, estos animales son en su mayoría herbívoros como bovinos, equinos, ovinos, caprinos, entre otros y el hombre, especies consideradas como huéspedes accidentales, o fondos de saco epidemiológico pues una vez que el virus llega a ellos resulta más difícil que se propague a otros animales susceptibles (Wilkerson, 1995).

El virus de la rabia es mantenido en dos ciclos epidemiológicos, cada uno con diferentes reservorios: el ciclo urbano donde existe participación, principalmente, de perros, gatos y otros animales que viven en contacto directo con el hombre y el ciclo silvestre que se concentra principalmente en reservorios terrestres (zorros, zorrillos y mapaches) y un reservorio aéreo (los murciélagos) (Blackwood et al., 2013; Bárcenas-Reyes et al., 2015). También en el ciclo urbano puede existir relación con el ciclo silvestre, ya que ha sido posible el aislamiento de variantes del virus correspondientes a animales silvestres en el ser humano y animales domésticos infectados (Kotait et al., 2007; Páez Núñez, García, Boshell, 2003; Guarino, et al., 2013; CENAPRECE, 2020).

Algunos autores mencionan el ciclo rural, que involucra la participación de animales silvestres, especialmente el ciclo aéreo en donde el murciélago hematófago *Desmodus rotundus* transmite el virus de la rabia a los bovinos y especies ganaderas (Bárcenas, et al., 2015). Este ciclo presenta un gran impacto económico y de Salud Pública (Acha y Malága-Alba, 1988; Hanlon et al., 2007; OIE, 2020).

Las alteraciones en el medio ambiente natural influenciadas por el cambio climático y la actividad humana, han generado desequilibrios ambientales que impactan en el ecosistema, alterando la distribución geográfica y las poblaciones de cientos de animales silvestres que transmiten patógenos de riesgo para el ser humano y los animales domésticos (Crowl, Crist, Parmenter, Belovsky y Lugo, 2008). Tal es el caso del murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*) adaptándose a distintos climas, alturas y ecosistemas que hace algunas décadas eran consideradas como barreras naturales para su especie (Piaggio, et al., 2017); influenciando su movimiento desde áreas naturales hacia ambientes rurales y urbanos, donde existen asentamientos humanos y presencia de animales domésticos (Constantine, 2003), incrementando la posibilidad de contacto entre el hombre, los animales domésticos y los animales silvestres infectados (Shi, 2010).

En América Latina, la rabia humana transmitida por los caninos domésticos se encuentra en vías de eliminación. No obstante, en los últimos años, la rabia humana transmitida por *Desmodus rotundus* ha cobrado mayor importancia epidemiológica ya que es el principal reservorio y transmisor del virus de la rabia en alrededor del 68% de los casos registrados (OPS, 2018). Éste quiróptero se localiza en las áreas tropicales y subtropicales, desde el norte de México hasta el norte de Argentina y Chile (Da Rosa et al., 2006; Loza-Rubio et al., 2012).

En México a partir del 2010 al 2016, el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades registró 10 casos de rabia humana transmitida por animales silvestres, de los cuáles 9 casos fueron transmitidos por el murciélago hematófago (CENAPRECE, 2020).

La Rabia Paralítica (RP) es la presentación de la enfermedad en bovinos y especies ganaderas, caracterizada por la parálisis del tren posterior. La RP es transmitida a éstos animales a través de la mordedura del murciélago hematófago *Desmodus rotundus* por ser su principal fuente de alimento (Lee, Papes y Van Den Bussche, 2012). Esta enfermedad es endémica en zonas tropicales y subtropicales del continente americano (FAO, 2017).

Los ataques por *Desmodus rotundus* a especies ganaderas son cada vez más frecuentes, incluso en regiones que por décadas se habían considerado libres de rabia. Esta problemática se agrava, ya que la presencia del ganado favorece el incremento de las poblaciones y la distribución geográfica de este reservorio (Bárceñas, et al., 2015).

En México la rabia paralítica en bovinos y especies ganaderas se considera endémica en el 78% del territorio nacional siendo uno de los principales problemas que afecta al sector pecuario mexicano (PRONABIVE, 2018), ya que se han notificado casos positivos en 25 estados de la República, por la costa del Pacífico desde el sur de Sonora hasta Chiapas, y por la costa del Golfo de México desde Tamaulipas hasta Quintana Roo (SENASICA, 2020). La pérdida económica por la rabia paralítica en la industria ganadera es estimada en más de 23 millones de dólares anuales (Anderson, et al., 2014).

De acuerdo con los indicadores del Sistema de Vigilancia Epidemiológica del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, en el periodo de Enero a Diciembre del 2019, se notificaron 309 casos positivos a rabia en bovinos y especies

ganaderas transmitida por *Desmodus rotundus* de los cuales 26 corresponden al estado de Hidalgo (SENASICA, 2020), posicionándose en el sexto lugar con mayor número de casos de rabia parálitica en el país. Esto representa un serio problema de impacto en la Salud Pública, ya que estos casos pueden generar contactos entre los animales infectados y las personas, puesto que ha sido posible el aislamiento del virus de la rabia a partir de muestras de saliva y glándulas salivales de bovinos infectados (Delpietro y Russo, 1996). Lo cual constituye un nuevo desafío, debido a la gran variabilidad que presenta el virus de la rabia, lo que hace que su transmisión y distribución, sea más dependiente del reservorio, que de la región geográfica, haciendo que la prevención y el control sean bastante complejos (Piaggio, et al., 2017).

El comportamiento epidemiológico del virus de la rabia, está relacionado con el hábitat, diversidad y dinámica poblacional del murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*), así como el grado de las áreas geográficas perturbadas (Torres et al., 2014). La comprensión de factores ambientales, sociales y su relación con la forma en que la enfermedad se mantiene en el reservorio, es pertinente al plantear estrategias dirigidas a reducir el riesgo de la transmisión del virus de la rabia a bovinos y especies ganaderas (Lee, et al., 2012).

Este trabajo fue realizado en zonas endémicas de la región Otomí-Tepehua, en los municipios de Tenango de Doria, San Bartolo Tutotepec y Huehuetla, donde se han confirmado casos positivos a rabia parálitica, se han identificado nichos con la presencia de *Desmodus rotundus*, se ha notificado agresión (mordeduras) en bovinos y especies ganaderas y existe una inquietud social que demanda el control de la población de este quiróptero en la región. Hasta la fecha no existen estudios sobre epidemiología molecular del virus de la rabia en murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) de esta región, por lo que resulta relevante el presente estudio a fin de realizar una actualización de la distribución geográfica de la enfermedad, para predecir áreas potenciales en riesgo de infección, así como continuar en coordinación con el personal de salud humana y de salud animal, buscando introducir estrategias que permitan limitar la propagación del virus de la rabia entre los animales silvestres y los animales domésticos, salvaguardando la salud humana.

ANTECEDENTES

La posibilidad de que los murciélagos hematófagos fuesen transmisores del virus de la rabia, fue contemplada inicialmente a comienzos del siglo XX. La hipótesis surgió a raíz de un brote de rabia, (que sucedió en el estado de Santa Catarina, Brasil), en el cual murieron cerca de 4000 bovinos, 1000 equinos y mulares, la situación produjo grandes pérdidas económicas a la población local, la enfermedad era conocida como “peste das cadeiras”. Por medio de la información de productores de la región, se llegó a saber sobre casos fatales de la enfermedad en ambos márgenes del Rio Itajaí, lugar de difícil acceso para los perros, hecho sumado a la presencia de murciélagos hematófagos que se estaban alimentando sobre el ganado, los cuales demostraban un comportamiento agresivo entre sus congéneres (Carini, 1911).

Dos veterinarios alemanes, Haupt y Rehaag en 1925, investigando en la misma región donde Carini había diagnosticado la rabia en bovinos, identificaron por microscopia óptica la presencia de corpúsculos de Negri, los cuales son patognomónicos para rabia, en el sistema nervioso central de un murciélago hematófago que estaba alimentándose a partir de un bovino, confirmando la hipótesis de Carini. Ellos también describieron por primera vez, en Brasil, la presencia del virus de la rabia en un murciélago no hematófago de la especie *Phyllostoma superciliatum*, actualmente clasificado como *Artibeus lituratus* (Haupt y Rehaag, 1925).

Una década después, de la epidemia de rabia en Santa Catarina, entre 1925 y 1936 la rabia devastó la Isla caribeña de Trinidad, comprometiendo incluso a seres humanos. Los médicos Hurst y Pawan (1931) confirmaron que se trataba del virus de la rabia transmitido por el murciélago hematófago *Desmodus rotundus*, además se constató que la transmisión ocurría por la mordedura de murciélagos enfermos, los cuales generalmente después de atacar a su presa, morían, siendo posible confirmar en el laboratorio la presencia del virus en estos especímenes (Hurst y Pawan, 1931).

Después de iniciadas las primeras investigaciones, el virus de la rabia comenzó a ser aislado de otras especies de murciélagos de hábitos hematófagos, *Desmodus rotundus* y *Diphylla ecaudata* (Lima, 1934; Torres, 1934). Un espécimen de *D. ecaudata*, que fue diagnosticado positivo para rabia, estaba en el mismo refugio con cinco ejemplares de *Desmodus rotundus*, de éstos, dos presentaron parálisis y dificultad de vuelo, otros dos murieron sin signos clínicos, uno sobrevivió a la infección y se convirtió aparentemente en diseminador del virus (Torres y Queiroz Lima, 1935).

En México por primera vez se demostró que la enfermedad conocida como “renguera”, era igual a “la peste das cadeiras” de Brasil y que correspondía a la rabia ancestral, que había sido descrita por Queiroz Lima (Tellez, 1944).

Después de estos hallazgos, la comunidad científica internacional aceptó que *Desmodus rotundus* podía transmitir el virus de la rabia al ser humano y a otras especies de mamíferos. Existen varios relatos de mordeduras de murciélagos a seres humanos. Algunos ocurrieron en las poblaciones indígenas como los yanomami, en Venezuela, en 1979, como consecuencia de la deforestación generada por la actividad minera de explotación aurífera (Almansa y García, 1980). En 1975, varias personas fueron mordidas por *Desmodus rotundus* en Belice, Centro América, después del sacrificio de especies ganaderas en esta área (MacCarthy, 1989). En una villa en el área rural de Brasil, los ataques se distribuyeron en función de cambios ambientales locales y aplicación de un pesticida tóxico en bovinos (Bastida, Bonito, Nishioka, 1993).

En Venezuela, en 1992, hubo un brote de rabia causada por murciélagos hematófagos, con 154 casos de mordeduras en un período de cuatro meses en la mina de oro Payapal. En este brote los pacientes fueron mordidos durante la noche, en su mayoría en los dedos. Es posible que los cambios introducidos por la actividad minera y el incremento de la población humana favorezcan comportamientos predatorios alternativos del murciélago hematófago *Desmodus rotundus*, recurriendo a la sangre humana como fuente de sustento (Caraballo, 1993).

La región Amazónica es un área de alto riesgo. Epidemias de rabia en humanos, transmitida por *Desmodus rotundus* han ocurrido en áreas remotas de Perú, Venezuela y Brasil, generalmente en lugares de difícil acceso. Durante los años 2004 y 2005, decenas de personas contrajeron la rabia por murciélago en esta región. Brasil fue el país con mayor número de casos (64), seguido por Perú (15) y Colombia (14) (Da Rosa, Kotait, Barbosa, Carrieri, Brandão, Pinheiro, et al., 2006). En los lugares donde ocurrieron éstos casos de rabia humana, muchas personas vivían en condiciones de extrema pobreza, en casas vulnerables y áreas en las cuales la población ganadera es pequeña (Rupprecht, Barret, Briggs, Cliquet, Fooks, Lumlertdacha, et al., 2008).

Las transmisiones secundarias del virus de la rabia en seres humanos puede ocurrir principalmente por contacto entre animales domésticos y murciélagos infectados. En el año 2001, en San Pablo, Brasil, una mujer falleció después de haber sido mordida por

su gata. La tipificación antigénica reveló que se trataba de la variante 3 (AgV3), propia del murciélago hematófago *Desmodus rotundus* (Kotait, et al., 2007).

De manera similar, en Quilichao, Colombia en el año 2008 fueron registrados dos casos de rabia en niños que fueron mordidos por un gato, la tipificación antigénica confirmó variante AgV3 (Brito, Chamone, da Silva, Wada, Miranda y Castilho, 2011).

Así mismo en 2009 en Jalisco, México se registró un caso de transmisión secundaria de rabia en una persona de 63 años quien manipuló el hocico y tuvo contacto directo con la saliva de un bovino sospechoso de rabia (CENAPRECE, 2020).

Del 2010 al 2016 en México se han reportado 10 casos de rabia humana transmitida por animales silvestres, de los cuáles 9 casos fueron transmitidos directamente por el murciélago hematofago (*Desmodus rotundus*), sucediendo principalmente en poblaciones rurales que residen cerca de nichos ecológicos donde prolifera esta especie (CENAPRECE, 2020).

En el año 2016 se registraron dos casos de Rabia humana en México. El primer caso sucedió a finales de Septiembre del 2015, en el Estado de Guerrero, un hombre de 54 años fue agredido por un murciélago hematófago en su mano derecha dentro de su casa, no acude a solicitar atención médica, seis meses después, inicia el cuadro clínico, refiriendo cefalea, dolor cervical, fiebre no cuantificada, espasmos y disminución de la fuerza muscular en brazos y piernas, presentando dificultad para deambular. Acude a unidad médica privada con diagnóstico de tétanos, es referido a unidad de terapia intensiva en Hospital presentando un cuadro compatible con encefalomiелitis aguda. Durante su estancia intrahospitalaria es manejado con ventilación asistida, antibiótico terapia y vacuna e inmunoglobulina antitetánica, se toman muestras antemortem: impronta de córnea y biopsia de cuero cabelludo. El paciente presentó cuatro paros cardiorrespiratorios y falleció el 19 de Marzo; se obtuvo tejido nervioso, mismo que el InDRE reporta como positivo a rabia y la tipificación antigénica confirmó variante AgV3 (CENAPRECE, 2019).

El segundo caso de rabia humana sucedió en Tamaulipas, un hombre fue agredido por un murciélago el 5 de Septiembre del 2016, en el Ejido 8 de mayo, municipio de Soto la Marina, en la rodilla derecha. El 3 de Octubre inicia con cuadro clínico para lo cual refiere, sensación de calor, escalofríos, dolor en miembro pélvico derecho, sin acudir a consulta médica; el jueves 6 de Octubre percibe mayor dolor a nivel del miembro pélvico,

con sensación de pérdida de fuerza y dolor abdominal, acude al IMSS donde es referido al departamento de epidemiología, aplicándole la primera dosis de la vacuna antirrábica humana el 7 de Octubre y citándolo para el 10 de Octubre para la segunda dosis. El paciente acude nuevamente por continuar con sintomatología, por lo que se decide su traslado al Hospital General de Ciudad Victoria el 8 de Octubre, ya con diagnóstico de mordedura de murciélago el 9 de Octubre, se le aplicó IgAH: 820 UI en la herida y 820 vía IM. Fallece el 19 de Octubre, el InDRE reporta resultado positivo de muestra encefálica con variante antigénica AgV11 perteneciente a *Desmodus Rotundus* (CENAPRECE, 2020). Cabe destacar que en ambos casos se recibe la atención médica y la vacunación antirrábica muy tardía y esto se debe al desconocimiento tanto de la enfermedad, como del reservorio, en estos casos el murciélago hematófago. Por lo cual resulta relevante informar y concientizar a la población que vive en las zonas vulnerables en donde la rabia es endémica y existe la presencia del reservorio. De igual manera no bajar la guardia en cuanto a la prevención mediante las campañas de vacunación a los animales domésticos, puesto que el 14 de abril del 2009, en Jalisco, en el municipio de Hostotipaquillo, una persona se infectó de rabia al manipular el hocico de un bovino infectado, la cual falleció un mes después (CENAPRECE, 2020).

De igual forma en el año 2017, en México, se registraron dos casos de rabia en dos caninos domésticos; el primer caso sucedió en Yucatán, fue un canino macho de 5 meses, carente de vacunación antirrábica, el cual agredió a una persona y al realizar la tipificación antigénica, se le encontró la variante AgV3 perteneciente a *Desmodus rotundus*. El segundo caso sucedió en Chiapas, fue una hembra también carente de la vacunación antirrábica, esta perra no agredió a ninguna persona, sin embargo tuvo contacto con 15 y también le fue hallada la variante antigénica AgV3 (CENAPRECE, 2019).

Además de los problemas de impacto en la salud pública, están los de impacto económico en el sector agropecuario. De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud, la rabia en bovinos y especies ganaderas sucede principalmente en América Latina (OPS, 2019). Las actividades hematófagas del murciélago *Desmodus rotundus* sobre el ganado, generan pérdidas económicas directas, ocasionando la muerte del animal al infectarlo con el virus de la rabia, o bien, pérdidas económicas indirectas, causando una baja en la producción de carne de 39.7kg por animal (Schmidt y Badger, 1979) y depreciación del cuero al disminuir su calidad, también pueden ocasionar infecciones secundarias en las heridas ocasionadas por la mordedura. Así mismo la pérdida continua de sangre causada por su alimentación diaria, puede llegar

a debilitar a los animales ocasionando anemia u otras enfermedades que podrían causarles la muerte (Romero-Almaraz, Aguilar- Setién y Sánchez-Hernández, 2006; Kuzmin, et al., 2007).

En México la Rabia Paralítica en bovinos y especies ganaderas se considera endémica en el 78% del territorio nacional siendo uno de los principales problemas que afecta al sector pecuario mexicano (PRONABIVE, 2018), ya que se han notificado casos positivos en 25 estados de la República, por la costa del Pacífico desde el sur de Sonora hasta Chiapas, y por la costa del Golfo de México desde Tamaulipas hasta Quintana Roo (SENASICA, 2019). La pérdida económica por la rabia paralítica en la industria ganadera es estimada en más de 23 millones de dólares anuales (Anderson, *et al.*, 2014).

De acuerdo con los indicadores del Sistema de Vigilancia Epidemiológica del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, en el periodo de Enero a Diciembre del 2019, se notificaron 309 casos positivos a rabia en bovinos y especies ganaderas transmitida por *Desmodus rotundus* de los cuales 26 corresponden al estado de Hidalgo (SENASICA, 2020), posicionándose en el sexto lugar con mayor número de casos de rabia paralítica en el país.

Al igual que en muchos otros países, en México existe un considerable sub-registro de casos debido, principalmente a la falta de suficientes laboratorios especializados para realizar el diagnóstico. Asimismo, la mayoría de los casos que suceden en áreas rurales, no son registrados debido al desconocimiento de la enfermedad por parte de los productores (Lee et al., 2012; Ramírez-Romero, 2014). Se considera que por cada caso de rabia notificado, existen diez que no se informan (Fornes et al., 1974).

En relación al diagnóstico de la rabia, la participación de los laboratorios ha sido crucial para la confirmación de un caso positivo por la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD), que es la prueba de referencia a nivel mundial (NOM-067-ZOO-2007) (SAGARPA, 2014). De igual modo, los procedimientos inmunológicos utilizados en la caracterización viral basados en el empleo de anticuerpos monoclonales y, más recientemente, los análisis de secuenciación genética, han permitido generalizar que la mayoría de los casos de rabia en bovinos, en América Latina, se deben a la transmisión por el murciélago hematófago *Desmodus rotundus* (Escobar, Peterson, Favi, Yung y Medina, 2015).

La distribución geográfica de la rabia parálitica en bovinos y especies ganaderas ha ido en incremento paulatinamente (Lee, et al., 2012). Estudios de epidemiología espacial y ambiental, han tratado de identificar áreas geográficas con alto riesgo de transmisión y posibles factores ambientales relacionados con la aparición de la enfermedad en aquellas regiones donde existe la presencia especies ganaderas y *Desmodus rotundus*, ya que la ganadería representa la fuente primaria de alimento para estos quirópteros sobre todo en países de América Central y México. Altas densidades de ganado bovino por km² y el hábitat adecuado favorecen la presencia del reservorio (Lee, et al., 2012).

Las alteraciones en el medio ambiente natural influenciadas por el cambio climático y la actividad humana, han generado desequilibrios ambientales que impactan en el ecosistema, alterando la distribución geográfica y las poblaciones de cientos de animales silvestres que transmiten patógenos de riesgo para el ser humano y los animales domésticos (Crowl, Crist, Parmenter, Belovsky y Lugo, 2008). Tal es el caso del murciélago hematófago *Desmodus Rotundus* adaptándose a distintos climas, alturas y ecosistemas que hace algunas décadas eran consideradas como barreras naturales para su especie (Piaggio, et al., 2017); influenciando su movimiento desde áreas naturales hacia ambientes rurales y urbanos, donde existen asentamientos humanos y presencia de animales domésticos (Constantine, 2003), incrementando la posibilidad de contacto entre el hombre y los animales infectados (Shi, 2010).

Es conveniente destacar que los murciélagos no son solamente importantes reservorios del virus de la rabia, sino también de una amplia gama de patógenos que pueden ser causa de enfermedad en humanos y animales domésticos (Hayman, Bowen, Cryan, McCracken, O'Shea, Peel, et al., 2013).

Avelino *et al.*, 2011, realizó un trabajo cuyo objetivo fue estudiar el patrón epidemiológico de la rabia en muestras del sistema nervioso central de murciélagos no hematófagos y animales herbívoros de São Paulo, Brasil. Utilizando la caracterización antigénica con anticuerpos monoclonales y la caracterización genética mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR), seguida de secuenciación y análisis filogenético, obtuvieron como resultado, la identificación de la variante 3 (AgV-3) en el 71.4% (15/21) de las muestras de murciélagos y el 100% (5/5) en las muestras de animales herbívoros. También se identificó en el 90,9% (10/11) de las muestras de murciélagos frugívoros (*Artibeus lituratus*) y en el 55,6% (5/9) de las muestras de los murciélagos insectívoros (tres *Lasiurus ega*, un *Molossus molossus* y un *Lasiurus blossevillii*). Cabe resaltar que ninguna de las muestras estudiadas pertenecía a

Desmodus rotundus y que la variante antigenica más encontrada fué la relacionada con ésta especie. Se puede inferir que los murciélagos hematófagos parecen ser la fuente más eficiente de propagación del virus de la rabia, ya que sus hábitos de alimentación conducen a atacar a diferentes especies animales, incluidas otras especies de murciélagos en interacciones sociales agresivas. Es por ello que el estudio de la epidemiología molecular del ciclo aéreo de la rabia es una herramienta muy importante para comprender las posibles relaciones entre las diferentes especies de murciélagos en cuanto a las posibilidades de transmisión del virus rábico a otras especies animales y humanos. Además, surge la necesidad de estudios en refugios de murciélagos, para observar la biología y el comportamiento de estos animales y su participación en la transmisión del virus de la rabia (Avelino, et al., 2011).

Un estudio epidemiológico descriptivo de corte transversal realizado en Córdoba, Colombia, determinó la presencia del virus rábico en 100 murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) mediante la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD), teniendo como resultado el 13% de positividad, en consecuencia sugieren continuar realizando vigilancia epidemiológica y control de las poblaciones de este quiróptero, con la finalidad de prevenir la transmisión del virus de la rabia entre los animales silvestres y las especies ganaderas (Betancur, Calderón y Rodríguez, 2016).

Bárcenas-Reyes, Loza-Rubio, Zendejas, Luna, Cantó y Milián, en 2015, realizaron un estudio para determinar la relación eco-epidemiológica y molecular de la rabia paralítica bovina transmitida por el murciélago hematófago *Desmodus rotundus* a las diferentes especies de animales domésticos en la región centro de México: Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí en un periodo de 10 años, encontrando 1037 casos presentados en diferentes especies domésticas y silvestres, de las cuales 911 (87.9%) ocurrieron en SLP, 82 (7.9%) en Querétaro y 44 (4.2%) en Guanajuato. El mayor número de casos (85%) ocurrió en bovinos. Los meses de mayor incidencia fueron de diciembre a marzo y la variante antigénica viral fue AgV11 propia del murciélago hematófago. Además observaron que la diseminación reciente de la enfermedad a zonas libres coincide con la presencia del murciélago hematófago *Desmodus rotundus*. Así mismo recomienda mantener un monitoreo constante para la detección oportuna de casos cuando existen condiciones favorables para la presencia del reservorio y la presencia de especies ganaderas, además de los antecedentes de casos en regiones cercanas (Bárcenas, et al., 2015).

MARCO TEORICO

El papel de los murciélagos como principales reservorios y transmisores de virus patógenos

Los murciélagos son un grupo de mamíferos diverso con amplia distribución geográfica, pertenecen al orden *Chiroptera*, donde se conocen aproximadamente 1,240 especies organizadas en 18 familias en dos subórdenes: Megachiroptera y Microchiroptera (Chan, To, Tse, Jin, Yuen, 2013; Calisher, Field, Holmes, Schountz, 2006; Jones, et al., 2005; Wibbelt, Marianne, Schountz, Voigt, 2010; Calisher, 2015).

Los murciélagos proveen servicios ecológicos que benefician a los ecosistemas, tales como la polinización, la depredación de plagas de insectos y la dispersión de semillas (Pijl, 1957; Fleming et al., 2009; Lobova et al. 2003). Sin embargo, a pesar de su importancia ecológica, los murciélagos también actúan como principales reservorios y transmisores eficientes de más de sesenta virus, de los cuales 59 son virus ARN, potencialmente importantes en la generación de enfermedades emergentes y reemergentes en humanos, animales domésticos y animales silvestres. Es así que algunas especies de murciélagos, representan un riesgo para la salud pública y la salud animal (Rodhain, 2015), actuando como principales reservorios y transmisores del virus de la Rabia (Familia *Rhabdoviridae*), el virus Nipah y Hendra (*Paramyxoviridae*), el virus del Ébola y Marburg (*Filoviridae*), el virus del SARS-CoV y el MERS-CoV (*Coronaviridae*), entre otros (Wong, Lau, Woo, Yuen, 2007). La diversa bioecología de las diferentes poblaciones de murciélagos permite el intercambio de virus entre especies conespecíficas migratorias y no migratorias (Rodhain, 2015).

La infección cruzada entre la gran cantidad de especies de murciélagos, puede generar nuevos virus que pueden saltar la barrera entre especies animales poniendo en riesgo a la humanidad. La comprensión del reservorio natural, el huésped amplificador, el centro epidémico y las poblaciones humanas en riesgo, son cruciales en el control de las zoonosis emergentes y reemergentes (Tabla 1) (Rodhain, 2015).

Tabla 1. Dinámica de transmisión de virus asociados a murciélagos

Virus	Reservorio natural	Huésped amplificador	Población en alto riesgo de infección zoonótica	en alto infección	Epicentro para la transmisión de animales a humanos	Epicentro para la transmisión de humano a humano
Coronavirus SARS-CoV	Murciélagos ^a	Civeta de las palmeras y posiblemente otros animales en wet markets	Restaurant trabajadores en el manejo de animales silvestres	o en el manejo de animales silvestres	Wet markets (mercados mojados populares en Asia)	Centros médicos, contacto directo con personas infectadas.
Coronavirus MERS-CoV	Murciélagos ^a	Camellos, antilopes (posible).	Biólogos o personal que realice manejo de murciélagos	que manejen camellos	Personas que manejen camellos	Centros médicos, contacto directo con personas infectadas.
Coronavirus CoVid-19	Murciélagos ^a , Pangolin ^a		Restaurant trabajadores en el manejo de animales silvestres	o en el manejo de animales silvestres	Wet markets (mercados mojados populares en Asia)	Centros médicos y contacto directo con personas infectadas.
Ébola virus	Murciélagos ^a	Primates	Biólogos en el manejo de primates, consumidores de carne de animales silvestres		Bosques	Centros médicos y contacto directo con fluidos de personas infectadas
Hendra virus	Murciélagos	Equinos	Contacto directo con equinos		Granja de equinos	Nulo
Menangle virus	Murciélagos	Cerdos	Granjas de cerdos		Granjas de cerdos	Nulo
Nipah virus	Murciélagos	Cerdos	Trabajadores de granja o matadero		Granja de cerdos y mataderos	Centros médicos (posible) y familias (posible)
Virus de la Rabia	Murciélagos, carnívoros	Nulo (la transmisión es directa, murciélago a humano u otro mamífero).	Biólogos, veterinarios, personal que realice manejo de murciélagos y residentes en áreas endémicas (América Latina).		Residentes en zonas rurales endémicas y ocasionalmente en zonas urbanas.	Nulo, raramente debido a trasplante de órganos
European and Australian bat lyssaviruses	Murciélagos	Nulo (la transmisión es directa, murciélago a humano u otro mamífero).	Biólogos y personas que manejen murciélagos		Solamente casos esporádicos	Nulo

^a La transmisión de murciélagos a humanos ha sido postulada para esos virus pero no han sido probados.

Fuente: Adaptado de Wong, *et al.*, 2007; Zhang, Zhang, 2020

Aspectos biológicos del murciélago hematófago *Desmodus rotundus*

De entre las aproximadas 138 especies de murciélagos que habitan en México, existen tres de hábitos hematófagos, pertenecen a la familia *Phyllostomidae*, subfamilia *Desmondotinae*. Estos murciélagos tienen comportamiento único y grandes adaptaciones anatómicas que favorecen sus hábitos y tipo de alimentación. Están representados por tres géneros: *Desmodus rotundus* o vampiro de patas pelonas, es el más común y abundante, con amplia distribución desde México hasta América del sur (Greenhall *et al.*, 1983). Este murciélago se alimenta de sangre de mamíferos, especialmente bovinos, equinos y porcinos y es responsable por ataques eventuales a humanos (Aguiar, 2007). La especie *Diphylla eucadata* o vampiro de patas peludas es

el que posee hábitos más especializados, consumiendo sangre de aves de tamaño mediano y grande (Greenhall *et al.*, 1984). Otra especie, *Diaemus youngi* o vampiro con la punta de las alas blanca, es la más rara y con distribución restringida. Ataca preferencialmente aves, pero puede consumir sangre de cabras y ganado (Greenhall y Schutt Jr., 1996; Peracchi *et al.*, 2006).

El murciélago hematófago *Desmodus rotundus* es de tamaño mediano su longitud va de 75 a 93 milímetros; cuando son jóvenes el dorso es gris pálido o gris negruzco; cuando son adultos, su coloración es café oscuro, café claro o rojizo; el vientre es blanquecino; el pelo corto, denso y suave; el rostro corto y afilado, con la hoja nasal rudimentaria; tienen ojos grandes, orejas pequeñas y puntiagudas; labio inferior escotado en forma de "V"; membrana interfemoral con pelo corto y escaso en el dorso; se caracteriza por presentar el pulgar bien desarrollado con tres cojinetes bien marcados (Greenhall *et al.*, 1983; Velasco-Villa *et al.*, 2002), así como locomoción cuadrúpeda y capacidad para levantar el vuelo desde el suelo (Ceballos y Oliva, 2005); sus alas son largas y anchas; no tiene cola; presenta calcáneo corto; los huesos de la extremidades superiores son fuertes y con bordes y procesos para la fijación de los músculos; caja craneal globosa; incisivos y caninos superiores grandes y con forma de navaja, tiene cuatro incisivos inferiores, pequeños y bilobados, y un diastema en la parte media de la mandíbula (Fig. 1 y 2). El peso promedio de los individuos adultos, inactivos y sin alimento es de 27 a 33 gramos (Romero-Almaraz, *et al.*, 2006).



Fig. 1 *Desmodus rotundus* adulto.
Hidalgo, México.



Fig. 2 *Desmodus rotundus* juvenil,
Hidalgo, México.

Distribución geográfica

Históricamente se ha señalado que la distribución de *Desmodus rotundus* está restringida a las zonas tropicales y cálidas de América. Para México está documentada desde el Norte de Tamaulipas y Sonora, hasta la frontera sur del país, y de allí hasta el norte del territorio argentino y la región central de Chile (Greenhall *et al.*, 1983; Sánchez-Hernández *et al.*, 2002). Sin embargo, el frecuente incremento de la ganadería y la alteración de la vegetación tropical han favorecido su distribución, adaptándose a altitudes y climas que hace algunas décadas eran consideradas como barreras naturales para su especie (Ceballos *et al.*, 2005). En México se ha reportado en altitudes que van desde los 3 msnm, presentes en las costas de Campeche y Yucatán, hasta los 2,420 msnm en la Sierra del Estado de Hidalgo (Jiménez, 2005), llegando hasta los 3680 msnm en países de América del Sur como Perú (Quintana y Pacheco, 2007).

Este quiróptero ocupa una gran variedad de hábitats, como grutas, cuevas, fisuras de rocas y oquedades de troncos y ramas de árboles, así como refugios artificiales como minas, canales de riego, alcantarillas, chimeneas, casas abandonadas, sótanos, tejados, pozos y drenajes, lo que demuestra que son oportunistas muy adaptables que aprovechan los cambios ocasionados por el ser humano en los ambientes naturales. El tamaño de sus colonias varía mucho dependiendo el lugar, tipo, tamaño, características y condiciones del refugio Salmier *et al.*, (2017), estimó un tamaño poblacional que va de 60 a 100 individuos. Se ha observado que *Desmodus Rotundus* es una especie gregaria y de poca actividad migratoria (De Thoisy *et al.*, 2016).

Las colonias se componen por lo común por adultos. En estas colonias los murciélagos forman grupos compactos, donde interactúan con sus congéneres en actividades de acicalamiento individual y social, durante las cuales se limpian y se lamen entre ellos, se auxilian en el cuidado de las crías. Los machos adultos compiten y luchan constantemente para tener acceso a las hembras o a los refugios con hembras. Es frecuente observar machos adultos con las orejas mutiladas, o con heridas y sangre en el rostro y antebrazos que indican que hubo una lucha (Romero-Almaraz, *et al.*, 2006).

Reproducción

Algunos autores han reportado que la reproducción de *Desmodus rotundus* es poliéstrica asincrónica, es decir, que se reproduce todo el año con una proporción sexual de 1:1 es decir, un macho por cada hembra; y que no presenta incrementos estacionales de nacimientos, lactancia o preñez, dado que se han encontrado hembras gestantes, lactantes e inactivas y machos con testículos escrotados, abdominales e inguinales en cualquier periodo del año (Crespo *et al.*, 1961; Alencar *et al.*, 1994; Arellano-Sota. 2004; Bernard, 2005; Quintana y Pacheco, 2007). Sin embargo se ha observado que existe un máximo de reproducción en la estación lluviosa o al inicio de ésta (Carrasco-Rueda, 2011).

Tienen un periodo de gestación de siete meses, con una sola cría por parto (Ceballos, *et al.*, 2005). En la naturaleza el murciélago hematófago puede llegar a vivir más de 17 años (Romero-Almaraz, *et al.*, 2006).

Comportamiento poblacional y alimentación

Los primeros conocimientos ecológicos generados sobre *Desmodus rotundus* están relacionados con su área de forrajeo y el establecimiento de sus colonias. Málaga- Alba (1954) reporta que estos quirópteros pueden viajar en busca de alimento de 15 a 20 km de distancia respecto a su refugio. No obstante se conoce que algunos machos llegan a viajar hasta 100 km en busca de nuevas colonias y hembras (Lord, 1981).

Los murciélagos hematófagos normalmente salen a buscar su alimento en completa oscuridad, la cual depende de las fases de la luna. La mayor actividad la realizan entre la media noche y la 1:00 am, pero pueden buscar presas entre las 20:00 y las 4:00 horas, con un total de 7 a 8 horas de actividad diaria. Además de la búsqueda de alimento, los desplazamientos de estos quirópteros de un área a otra, se deben a la necesidad que tienen los machos jóvenes de formar o integrarse a otras colonias cuando son rechazados y expulsados por los individuos dominantes que gozan de un estatus social bien definido en el refugio (Romero-Almaraz, *et al.*, 2006).

Se alimentan de sangre de diferentes vertebrados, en particular ganado vacuno. Cuando los murciélagos hematófagos van a atacar a su presa se acercan cuidadosamente, caminando sobre sus pulgares y patas traseras, con el cuerpo y la cabeza levantada. En otras ocasiones aterrizan en el lomo de su presa. Para morder escogen áreas muy

vascularizadas, como el dorso del cuello, el borde de las orejas o la parte lateral, el borde de las pezuñas y la base de la cola. Una vez que el murciélago ha elegido el sitio donde va a morder, lo humedece con su saliva en un radio de 10 a 15 milímetros; luego recarga la mandíbula inferior contra la piel de la presa, de modo que se forma un reborde pequeño y muerden con los incisivos de manera rápida. La saliva tiene una sustancia que actúa como anestésico. La herida llega hasta la dermis, razón por la cual emana sangre en abundancia, además de que el vampiro la mantiene fresca pues durante la ingestión de la sangre golpea continuamente la zona de la herida con la lengua e introduce un anticoagulante, la desmoquinasa, que posee en la saliva. La alimentación dura hasta 25 minutos, pero los vampiros lamen la sangre activamente por 13 minutos. En vida libre el murciélago ingiere de 15-20 ml de sangre por día, lo cual representa la mitad de su peso corporal (Romero-Almaraz, et al., 2006). Llegan a formar grupos de caza de dos a seis individuos, comportamiento que puede reflejar la estructura social dentro del refugio (Greenhall, 1983).

Por lo general, se alimentan de la misma presa y de la misma herida durante muchas noches seguidas, inclusive un sólo animal puede ser visitado por varios murciélagos, durante la misma noche (Perachi *et al.*, 2006; Langoni et al., 2008).

Durante los primeros días posteriores al nacimiento de las crías, algunos de los miembros de la colonia alimentan a la madre con sangre que le regurgitan en la boca a fin de que no descuide a la cría al salir a alimentarse. Otro comportamiento semejante es de las hembras que actúan como nodrizas en el cuidado y lactancia de los individuos jóvenes, cuando la madre se encuentra ausente (Sánchez-Hernández, et al., 2002).

En la colonia, cuando un individuo no puede asegurarse de su alimentación diaria, los otros regurgitan la sangre consumida para alimentarlo, esta conducta es altruista es necesaria, pues un murciélago no es capaz de sobrevivir mucho tiempo sin alimento y puede morir después de 48 horas aproximadamente (Quintana y Pacheco, 2007).

El virus de la rabia y su relación con los murciélagos

El virus de la rabia es un lyssavirus compuesto de genoma de ARN, que tienen una polimerasa desprovista de un mecanismo de corrección, por lo cual evolucionan más rápidamente (Drake, Charlesworth y Crow, 1998). Sus vectores pertenecen a los órdenes Carnívora y *Chiroptera*. Badrane y Tordo (2001) realizaron un estudio en donde compararon los genes que codifican para la glicoproteína de membrana de superficie

en 36 *lyssavirus* de carnívoros y 17 de quirópteros. Haciendo una reconstrucción filogenética, encontraron que se produjo un cambio de huésped en la historia de los *lyssavirus* y que estos evolucionaron en los murciélagos mucho antes de la aparición de la rabia en los carnívoros terrestres, determinando su aparición de 888 a 1459 años atrás (Badrane y Tordo, 2001).

Actualmente, la transmisión del virus de la rabia de murciélagos a mamíferos terrestres sigue produciéndose, fenómeno que los epidemiólogos llaman spillover o “derrame” y que puede dar origen a enfermedades emergentes. Cuando el virus gana suficiente adecuación a un nuevo hospedero se presenta el fenómeno “host switching” (cambio de huésped) (Badrane y Tordo, 2001; Kuzmin et al., 2009). Los host switching del virus de la rabia de murciélagos a carnívoros terrestres son importantes para comprender la evolución y emergencia de esta enfermedad, las implicaciones en la Salud Pública, particularmente en áreas donde la rabia terrestre ha sido eliminada (Kuzmin, 2009).

En América Latina y en particular en México, la incidencia de casos de rabia en animales domésticos principalmente en perros y gatos se encuentra en vías de eliminación (OMS, 2020). No obstante, la rabia transmitida por el murciélago hematófago *Desmodus rotundus* a bovinos y especies ganaderas ha tenido un incremento importante y esto es debido a las alteraciones en el medio ambiente natural influenciadas por el cambio climático y la actividad humana, generando desequilibrios ambientales que impactan en la ecología de este quiróptero influenciando su movimiento desde áreas naturales hacia ambientes rurales y urbanos, donde existen asentamientos humanos y presencia de animales domésticos (Constantine, 2003), incrementando la posibilidad de contacto entre el hombre, los animales domésticos y los animales silvestres (Shi, 2010).

La patogenia del virus de la rabia en murciélagos es poco conocida, se sabe que estos animales cuando están infectados, pueden albergar el virus por períodos mayores que otras especies en su saliva y permanecer infectantes antes de presentar signos clínicos, se estima que la probabilidad de que un murciélago hematófago desarrolle la infección letal es del 10%. Son considerados murciélagos sospechosos de estar infectados con el virus rábico, aquellos que sean encontrados durante el día en lugares no habituales y con dificultad de vuelo o signos neurológicos. Todo animal sospechoso debe ser enviado al laboratorio para diagnóstico e identificación. En el caso de *Desmodus rotundus* los principales signos que se presentan son: hábito de comer durante el día, hiperexcitabilidad, agresividad, falta de coordinación, espasmos musculares, parálisis y muerte (Blackwood et. al, 2013).

Aspectos moleculares del virus de la rabia

El virus de la rabia pertenece al orden de los *Mononegavirales*, dentro de este orden se agrupa en la familia *Rhabdoviridae*, y es del género *Lyssavirus*, por microscopía electrónica se define su forma como bala, mide 100-300 nm de longitud por 75 nm de diámetro aproximadamente, tiene una envoltura exterior de 8 nm con espículas de 5 nm que engloban a una ribonucleocápside central de aspecto denso y estructura helicoidal (Tordo y Poch, 1988).

El virus de la rabia tiene 12,000 ribonucleótidos. Está compuesto bioquímicamente por 74% de proteínas, 20% de lípidos, 3% de carbohidratos y 3%, RNA (Albertini, Ruigrok, Blondel, 2011). El genoma del virus está compuesto de ARN helicoidal, de una sola cadena de polaridad negativa, con polimerasa (nucleoproteína) dependiente de ARN y se transcribe en el orden 3´N-P-M-G-L-5´ en un ARN corto y en cinco ARN mensajeros que codifican sucesivamente para 5 proteínas estructurales: una glicoproteína superficial (G), una proteína de la membrana interna o matriz (M), tres proteínas nucleares, ribonucleoproteína (RNP), nucleoproteína (N) y fosfoproteína (P) y una ARN-polimerasa dependiente de ARN (L). Las cinco proteínas son producidas a partir de ARN mensajeros monocistrónicos transcritos de los correspondientes genes estructurales (Fig. 3) (Albertini, Ruigrok, Blondel, 2011).

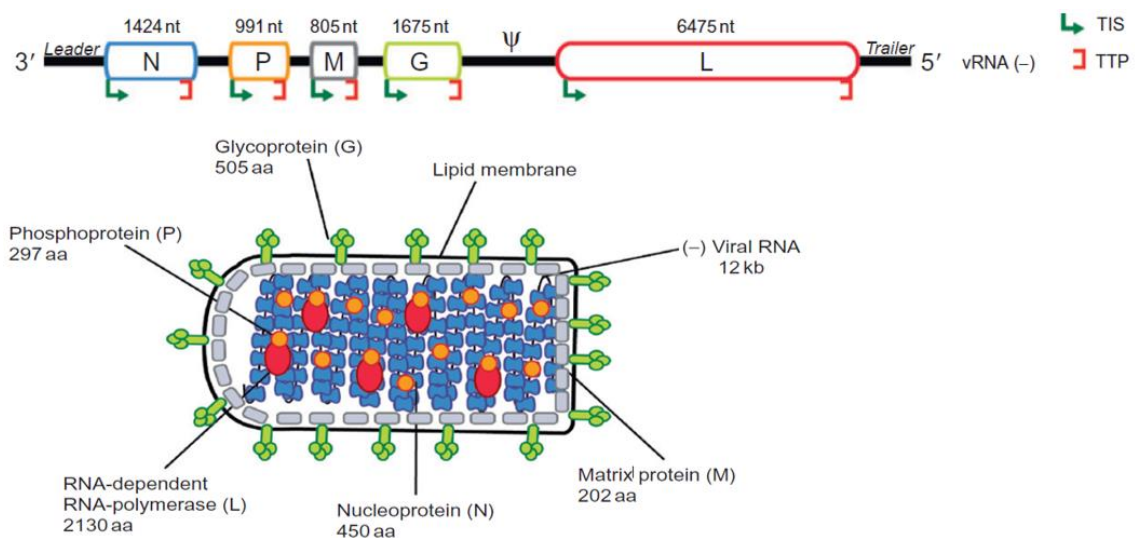


Fig. 3 Organización del virus de la rabia y sus proteínas: N nucleoproteína, P fosfoproteína, M proteína matriz, G glicoproteína y L una ARN-polimerasa dependiente de ARN.

Fuente: Adaptado de Albertini, Ruigrok, Blondel (2011).

Las proteínas N, M y L son similares en estructura y longitud en todos los lyssavirus, mientras que la longitud en las proteínas P y G son variables (Marston *et al.*, 2007).

La proteína N encapsula y protege de la degradación al genoma del virus formando una nucleocápside (o ribonucleoproteína), resistente a las enzimas RNAsas, que sirve de molde tanto para la replicación como para la transcripción. La ribonucleoproteína (N), antes de asociarse al ARN, se asocia a la fosfoproteína (P) la cual la mantiene en una forma soluble. La fosfoproteína (P), junto con la polimerasa (L), constituyen los componentes de las actividades de la polimerasa dependiente, la cual consiste en la transcripción y la replicación. Estas dos actividades se desarrollan por distintos complejos de la polimerasa, el complejo L-(P)₃, en la actividad transcriptasa, o N-P-L en la replicasa. Los complejos de la transcriptasa y la replicasa también se asocian con proteínas celulares, que son necesarias para la actividad. El ensamblaje de la polimerasa viral dentro de los viriones es esencial, ya que el genoma viral, que es ARN negativo, no puede ser usado como ARNm, y las células huésped no tienen las enzimas apropiadas para catalizar la transcripción (Albertini, Ruigrok, Blondel, 2011).

La proteína de la Matriz (M) es la proteína más pequeña actuando como puente de unión entre la parte de las espículas de la glicoproteína (G) que atraviesan la membrana y la nucleocápside. Entre las funciones de la proteína M se encuentran la participación en el ensamblaje del virus y en su salida de la célula, así como la regulación a la baja de la transcripción. Por último, la proteína L dirige la transcripción y replicación del ARN vírico. La tasa de mutación de los genomas de los virus ARN es entre mil y un millón de veces mayor que la de los genomas de los virus ADN, hecho debido en gran medida a que las polimerasas de ARN carecen de los mecanismos intrínsecos de “corrección de pruebas” que poseen las polimerasas de ADN. No obstante, y a pesar del gran potencial de mutación aleatoria, los aislados de virus de la rabia presentan en general altos niveles de conservación, lo cual indica la existencia de fuertes presiones selectivas (Albertini, Ruigrok, Blondel, 2011).

La proteína G es una glicoproteína tipo I, con un dominio extracelular de gran tamaño que forma las espículas triméricas que sobresalen de la membrana y juegan un papel imprescindible en la patogenia, ya que es responsable de la unión del virus en las células huésped y también colabora en el ensamblaje de los viriones; un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. Junto con la proteína M, está implicada en la formación de la envoltura vírica y en la producción de viriones. La proteína G es

también una diana de los linfocitos T y de los anticuerpos neutralizantes del virus (Albertini, Ruigrok, Blondel, 2011).

Ciclo del virus de la Rabia

El ciclo viral se lleva a cabo en el citoplasma de la célula huésped. Lo primero que sucede es la adsorción, proceso por el cual inicia la infección a través de la interacción del virus y de los receptores de la superficie celular tales como, el receptor nicotínico para la acetilcolina (nAChR), el receptor para neurotropina p75 o moléculas de adhesión de células neuronales (NCAM). Posteriormente se origina la penetración, en donde el virus ingresa a la célula a través de la vía endocítica. El ambiente ácido del endosoma induce un cambio en la conformación de la glicoproteína (G) que media la fusión de la envoltura viral con la membrana celular y da como resultado la liberación al citoplasma de la ribonucleoproteína (RNP) a este proceso se le conoce como desnudamiento. Antes de iniciar la replicación del RNA viral ocurre la transcripción del genoma. La glicoproteína (G) se sintetiza sobre los ribosomas adosados al retículo endoplásmico, luego es transportada hacia el aparato de Golgi donde es modificada. La glicoproteína madura es transportada por vesículas hacia la membrana plasmática de la célula huésped, con la que se fusiona. Por otro lado, se sintetizan las proteínas de la matriz (M) y de la nucleocápside (N), se ensamblan y se asocian con la membrana plasmática que contiene las glicoproteínas transmembranales. Finalmente, la membrana plasmática se pliega alrededor de la nucleocápside y los viriones son liberados por gemación (Fig. 4).

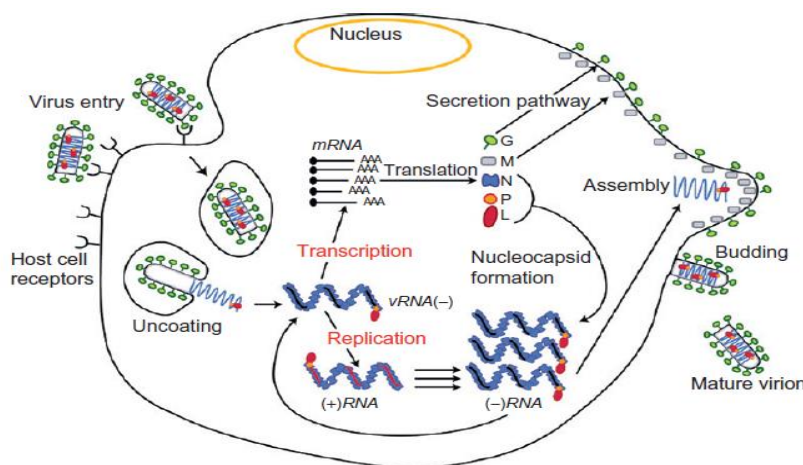


Fig. 4 Ciclo del virus de la rabia. Se pueden observar varias fases: unión al receptor, endocitosis seguida de fusión de membrana y liberación de nucleocápsides, luego transcripción, replicación y finalmente ensamblaje de virus y progenie de gemación virión.

Fuente: Adaptado de Albertini, Ruigrok, Blondel (2011).

Actualmente se ha demostrado que la transcripción y la replicación del virus de la rabia tienen lugar dentro de los corpúsculos de Negri, que son cuerpos de inclusión formados durante la infección viral (Albertini, Ruigrok, Blondel, 2011).

Patogenia del virus de la rabia

La severidad, localización y cantidad de mordeduras influye en la transmisión del virus de la rabia, habiéndose asociado las mordeduras en la cabeza o en el cuello con los periodos de incubación más cortos y las tasas de mortalidad más altas (Rupprecht *et al*, 2002). El éxito de la transmisión depende de la cantidad de virus inoculado, la ruta de administración y la susceptibilidad del hospedador (Nel y Markotter, 2007).

Los mecanismos de patogenicidad del virus de la rabia son el neurotropismo, la neuroinvasividad y el deterioro de las funciones neuronales (Dietzschold *et al*, 2005).

Una vez inoculado el virus, se une a los receptores celulares, posteriormente infecta las neuronas a través de las placas motoras o fibras sensoriales y se propaga hasta alcanzar el sistema nervioso central (SNC), donde comenzará su rápida replicación. Es entonces cuando comienzan los efectos patológicos y se manifiestan los signos clínicos. Posteriormente, el virus es transportado desde el SNC a través de los nervios periféricos, hacia múltiples localizaciones, entre las que se destacan a las glándulas salivales por su importancia en la transmisión. Con la diseminación del virus a través de la saliva se completaría su ciclo de infección. El periodo de incubación varía entre 25 y 150 días, periodo en que los animales infectados desarrollan e intensifican síntomas como temblores musculares, salivación excesiva y espasmos causadas por las alteraciones en el SNC, que puede desencadenar la parálisis final del sistema respiratorio y la muerte (Turmelle, Jackson, Green, McCracken, Rupprecht, 2010).

Clasificación y aspectos epidemiológicos del virus de la rabia

El género *Lyssavirus* está conformado por varias especies, entre los criterios usados para efectuar dicha subdivisión se consideran los siguientes: la distancia genética, el perfil antigénico, la distribución geográfica y el espectro de hospederos. Todos los miembros de este grupo causan encefalitis fatales en humanos y en una amplia variedad de mamíferos, siendo imposible hacer una diferenciación clínica entre ellas (Wunner, 2007).

El género *lyssavirus* se clasifica en siete genotipos (Tabla 2). El genotipo 1 corresponde al virus de la rabia clásica que incluye a las cepas de referencia de laboratorio, a las

cepas vacunales, así como a los virus aislados de animales rabiosos silvestres o domésticos a través de todo el mundo (ICTV, 2019).

Tabla 2. Clasificación y distribución de los lyssavirus

Nombre	Genotipo	Virus Abbrev.	Distribución geográfica	Reservorios
Lyssavirus Rabia clásica	1	RABV	Cosmopolita; excepto en Australia, Gran Bretaña, Inglaterra, Irlanda, Nueva Zelanda, Japón, Antártida, Escandinavia, Hawai.	Carnívoros (todo el mundo) Murciélagos (América)
Lagos-bat-virus	2	LBV	Nigeria, Senegal, Zimbabwe, Rep. Centroafricana, Sudáfrica.	Murciélagos frugívoros (Megachiroptera)
Mokola-virus	3	MOKV	Nigeria, Camerún, Zimbabwe, República Centroafricana.	Gatos, perros, musarañas, roedores.
		Obodhiang (OBD)	Sudán	Equinos, bovinos y mosquitos <i>Mansonia uniformis</i>
		Kotonkan (KOT)	Nigeria	Mosquitos del género <i>Culicoides</i> spp.
Duvenhage virus	4	DUVV	Sudáfrica, Zimbabwe.	Murciélagos insectívoros.
European bat lyssavirus	1 5	EBLV-1	Francia, Polonia, Dinamarca, Alemania	Murciélagos insectívoros: <i>Eptesicus</i> y <i>Pipistrellus</i> .
European bat lyssavirus	2 6	EBLV-2	Francia, España, Alemania, Dinamarca,	Murciélagos insectívoros <i>Myotis</i> sp.
Australian lyssavirus	bat 7	ABLV	Australia	Murciélagos <i>Pteropus</i> spp. y <i>Saccolaimus flaviventris</i> .
Aravan virus		ARAV	Asia central	Murciélagos insectívoros
Khujand virus		KHUV	Este de Siberia	Murciélagos insectívoros
Bokeloh lyssavirus	bat	BBLV	Alemania	<i>Myotis nattereri</i>
Gannoruwa lyssavirus	bat	GBLV	Sri Lanka	Indian flying fox (<i>pteropus medius</i>)
Irkut lyssavirus		IRKV		
Khujand lyssavirus		KHUV	Tajikistan	<i>Myotis mystacinus</i>
Ikoma lyssavirus	3	IKOV	Tanzania	<i>Civeta africana</i>
Lleida bat lyssavirus		LLEBV	Lleida, España	Murciélago insectívoro (<i>Miniopterus schreibersii</i>)
Shimoni lyssavirus	bat	SHIBV	Kenya	Murciélago de nariz de hoja de <i>Commerson</i>
Taiwan lyssavirus	bat	TWBLV	Taiwan	
West Caucasian bat virus		WCBV	Región Caucásica	Murciélagos insectívoros

Fuente: Adaptada y/o modificada de International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). *Genus: Lyssavirus*. Berlin, Germany.: Microbiology society. Recuperada de https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/mononegavirales/w/rhabdoviridae/795/genus-lyssavirus

El genotipo I está ampliamente distribuido en el mundo y es de mayor importancia epidemiológica ya que se ha demostrado que existen varios reservorios para este genotipo, cuyas variantes (AgV) permanecen en la naturaleza en ciclos independientes (Wilkerson, 1995).

Todos los mamíferos son susceptibles al virus de la rabia y se pueden dividir en dos categorías: la primera corresponde a los reservorios o animales que mantienen el virus y lo diseminan de manera eficaz, estos animales son principalmente del orden Carnívora

como perros, zorros, zorrillos, mapaches, lobos, coyotes, entre otros y del orden *Chiroptera* al que pertenecen los murciélagos. La segunda corresponde a los animales que si bien pueden padecer la enfermedad, no la diseminan de manera tan eficaz como lo hacen los reservorios, estos animales son en su mayoría herbívoros como bovinos, equinos, ovinos, caprinos, entre otros y el hombre, especies consideradas como huéspedes accidentales, o fondos de saco epidemiológico, pues una vez que el virus llega a ellos resulta más difícil que se propague a otros animales susceptibles (Wilkerson, 1995).

El virus de la rabia es mantenido en dos ciclos epidemiológicos, cada uno con diferentes reservorios: el ciclo urbano donde existe participación, principalmente, de perros, gatos y otros animales que viven en contacto directo con el hombre y el ciclo silvestre que se concentra principalmente en reservorios terrestres (zorros, zorrillos, mapaches, entre otros) y un reservorio aéreo (los murciélagos) (Blackwood et al., 2013; Bárcenas-Reyes et al., 2015). También en el ciclo urbano puede existir relación con el ciclo silvestre, ya que ha sido posible el aislamiento de variantes del virus correspondientes a animales silvestres en el ser humano y animales domésticos infectados (Kotait et al., 2007; Páez Núñez, García, Boshell, 2003; Guarino, et al., 2013; CENAPRECE, 2020).

Algunos autores mencionan el ciclo rural, que involucra la participación de animales silvestres, especialmente el ciclo aéreo en donde el murciélago hematófago *Desmodus rotundus* transmite el virus de la rabia a los bovinos y especies ganaderas (Bárcenas, et al., 2015). Este ciclo presenta un gran impacto económico y de Salud Pública (Acha y Málaga-Alba, 1988; Hanlon et al., 2007; OIE, 2020).

En México se han aislado 9 de las 11 variantes del genotipo 1, estas variantes son: AgV1 la cual corresponde al perro (*Canis lupus familiaris*), AgV3, AgV5 y AgV11 propias del murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*), AgV4 y AgV9 del murciélago insectívoro (*Tadarida brasiliensis*), AgV7 del zorro de Arizona, AgV8 y AgV10 de zorrillo (Díaz et al., 1994).

Ko-Villa et al. (2006) usando un panel de ocho anticuerpos monoclonales desarrollados para la caracterización del virus de la rabia de muchas partes de América Latina, identificaron una cantidad de antígenos variantes (Ag) que circulan en México. Estos son AgV3 y AgV11 (murciélago hematófago). La variante antigénica AgV3 y AgV11 mostraron una superposición en la distribución a lo largo de la costa este de México. La variante AgV11 tiene una distribución continua sobre las regiones tropicales y

subtropicales a lo largo del Golfo de México, así como también en los estados de Chiapas y Oaxaca dentro de las llanuras del Istmo de Tehuantepec, mientras que la variante AgV3 se encontró desde Tamaulipas hasta Yucatán en toda la región adyacente al Golfo de México y el Caribe Mexicano (Velasco-Villa, *et al.*, 2006).

Diagnóstico del virus de la rabia

La rabia es una importante zoonosis para la cual las técnicas de diagnóstico se han tenido que estandarizar internacionalmente (OIE, 2020). En México, el Programa Nacional de Zoonosis del Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE), la Dirección General de Epidemiología (DGE) y el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE) mantienen la vigilancia epidemiológica de la rabia a través de la implementación de diferentes estrategias, las más utilizadas son: la técnica de Inmunofluorescencia Directa (IFD), la caracterización antigénica, la prueba biológica, el aislamiento viral en cultivo celular, la RT-PCR y secuenciamiento nucleotídico (Meslin, Kaplan y Koprowsky, 1996).

Técnica de Inmunofluorescencia directa

La inmunofluorescencia directa (IFD) es la técnica de oro utilizada para el diagnóstico del virus de la rabia en todo el país. Su principio se basa en la detección por medio de inmunofluorescencia directa epítomos de la proteína N del virus de la rabia a través de interacciones inmunoenzimáticas mediante la mezcla de anticuerpos monoclonales y la fluoresceína. La identificación del agente se realiza en una impronta de tejido del sistema nervioso central (SNC), incluyendo asta de Amón, el cerebelo y la médula oblonga (Meslin, Kaplan y Koprowsky, 1996).

Caracterización antigénica

Mediante la utilización de anticuerpos monoclonales (AcMo) dirigidos contra diferentes epítomos de la proteína N del virus de la rabia y un anticuerpo (anti IgG) de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se determina el reservorio responsable de la transmisión de la enfermedad. Los AcMo son moléculas producidas por híbridos producto de la fusión de un mieloma y un esplenocito hiperinmune. Cuando estos AcMo se emplearon para analizar su reactividad contra los virus aislados de diferentes reservorios, se encontró que algunos reconocían todas las cepas virales, pero

otros poseían una reactividad específica para un solo tipo de reservorio. De esta manera al utilizar un grupo o panel de anticuerpos se pueden determinar patrones antigénicos, los cuales son específicos dependiendo de la especie animal (reservorio) de la cual se ha aislado el virus. Esto se pudo determinar gracias al estudio de un gran número de cepas virales, aisladas de diferentes especies de animales en todo el continente Americano. Esta técnica se utiliza exclusivamente para investigaciones epidemiológicas, actualmente se usa para confirmar la fuente de infección en cualquier caso de rabia (Meslin, Kaplan y Koprowsky, 1996).

Extracción y purificación del RNA

Se lleva a cabo mediante la utilización de agentes caotrópicos que permiten la eliminación de material orgánico, así como también de las diferentes cápsides que conforman al virus de la rabia, dejando libre al RNA el cual puede ser solubilizado en agua grado PCR, quedando listo para su posterior utilización en las diferentes técnicas de biología molecular (Meslin, Kaplan y Koprowsky, 1996).

Técnica de Retro-transcripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Es una variante de PCR que nos permite amplificar un fragmento de la proteína N del virus de la rabia y se lleva a cabo en dos etapas. En la primera etapa ocurre la transcripción inversa utilizando la enzima transcriptasa reversa con el fin de obtener cADN complementario (cADN), el cual es utilizado para llevar a cabo la siguiente etapa. La segunda etapa se lleva a cabo con la enzima Taq polimerasa para obtener DNA de doble cadena y consta de tres ciclos:

a) Desnaturalización: en la cual la muestra se somete a una temperatura de ebullición de 94°C, es aquí donde la doble cadena de DNA se separa.

b) Alineación: donde al bajar la temperatura a 55°C se incorporan los iniciadores y se alinean a los extremos 5´ y 3´ terminal del fragmento que se desea amplificar.

c) Extensión: se lleva a cabo a 72°C, temperatura óptima en la que la Taq polimerasa junto con el cofactor catiónico MgCl₂ incorpora los desoxinucleótidos (dTTP, dGTP, dATP, dCTP) para formar la nueva cadena (Meslin, Kaplan y Koprowsky, 1996).

Prevención y control de la rabia transmitida por el murciélago hematófago en México

En México la prevención y el control de la rabia transmitida por el murciélago hematófago *Desmodus rotundus* se realiza bajo el seguimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-067-ZOO-2017, Campaña Nacional para la prevención y control de la rabia en bovinos y especies ganaderas. Las vertientes estratégicas de esta campaña se basan en el diagnóstico de la enfermedad, la capacitación del personal operativo y de los productores, la vacunación antirrábica del ganado y el control de las poblaciones del murciélago hematófago (SAGARPA, 2014).

La vacunación antirrábica en bovinos y especies ganaderas, es obligatoria en áreas endémicas del territorio mexicano. En aquellos lugares donde se presentan casos clínicos de la enfermedad confirmados por laboratorio, se realizan acciones de manera focal y perifocal en un radio mínimo de 10 kilómetros del foco inicial. El esquema de vacunación antirrábica en el ganado mayor de un año de edad se realiza de manera anual y en el ganado menor de un año, se le pone la primera vacuna al primer mes edad con los siguientes refuerzos a los tres y a los seis meses respectivamente. Además se realiza el control de las poblaciones del murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*), mediante el diseño de estrategias y un programa de acciones, considerando e indicando la dimensión del área, las barreras naturales, la población bovina y especies ganaderas, la incidencia de mordeduras. Una vez que se realiza la identificación taxonómica de los murciélagos hematófagos capturados, en corral o refugio por personal capacitado, se realiza el tratamiento tópico con pomada vampiricida a base de anticoagulantes orales (SAGARPA, 2014).

La región Otomí-Tepehua

La región Otomí-Tepehua se encuentra localizada geográficamente al oriente del Estado de Hidalgo, situada entre los meridianos 20° 28' latitud norte y 98° 21' longitud oeste. Se encuentra integrada por seis municipios: Acaxochitlán, Agua Blanca de Iturbide, Huehuetla, Metepec, San Bartolo Tutotepec y Tenango de Doria.

Cabe desatacar a los municipios de Tenango de Doria, San Bartolo Tutotepec y Huehuetla por su relevancia en este trabajo. Estos municipios se encuentran ubicados a una altura sobre el nivel del mar (msnm) que va de los 100 a los 2,800 msnm respectivamente (INEGI, 2009).

En cuanto a su población el 33% pertenece a grupos indígenas, entre los que destacan otomíes y tepehuas. Más del 80% de la población vive en condiciones de alta a muy alta marginación con déficits de infraestructura, agua potable, drenaje, electrificación, vías de comunicación, educación y salud. Aproximadamente el 80% de la población se dedica a actividades primarias por lo que su economía es fundamentalmente agropecuaria (Vargas, 2011).

Tenango de Doria

El municipio se encuentra ubicado entre los paralelos 20° 15´ y 20° 25´ de latitud norte; los meridianos 98° 05´ y 98° 20´ de longitud oeste; tiene una altitud que va de los 700 a los 2,800 msnm. Colinda al norte con los municipios de San Bartolo Tutotepec y Huehuetla; cuenta con 57 localidades y una población total de 18,766 habitantes (INEGI, 2015). Se localiza dentro de la Sierra Madre Oriental, formado por sierra en un 70% y localizado también en el eje neovolcánico, conformado por lomeríos y constituido por pendientes mayores al 15%. De las principales elevaciones presentes en el municipio, se encuentran los cerros del Estribo, Brujo, Debosda, el Crío, Macho y la Cuchila todos ellos por encima de los 1000 msnm (INEGI, 2009).

Presenta una diversidad de climas como templado húmedo con lluvias todo el año en un 47%, templado húmedo con abundantes lluvias en verano en un 31%, semicálido húmedo con lluvias todo el año en un 13% y semifrío húmedo con abundantes lluvias en verano en un 9%. La temperatura se mantiene en un rango que va 10- 20°C, con una precipitación pluvial de 100- 2,600 milímetros anuales (INEGI, 2009).

San Bartolo Tutotepec

El municipio se encuentra ubicado entre los paralelos 20° 19´ y 20° 37 de latitud norte; los meridianos 98° 02´ y 98° 21 de longitud oeste; tiene una altitud que va de los 300 a los 2,600 msnm. Colinda al norte con el estado de Veracruz y el municipio de Huehuetla; al este con el municipio de Huehuetla; al sur con los municipios de Huehuetla, Tenango de Doria. Cuenta con 140 localidades y una población total de 17, 837 habitantes (INEGI, 2009). El municipio de San Bartolo Tutotepec tiene una superficie abrupta, ya que está en la Sierra Madre Oriental, además de acantilados, grutas, mesetas y una planicie de valles (INEGI, 2009).

Presenta diferentes climas que va de semicálido húmedo con lluvias todo el año en un 60%, templado húmedo con lluvias todo el año en un 32%, templado húmedo con abundantes lluvias en un 7% y semifrío húmedo con abundantes lluvias en verano en

1%. Tiene un rango en la temperatura que va de los 10°C a los 24°C; su precipitación pluvial va de 100-2,600 milímetros anuales con un periodo de lluvias de junio a octubre. En el municipio se encuentran los ríos: Beltran, Borbollón, río Xuchitlan, Pactepec y Tenango (INEGI, 2009).

Huehuetla

El municipio de Huehuetla está ubicado en el corazón de la Sierra Hidalguense entre los paralelos 20° 23' y 20° 41' de latitud norte, los meridianos 97° 59' y 98° 11' de longitud oeste, altitud entre 100 y 1,700 msnm, forma parte de Sierra Madre Oriental, que comprende la franja desde la Sierra de Puebla y forma parte de la Sierra de Tenango. Huehuetla está encumbrado en una cañada donde se observan formaciones rocosas y abundante vegetación, con grandes extensiones montañosas. Dentro del relieve de mayor altura están los cerros de Nanjuai y Ocotlal con una altura de 1600 msnm, el cerro de Chamisal de 1330 msnm, el cerro de Chapingo y el de La luna de 1100 msnm. A medida que se avanza hacia San Lorenzo Achiotepec va disminuyendo la altura, así tenemos que la Esperanza 2 y Juntas Chicas alcanzan una altura de 300 msnm. Cuenta con 71 localidades y una población total de 22, 927 habitantes (INEGI, 2009).

La variación climática del municipio va de semicálido húmedo con lluvias todo el año en un 78%, cálido húmedo con lluvias todo el año en un 19 % y templado húmedo con lluvias todo el año en un 3%. Se registra un rango en la temperatura que va de 16-26°C con una precipitación pluvial que va de 1,900-2,600 milímetros (INEGI, 2009).

Los principales ríos que cruzan al municipio son cuatro: río Chiflón, que sirve de límite entre el estado de Veracruz y el municipio, el río Pantepec que pasa por la cabecera municipal, el río Blanco que sirve de límite entre el municipio y el estado de Puebla y el río Beltran, que pasa por la localidad que lleva el mismo nombre (INEGI, 2009).

JUSTIFICACIÓN

Pese a los adelantos logrados en cuanto al método científico y herramientas de control, la rabia sigue constituyendo una amenaza latente para las poblaciones humanas y animales. Actualmente México se encuentra libre de rabia humana transmitida por caninos domésticos (OPS, 2020), sin embargo en los últimos años la rabia humana transmitida por el murciélago hematófago *Desmodus rotundus* ha cobrado mayor importancia epidemiológica (OMS, 2020).

De acuerdo con el Centro Nacional de Programas Preventivos del 2010 al 2016 se registraron 10 casos de rabia humana en el país transmitida por animales silvestres, de los cuales 9 casos fueron por *Desmodus rotundus* (CENAPRECE, 2020). Así mismo el Sistema de Sanidad, Calidad e Inocuidad Agroalimentaria registró de Enero a Diciembre del 2019, 309 casos de rabia transmitida por *Desmodus rotundus* a bovinos y especies ganaderas (SENASICA, 2020), representando un serio problema de impacto en la salud pública, ya que estos casos pueden generar contactos entre los animales domésticos infectados y las personas. Cabe mencionar que en el 2009 se registró un caso de rabia humana por transmisión secundaria al manipular el hocico y tener contacto directo con la saliva de un bovino infectado por este reservorio (CENAPRECE, 2020).

Los estudios de epidemiología molecular son herramientas útiles para la vigilancia epidemiológica de enfermedades virales, ya que se pueden estudiar los patrones de comportamiento del virus dentro de la región así como la identificación de sus reservorios y con ello evaluar el impacto de los programas de prevención y control de la enfermedad. La organización de campañas para la prevención y control de la rabia requiere de la correcta identificación del virus que circula en la región y de las especies involucradas así como de los movimientos interespecíficos e intraespecíficos del virus para determinar las medidas sanitarias apropiadas para su control (Aréchiga-Ceballos, 2010).

El presente trabajo pretende determinar la epidemiología molecular del virus de la rabia en murciélagos hematófagos de zonas endémicas de la región Otomí-Tepehua, Hidalgo, donde se han identificado nichos con la presencia del murciélago hematófago, se ha notificado agresión (mordeduras) en bovinos y especies ganaderas y existe una inquietud social que demanda el control de la población de este reservorio en la región. Hasta la fecha no existen estudios sobre epidemiología molecular del virus de la rabia en murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) de esta región, por lo que resulta

relevante el presente estudio a fin de realizar una actualización de la distribución geográfica de la enfermedad, para predecir áreas potenciales en riesgo de infección humana, así como continuar en coordinación con el personal de salud animal, buscando introducir estrategias que permitan limitar la propagación del virus de la rabia entre los animales silvestres y los animales domésticos, salvaguardando así la salud de la población ya que se han detectado casos de rabia humana transmitida de manera directa por el murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*) y casos de transmisión secundaria a través de la manipulación y contacto directo con animales domésticos infectados por este reservorio.

HIPOTESIS

La prevalencia del virus de la rabia es mayor en murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) machos juveniles, comparada con el grupo de los machos adultos y de las hembras juveniles y adultas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la epidemiología molecular del virus rábico en murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) de zonas endémicas en la región Otomí-Tepehua, Hidalgo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir la prevalencia del virus de la rabia en *Desmodus rotundus* por sexo y edad relativa.
- Determinar la asociación del sexo y la edad relativa con la positividad al virus de la rabia.
- Realizar un modelo de regresión logística para establecer la relación estadística que existe entre la VD y las VI.

MATERIALES Y METODOS

Aspectos éticos

Antes de comenzar con la realización de este trabajo de investigación, se requirió cumplir con un esquema de vacunación antirrábica pre-exposición completo de acuerdo con la NOM-011-SSA2-2011 Para la prevención y control de rabia, el cual fue proporcionado por la Secretaria de Salud en el municipio de Tulancingo perteneciente al Estado de Hidalgo. Posteriormente se realizó un prueba serológica de titulación de anticuerpos en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) "Doctor Manuel Martínez Báez", obteniendo un resultado de 1.5 UI/ml (valores \geq de 0.5 UI/ml de acuerdo con la OMS).

La recolección de los murciélagos hematófagos del género *Desmodus rotundus* se realizó con la supervisión, equipo, coordinación y el acompañamiento del personal capacitado que labora dentro la Campaña Nacional para la Prevención y Control de la Rabia en bovinos y especies ganaderas (NOM-067-ZOO-2007) del Comité Estatal de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Hidalgo (C.E.F.P.P.E.H). Los murciélagos fueron sacrificados de forma humanitaria de acuerdo con la NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres.

Todas las técnicas para el diagnóstico del virus de la rabia utilizadas para este trabajo de investigación, se llevaron de acuerdo con los estándares de procedimientos de bioseguridad del reglamento de la Ley general de salud en materia de investigación para la salud en su título cuarto de la Bioseguridad de las Investigaciones, Capítulo I De la Investigación con Microorganismos Patógenos o Material Biológico que pueda contenerlos en su art 78 y 79 grupo de riesgo III (riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo), art 81 y 83, así como el seguimiento de las recomendaciones emitidas por el manual de bioseguridad en el laboratorio de la Organización Mundial de la Salud, atendiendo el nivel II de bioseguridad, laboratorio para diagnóstico e investigación, con buenas prácticas de laboratorio, equipo de protección personal y señales de riesgo biológico, uso de gabinete de bioseguridad clase II tipo A/B2 para diagnóstico (Ginebra, 2005).

Material biológico

Para la realización y validación de este trabajo de investigación se utilizó un control positivo al virus de la rabia a partir de una muestra de encéfalo de bovino determinado por la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD) con número de identificación 78, el cual fue validado por el InDRE y donado por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Tamaulipas (LESPT).

Determinación del tamaño de la muestra

Se realizó un estudio epidemiológico descriptivo, de corte transversal y analítico. Se llevó a cabo un muestreo no probabilístico por conveniencia. El tamaño de la muestra se determinó de acuerdo con Salmier *et al.*, (2017) partiendo de 100 individuos como población total (N) obteniendo una $n= 80$ especímenes con un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$ y $Z=1.96$).

$$n = \frac{N}{1 + \frac{e^2(N-1)}{Z^2 pq}} \qquad n = \frac{100}{1 + \frac{(0.05)^2(100-1)}{(1.96)^2 (0.25)}} = 80$$

Criterios de inclusión: Murciélagos hematófagos del género *Desmodus rotundus* machos y hembras, cualquier edad que se capturen en el área de estudio.

Criterios de exclusión: Murciélagos de otro género.

Criterios de eliminación: Murciélagos del género *Desmodus rotundus* sexo hembra y macho cualquier edad que no se les pueda extraer tejido encefálico.

Captura de murciélagos

El periodo de recolección se realizó del 05 de abril del 2019 al 30 de enero del 2020 en potreros y refugios situados en algunas localidades de los municipios de Tenango de Doria, San Bartolo Tutotepec y Huehuetla pertenecientes al Estado de Hidalgo, lugares que se georreferenciaron a través de un equipo satelital eTrex® 20 y se registraron en una base de datos. Por medio de un muestreo por conveniencia, se seleccionaron 3 cuevas habitadas por el murciélago hematófago *Desmodus rotundus* y 8 potreros donde se notificó y se observó la presencia de agresión (mordeduras en dorso, cuello, extremidades, entre otras) por este reservorio en el ganado. Se programaron los días de captura con base en el calendario lunar, tomando los días de mayor oscuridad como óptimos para la realización de la colecta; se colocaron redes de niebla de 3, 6 y 12

metros alrededor de los potreros, las cuales se revisaron cada 20 minutos a partir de las horas con menos luz para recoger a los especímenes una vez clasificados taxonómicamente conforme a las claves establecidas por el personal capacitado del C.E.F.P.P.E.H (Fig.5). En las cuevas, la captura se realizó en el día (Fig. 6).



Fig. 6. Potrero "La periguera", Huehuetla, Hgo.



Fig. 5 Cueva "Zopilote", San Bartolo Tutotepec, Hgo.

En total se realizaron 11 capturas dentro de la región, colectando un total de 80 especímenes en todo el periodo, los cuales se trasladaron al laboratorio de patología del Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. En donde se realizó el sacrificio, necropsia y toma de muestras de encéfalo. Así mismo, las muestras se clasificaron y registraron en una base de datos de acuerdo a su sexo (macho y hembra), edad relativa (juvenil y adulto) y ubicación geográfica.

Determinación del sexo y de la edad relativa de los murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*)

El sexo de los especímenes se determinó mediante la observación directa de sus aparatos reproductores, en el caso de las hembras se observó vulva y en los machos testículos y pene. Los murciélagos juveniles se distinguieron de los murciélagos adultos por la falta de osificación en la articulación epifisaria entre los huesos metacarpiano y de la falange proximal, demostrada tras la transiluminación del ala (Núñez y Viana, 1997) así como la posición de los testículos en los machos (inguinal e intraabdominal).

Necropsia y toma de muestras

Los ejemplares fueron sacrificados humanitariamente. Se anestesiaron con 0.03 ml de ketamina/xilacina (1:1) con jeringa hipodérmica de 1 ml vía subcutánea, posteriormente fueron sangrados en blanco vía intracardiaca con una jeringa de 3 ml. Inmediatamente después del sacrificio, se realizó la necropsia y extracción del encéfalo el cual se resguardó a -80°C para la identificación del virus de la rabia mediante las técnicas de RT-PCR y PCR anidada.

Diagnóstico del virus de la Rabia a través de pruebas moleculares

El diagnóstico se realizó en el laboratorio de Aislamiento BSL2 de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia “Dr. Norberto Treviño Zapata” de la Universidad Autónoma de Tamaulipas. En donde se realizaron las pruebas moleculares de Retro-transcripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) y PCR anidada.

Purificación de ARN

Para la purificación del ARN en un solo paso se utilizó el reactivo RNAget (BioTecMol, cat.RP-200-RNAget). Inicialmente se colocaron 200 mg de tejido encefálico en un tubo eppendorf de 2 ml al cual se le agregó 1 ml de RNAget y se mezcló vigorosamente en un vortex por 15 segundos dejándolo incubar a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se le adicionaron 0.2 ml de cloroformo (SIGMA, cat. 288306-1) y se agitó vigorosamente en un vortex por 15 segundos dejándolo incubar a temperatura ambiente por 3 min. Luego se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4°C. Posteriormente se recuperó la fase acuosa en un tubo eppendorf de 1.5 ml. A continuación, a la muestra se adicionaron 500 µl de alcohol isopropílico absoluto (bioWORLD, cat. 40970004-1) el cual se homogenizó por inversión y se dejó incubar por 10 min, después se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C. El ARN se identificó mediante la observación directa de una pastilla en el fondo del tubo. El sobrenadante se decantó y se le adicionó a la pastilla de ARN 1 ml de etanol al 75% en agua dietil pirocarbonato (DEPC) (ambion, cat. 9935) para mezclarlo vigorosamente en un vortex. Una vez mezclado se centrifugó a 10,500 g por 10 min a 4°C. Luego se eliminó el sobrenadante por decantación dejando secar la pastilla a temperatura ambiente por 10 min y posteriormente se resuspendió el ARN en 25 µl de agua DEPC y se conservó a -80°C hasta su utilización (Fig. 7).

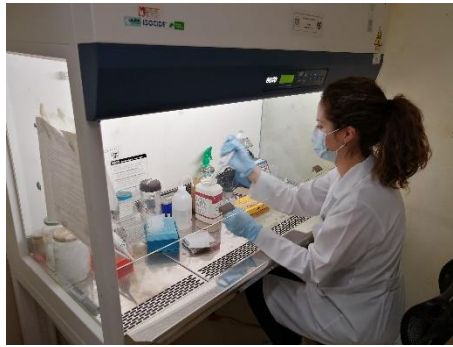


Fig. 7 Extracción de ARN en muestras de tejido encefálico de murciélagos (*D. rotundus*).

Evaluación del ARN

La concentración y pureza del ARN de las muestras de tejido encefálico obtenido en el proceso de extracción se determinó mediante espectrofotometría Genova nano (JENWAY, cat. 737501) a una longitud de onda entre 260/280 nanómetros. El valor de pureza se determinó mediante la media de 2 lecturas por cada muestra (Fig. 8 A y B).



Fig. 8 A. Evaluación de la concentración y pureza de ARN. B. Lectura de la concentración y pureza de ARN.

Identificación del virus de la Rabia por RT-PCR

La retro-transcripción (RT-PCR) es una variante de la PCR y su principal uso está relacionado en el diagnóstico molecular de genes de virus ARN. Su principio se basa en la retro-transcripción de una hebra de ARN en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa o transcriptasa reversa y el resultado se amplifica mediante una PCR tradicional (Meslin, Kaplan y Koprowsky, 1996).

Para esta prueba molecular se utilizó el Super Mix RT-PCR 2X (BioTecMol, cat. RT-PCR-TR-100) que consiste en una mezcla calibrada, para llevar a cabo en un solo paso,

la retro-transcripción (RT) y amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la secuencia del iniciador sentido JW12 (ATGTAACACCYCTACAATTG) y el iniciador antisentido JW6 (CARTTVGCRCACATYTTTRTG) que codifica para el gen de la proteína N del virus de la rabia obteniendo un producto final de 606 pb (Heaton et al., 1997).

Para la retro-transcripción (RT) se realizó una primera mezcla de reacción en cada tubo eppendorf de 0.2 ml al cual se le agregaron 2 µl del iniciador antisentido JW6, 1 µl de DNTP's (10mM) (Invitrogen, cat.10297018), 3 µl de agua (DEPC) (ambion, cat. 9935) y 3 µl de ARN, obteniendo un volumen final de 9 µl en cada tubo, los cuales se colocaron en un termociclador (BIO-RAD, cat. 1709701EDU) a 65°C durante 5 minutos. Posteriormente se preparó una segunda mezcla de reacción en la cual se agregaron 10 µl del Buffer Super Mix RT-PCR 2X (BioTecMol, cat. RT-PCR-TR-100), 1 µl de DNTP's (10 mM) (Invitrogen, cat. 10297018), 2.5 µl del iniciador sentido JW12, 2.5 µl del iniciador antisentido JW6 y 30 µl de agua (DEPC) obteniendo un volumen final de 45 µl, el cual se agregó a cada tubo correspondiente de la primera mezcla. La programación del termociclador para RT-PCR del virus de la rabia correspondió a los siguientes ciclos (Tabla 3):

Tabla 3. Programación del termociclador para la identificación del virus de la rabia por RT-PCR

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Retro-transcripción	65°C	5 minutos	1
	42°C	40 minutos	1
Desnaturalización inicial	94°C	10 minutos	1
Desnaturalización	94°C	30 segundos	35
Alineación	55°C	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

Fuente: Breslauer, Frank, Blocker, Marky, (1986).

Identificación del virus de la rabia por PCR Anidada

La PCR anidada es una variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de iniciadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección. Primero se realiza una reacción con los iniciadores externos para amplificar una región del ADN más extensa, que contiene el segmento diana. Después, este producto de amplificación se utiliza como molde para

una segunda PCR con los iniciadores internos para amplificar la región específica, obteniendo un producto final de 586 pb (Pichart *et al.*, 2004).

En la PCR anidada se preparó una mezcla de reacción por cada tubo eppendorf de 0.2 ml, al cual se le adicionó 2 µl de ADN complementario (ADNc) obtenido en la RT-PCR, de igual forma se le adicionaron 5 µl de buffer 10X (BioTecMol), 1 µl de DNTP's (Invitrogen, cat. 10297018). Los iniciadores utilizados correspondieron a 2 µl del iniciador sentido JW12 (ATGTAACACCYCTACAATTG), 2 µl del iniciador antisentido JW10.1 (GTCATCAAAGTGTGRTGCTC), 2 µl del iniciador antisentido JW10.2 (GTCATCAATGTGTGGRTGTTC), 2 µl del iniciador antisentido JW10.3 (GTCATTAGAGTATGGTGTTC), 2.5 µl de MgCl, 1 µl de polimerasa (BioTecMol) y por ultimo 26.5 µl de agua (DEPC) (ambion, cat. 9935) obteniendo un volumen final de 46 µl en cada tubo. La programación del termociclador 2720 (Applied Biosystems, cat. 4359659), para el virus de la rabia a través de la prueba de PCR anidada fue la siguiente (Tabla 4).

Tabla 4. Programación del termociclador para la identificación del virus de la rabia por PCR anidada

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	10 minutos	1
Desnaturalización	94°C	30 segundos	30
Alineación	55°C	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

Fuente: Breslauer, Frank, Blocker, Marky, (1986).

Visualización de los productos de PCR mediante electroforesis

Para la visualización de los productos de PCR se utilizaron geles de agarosa al 2% para lo cual, se colocó en la cámara de electroforesis (BIO-RAD, cat.Sf1704467) ya preparada con TAE 1X. Se utilizaron 5 µl del marcador de peso molecular de 100 pb (Bioline, cat. BIO-33056) en el primer pozo, en los siguientes pozos se colocó la mezcla de 2.5 µl de buffer de muestra (Bioline, cat. BIO-33056) más 9 µl de ADN obtenido en la PCR, además se colocó un control negativo y un control positivo (No.78, LESPT) por gel. Las condiciones de la electroforesis fueron a 80 voltios constantes por 60 minutos. Una vez terminada la electroforesis se realizó la tinción del gel, utilizando bromuro de etidio a 0.5 µg/ml. Posteriormente se realizó la visualización del gel y resguardo de las

imágenes en el fotodocumentador E-Gel™ Imager System (ThermoFisher scientific, cat. 4466611).

ANALISIS ESTADÍSTICO

Se describirá la ocurrencia de las variables mediante cifras absolutas y relativas; para determinar la diferencia de proporciones se utilizará X^2 .

Se estimara la asociación mediante la Razón de Prevalencias y la Razón de Momios de la Prevalencia con IC95% y $p \leq 0.05$, así como un análisis multivariado mediante un modelo de Regresión logística. Se utilizará el programa estadístico SPSS.

RESULTADOS

Tamaño de la muestra

Se realizó un estudio epidemiológico descriptivo, de corte transversal y analítico. Se llevó a cabo un muestreo no probabilístico por conveniencia. El tamaño de la muestra se determinó de acuerdo con Salmier *et al.*, (2017) partiendo de 100 murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) como población total (N), obteniendo una $n= 80$ especímenes con un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$ y $Z=1.96$).

$$n = \frac{N}{1 + \frac{e^2(N-1)}{Z^2 pq}} \qquad n = \frac{100}{1 + \frac{(0.05)^2(100-1)}{(1.96)^2 (0.25)}} = 80$$

Se colectaron 80 murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) en el periodo de Abril del 2019 a Enero del 2020 en zonas endémicas de la región Otomí-Tepehua perteneciente al Estado de Hidalgo. Se determinó el sexo de los murciélagos capturados mediante la observación directa de sus aparatos reproductores; se identificó vulva en las hembras y testículos y pene en los machos obteniendo los siguientes resultados en donde el 61.3% (49/80) fueron machos y el 38.8% (31/80) fueron hembras (Tabla 5) (Ilustración 1).

Tabla 5. Clasificación de los murciélagos según el sexo

Sexo				Porcentaje	Porcentaje
		Frecuencia	Porcentaje	válido	acumulado
Válido	Macho	49	61.3	61.3	61.3
	Hembra	31	38.8	38.8	100.0
	Total	80	100.0	100.0	

Tabla 5. Análisis estadístico de la variable sexo. Los resultados se expresan de acuerdo a la frecuencia de machos y hembras capturadas utilizando cifras absolutas y relativas.

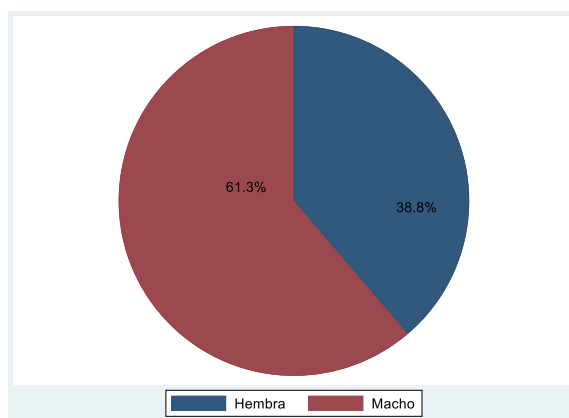


Ilustración 1 Representación gráfica de la proporción sexo.

De igual forma se determinó la edad relativa de los especímenes en donde los juveniles se distinguieron de los adultos por la falta de osificación en la articulación epifisaria entre los huesos metacarpiano y de la falange proximal, demostrada tras la transiluminación del ala (Núñez y Viana, 1997) así como la posición de los testículos en los machos (inguinal e intraabdominal). Como resultado se obtuvo lo siguiente: el 65% (50/80) fueron adultos y el 35% (28/80) fueron juveniles (Tabla 6) (Ilustración 2).

Tabla 6. Clasificación de los murciélagos según la edad relativa

Edad		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	Adulto	52	65.0	65.0	65.0
	Juvenil	28	35.0	35.0	100.0
	Total	80	100.0	100.0	

Tabla 6. Análisis estadístico de la variable edad. Los resultados se expresan de acuerdo a la frecuencia de adulto y juvenil utilizando cifras absolutas y relativas.

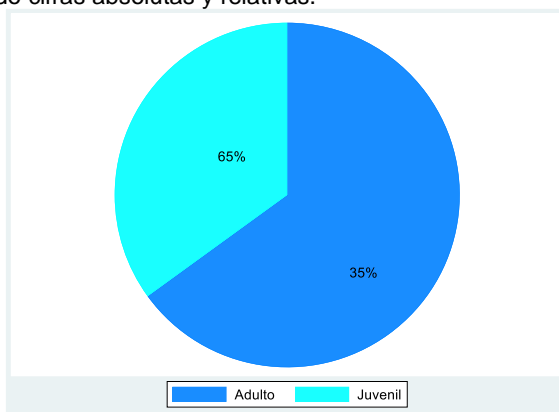


Ilustración 2 Representación gráfica de la proporción edad relativa

Detección del virus de la rabia mediante la prueba molecular de RT-PCR

En la prueba molecular de RT-PCR realizada en las 80 muestras de tejido encefálico de murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) no se detectó amplificación del gen N del virus de la rabia (606pb). Por lo tanto todas las muestras se consideraron negativas a través de esta técnica (Fig. 9).

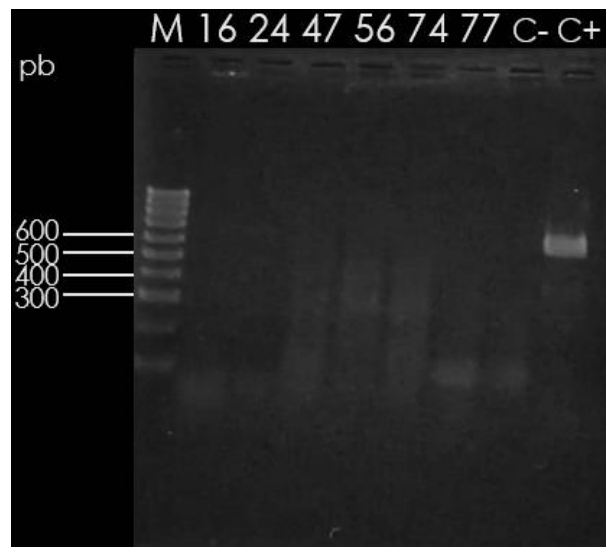


Fig. 9 Gel de agarosa al 2% mostrando productos de amplificación por RT-PCR para un segmento del gen N del virus de la rabia.

De izquierda a derecha, carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb (Bioline), carriles del 2-7: muestras de quirópteros 16, 24, 47, 56, 74 y 77 respectivamente, carril 8: control negativo (sin templado), carril 9: control positivo.

Detección del virus de la rabia mediante la prueba molecular de PCR anidada

En la prueba molecular de PCR anidada realizada a partir del producto final de la RT-PCR de las 80 muestras de tejido encefálico de murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) se detectó amplificación del gen N del virus de la rabia en seis muestras, con un producto de 586 pb (Fig. 10).

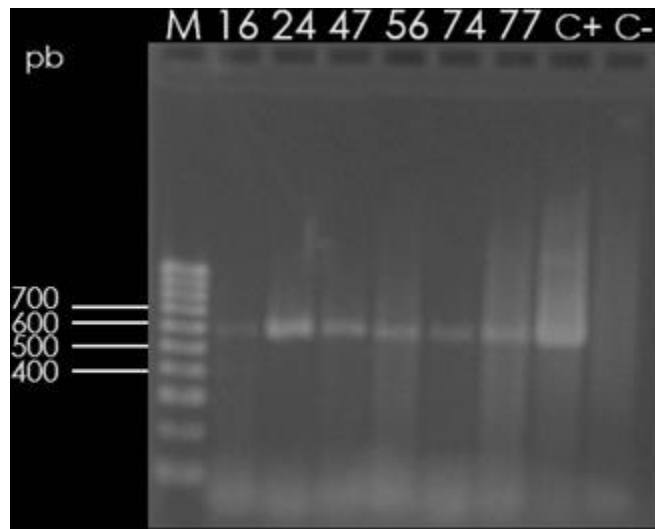


Fig. 10 Gel de agarosa al 2% mostrando los productos de amplificación por PCR anidada para un segmento del gen N del virus rábico.

De izquierda a derecha: carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb (Bioline), carriles del 2-7: muestras de quirópteros 16, 24, 47, 56, 74 y 77 respectivamente, carril 8: control positivo, carril 9: control negativo (sin templado).

Prevalencia del virus de la rabia en murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) de zonas endémicas de la región Otomí-Tepehua

De los 80 murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) capturados para este estudio se identificaron 6 positivos al virus de la rabia a través de la prueba molecular de PCR anidada. Por lo tanto la prevalencia del virus de la rabia en murciélagos hematófagos de zonas endémicas de la región Otomí-Tepehua del Estado de Hidalgo correspondió a 7.5% (tabla 7).

$$P = \frac{6}{80} = 0.075(100) = 7.5\%$$

Tabla 7 Rango del Intervalo de confianza de la proporción del RABV

		Estadístico	Desv. Error
RABV	Proporción de positividad al virus de rabia	.0750	.030
	95% de intervalo de	Límite inferior	.0160
	confianza para la media	Límite superior	.1340

Se tiene la confianza del 95% de que la verdadera proporción de murciélgos infectados con el virus de la rabia esta entre 1.6% y 13.4%.

Prevalencia de la positividad al virus de la rabia por sexo

$$P = \frac{5}{31} = 0.16(100) = 16\% \quad P = \frac{1}{49} = 0.02(100) = 2\%$$

La proporción de la positividad del virus de la rabia fue mayor en el grupo de las hembras (16%) en comparación con el grupo de los machos (2%) (Ilustración 3).

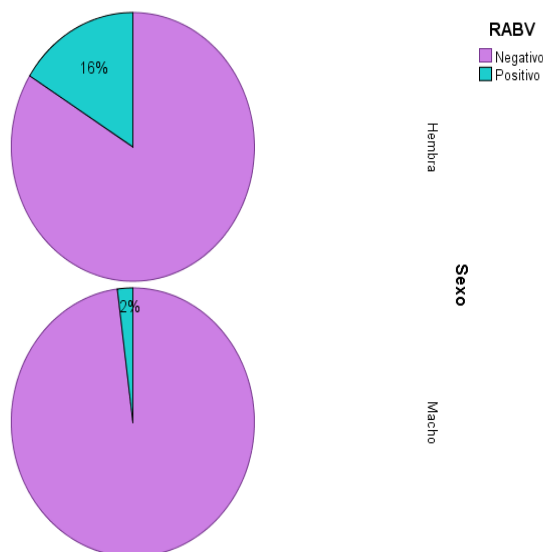


Ilustración 3 Prevalencia del virus de la rabia en hembras y machos

Prevalencia de la positividad del virus de la rabia por edad relativa

$$P = \frac{5}{52} = 0.09(100) = 9\% \quad P = \frac{1}{28} = 0.03(100) = 3\%$$

La proporción de la positividad del virus de la rabia por edad relativa fue mayor en el grupo de los adultos (9%) en comparación con el grupo de los juveniles (3%).

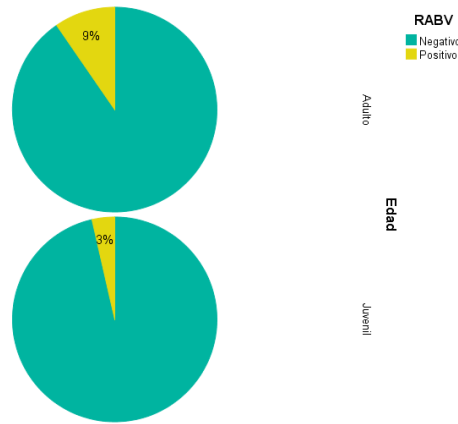


Ilustración 4 Prevalencia del virus de la rabia por edad relativa

Prueba de hipótesis

Tabla 8 Prueba de hipótesis

Resumen de prueba de hipótesis				
	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	Las distribuciones de los diferentes valores entre Sexo y RABV tienen las mismas probabilidades.	Prueba de McNemar para muestras relacionadas	.000	Rechazar la hipótesis nula.
Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de .05.				

Asociación del sexo con la positividad al virus de la rabia

Estimación de la asociación del sexo (hembra/macho) con la positividad al virus de la rabia (RABV), mediante la razón de prevalencias (RP) y la razón de momios de la prevalencia (RMP) con un intervalo de confianza IC_{95%} (1.4-72) y un valor de $p < 0.05$ (Tabla 9).

Tabla 9. Sexo*RABV

	RABV		
	Positivo	Negativo	
Hembra	5	26	31
Macho	1	48	49
Total	6	74	80

Tabla 7. Tabla de contingencia para buscar la asociación en el cruce de la variable dependiente (RABV) con la variable independiente sexo (hembra/macho), en donde el ser hembra indica la exposición.

Razón de prevalencias

$$RP = \frac{a}{n_1} \div \frac{c}{n_0} \quad RP = \frac{5}{31} \div \frac{1}{49} = 7.9$$

Por lo tanto el riesgo de estar infectados con el virus de la rabia es 7.9 veces mayor en el grupo de las hembras, comparado con el grupo de los machos.

Razón de momios de la prevalencia (RMP)

$$RMP = \frac{ad}{bc} \quad RMP = \frac{(5)(48)}{(26)(1)} = 9.2$$

Existe 9.2 veces el riesgo de que las hembras estén infectadas con el virus de rabia en comparación con el grupo de los machos. Prueba de X^2

$$X^2 = \frac{n(ad - bc)^2}{(a + c)(b + d)(a + b)(c + d)}$$

$$X^2 = \frac{80(5)(48) - (26)(1)^2}{(5 + 1)(26 + 48)(5 + 26)(1 + 48)}$$

$$X^2 = \frac{80(240 - 26)^2}{(6)(74)(31)(49)}$$

$$X^2 = 5.43$$

Las diferencias en las proporciones observadas entre el grupo de las hembras y el grupo de los machos son estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Asociación de la edad relativa con la positividad al virus de la rabia

Estimación de la asociación de la edad relativa (juvenil/adulto) con la positividad al virus de la rabia (RABV), mediante la razón de prevalencias (RP) y la razón de momios de la prevalencia (RMP) con un intervalo de confianza IC_{95%} y un valor de $p < 0.05$ (Tabla 10).

Tabla 10. Edad*RABV

Tabla 8. Edad*RABV

	RABV		
	Positivo	Negativo	
Adulto	5	47	52
Juvenil	1	27	28
Total	6	74	80

Tabla 8. Tabla de contingencia para buscar la asociación en el cruce de la variable dependiente (RABV) con la variable independiente edad relativa (juvenil/adulto), en donde el ser adulto indica la exposición.

Razón de prevalencias

$$RP = \frac{a}{n1} \div \frac{c}{n0} \qquad RP = \frac{5}{52} \div \frac{1}{28} = 2.6$$

Por lo tanto la el riesgo de estar infectados con el virus de la rabia es 2.6 veces mayor en el grupo de los adultos, comparado con el grupo de los juveniles.

Razón de momios de la prevalencia (RMP)

$$RMP = \frac{ad}{bc} \qquad RMP = \frac{(5)(27)}{(47)(1)} = 2.8$$

Existe 2.8 veces el riesgo de que los murciélagos hematófagos adultos estén infectados con el virus de rabia en comparación con el grupo de los juveniles.

Prueba de X^2

$$X^2 = \frac{n(ad - bc)^2}{(a + c)(b + d)(a + b)(c + d)}$$
$$X^2 = \frac{80(5)(27) - (47)(1)^2}{(5 + 1)(47 + 27)(5 + 47)(1 + 27)}$$
$$X^2 = \frac{80(135 - 47)^2}{(6)(74)(52)(28)}$$
$$X^2 = 0.9$$

Las diferencias en las proporciones observadas entre el grupo de los adultos y el grupo de los juveniles no son estadísticamente significativas.

Modelo de Regresión logística binaria

La prueba de Durbin-Watson indica que se cumple el supuesto de independencia de errores (2.403) (Tabla 11).

Tabla 11. Resumen del modelo^b

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación	Durbin-Watson
1	.261 ^a	.068	.056	.258	2.403

a. Predictores: (Constante), Sexo

b. Variable dependiente: RABV

En la estadística de colinealidad el VIF tiene un valor igual a 1 por lo tanto indica que no hay multicolinealidad (VIF: 1) (Tabla 12).

Tabla 12. Coeficientes^a

Modelo		Coeficientes				Estadísticas de colinealidad	
		Coeficientes no estandarizados		estandarizados		Tolerancia	VIF
		B	Desv. Error	Beta	t	Sig.	
1	(Constante)	9.120	.087		104.941	.000	
	Sexo	-.141	.059	-.261	-2.384	.020	1.000 1.000

a. Variable dependiente: RABV

Para el bloque 1 del modelo de regresión logística, la puntuación de la eficiencia estadística de ROA indica que hay una mejora significativa en la predicción de la probabilidad de ocurrencia de las categorías de la variable dependiente (RABV) con un valor de Chi-cuadrado (X^2) de 5.46 y un valor de $p < 0.05$ ($p=0.019$) (Tabla 13).

Tabla 13. Pruebas ómnibus de coeficientes de modelo

		Chi-cuadrado	Gl	Sig.
Paso 1	Paso	5.467	1	.019
	Bloque	5.467	1	.019
	Modelo	5.467	1	.019

El valor de R cuadrado de Nagelkerke indica que el modelo propuesto explica el 16% de la varianza de la variable dependiente (0.160) (Tabla 14).

Tabla 14. Resumen del modelo

Paso	Logaritmo de la verosimilitud -2	R cuadrado de Cox y Snell	R cuadrado de Nagelkerke
1	37.155 ^a	.066	.160

a. La estimación ha terminado en el número de iteración 7 porque las estimaciones de parámetro han cambiado en menos de .001.

Para el análisis de regresión logística el bloque 1 indica que hay un 92.5% de probabilidad de acierto en el resultado de la positividad al virus de la rabia (RABV), cuando se conoce el sexo de los murciélagos (Tabla 15).

Tabla 15 Clasificación^a

	Observado	Pronosticado			
		RABV		Porcentaje correcto	
		Negativo	Positivo		
Paso 1	RABV	Negativo	74	0	100.0
		Positivo	6	0	.0
Porcentaje global					92.5

a. El valor de corte es .500

Por lo tanto la interpretación de nuestro modelo de regresión logística binaria nos dice que los murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) del sexo hembra presentan 9.2 veces más el riesgo de estar infectadas con el virus de la rabia en comparación con el grupo de los machos (Tabla 16).

Tabla 16. Variables en la ecuación

	B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	
Paso 1 ^a	Sexo(1)	2.223	1.122	3.923	1	.048	9.231
	Constante	-3.871	1.010	14.680	1	.000	.021

a. Variables especificadas en el paso 1: Sexo.

DISCUSIÓN

Se realizó un estudio epidemiológico descriptivo, de corte transversal y analítico en donde se determinó la epidemiología molecular del virus de la rabia en murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) de zonas endémicas de la región Otomí-Tepehuá, Hidalgo. Se llevó a cabo un muestreo no probabilístico por conveniencia. El tamaño de la muestra se determinó de acuerdo con Salmier *et al.*, (2017) partiendo de 100 quirópteros como población total (N), obteniendo una n= 80 especímenes con un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$ y $Z=1.96$). De los especímenes capturados se determinó el sexo en donde el 61.3% (49/80) fueron machos y el 38.8% (31/80) fueron hembras lo cual difiere con los hallazgos de Juárez (2012), en donde identificó mayor proporción de hembras (44.5%) en comparación con los machos (22%). Nuñez y Viana (1997) informaron que la proporción entre las hembras y los machos, descrita en varios estudios, presentaron resultados que difirieron según la distribución poblacional de la especie, el tamaño de la muestra o el método de captura. Es posible que el período del año, las condiciones climáticas y el tiempo de recolección de los murciélagos a lo largo de la noche también puede interferir en la proporción sexual de los especímenes recolectados (Gomes y Uieda, 2004). El periodo de muestreo del presente estudio se realizó en el periodo de otoño e invierno durante las horas de mayor oscuridad y el tiempo de captura de 7 horas (20:00 pm a la 3:00 am) aproximadamente. La mayor parte del muestro se realizo en los potreros.

Además se realizó la detección del virus de la rabia en las 80 muestras de tejido encefálico de los quirópteros capturados, mediante dos pruebas moleculares: la RT-PCR y PCR anidada. En RT-PCR no se detectó amplificación del gen N del virus de la rabia en ninguna de las muestras. Por lo tanto todas las muestras se consideraron como negativas. Sin embargo de acuerdo con Heaton, *et al.*, (1997) y Rojas, *et al.*, (2006) se podrían considerar como falsos negativos debido a que sí la concentración de ADN es menor a 10 ng/ μ l no es posible visualizar el producto esperado (606pb) en el gel de agarosa a través de la transiluminación, por ello se recomienda un segundo ciclo de amplificación (Olave, 2009). Es por esta razón que se realizó la prueba molecular de PCR anidada a partir del producto final de la RT-PCR, en la cual se amplificó el gen N del virus de la rabia en seis muestras (6/80) identificando un producto final de 586 pb, que comprende dos rondas de amplificación, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección (Pichart *et al.*, 2004). Wang, *et al.*, (2019) demostraron que este método tiene 100% de sensibilidad y 99.97% de especificidad en comparación con la inmunofluorescencia directa (IFD) que es el método estándar de oro

recomendado por la OMS y la OIE, por ello sugiere, que podría ser un método alternativo conveniente a la IFD para el diagnóstico del virus de la rabia.

Se determinó la prevalencia del virus de la rabia en murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) en zonas endémicas de la región Otomí-Tepehua, Hidalgo, obteniendo un valor de 7.5% que es mayor con lo típicamente estimado (<1%) en poblaciones de murciélagos silvestres dentro de regiones endémicas (Rupprecht, 2000 y Childs, *et al.*, 2007, citados por Seetahal, *et al.*, 2020). Sin embargo, el valor de prevalencia ha descendido en los últimos años con respecto a los hallazgos de Olave, 2009 donde obtuvo un 35% de prevalencia en lugares próximos a la región (Huehuetla, Hidalgo; Huayacocotla, Veracruz, entre otros). Los valores de prevalencia bajos con respecto a estos estudios podrían relacionarse a que el sistema inmunológico de los murciélagos juega un papel importante controlando rápidamente la replicación viral a niveles muy bajos, lo que limita las consecuencias clínicas en estos animales, pero que aún da como resultado la diseminación viral y la posterior propagación a otros animales (Loza-Rubio, *et al.*, 2018). Por otro lado, se realizó una comparación de la proporción de la positividad al virus de la rabia con respecto al sexo en donde fue mayor en el grupo de las hembras (16%) en comparación con el grupo de los machos (2%). Valores que concuerdan con los hallazgos de Seetahal, *et al.*, 2020 en donde obtuvo mayor seropositividad en las hembras (57.6%) comparada con el grupo de los machos (42.4%). Con relación a la asociación del sexo de los murciélagos hematófagos con la positividad al virus de la rabia, se realizó una estimación mediante la razón de prevalencias (RP) y la razón de momios de la prevalencia (RMP) con un intervalo de confianza IC_{95%} y un valor de $p < 0.05$. Encontrando que el riesgo de estar infectados con el virus de la rabia es 7.9 veces mayor en el grupo de las hembras, comparado con el grupo de los machos y que de acuerdo con la razón de momios de la prevalencia existe 9.2 veces el riesgo de que las hembras estén infectadas con el virus de la rabia en comparación con el grupo de los machos. De igual forma se realizó la prueba de Chi cuadrado (X^2) en donde se obtuvo un valor de 5.43, ($p < 0.019$), (IC_{95%}=1.4-72) donde las diferencias en las proporciones observadas entre el grupo de las hembras y el grupo de los machos son estadísticamente significativas.

Así también, de las cinco hembras infectadas, dos se encontraron en estado de gestación, quizá sería interesante plantearse que puede ocurrir la transmisión del virus de la rabia a las crías mediante interacciones cercanas con la madre ya que se han descrito comportamientos que podrían tener relación con la transmisión tales como la regurgitación de sangre, el acicalamiento y los lamidos sociales en donde la saliva entre en contacto con la piel lesionada o mucosas de las crías (Kobayashi, 2005; Velasco-

Villa, 2006). Esto es consistente con estudios previos que sugieren que los murciélagos pueden estar expuestos al virus de la rabia poco después del nacimiento (Steece y Altenbach, 1989) lo cual podría facilitar el mantenimiento del virus a largo plazo (George, *et al.*, 2011). Seetahal, *et al.*, 2020, observó que los niveles de títulos de anticuerpos eran comparables entre la madre y la cría seropositiva, además encontró una mayor prevalencia viral en hembras gestantes y lactantes.

En cuanto a la comparación de la proporción de la edad relativa (juvenil/adulto) con la positividad al virus de la rabia, fue mayor en el grupo de los adultos (9%) en comparación con el grupo de los juveniles (3%). Valores que difieren con los hallazgos de Seetahal, *et al.*, 2020 en donde su proporción de seropositividad fue mayor en juveniles (34.8%) comparada con los adultos (6.9%) y además encontró una asociación en donde nos dice que los juveniles tienen mayor riesgo de estar infectados con el virus de la rabia. Por el contrario en este estudio la asociación de la edad relativa (juvenil/adulto) con la positividad al virus de la rabia mediante la RP y la RMP ($IC_{95\%}$ y $p < 0.05$) es 2.6 veces mayor en el grupo de los adultos, comparado con el grupo de los juveniles y que en relación con la RMP existe 2.8 veces la probabilidad de que los murciélagos hematófagos adultos estén infectados con el virus de rabia en comparación con el grupo de los juveniles. Sin embargo ($X^2 = 0.9$) las diferencias en las proporciones observadas entre el grupo de los adultos y el grupo de los juveniles no son estadísticamente significativas.

Se realizó un modelo de regresión logística bivariada para establecer la relación estadística que existe entre la positividad del virus de la rabia (RABV) y el sexo, cabe mencionar que la variable de la edad relativa no se tomó en cuenta para este modelo ya que no fue estadísticamente significativa. Para el bloque 1 del modelo, la puntuación de la eficiencia estadística de ROA indica que hay una mejora significativa en la predicción de la probabilidad de ocurrencia de las categorías de la variable dependiente (RABV) con un valor de Chi-cuadrado (X^2) de 5.46 y un valor de $p < 0.05$ ($p=0.019$). El valor de R cuadrado de Nagelkerke indica que el modelo propuesto explica el 16% de la varianza de la variable dependiente (RABV) (0.160). Para el análisis de regresión logística el bloque 1 indica que hay un 92.5% de probabilidad de acierto en el resultado de la positividad al virus de la rabia (RABV), cuando se conoce el sexo de los murciélagos. Por lo tanto la interpretación de nuestro modelo de regresión logística nos dice que los murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) del sexo hembra presentan 9.2 veces más el riesgo de estar infectadas con el virus de la rabia en

comparación con el grupo de los machos, valor que coincide con la razón de momios de la prevalencia.

En respuesta a la hipótesis planteada, existe diferencia estadísticamente significativa entre las proporciones de sexo (macho/hembra) establecidas ($X^2=5.46$, gl. 1, $p=0.019$), sin embargo la mayor prevalencia correspondió al grupo de las hembras y en cuanto a la edad relativa (juvenil/adulto) y la positividad al virus de la rabia no hubo diferencia estadísticamente significativa.

Cabe destacar que el virus aún se encuentra circulando en la región y que el murciélago hematófago es el principal reservorio y transmisor de la rabia a los animales domésticos especialmente a bovinos y especies ganaderas de la zona, lo cual representa un serio problema de impacto en la Salud Pública, ya que estos casos pueden generar contactos entre los animales infectados y las personas, puesto que en México del 2010 al 2016 se registraron 9 casos de rabia humana transmitida de manera directa por este quiróptero y un caso de rabia humana en 2009 por transmisión secundaria a través de la manipulación y contacto directo con la saliva de un bovino infectado (CENAPRECE, 2020). El comportamiento epidemiológico del virus de la rabia, está relacionado con el hábitat, diversidad y dinámica poblacional del murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*), así como el grado de las áreas geográficas perturbadas (Torres et al., 2014). En los lugares donde han ocurrido casos de rabia humana transmitida por este reservorio, la población habita en condiciones de extrema pobreza, en casas vulnerables y áreas en las cuales existe ganadería familiar (Rupprecht, Barret, Briggs, Cliquet, Fooks, Lumlertdacha, et al., 2008; CENAPRECE, 2020), cabe resaltar que estas características son afines con la región Otomí-Tepehua, donde la rabia es endémica y existe la presencia del murciélago hematófago así como el que más del 80% de la población vive en condiciones de alta a muy alta marginación con déficits de infraestructura, agua potable, drenaje, electrificación, vías de comunicación, educación y salud (Vargas, 2011). Aproximadamente el 80% de la población de esta zona se dedica a actividades primarias por lo que su economía es fundamentalmente agropecuaria, la mayoría de los productores cuentan con pocas cabezas de ganado (INEGI, 2009). La comprensión de factores ambientales, sociales y su relación con la forma en que la enfermedad se mantiene en el reservorio, es pertinente al plantear estrategias dirigidas a reducir el riesgo de la transmisión del virus de la rabia en zonas vulnerables (Lee, et al., 2012). Es por ello que la vigilancia epidemiológica del virus de la rabia es importante para conocer el comportamiento del virus dentro de la región así como las especies involucradas, dirigiendo la atención del personal de salud animal a

los lugares afectados con la finalidad de prevenir brotes que pongan en riesgo a la salud humana.

CONCLUSIONES

- De los 80 murciélagos hematófagos estudiados en la región Otomí-tepehua, Hidalgo se detectaron 6 positivos al virus de la rabia mediante la prueba molecular de PCR anidada.
- La proporción de positividad al virus de la rabia fue mayor en las hembras (16%) en comparación con el grupo de los machos (2%).
- La prevalencia del virus en murciélagos hematófagos en zonas endémicas de la región Otomí-tepehua fue de 7.5%.
- Los análisis de asociación mediante la razón de prevalencia y razón de momios de la prevalencia (IC=95%, $X^2=5.43$, $p=0.020$) mostraron que la probabilidad de estar infectados con el virus de la rabia es 7.9 veces mayor en el grupo de las hembras, comparado con el grupo de los machos y que existe 9.2 veces la probabilidad de que las hembras estén infectadas con el virus de la rabia en comparación con el grupo de los machos. En el modelo de regresión logística se obtuvo una OR de 9.2.
- La rabia continua siendo un riesgo para las poblaciones humanas y animales de la región Otomí-tepehua y el principal reservorio y transmisor de la enfermedad es el murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*) por ello es importante realizar esfuerzos dirigidos a limitar exposiciones ya sea directamente con este quiróptero o bien con animales domésticos infectados.
- Asimismo trabajar en educación sanitaria para la población, ya que se trata de una enfermedad completamente prevenible y la ocurrencia de casos humanos está relacionada con la falla de las campañas de vacunación en los animales domésticos, su vigilancia y control debido al aislamiento extremo de algunas comunidades, estando relacionada directamente con la pobreza y ambientes desfavorecidos.

- Este escenario epidemiológico exige reexaminar las medidas de control aplicadas hasta el momento desde un abordaje multidisciplinar, así como cooperación intersectorial y participación de la comunidad.
- La investigación del virus de la rabia en los murciélagos es importante para identificar la presencia y la circulación viral en la región, dirigiendo la atención del personal de salud animal a los lugares afectados para limitar la propagación de la enfermedad.

REFERENCIAS

- Acha, P.N., Málaga-Alba, A. (1988). Economic losses due to *Desmodus rotundus*. En A. M. Greenhall, U. Schmidt. (Ed.). *Natural history of vampire bats* (pp. 207-214) Boca raton, Florida: CRC Press.
- Aguiar, L.M.S. (2007). Subfamilia Desmodontinae. En N. R. Reis, A. L. Peracchi, W.A. Pedro, Lima (Ed.), *Morcegos do Brasil* (pp.39-43). Brasil: Londrina.
- Aguilar-Setién, A., Loza-Rubio, E., Salas-Rojas, M., Brisseau, N., Cliquet, F., Pastoret, P., Rojas-Dotor, S., Tesoro, E. y Kretschmer, R. (2005). Salivary excretion of rabies virus by healthy vampire bats. *Epidemiol. Infect.*, 133, 517-522.
- Albertini, A.A.V., Ruigrok, R.W.H., Blondel, D. (2011). Rabies virus transcription and replication. En A.C. Jackson. (Ed.), *Research advances in rabies* (1-19). San Diego, CA: ELSEVIER
- Alencar, A.O., Silva, M.M., Da Arrada, A.J. y Guerra, D.Q. (1994). Aspectos biológicos e ecológicos de *Desmodus rotundus* (Chiroptera) do Brasil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 14(4), 95-103.
- Almansa, J.C., Garcia, R.C. (1980). Incidencia del murciélago hematófago *Desmodus rotundus* sobre los indígenas Yanomami de Venezuela. *Donana Acta Vertebr*, 7(1), 113-7.
- Anderson, A., Shwiff, S., Gebhardt, K., Ramírez, A.J., Shwiff, S., Kohler, D., Lecuona, L. (2014). Economic evaluation of vampire bat (*Desmodus rotundus*) rabies prevention in Mexico. *Transboundary and emerging diseases*, 61(2), 140-6. doi: 10.1111/tbed.12007.
- Aréchiga-Ceballos, N., Velasco-Villa, A., Shi, M., Flores-Chávez, B., Barro, E., Cuevas-Domínguez, E., Aguilar-Setién, A. (2010). New rabies virus variant found during an epizootic in White-nosed coatis from the Yucatán Peninsula. *Epidemiol Infect*, 138, 1586-1589.
- Arellano-Sota, C. (2004). Control of bovine paralytic in Latin American and the Caribbean. *National Institute for livestock research, Mexico*, 14.
- Avelino, A., de Almeida, C., Bastos, D., Seabra, C., Martos, M., Edison, L. y Favoretto, S. (2011). Molecular characterization of rabies virus isolated from nonhaematophagous bats in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(6), 678-683.
- Badrane, H., Tordo, N. (2001). Host switching in lyssavirus history from the chiroptera to the carnivore orders. *Journal of virology*, 75(17), 8096-8104.
- Bárcenas-Reyes I., Loza-Rubio E., Zendejas-Martínez H., Luna-Soria H., Cantó-Alarcón G. J., Milián-Suazo F. (2015). Comportamiento epidemiológico de la rabia paralítica bovina en la región central de México, 2001–2013. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 38(5), 396–402.
- Bárcenas-Reyes, I., Loza-Rubio, E., Zendejas, H. Luna, H., Cantó, J.C. & Milián, F. (2015). Comportamiento epidemiológico de la rabia bovina en la región central de México, 2001-2013. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 38(5), 396-402.
- Barclay R.M.R., Ulmer J., MacKenzie C.J.A., Thompson M.S., Olson L., McCool J., et al. (2004). Variation in the reproductive rate of bats. *Canadian Journal of Zoology*, 82(5), 688-693. doi: 10.1139/ z04-057
- Batista-da-Costa, M., Bonito R.F., Nishioka, S.A. (1993). An outbreak of vampire bat bites in a Brazilian village. *Tropical medicine and parasitology*, 44(3), 219-20.
- Bernard, E. (2005). Morcegos vampiros. Sangue, raiva e preconceito. *Ciencia hoje*, 36(214), 44-49.

- Blackwood, J. C., Streicker, D. G., Altizer, S. & Rohani, P. (2013). Resolving the roles of immunity, pathogenesis, and immigration for rabies persistence in vampire bats. *PNAS*, 110(51), 20837-20842.
- Breslauer K. Frank, R. Blocker, H., Marky, L.A. (1986). Predicting DNA dúplex stability from the base sequence. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 83(11), 3746-50.
- Brito, M.G., Chamone, T.L., da Silva, F.J., Wada, M.Y., Miranda, A.B., Castilho, J.G., et al. (2011). Antemortem diagnosis of human rabies in a veterinarian infected when handling a herbivore in Minas Gerais, Brazil. *Revista do Instituto de medicina tropical en Sao Paulo*, 53(1), 39-44.
- Calisher, C.H., Childs, J.E., Field, H.E., Holmes, K.V., Schountz, T. (2006). Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 531-545.
- Calisher, C., H. (2015). Viruses in bats: a historic review. *Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases*. Wiley, New York, 23-47.
- Caraballo, A.J. (1993). Outbreak of vampire bat biting in a Venezuelan village. *Revista de Saude Carini*, A. (1911). About one large epizootie of rabies. *Ann Inst Pasteur*, 25, 843-846.
- Carrasco-Rueda, F. (2011). Diversity and species composition of bats in forest fragments in the Chanchamayo Province, Junin. University of Florida.
- Ceballos, G., Oliva, G. (2005). Los mamíferos silvestres de México. Campeche, México: FCE, CONABIO.
- Centro Nacional de Programas preventivos y control de enfermedades. (2020). Rabia. Recuperado de http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/zoonosis/rabia_humana.html
- Centro Nacional de Programas preventivos y control de enfermedades. (2020). Rabia humana. Recuperado de <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/zoonosis/descargas/pdf/caso1rh2016.pdf>
- Centro Nacional de Programas preventivos y control de enfermedades. (2020). Rabia humana. Recuperado de <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/zoonosis/descargas/pdf/caso3rh2009.pdf>
- Chan, J.F, To, W., Tse, K.K.W., Jin, H., Yuen, K.Y. (2013). Interspecies transmission and emergence of novel viruses: lessons from bats and birds. *Trends in microbiology*, 21, 544-555.
- Childs, J.E., Leslie, A., Real, L.A. (2007). In Rabies, 2nd ed. En A. C. Jackson, W.H. William. (Eds.), *Epidemiology* (123-200). London, UK: Elsevier.
- Constantine, D. G. (2003). Geographic Translocation of Bats: Known and Potential Problems. *Emerging Infectious Diseases*, 9(1), 17-21. doi: 10.3201/eid1309.020104
- Crespo, J. A., Vanella, J.M., Blood, B.J., Carlo, J.M. (1961). Observaciones ecológicas del vampiro *Desmodus Rotundus* (Geoffroy) en el noreste de Córdoba. *Revista de el Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"*, 6, 131-160.
- Crowl, T. A., Crist, T. O., Parmenter, R. R., Belovsky, G., & Lugo, A. E. (2008). The spread of invasive species and infectious disease as drivers of ecosystem change. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 6, 238–246.

- Da Rosa, E. S., Kotait, I., Barbosa, T. F., Carrieri, M. L., Brandão, P. E., Pinheiro, A. S. Ferreira M. (2006). Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 12, 1197-202.
- Da Rosa, E.S., Kotait, I., Barbosa, T.F., Carrieri, M.L., Brandão, P.E., Pinheiro, A.S., et al. (2006). Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. *Emerging infectious diseases*, 12(8):1197-202.
- De Thoisy, B., Bourhy, H., Delaval, M., Pontier, D., Dacheux, L., Darcissac, E., et al. (2016). Bioecological Drivers of Rabies Virus Circulation in a Neotropical Bat Community. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10, e0004378.
- Delpietro, H.A., Russo, R.G. (1996). Ecological and epidemiologic aspects of the attacks by vampire bats and paralytic rabies in Argentina and analysis of the proposals carried out for their control. *Revue scientifique et technique*, 15(3), 971-984.
- Diaz, A.M., Papo, S., Rodriguez, A., Smith, J.S. (1994). Antigenic analysis of rabies-virus isolates from Latin American and the Caribbean. *Journal of veterinary medicine*, 41, 153-160.
- Dietzschold, B., Li, J., Faber, M., Schnell, M. (2008). Concepts in the pathogenesis of rabies. *Future virology*, 3(5), 481-90.
- Dietzschold, B., Schnell, M., Koprowski, H. (2005). Pathogenesis of Rabies. *Current Top Microbiol Immunol*, 292-56.
- Domenica, S., Cizdziel P.E., Chomczynski. P. (1993). TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus*, 14(4), 532-535.
- Drake, J.W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., Crow, J.F. (1998). Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, 148, 1667–1686.
- Escobar, L.E., Peterson, A.T., Favi, M., Yung, V., Medina-Vogel, G. (2015). Batborne rabies in Latin America. *Revista do Instituto de Medicina Tropical em Sao Paulo*. 57(1), 63-72.
- Fahl, W.O., Garcia A.I.E., Achkar S.M., Mori E., Asano K.M., Iamamoto K., Scheffer K.C. (2015). Rabia transmitida por murciélagos en Brasil. *Acta biológica Colombiana*, 20(3), 21-35. doi: 10.15446/abc.v20n3.45481
- Fornes, A., Lord, R. D., Kuns, M. L., Largui, O. P., Fuenzalida, E., Lazara, L. (1974). Control of bovine rabies through vampire bats control. *Journal of wildlife diseases*, 10(4), 310-6.
- Ge, P., Tsao, J., Schein, S., Green, T.J., Luo, M., Zhou, Z.H. (2010). Cryo-EM model of the bullet-shaped vesicular stomatitis virus. *Science*, 327, 689–693.
- George, D.B., Webb, C.T., Farnsworth, M.L., O’Shea, T.J., Bowen, R.A., Smith, D.L., Stanley, T.R., Ellison, L.E., Rupprecht, C.E. (2011). Host and viral ecology determine bat rabies seasonality and maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108, 10208–10213.
- Gomes, M., Uieda, W. (2004). Abrigos diurnos, composição de colônias, dimorfismo sexual e reprodução do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (E. Geoffroy) (Chiroptera, Phyllostomidae) no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira De Zoologia*, 21. doi: 10.1590/S0101-81752004000300025
- Greenhall, A. M., Joermann, G., Schmidt, U. (1983) *Desmodus rotundus*. *Mammal Species*, 2002,1-6
- Greenhall, A.M., Schmidt, U., Joermann, G. (1984) *Diphylla ecaudata*. *Mammalian Species*, 227, 1-3.

- Greenhall, A.M., Schutt, Jr. W.A. (1996). *Diaemus youngi*. *Mammalian Species*, 533:1-7.
- Guarino, H., Castilho, J.G., Souto, J., Oliveira, R.DEN, Carrieri, M.L., Kotait, I. (2013). Antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from Uruguay. *Virus research*, 173(2), 415-420.
- Hanlon, C.A., Niezgoda, M., Rupprecht, C.E. (2007). Rabies in terrestrial animals. En A. C. Jackson, W. H. Wunner. (2da Ed.) *Rabies* (pp. 201-258). San Diego: Academic Press.
- Haupt, H., Rehaag, H. (1925). Raiva epizoótica nos rebanhos de Santa Catarina, transmitida por morcegos. *Bol Soc Bras Med Vet*, 2, 17-47
- Hayman, D.T., Bowen, R.A., Cryan, P.M., McCracken, G.F., O'Shea, T.J., Peel, A.J., et al. (2013). Ecology of zoonotic infectious diseases in bats: current knowledge and future directions. *Zoonoses and Public Health*, 60(1), 2-21. doi: 10.1111/zph.12000.
- Heaton, P., Johnstone, P., McElhinney, L., Cowley, R., O'Sullivan, E., Whitby, J. (1997). Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies related viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 2762-2766.
- Hurst, E.W., Pawan, J.L. (1931). An outbreak of rabies in Trinidad without history of bites, and with the symptoms of acute ascending myelitis. *Lancet*, 2(5638), 622-8.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez. (2017). Lineamientos para la vigilancia por laboratorio de la rabia, Indre. Mexico: Secretaria de Salud: 44-58.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2009). Huehuetla, Hidalgo. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Recuperado de: http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/13/13027.pdf
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2009). San Bartolo Tutotepec, Hidalgo. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Recuperado de: http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/13/13053.pdf
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2009). Tenango de Doria, Hidalgo. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Recuperado de: http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/13/13060.pdf
- Jiménez, R. J. A. (2005). Alteraciones en la etología de los murciélagos hematófagos del género *Desmodus Rotundus* y su papel en la transmisión de la rabia en México. XVI Reunión Internacional de Rabia en las Américas. Ontario, Canadá.
- Jones, B.A., Grace, D., Kock, R., Alonso, S., Rushton, J., Said, M.Y., Pfeiffer, D.U. (2013). Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110:8399-8404.
- Juárez, L. G. (2012). Dinamica poblacional del murcielago vampiro *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae) en la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlan, Hidalgo, México [tesis de maestría, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo] Recuperado de <https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/15403/Din%C3%A1mica%20poblacional%20del%20murci%C3%A9lago%20vampiro.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Kobayashi, Y., Sato, G., Shoji, Y., Sato, T., Itou, T., Miura, Y., et al. (2005). Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. *J Med Vet Sci*, 67, 647-652.

- Kotait, I., Carrieri, M.L., Carnieli, P.Jr., Castilho, J.G., Oliveira, R.N., Macedo, Cl., *et al.* (2007). Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. *Boletim Epidemiológico Paulista*, 4(40), 1-8.
- Kuzmin, I.V., Novella, I.S., Dietzgen, R.G., Padhi, A., Rupprecht, C.E. (2009). The rhabdoviruses: biodiversity, phylogenetics, and evolution. *Infection, Genetic and Evolution*, 9(4), 541-53.
- Langoni, H., Souza, L.C., Zetun, C.B., Silva, T.C.C., Hoffmann, J.L., Silva, R.C. (2008). Serological survey for rabies in serum samples from vampire bats (*Desmodus rotundus*) in Botucatu Region, SP, Brazil. *Journal Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 14(4), 651-659.
- Lee, D.N., Papes, M., Van Den Bussche, R. A. (2012). Present and potential future distribution of common vampire bats in the Americas and the associated risk to cattle. *PLOS ONE*, 7(8), 1-9.
- Lima, E.Q. (1934). A transmissão da raiva bovina pelo morcego hematophago *Desmodus rotundus*. *Brasil-Med*, 48:38.
- Lobova, T.A, Mori, S.A, Blanchard, F., Peckham, H., Charles-Dominique P. (2003). Cecropia as a food resource for bats in French Guiana and the significance of fruit structure in seed dispersal and longevity. *Am. J. Bot*, 90, 388-403.
- Lord, R.D. (1981). Guía sobre estrategia ecológica para controlar la rabia bovina. *Ciencia veterinaria*, 3, 78-101.
- Loza-Rubio, E., Rojas-Anaya, E., López, J., Olivera-Flores, M. T., Gómez-Lim, M., Tapia-Pérez, G. (2012). Induction of a protective immune response to rabies virus in sheep after oral immunization with transgenic maize, expressing the rabies virus glycoprotein. *Vaccine*, 30(37), 5551-5556.
- MacCarthy, T. (1989). Human depredation by vampire bats (*Desmodus rotundus*) following a hog cholera campaign. *The american journal of tropical medicine and Hygiene*, 40, 320-2.
- Málaga-Alba, A. (1954). Vampire Bat as a carrier of rabies. *American Journal of public health*, 44, 909-917.
- Marston, D. A., McElhinney, L.M., Johnson, N., Muller, T., Conzelmann, K. K., Tordo, N., Fooks, A. R. (2007). Comparative analysis of the full genome sequence of European bat lyssavirus type 1 and type 2 with other lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G-L 30 non-translated region. *Journal of General Virology*, 88, 1302–1314.
- Méndez-Ojeda, M.L., Rojas-Anaya, E., Morales, J.F., Tapia-Pérez, G., Suzán, G., Gaona, O., Medellín-Legorreta, R., Rupprecht, C., Loza-Rubio, E. (2018). Detection of rabies virus in organs unrelated to the central nervous system of experimentally-inoculated vampire bats. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9 (3), 436-450.
- Meslin, F. X., Kaplan, M.M., Koprowsky, H. (1996). *Laboratory Techniques in Rabies*. 4th ed. World Health Organization. Geneva.
- Nagarajan, T., Mohanasubramanian, B., Seshagiri, E.V., Nagendrakumar, S.B., Saseendranath, M.R., Satyanarayana, M.L. *et al.* (2006). Molecular Epidemiology of Rabies Virus Isolates in India. *Journal of clinical microbiology*, 44(9), 3218-3224.
- Nel, L.H., Markotter, W. (2007). Lyssaviruses. *Crit. Rev. Microbiol*, 33(4):301-324.
- Nuñez, H.A. y Vianna, M.L. (1997). Estacionalidad reproductiva en el vampiro común *Desmodus rotundus* en el Valle de Lerma (Salta, Argentina). *Revista de biología tropical*, 45(3), 1231-1235.

- Olave, J.I. (2009). Frecuencia del virus de la rabia en quirópteros hematófagos de algunas áreas endémicas del Estado de Hidalgo y la Sierra Norte del Estado de Veracruz por inmunofluorescencia directa y detección molecular [tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México] Repositorio de tesis DGB SDI. https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000646384
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2019). Fortalecimiento del sistema de prevención y control de la rabia paralítica bovina. Recuperado de <http://www.fao.org/in-action/prevencion-rpb/resumen/es/>
- Organización Mundial de la Salud. (2020). Nuevo plan estratégico mundial para eliminar la rabia transmitida por los perros para 2030. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/commentaries/detail/new-global-strategic-plan-to-eliminate-dog-mediated-rabies-by-2030>
- Organización Mundial de la Salud. (2020). Rabia. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/rabies>
- Organización Mundial de la Salud. (2020). What is rabies?. Recuperado de <https://www.who.int/rabies/about/en/>
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2020). Portal sobre la rabia. Recuperado de <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/portal-sobre-la-rabia/que-es-la-rabia/>
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2020). Rabies: aetiology, epidemiology, diagnosis, prevention and control. Recuperado de https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/RABIES_FINAL.pdf
- Organización Panamericana de la Salud (2020). México está libre de rabia humana transmitida por perros. Recuperado de: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=15585:mexico-is-free-from-human-rabies-transmitted-by-dogs&Itemid=1926&lang=es#:~:text=La%20OMS%20considera%20que%20un,iniciarlo%20en%20diciembre%20de%202016.
- Organización Panamericana de la Salud. (2018). Las américas hacia la eliminación de la rabia. Recuperado de https://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_content&view=article&id=509:rabia&Itemid=181
- Páez, A., Núñez, C., García, C., Boshell, J. (2003). Molecular epidemiology of rabies epizootics in Colombia: evidence for human and dog rabies associated with bats. *The journal of general virology*, 84, 795-802.
- Peracchi, A. L., Lima, I.P., Reis, N.R., Nogueira, M.R., Filho, .HO. (2006) Ordem Chiroptera. En N.R. Reis, A.L. Peracchi, W. A. Pedro, Lima (Ed.) *Mamíferos do Brasil* (pp. 162-164). Brasil: Londrina.
- Piaggio, A. J., Russell A. L., Osorio I. A., Jiménez Ramírez A., Fischer J. W., Neuwald J.L., et al. (2017). Genetic demography at the leading edge of the distribution of a rabies virus vector. *Ecology and Evolution*, 7(14), 5343–5351.
- Pijl, V.D. (1975). The dispersal of plants by bats (Cheiropterochory). *Acta Bot Nederlandica*, 6, 291-315.
- Productora Nacional de biológicos veterinarios. (2018). La importancia de controlar la rabia paralítica bovina. Recuperado de <https://www.gob.mx/pronabive/articulos/la-importancia-de-controlar-la-rabia-paralitica-bovina?idiom=es>

- Quintana, N.H. y Pacheco, V.T. (2007). Identificación y distribución de los murciélagos vampiros del Perú. *Revista Peruana de Medicina experimental y Salud Pública*, 24(1), 81-88.
- Ramírez-Romero, R., Ramírez-Hernández, C., García-Márquez, L. J., Macedo-Barragán, R. J., Martínez-Burnes, J., & López-Mayagoitia, A. (2014). Bovine diseases causing neurological signs and death in Mexican feedlots. *Tropical animal health and production*, 46(5), 823-829.
- Rodhain E. (2015). Bats and Viruses: complex relationships. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique*, 108, 272-289.
- Romero-Almaraz, M.L., Aguilar-Setién, A., Sanchez-Hernández, C. (2006). Murciélagos benéficos y vampiros: características, importancia, rabia, control y conservación. México: IMSS.
- Rupprecht, C.E., Barrett, J., Briggs, D., Cliquet, F., Fooks, A.R., Lumlerdacha, B., et al. (2008). Can rabies be eradicated? Developments in biologicals (Basel), 131. 95-121.
- Rupprecht, C.E., Hanlon, C.A, Hemachudha, T. (2002). Rabies re-examined. *The lancet infectious diseases*, 2, 327-343.
- Salmier A., Tirera S., de Thoisy B., Franc A., Darcissac E., Donato D., et al. (2017) Virome analysis of two sympatric bat species (*Desmodus rotundus* and *Molossus molossus*) in French Guiana. *PLoS ONE*, 12(11), e0186943.
- Sánchez- Hernández, C., Romero-Almaráz, M.L., Flores- Oviedo, A., García- Estrada, C., Villagran-Santa Cruz, M. (2002). *Desmodus rotundus murinus*. En F. A. Noguera, J.H. Vega Rivera, A. N. García Aldrete y M. Quesada Avedaño (Eds.), *Historia natural de chamela* (pp. 568). México: UNAM.
- Schmidt, K.M., Badger, D.D. (1979). Some social and economic aspects in controlling vampire bats. *Proc Okla Acad Sci*, 59, 112–114.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2014). Norma Oficial Mexicana NOM-067-ZOO-2007. Campaña nacional para la prevención y control de la rabia en bovinos y especies ganaderas. Diario oficial. Recuperado de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203509/NOM-067-ZOO-2207_20may11_Ori.pdf
- Seetahal, J.F., Greenberg, L., Satheshkumar, P., Sanchez-Vazquez, M.J., Legall, G., Singh, S., Ramkissoon, V., Schountz, T., Munster, V., Oura, C., Carrington, C. (2020). The Serological Prevalence of Rabies Virus-Neutralizing Antibodies in the Bat Population on the Caribbean Island of Trinidad. *Viruses*, 12(2), 178. doi: 10.3390/v12020178
- Servicio Nacional De Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2020). Indicadores de la Campaña Nacional para la prevención y control de la rabia en bovinos y especies ganaderas. Recuperado de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/553528/Indica_Vigi_Ene-Dici_2019_v2.pdf
- Shi, Z. (2010). Bat and virus. *Protein Cell*, 1(2), 109-114. doi: 10.1007/s13238-010-0029-7
- Sistema de Información Regional de Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas. (2006). Rabia transmitida por murciélagos hematófagos en la región amazónica: Consulta de expertos. Recuperado de <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/VP/rabia-murcielagos.htm>
- Steece, R., Altenbach, J.S. (1989). Prevalence of rabies specific antibodies in the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*) at Lava Cave, New Mexico. *J. Wildl. Dis.*, 25, 490–496.
- Téllez G. A. (1944). El vampiro portador del virus del derriengue. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, (1-2), 35-41.

- Tordo, N., Poch, O. (1988). Structure of rabies virus. En J. B. Campbell y K. M. Charlton. (Eds.), *Rabies* (pp. 25–45). Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Torres, C., Lema, C., Dohmen, F. G., Beltran, F., Novaro, L., Russo, S., y Cisterna, D. (2014). Phylodynamics of vampire bat transmitted rabies in Argentina. *Molecular Ecology*, 23(9), 2340-2352. Doi: 10.1111/mec.12728
- Torres, S., Queiroz Lima, E. (1935). A raiva e sua transmissão por morcegos hematófagos e infectados naturalmente. *Rev Depto Nac Prod Animal*, 2, 1-55.
- Turmelle, A.S., Jackson, F.R., Green, D., McCracken, G.F., Rupprecht, C.E. (2010). Host immunity to repeated rabies virus infection in big brown bats. *Journal General Virology*, 91(9), 2360-2366.
- Vargas, P. (2011). Pobreza, migración y desempleo: mujeres en la región otomí-tepehua de hidalgo. *Nueva antropol*, 24(75), 93-109.
- Velasco-Villa A., Gómez-Sierra, M., Juárez-Islas, V., Meléndez- Félix, A., Vargas-Pino, F., Velázquez-Monroy, O. y Flisser, A. (2002). Antigenic diversity and distribution of rabies virus in Mexico. *Journal of clinical microbiology*, 40(3), 951-958.
- Velasco-Villa A., Orciari, L.A., Juárez-Islas, V., Gómez-Sierra, M., Padilla-Medina, I., Flisser, A., et al. (2006). Molecular diversity of rabies viruses associated with bats in Mexico and others countries of America. *J. Clin. Microbiol*, 44(5), 1697-1710.
- Wang, Y., Xu, W., Guo, H., Gong, W., He, B., Tu, Z., Tu, C., Feng, Y. (2019). Evaluation of a Universal Nested Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction for the Detection of Lyssaviruses, *J. Vis. Exp.*, (147), e59428, doi: 10.3791/59428.
- Warrell, M.J., Warrell, D.A. (2015). Rabies: the clinical features, management and prevention of the classic zoonosis. *Clinical medicine (London, England)*, 15(1), 78-81.
- Wibbelt, G., Marianne S., Schountz, T., Voigt, C. (2010). "Emerging diseases in Chiroptera: why bats?" *Biology letters*, (6), 438-440.
- Wilkerson, J. A. (1995). Rabies: epidemiology, diagnosis, prevention and prospects for worldwide control wilderness and environmental medicine, 48-96. doi: 10.1016/S1080-6032(13)80009-9
- Wong, S., Lau, S., Woo, P., Yuen, K.Y. (2007). Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Reviews in medical virology*, 67-91.
- Wunner, W.H. (2007). Rabies Virus. En A. C. Jackson, W.H. Wunner (2 ed.) *Rabies* (pp. 23-69). Ontario, Canadá: ELSEVIER
- Zhang, T., Wu, Q., Zhang, Z. (2020). Probable origin of SARS-Cov-2 associated with the CoVid-19 outbreak. *Current biology*, 30, 1346-1351.

ANEXO I

Resultados de Concentración y pureza del ARN

Resultados del ARN total obtenido en cada muestra de tejido encefálico, encontrándose dentro del rango de calidad clasificado como óptimo ≥ 1.8 de ARN para pruebas moleculares (Chomczynski, Cizdziel, Simms, 1993) (Tabla 15).

Tabla 17. Concentración y pureza de ARN

Muestra	ng/ μ l	Pureza 260/280
1802	3424.1	2.058
1803	4331.2	2.019
1804	1338	1.844
1805	3337.9	1.893
1905	2091.5	2.055
1806	4052.9	2.051
1807	4238.1	2.096
1808	5757.4	2.133
1809	1970.3	1.879
1810	1523.7	1.789
1811	2556.9	2.054
1812	964.62	2.001
1813	3448.1	2.020
1814	3250	2.080
1815	878.02	1.843
1816	2237	1.989
1917	2790.4	1.998
1918	2537.4	2.054
1920	2708.5	2.043
1921	2793.8	2.025
1922	5803.9	2.138
1923	4604.4	2.108
1924	2907.8	1.731
1925	1367.4	2.021
1926	2710.9	2.078
1927	3550.5	2.076
1928	5194.6	2.091
1929	1256.9	1.966
1930	1236.1	1.903
1931	1005	1.907
1932	1772.1	2.055
1933	3541	1.843
1934	1028.4	2.011
1935	752.32	1.904
1936	2021.6	2.055
1937	2527.5	1.576
1938	4867.8	1.503
1939	4709.3	1.427
1940	709.2	2.028
1941	2369.8	2.085
1942	1719.7	2.038
1943	3085.5	2.084
1944	2133	2.067
1945	2784.2	2.089
1946	5846.7	1.994
1947	5618.3	2.005
1948	5336.8	1.782
1949	2603.5	2.069
1950	2898.1	2.090
1951	3041.4	1.949
1952	642.77	2.047
1953	2229.8	2.002
1954	1440.8	1.962
1955	3993.2	2.090
1956	1307.6	2.046
1957	633.26	1.838
1958	1476.1	1.957
1959	3467	2.084
1960	1115	1.945
1961	744.87	1.901
1962	439.03	1.738
1963	646.76	1.701
1964	948.50	1.552
1965	1360.4	1.945
1966	739.04	1.923
1967	861.94	1.915
1968	1381.2	1.564
1969	414	1.616
1970	540.22	1.780
1971	592.62	1.859

1972	620.97	1.826
1973	5502.5	1.854
1974	245.32	1.481
1975	908.88	1.832
1976	327.40	1.543
1977	1429.4	1.749
1978	250.09	1.647
1979	537.35	1.697
1980	4425.2	1.742
1981	539.98	1.792

ANEXO II



VERDAD, BELLEZA, PROBIDAD

UAT



Facultad de Medicina
Veterinaria y Zootecnia
Dr. Norberto Treviño Zapata

R-AP-05-08-01
VER. 4 ACT. 31/01/2020

A QUIEN CORRESPONDA:

El que suscribe Jefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia "Dr. Norberto Treviño Zapata" dependiente de la Universidad Autónoma de Tamaulipas.

HACE CONSTAR

Que la **MVZ. Esbeydi Abigail Amador Martínez**, realizó una estancia de investigación relacionada con el proyecto de rabia titulado "**Epidemiología molecular del virus rábico en murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) de zonas endémicas de la Región Otomí-Tepehua, Hidalgo**, en el Laboratorio de Diagnóstico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia "Dr. Norberto Treviño Zapata" durante el periodo comprendido del 28 de julio al 28 de agosto del 2020.

Para los fines legales que a la interesada convengan, se extiende la presente en Ciudad Victoria, Tamaulipas a los veintiocho días del mes de agosto del año dos mil veinte.

Atentamente
"Verdad, Belleza, Probidad"


Dr. Hugo Brígido Barrios García



DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INV.
FAC. DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
"DR. NORBERTO TREVIÑO ZAPATA"
CD.VICTORIA, TAM.

c.c.archivo



Km. 5 Carretera Victoria - Mante S/N.
Cd. Victoria, Tamaulipas, México. C.P. 87274

PARA CREAR UNAS BUENAS
PRÁCTICAS DE CALIDAD



Teléfono directo: (834) 312-1061, 312-9531
Commutador: (834) 3181800, ext. 2501, 2502