



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE RHABDOVIRUS MEDIANTE
RETROTRANSCRIPCIÓN EN DOS POBLACIONES DE MURCIÉLAGO VAMPIRO
(*DESMODUS ROTUNDUS*) DEL ESTADO DE PUEBLA.**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

HEBRAN UZIEL ORTEGA ZEMPOALTECATLC

DIRECTOR: DR. PABLO OCTAVIO AGUILAR

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO

Julio de 2022



Mineral de la Reforma, Hgo., a 20 de julio de 2022

Número de control: ICBI-D/937/2022
Asunto: Autorización de impresión.

MTRO. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Con fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio le comunico que el Jurado asignado al Pasante de la Licenciatura en Biología **Hebran Uziel Ortega Zempoaltecatlc**, quien presenta el trabajo de titulación **“Evaluación de la presencia de Rhabdovirus mediante retrotranscripción en dos poblaciones de murciélago vampiro (Desmodus rotundus) del estado de Puebla”**, después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

Presidente Dr. Raúl Ortiz Pulido

Secretario: Dra. Sylvia Martínez Hernández

Vocal: Dr. Pablo Octavio Aguilar

Suplente: Dra. Dulce María Galván Hernández

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
“Amor, Orden y Progreso”

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval
Director del ICBI



Ciudad del Conocimiento
Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia
Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,
México. C.P. 42184
Teléfono: 771 71 720 00 ext. 2231 Fax 2109
direccion_icbi@uaeh.edu.mx

OAAS/AEM



www.uaeh.edu.mx

DEDICATORIA

Dedico esta tesis, resultado de años de trabajo, estudio, esfuerzo y perseverancia a mi mamá Eva, por siempre apoyarme en todas mis decisiones así como de su incondicional e inefable amor y devoción de madre; a mi hermanito Orlando, por su apoyo absoluto con todas las decisiones que he tomado aunado a su lealtad, amistad y sobre todo amor con el que siempre me ha tratado; a mi abuelita, mi mamá Queta, por su cálido y noble amor con el que siempre me ha cuidado desde pequeño y que nunca me ha desalentado de seguir mis sueños.

Al resto de mi familia que de un modo u otro tampoco me han desanimado de perseguir todas mis objetivos y metas brindándome un valioso consejo, su desinteresada ayuda y más aún importante, su total amor y cariño.

A mis amigos, Mario, Lesly, Guadalupe y Abigail, que siempre han estado para mí, ayudándome no solo académicamente sino emocionalmente al cambiar una lágrima por una risa o ponerme los pies sobre la tierra y, por supuesto, por quererme a su muy particular y fraterno modo de hacerlo.

AGRADECIMIENTOS

A la UAEH, por abrirme las puertas y recibirme dentro de su comunidad universitaria, así como otorgándome todas las herramientas necesarias para la realización de mis estudios y esta tesis.

Al Dr. Alberto Rojas Martínez, por proporcionar el material de estudio, así como por brindar asesoría y compartir su conocimiento para la realización de este trabajo.

Al Mtro. Mario, el codirector *de facto* de este trabajo, por ser un gran guía y un excelente amigo y compañero cuya invaluable ayuda ha sido determinante para la culminación de esta tesis.

Al Dr. Pablo, por ser un mentor y un excelente maestro que a pesar de mis errores permaneció conmigo y no me dejó a mi suerte, con lo que, sin su ayuda, jamás habría terminado este trabajo. También por ser una inspiración que me ha ayudado a enfocar el camino que quiero seguir con todos los valores y principios que le he aprendido.

Al Dr. Luis Fernando Rosas Pacheco, por su inestimable ayuda al permitirme usar los equipos de su laboratorio bajo su cargo.

Agradezco a Dios, por haberme permitido vivir todos estos años de universidad con salud, así como haber puesto en mi camino maravillosas personas que se han convertido en seres queridos muy importantes.

A mi familia por su eterno apoyo, amor y motivación para seguir superándome día a día.

Al resto de mis compañeros de laboratorio e investigadores adscritos que colaboraron, ayudaron y orientaron para poder realizar este trabajo.

CONTENIDO

Permiso de impresión (anexar cuando sea autorizado)	I
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
CONTENIDO	IV
ÍNDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ABREVIATURAS	VIII
1 RESUMEN	1
2 INTRODUCCIÓN	2
3 ANTECEDENTES	4
3.1 Generalidades del virus	4
3.1.1 <i>Taxonomía y filogenia</i>	4
3.1.2 <i>Morfología y Estructura</i>	5
3.1.3 <i>Transcripción y replicación viral</i>	8
3.2 Diagnóstico molecular	9
3.2.1 <i>Inmunodetección</i>	10
3.2.2 <i>Retrotranscripción</i>	11
3.3 Biología del vector	13
3.3.1 <i>Generalidades</i>	13
3.3.2 <i>Ecología y comportamiento</i>	13
3.3.3 <i>Implicaciones económicas</i>	15
4 HIPÓTESIS	16
5 JUSTIFICACIÓN	16
6 OBJETIVO GENERAL	17
7 OBJETIVOS PARTICULARES	17
8 METODOLOGÍA	18
8.1 Sitio de estudio	18
8.2 Colecta de material	18
8.3 Extracción de cerebros del murciélago vampiro	19
8.4 Extracción de RNA	20
8.5 Limpieza con cloruro de litio	22
8.6 Retrotranscripción y amplificación	22
9 RESULTADOS	24
9.1 Caracterización poblacional	24
9.2 Estandarización de los protocolos de aislamiento del RNA	24
9.3 Retrotranscripción	25
10 DISCUSIÓN	26
12 CONCLUSIÓN	31
13 REFERENCIAS	32

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1. Sets de primers utilizados tanto en RT-PCR como PCR.....	23
Tabla 2. Materiales usados en las reacciones de PCR.	23
Tabla 3. Estructura poblacional de las colonias de <i>Desmodus rotundus</i> analizadas.	24
Tabla 4. Cuantificación de calidad y cantidad de RNA extraído. Individuos en rojo representan casos positivos a lyssavirus, AM: adulto macho, AH: adulto hembra, AH/G: adulto hembra gestante, AH/L: adulto hembra lactante.	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema lateral del virión. Los viriones de la rabia tienen forma de bala con peplómeros de glucoproteína con forma de espiga de 10 nm que cubren la superficie. La ribonucleoproteína está compuesta de RNA encerrado en nucleoproteína (Adaptado de: CDC, 2019).....6

Figura 2. El diagrama en sección transversal muestra las capas concéntricas: bicapa de membrana envolvente, proteína M y RNA genómico encapsulado (Basado en CDC, 2019).....7

Figura 3. Ciclo de infección de RABV en neuronas de mamíferos. 1: Adsorción (receptores e interacción de viriones). 2: Penetración (entrada de virus). 3: Desdoblamiento (eliminación de nucleocápside). 4. Transcripción (síntesis de RNAm+ a partir de RNA-). 5. Traducción (síntesis de proteínas estructurales a partir de los mensajeros parciales). 6. Procesamiento (glicosilación de proteínas G en las membranas). 7. Replicación (producción de RNA- genómico a partir de una cadena intermedia positiva). 8. Ensamblaje (integración de todos los elementos). 9: Liberación de viriones completos recubiertos de la membrana del hospedero (Basado en CDC, 2019).....8

Figura 4. Transcripción del genoma del virus de la rabia. El RNA de cadena negativa encapsulado (naranja) sirve como plantilla para la transcripción por el complejo de polimerasa. La transcripción comienza con un RNA líder corto sin tapa (leRNA) desde el extremo 3' del RNA genómico. Esto es seguido por la transcripción de 5 mRNAs con extremo un extremo (C) y poliadenilado (A), que codifican las proteínas virales, las flechas indican el inicio de la traducción y las marcas rojas un codón de paro (Basado en Schnell et al., 2009).9

Figura 5. A) Murciélago vampiro congelado, B) Material de trabajo estéril, C), Corte transversal-occipital, D) Corte frontal-occipital, E) Extracción de lóbulo para respaldo, F) Maceración en nitrógeno de lóbulo restante, G) Macerado para extracción, H) Macerado en buffer de extracción con inactivador de RNAsa al 1%.....20

Figura 6. Electroforesis de acrilamida de los productos de PCR anidada. Las flechas indican la banda correspondiente al cDNA de lyssavirus. A la izquierda se indica con una flecha roja el individuo 4 de Caltepec, positivo. A la derecha se muestran los individuos Zapotitlán, el indicador de tamaño y los individuos 6, 15, 17 y 20 positivos para rabia. La flecha azul indica los autómeros y las bandas inespecíficas.26

Figura 7. A) Árbol filogenético de nucleoproteína (N) de lyssavirus completos, comparando aislamientos mexicanos, variantes representativas de reservorios carnívoros, procedencias del viejo mundo y un caso de una nueva variante en un inmigrante de Oaxaca. B Mapa con la ubicación de las muestras representativas asociadas con la rabia

transmitida por murciélagos vampiro en México y Estados Unidos, además de las
procedentes de *Tadaria brasillensis* (Tomado de: Velasco-Villa et al., 2008).31

ABREVIATURAS

BHK-21	Línea germinal de células de riñón de hámster bebé subclona 21
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades)
cDNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico) complementario
DNTPs	Dinucleótidos trifosfato
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
kb	Kilobases (1000 bases)
leRNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico) líder
LiCl	Cloruro de Litio
MgCl	Cloruro de Magnesio
NaOAc	Acetato de Sodio
N	Nucleoproteína viral
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PV	Polimerasa viral
qPCR	Reacción en cadena de polimerasa cuantitativo
RABV	Virus de la rabia
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico)
RNAm	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico) mensajero
RNP	Ribonucleoproteína helicoidal
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa cuantitativo
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
TCID50	<i>Median Tissue Culture Infectious Dose</i> (Dosis infectante cultivo celular)
TE-SDS	Tris ácido etildiaminotetraacético-dodecilsulfato sódico
TISs	Señales de iniciación de transcripción
TTP	Señales de terminación de poliadenilación de la transcripción

1 RESUMEN

Diversos brotes de rabia paralítica bovina han sido ampliamente documentados en México. Sin embargo, existen deficiencias para detectar oportunamente dichos brotes debido al uso de técnicas serológicas que requieren la presencia del virus activo con una alta carga viral. Por tanto, este trabajo fue realizado como una aproximación molecular del problema, para lograr un mejor manejo de dichos brotes optimizando su detección oportuna. Se propone al RT-PCR como una alternativa fiable al uso de técnicas serológicas, ya que pueden arrojar resultados sin la necesidad de muestras post-mortem de las vacas, directamente en el vector. Para sustentarlo, se colectaron murciélagos vampiro (*Desmodus rotundus*) de dos poblaciones, una de Caltepec y otra de Zapotitlán ambas en el estado de Puebla, se extrajo material genético (RNA) de muestras de cerebros, se cuantificó y evaluó su calidad y cantidad para después someterlo a análisis mediante RT-PCR. Los resultados mostraron la presencia de Rhabdovirus en al menos seis individuos, mayoritariamente machos de Zapotitlán. Así mismo, esta técnica demostró ser altamente sensible y específica. Basados en la información obtenida se identificó la presencia del virus activo y en fase lisogénica (no activo), con mayor incidencia en la población de Caltepec, y con prevalencia en machos por sobre las hembras. Estos resultados permiten identificar zonas de riesgo en pastizales ganaderos aledaños a la población de Caltepec y predecir una tendencia epidemiológica en el vector, basados en el comportamiento de cortejo y gestación, propagado principalmente por machos jóvenes en etapa reproductiva.

2 INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el virus de la rabia (RABV) constituye un riesgo de salud pública debido a su alta letalidad en caso de que los infectados no reciban el tratamiento adecuado a tiempo. Además, este virus constituye un riesgo económico y ecológico al provocar rabia paralítica bovina, popularmente conocida como derrengue, misma que es transmitida por el murciélago vampiro.

Según datos del gobierno de México (SENASICA, 2018), tan solo en 2018 se reportaron 457 casos positivos en el país, donde Veracruz presentó la mayor cantidad de ellos (83). Es de resaltar que Hidalgo y Puebla figuran con 21 y 40 casos respectivamente, por lo que este último se ubica como el segundo estado con más ganado afectado. Los datos sugieren que la proximidad entre Puebla y Veracruz podría englobar un problema regional más que estatal. De acuerdo con Acha (1968), este problema se presenta solamente en América Latina, afectando a diversos países entre los que se encuentra México, señala que las condiciones de temperatura presentes en la zona mencionada son propicias para el desarrollo de colonias de murciélagos vampiro. El mismo autor refiere que los casos de infección con rabia se deben a que es precisamente el ganado quien irrumpe en la zona de alimentación del quiróptero. Así mismo, los datos presentados por Zarza et al. (2017), muestran que una gran parte del país, exceptuando la zona norte, es apropiada para la subsistencia de los murciélagos vampiros, aun cuando no son autóctonos sino fauna invasora procedente de Sudamérica.

Se reconocen como áreas potenciales de ocupación las selvas o bosques templados, tales como los existentes en las Sierras Madre Oriental y Occidental. Lo anterior se corrobora con la información del SENASICA (2019) donde se muestra la coincidencia entre las regiones con mejores condiciones para el vampiro y el mayor

número de contagios. Aunado a lo anterior, es importante la detección oportuna de brotes para evitar núcleos epizoóticos.

Al respecto, en México la técnica estandarizada para la detección de RABV es la inmunofluorescencia (InDRE, 2017). Esta es fiable y efectiva en muestras encefálicas *post-mortem* de vacas infectadas con el virus activo; es decir que contenga las proteínas del virión en cantidad suficiente para que haya reacción inmunológica.

El utilizar técnicas que puedan detectar el virus, tanto en fase activa como latente, no solo en el hospedero sino en el vector portador a gran escala, hace posible una vigilancia epidemiológica y epizoótica efectiva, controlar poblaciones específicas del vector y mejorar las técnicas de control que hasta el momento se han utilizado para la prevención de daños ecológicos y económicos. Por lo anterior, en este trabajo se determinó la incidencia del virus de la rabia en muestras de cerebro del murciélago vampiro *Desmodus rotundus*, mediante la técnica de retrotranscripción, para establecer zonas de riesgo zoonótico en Puebla.

3 ANTECEDENTES

3.1 Generalidades del virus

3.1.1 Taxonomía y filogenia

El virus de la rabia pertenece al orden Mononegavirales, que son virus con genomas de RNA de cadena negativa no segmentados. Dentro de este grupo, se clasifican en la familia Rhabdoviridae, que incluye al menos tres géneros de virus con hospederos animales: *Lyssavirus*, *Ephemerovirus* y *Vesiculovirus* (CDC, 2019). Es de notar que dicha familia no posee recombinación significativa por lo que sus miembros parecen tener genomas altamente conservados, aunque se ha reportado que el gen P tiende a tener más cambios en su secuencia que el resto del genoma, probablemente por el papel que tiene en la transcripción y replicación del virus (Chare et al., 2003; Jordan et al., 2000). No obstante, Bourhy (2005) refiere en su estudio hecho con filogenia del gen L, que los múltiples integrantes de la familia Rhabdovirus no parecen tener un vínculo bien definido en virtud de que esta familia abarca virus que infectan plantas, peces, insectos y mamíferos, por lo que rastrear un ancestro común parece complicado y que más bien la diversidad de esta familia se debe a los distintos modos de infección y vida de sus integrantes.

El virus de la rabia pertenece al género *Lyssavirus* y es altamente neurotrópico en el huésped infectado por lo que, invariablemente causa una encefalomielitis mortal. Dicho género incluye al virus de la rabia (RABV), virus del murciélago de Lagos, virus de Mokola, virus de Duvenhage, virus de murciélago europeo 1 y 2 y virus de murciélago australiano (Murphy et al., 1995; Wunner, 2003). Filogenéticamente, se ha utilizado el gen N para clasificar a dichas especies dando como resultado la identificación de los virus listados previamente (Nadin-Davies, 2007). Cuando la filogenia se basa únicamente en este gen conservado todos parecen tener el mismo ancestro, cuyo centro de origen no está

bien definido, aunque se predice que pudiera tener lugar en el algún punto de África, Europa, Asia o Australia, condición que parece no darse con los Mokola virus (Badrane y Tordo, 2001). En todo caso, los virus que encontramos en México están emparentados con los procedentes de Sudamérica y constituyen un grupo bien delimitado. En otras palabras, tres de los cinco genes que conforman su genoma (N, L y P) tienen diferentes tasas de mutación determinadas por su interacción con el hospedero, la forma de infección y el origen del género.

3.1.2 Morfología y Estructura

Los Rhabdovirus están envueltos con una cápside típica en forma de bala o bastón para el caso de los virus de los vertebrados o con forma baciliforme para los organismos vegetales y se caracterizan por un espectro extremadamente amplio de huéspedes que abarca desde plantas, hasta insectos y mamíferos (Knudson, 1973; Jackson et al., 2005; Dietzgen et al., 2017). Justo como lo indica el nombre de la familia a la que pertenece, estos virus tienen un genoma de RNA de cadena negativa no segmentado único y comparten una organización genómica típica y un modo de expresión génica particular. Su información genética está presente en forma de un complejo de ribonucleoproteína helicoidal (RNP), en el que el RNA lineal está estrechamente asociado con la nucleoproteína viral (N). El genoma del virus tiene aproximadamente 12 kb, que codifica cinco proteínas (Albertini et al., 2011).

El RNA encapsulado, es una plantilla funcional para la transcripción y la replicación, pero no funciona como un mensajero desde el inicio de la infección ya que requiere pasar de un mensaje negativo a uno positivo, de aproximadamente una longitud de 50-100 nucleótidos, con marco de lectura de 3' a 5', por lo que requiere una RNA polimerasa dependiente de RNA, codificada por el propio virus y encapsulada junto con el RNP. Al iniciar la transcripción, se irá desplazando a lo largo del genoma para

transcribir un RNA líder corto y entonces transcribir, poliadenilar y encaperuzar (*capping o cap*) el resto de RNA mensajeros de los otros genes. Esta polimerasa viral, conocida como proteína L; forma un complejo con una fosfoproteína que constituye la subunidad no catalítica del complejo de polimerasa (Tordo et al., 1986; Jackson et al., 2005).

La cápside o envoltura con la característica forma de bala propia de los Rhabdovirus, está rodeada por la membrana tomada de la célula huésped, la cual interactúa con dos proteínas virales, la proteína de la matriz y la glicoproteína, que a su vez es la encargada de realizar la interacción entre virus y células, su estructura es trimérica (Gaudin et al., 1992; Iwasaki et al., 2004; Ma et al., 2014). En un nivel estructural, la proteína de la matriz funciona como un puente entre el virus de la rabia y la membrana del virión. La proteína de la matriz interactúa y condensa la RNP, produciendo la forma helicoidal típica de la RNP que se encuentra dentro de los viriones (Conzelmann et al., 1990) (Figuras 1 y 2).

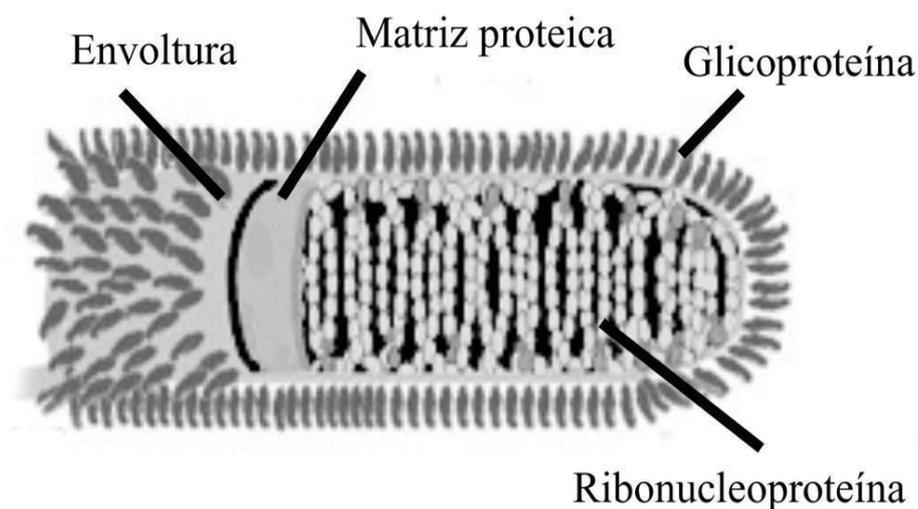


Figura 1. Esquema lateral del virión. Los viriones de la rabia tienen forma de bala con peplómeros de glicoproteína con forma de espiga de 10 nm que cubren la superficie. La ribonucleoproteína está compuesta de RNA encerrado en nucleoproteína (Adaptado de: CDC, 2019).

CORTE TRANSVERSAL

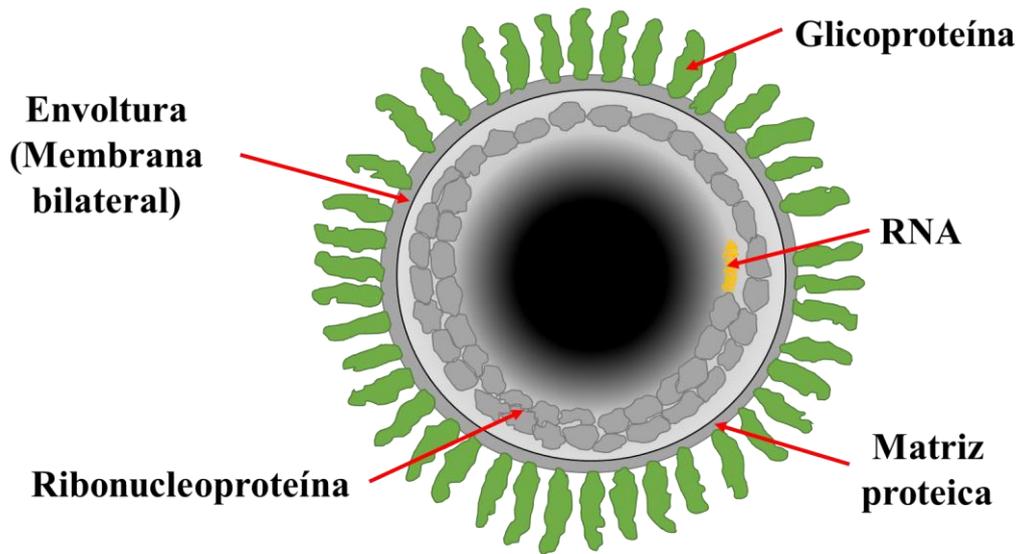


Figura 2. El diagrama en sección transversal muestra las capas concéntricas: bicapa de membrana envolvente, proteína M y RNA genómico encapsulado (Basado en CDC, 2019).

El ciclo de infección del virus de la rabia en una célula infectada se puede dividir en tres fases (Schnell et al., 2009): La primera incluye la unión y la entrada en la célula huésped por endocitosis, seguida de la fusión de la membrana viral y la membrana de la endosoma, para liberar el genoma viral (sin recubrimiento). En la segunda fase, se producen componentes de viriones (transcripción, replicación y síntesis de proteínas). La última fase del ciclo es el ensamblaje de los componentes virales, gemación y liberación de los viriones, que pueden iniciar una nueva ronda de infección. Estas tres etapas pueden subdividirse de acuerdo con procesos intermedios (Figura 3) como la remoción de la envoltura y de la nucleoproteína para la posterior liberación del RNA de cadena simple negativa junto con la polimerasa de RNA dependiente de RNA.

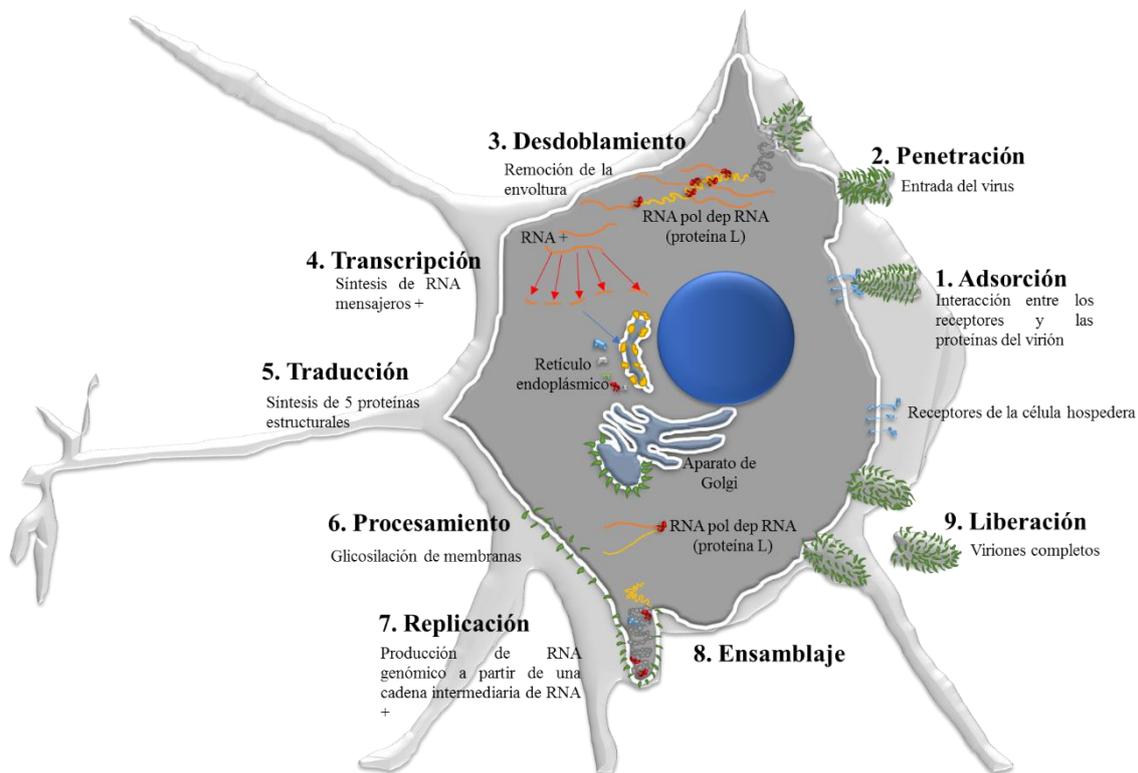


Figura 3. Ciclo de infección de RABV en neuronas de mamíferos. 1: Adsorción (receptores e interacción de viriones). 2: Penetración (entrada de virus). 3: Desdoblamiento (eliminación de nucleocápside). 4: Transcripción (síntesis de RNA⁺ a partir de RNA⁻). 5: Traducción (síntesis de proteínas estructurales a partir de los mensajeros parciales). 6: Procesamiento (glicosilación de proteínas G en las membranas). 7: Replicación (producción de RNA⁻ genómico a partir de una cadena intermedia positiva). 8: Ensamblaje (integración de todos los elementos). 9: Liberación de viriones completos recubiertos de la membrana del hospedero (Basado en CDC, 2019).

3.1.3 Transcripción y replicación viral

Como ya se ha mencionado, RABV es un virus de una sola hebra de RNA de sentido negativo, lo cual consiste en que el virus sintetiza una hebra de RNA⁺ a partir de la negativa para usarlas posteriormente como mRNA. Además, la hebra de RNA⁻ sirve de molde para la creación de copias del genoma viral para su empaquetamiento en otras partículas virales (Clark et al., 2019).

Tordo et al. (1986) refiere que su genoma está compuesto por 5 genes y contiene múltiples regiones intergénicas no codificantes que flanquean a cada gen y cada gen a su vez, posee pequeñas regiones que inician o terminan la transcripción. Estas regiones son

llamadas señales de iniciación de transcripción (TISs) y señales de terminación de poliadenilación de la transcripción (TTP) (Figura 4). Estas TTP tienen como secuencia 3' -A/U-C-U-U-U-U-U-U-U-G-5'. Los uracilos presentes en esta secuencia ayudarán, por medio de una RNA polimerasa, a producir la cola poliadenilada del mRNA (Tordo et al., 1986). A nivel molecular, la transcripción tiene lugar cuando el complejo de la polimerasa tiene acceso al RNA viral y reconoce y transcribe un promotor específico (RNA líder o guía) que transcribirá, poliadenilará y encaperuzará (*capping o cap*) el resto de RNA mensajeros de los otros genes, empezando por la cola poliadenilada 3' del genoma hasta la 5'. El control de la polimerasa estará a cargo de las señales de inicio o término antes mencionadas (Albertini, 2011, Walker et al., 2011).

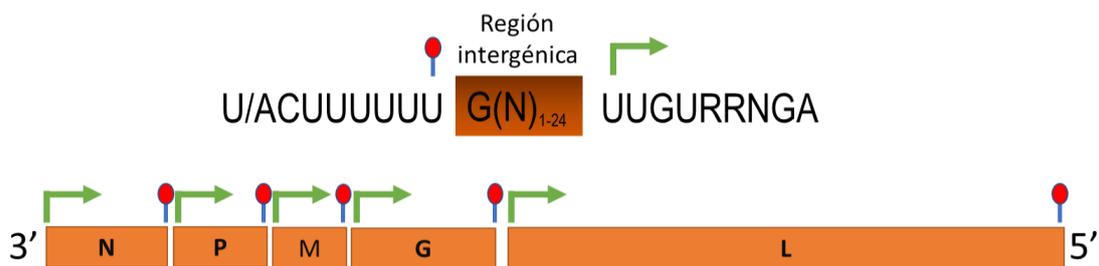


Figura 4. Transcripción del genoma del virus de la rabia. El RNA de cadena negativa encapsulado (naranja) sirve como plantilla para la transcripción por el complejo de polimerasa. La transcripción comienza con un RNA líder corto sin tapa (leRNA) desde el extremo 3' del RNA genómico. Esto es seguido por la transcripción de 5 mRNAs con extremo un extremo (C) y poliadenilado (A), que codifican las proteínas virales, las flechas indican el inicio de la traducción y las marcas rojas un codón de paro (Basado en Schnell et al., 2009).

3.2 Diagnóstico molecular

De acuerdo a Kumar (2013), los métodos más utilizados para identificar a los virus se pueden subdividir en tres categorías: técnicas que miden la infectividad viral (ensayo de placa viral, TCID50 y ensayo de focos de inmunofluorescencia), los que examinan el ácido nucleico y las proteínas virales (qPCR, inmunotransferencia, inmunoprecipitación, ELISA y ensayo de hemaglutinación) y aquellos que dependen del conteo directo de

partículas virales físicas (citometría de flujo viral y microscopía electrónica de transmisión). Estos últimos están relacionados con cultivos celulares y microscopía, por lo que se vuelven particularmente problemáticos debido a que se necesita personal capacitado y con experiencia para realizar un diagnóstico fiable y certero sin el riesgo inherente de contagio (Zhang et al., 2013).

Otros inconvenientes de los cultivos celulares para la detección de virus residen en que para realizarlos se requiere personal capacitado dedicado al cuidado de las placas 24/7 lo que pueden superar los costosos de las técnicas de biología molecular, se requiere equipo adecuado para los ensayos, sin mencionar que la sensibilidad y especificidad puede ser menor. Por lo anterior, se recomiendan otro tipo de técnicas para su diagnóstico e investigación (Leland y Ginocchio, 2007; Hematian et al., 2016).

3.2.1 Inmunodetección

La inmunofluorescencia es una técnica que utiliza anticuerpos marcados o conjugados con fluorescencia para detectar antígenos diana específicos. Los anticuerpos son proteínas complejas producidas por células B que generan una respuesta inmune específica-adaptativa contra un antígeno. Son usados principalmente en secciones de tejidos congelados, “frotis” celulares o células cultivadas. El antígeno se detecta a través de la unión a la molécula viral en la muestra con los anticuerpos modificados específicos contra agente. La modificación es el "marcado" del anticuerpo con un fluorocromo que absorbe la luz ultravioleta de una longitud de onda definida, pero transmite luz a una longitud de onda más alta. La luz emitida se detecta ópticamente con un microscopio especial equipado con filtros específicos para la longitud de onda de emisión del fluorocromo (microscopía confocal). El fluorocromo puede unirse directamente al anticuerpo específico del agente (inmunofluorescencia directa) o puede unirse a una molécula anti-inmunoglobulina que reconoce el anticuerpo específico del agente (inmunofluorescencia

indirecta). El método indirecto mejora la sensibilidad de la prueba, pero también puede aumentar el fondo. Esta técnica se usa ampliamente tanto en investigación científica como en laboratorios clínicos (Odell y Cook, 2013; Maclachlan y Dubovi, 2016).

A nivel internacional, el Comité de Expertos en Rabia, de la Organización Mundial de Salud refiere en su octavo informe (OMS, 2018) que la técnica predilecta para el diagnóstico de dicho virus es precisamente la inmunofluorescencia, debido a que el antígeno puede detectarse a simple vista y a esta prueba puede efectuarse en el terreno mediante un kit o estuche especial para este propósito. A nivel nacional, el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), de igual manera menciona en sus Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de la Rabia (InDRE, 2017) que la técnica preferida es la inmunofluorescencia. Dichas organizaciones contemplan esta técnica en los diagnósticos *post-mortem* y en algunos casos *ante-mortem*. Lo anterior se ve sustentado en diversos estudios que han diagnosticado rabia en varios animales, incluidos humanos. Casos concretos son el de Schneider y Furusho (1966) que lo detectaron al procesar muestras de cerebro y glándulas submaxilares de perros; Debbie et al. (1972) que logró detectar el virus en cultivos celulares de fibroblastos renales de hámster bebé (BHK-21) infectados; y López-Santa Cruz et al. (2013) que aplicaron esta metodología para la detección en quirópteros.

3.2.2 *Retrotranscripción*

El diagnóstico de RABV mediante la retrotranscripción es igualmente un método muy confiable que es recomendado tanto por la OMS como por el InDRE. Su voto de confianza se lo ha ganado en parte por su alta fiabilidad y sensibilidad. El proceso es simple: se extrae el material genético viral de alguna muestra biológica y se aísla, posteriormente se realiza la detección del RNA viral mediante la amplificación de este a través de la retrotranscriptasa por medio de la RT-PCR, la cual dará como resultado una

hebra de cDNA. Este cDNA será amplificado y convertido a DNA en una PCR normal o anidada, usando como enzima a la Taq polimerasa (Heaton et al., 1997; Araujo et al., 2008). Para dicho proceso se requieren de primers o cebadores específicos de ambos sentidos, tanto forward y reverse para la formación de cDNA (Kamolvarin et al., 1993). En este sentido, el origen de buena parte de los primers específicos para rabia provienen del gen N debido a que este es conservado y fuertemente expresado en los miembros de *Lyssavirus* además de que ha sido estudiado ampliamente (Bourhy et al., 1993; Wacharapluesadee & Hemachudha, 2010). Además, al estar ubicado en el primer segmento del RNA viral de cadena negativa, la retrotranscripción puede generar un transcrito completo si se usa un primer degenerado para las regiones de paro (UUGURRNGA) que incluya los cinco replicones, y a su vez obtener cDNAs para segmentos parciales como NP, NPM, NPMG y NPMGL, lo que se traduce en una infección activa con los mensajeros de RNA+ parciales. Así, un organismo con solo un producto de amplificación no estará activo al no transcribir los fragmentos codificantes (Figura 4).

Al respecto de la técnica, en los últimos años ha tomado mayor relevancia el uso de la qPCR (PCR cuantitativa) y su variante para RNA, RT-qPCR, de hecho, instituciones como el InDRE (2017) o la Organización Mundial de Sanidad Animal (2018) recomiendan el uso de esta variante para la detección de diversos patógenos entre ellos RABV. Si bien la técnica de RT-PCR convencional es buena, su variante en tiempo real cuantitativa lo es aún más por su alto grado de sensibilidad y rapidez para establecer un diagnóstico y la carga viral, por lo que se puede entender la razón de que sea preferida la segunda por sobre la convencional. En el contexto de los diagnósticos para rabia, Nagaraj et al. (2006) por ejemplo, muestra en su estudio que la técnica de RT-qPCR tiene más sensibilidad para establecer un diagnóstico y Aravindh-Babu et al. (2012) refiere lo

mismo, pero indica también que la instrumentación para esta técnica es muy costosa. Fuera de la esfera de influencia de la rabia, también se reportan resultados similares en trabajos hechos con virus en donde la variante de tiempo real tiene mejores resultados que la convencional (Pang et al., 2004; Deng et al., 2005; Zhao et al., 2007). Por tanto, es claro que la mejor técnica para diagnósticos ante mortem es RT-PCR en cualquiera de sus variantes.

3.3 Biología del vector

3.3.1 Generalidades

El murciélago vampiro pertenece al orden Chiroptera el cual a su vez posee dos subórdenes, Megachiroptera y Microchiroptera. El primero posee entre sus miembros a los grandes murciélagos frugívoros mientras que en el segundo se encuentran todos los demás quirópteros y que son de distribución mundial, misma al que pertenece *Desmodus rotundus* (Arellano-Sota, 1988). Anatómicamente, Villa-Ramírez (1976) menciona las características propias de estos mamíferos comprendiendo desde su pequeño tamaño (menos de 9 cm), fosas nasales abiertas con una nariz en forma de hoja, cráneo corto de forma cónica, diferentes tipos de coloración castaña en su pelo, membrana interfemoral corta, huesos de las piernas largos y una característica única del género *Desmodus* que es un pulgar largo con dos almohadillas.

3.3.2 Ecología y comportamiento

Arellano-Sota (1988) refiere que estos pequeños mamíferos son de distribución tropical y que únicamente se encuentran en dicha región del continente americano, preferentemente en Sudamérica. Así mismo, dado la naturaleza propia de esta región donde abunda la selva húmeda, es muy frecuente que el murciélago vampiro utilice como refugios o nidos, árboles o bien, cuevas. Lo anterior se ve sustentado en lo reportado por

Rocha et al. (2020) donde muestra que dicho organismo utiliza prácticamente cualquier cavidad incluyendo construcciones humanas. Se teoriza que el uso de cavidades como refugios se debe a sus hábitos nocturnos en virtud de que no salen a alimentarse cuando hay luz de la luna porque, en presencia de esta, los vampiros tienen más probabilidades de ser descubiertos por sus presas por lo que prefieren usar la oscuridad completa para su alimentación (Crespo et al., 1972). En este sentido se ha identificado que *D. rotundus* tiene preferencia por el ganado, especialmente vacuno y se asocia con la facilidad por ubicar al ganado, mayor aporte nutricional del mismo y por la poca respuesta de defensa (Acha, 1968; Voigt y Kelm, 2006). La relación directa con RABV se manifiesta en sus hábitos de limpieza y el modo en que el murciélago vampiro depreda a sus presas. Varios estudios (Greenhall, 1965; Crespo et al., 1972) describen las extensas sesiones de limpieza que realizan los vampiros en las cuales llegan a invertir más de media hora, con un trato especial en sus alas. Es innegable que un murciélago infectado con RABV disemine el virus por todo su cuerpo, lo que lo convierte en un fomite (vector pasivo) por sí mismo. Dado lo anterior, cuando ataca a sus presas es muy seguro que infecte a estos en virtud del modo de alimentación. Cuando *D. rotundus* ubica a su presa, vuela alrededor de ella por varios minutos hasta colocarse en el cuello u orejas, aunque también lo puede hacer en otras partes del cuerpo como axilas o patas, para empezar a alimentarse, si el animal reacciona el vampiro vuela, pero regresa al poco tiempo pudiendo permanecer por varios minutos alimentándose (Greenhall et al., 1971; Johnson et al., 2014). Por otro lado, la seroprevalencia en los vampiros tiende a ser alta cuando las infecciones se encuentran activas. Se calcula que entre el 29 al 80% de los vampiros en una colonia podrían estar infectados si es que existen intercambios entre cuevas cercanas que faciliten la transmisión, por lo que las técnicas actuales de control no son efectivas si es que existen estos niveles de dispersión (Becker et al., 2020).

3.3.3 Implicaciones económicas

Como ya se mencionó anteriormente, *D. rotundus* tiene hábitos nocturnos que están estrechamente relacionados con la luz de la luna. Sin embargo, existen características de comportamiento que las hacen de particular interés para el estudio de RABV y sus implicaciones económicas que repercuten directamente en lo ecológico. En el estudio publicado por Voigt y Kelm (2006) que se realizó utilizando isótopos de carbono para identificar qué tipo de presas preferían los vampiros, mostró una marcada preferencia por animales que se alimentaban con plantas C4, las cuales son habituales en la alimentación del ganado. Dado lo anterior, es evidente que existe un patrón en la dinámica ecológica de los lugares donde se han presentado los brotes del virus: la ganadería y la agricultura se valen, en la mayoría de los casos, de la deforestación para la obtención de nuevas tierras trabajables, pero a su vez abren nuevas fronteras donde confluyen animales silvestres, como el vampiro, y domésticos, como las vacas, convirtiendo a esas zonas perturbadas en caldos de cultivo para la propagación del virus de la rabia y del propio *D. rotundus*.

Las pérdidas económicas que genera la rabia en Puebla representan un riesgo ambiental para otras especies de murciélagos que no se alimentan de sangre, debido a que los pobladores al tratar de eliminar al murciélago vampiro, destruyen y perturban directamente los refugios, que son principalmente quemados o destruidos. Igualmente se sabe que utilizan gases venenosos, insecticidas, humo, o el uso de sustancias tóxicas (Juárez-Castillo, 2012). Muchas veces los refugios son habitados y visitados por diferentes especies de murciélagos, las cuales se ven afectadas negativamente por el daño en el refugio. Es por ello, por lo que es necesario conocer cómo se propaga la rabia entre los refugios y además es necesario realizar un control preventivo, el cual garantice el control del murciélago vampiro, sin afectar a las otras especies que se encuentran compartiendo los refugios con *D. rotundus*.

4 HIPÓTESIS

La retro-transcripción es una herramienta molecular sensible a la presencia de RNA viral con una alta especificidad, aunque no se utiliza como una prueba rutinaria en los vectores de la rabia *Desmodus rotundus* y solo se usa en ganado para verificar la infección debido a su costo, razón por la que SENASICA ha declarado que en la región del estudio no existen casos comprobados de rabia bovina. Por lo tanto, si existe una zoonosis potencial causada por el virus de la rabia en alguna población de murciélagos vampiro de Puebla, la herramienta molecular será capaz de cuantificar la incidencia del virus en los cerebros de los vectores infectados sin necesidad de esperar a que se presenten casos en el ganado.

5 JUSTIFICACIÓN

El virus de la rabia constituye un riesgo de salud pública debido a su alta letalidad en casos sin tratamiento, además constituye un riesgo económico y ecológico al provocar rabia parálitica bovina transmitida por el murciélago vampiro. Los datos indican la presencia del virus en Veracruz, Hidalgo y Puebla, por lo que la zoonosis se puede considerar un problema regional en auge dado que las poblaciones del vector se han extendido a zonas frías y templadas donde no existían previamente, ya que las condiciones de temperatura actuales son propicias para el desarrollo de colonias de murciélago vampiro, además que la extensión ganadera brinda nuevas fuentes de alimento al murciélago. Por lo anterior, es importante la detección oportuna de contagios para evitar brotes epizooticos con una técnica eficiente y rápida, que no solo debe aplicarse a ganado infectado sino a los vectores, a manera de prevención. A nivel económico, el estado de Puebla produjo, solo en 2020, 41,136.819 toneladas de carne bovina con un valor de 2,062,350.141 millones de dólares, así como 77507.691 toneladas de ganado de

pie bovino valuadas en 1,969,630.31 millones de dólares ingresando a los ganaderos más de 80 millones de pesos, según la SENASICA en su publicación “Rabia parálitica en bovinos y especies ganaderas. Análisis en México”. Los anteriores datos hacen visible el potencial impacto económico que podría tener brotes más frecuentes y acentuados en dicho estado, tan solo en el 2020 hubo pérdidas por 4.39 millones de pesos y si consideramos que la ganadería bovina es la segunda actividad más extendida en el medio rural es innegable el riesgo para los productores que dependen de esta actividad (SENASICA, 2021).

Este trabajo es una aproximación molecular que permitirá identificar en el vector la presencia de virus de la rabia en zonas ganaderas donde se han reportado casos de derriengue y donde la SENASICA (2020) predice que no existe la zoonosis. Los resultados permitirán a los ganaderos afectados realizar las acciones necesarias para el control de las poblaciones de murciélago vampiro *Desmodus rotundus*.

6 OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia del virus de la rabia en cerebros de murciélago vampiro *Desmodus rotundus*, mediante RT-PCR; para establecer el grupo demográfico con mayor prevalencia en dos cuevas del estado de Puebla durante el año 2019.

7 OBJETIVOS PARTICULARES

- Estandarizar un protocolo de aislamiento de RNA a partir de muestras de cerebro de *Desmodus rotundus*, que permita extraer de manera segura, eficiente y de forma rutinaria la molécula de RNA.

- Determinar los parámetros de retro-transcripción, tanto para la partícula viral como para un control positivo, que permitan determinar la infección de forma inequívoca.
- Caracterizar la estructura demográfica de *Desmodus rotundus* en dos poblaciones del estado de Puebla, mediante la identificación del estado reproductivo de los individuos; para establecer los parámetros poblacionales del vector que faciliten la propagación del virus.
- Contrastar la presencia de la infección entre dos poblaciones de *Desmodus rotundus* en Puebla, para determinar las categorías de la estructura demográfica con mayor prevalencia.

8 METODOLOGÍA

8.1 Sitio de estudio

La detección de Lyssavirus se llevó a cabo en muestras de cerebro de murciélagos vampiro colectados en La Mina de Don Ramón, Las Ventas y Paishtepé, San Antonio Texcala, en el Mpio. de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Además, se colectaron individuos de la cueva de Los Sabinos, Santiago Coatepec, Mpio. de Caltepec, Puebla.

8.2 Colecta de material

Los quirópteros fueron capturados por el Dr. Alberto Rojas Martínez durante el primer semestre del 2019, mediante el uso de redes de niebla dispuestas estratégicamente a la salida de los nidos de *Desmodus rotundus* para su captura. De Zapotitlán fueron colectados 61 ejemplares y de Caltepec 42, para un total de 103 ejemplares. Cabe destacar que estos sitios fueron elegidos por reportes de los pobladores, de vacas afectadas por derriengue, mismos que no fueron corroborados por SENASICA. Se escogieron los cerebros de individuos adultos para la extracción, los cuales fueron trasladados a las

instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEH. La estructura porcentual poblacional fue contrastada mediante una prueba de Chi², ponderando los datos.

8.3 Extracción de cerebros del murciélago vampiro

Los cadáveres fueron transportados en hieleras cerradas herméticamente conteniendo hielo seco, desde el momento de la dislocación cervical en campo hasta su conservación en congelador a -20°C en el laboratorio de genética del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEH.

La extracción del cerebro se realizó con el cadáver aún congelado (Figura 5a), en campo estéril plastificado con charolas lavadas con alcohol al 70% y material esterilizado, con uso de todo el equipo de protección (guantes, bata, cubrebocas y gafas) (Figura 5b). Se realizó un primer corte transversal por debajo de la zona occipital hasta seccionar por debajo del cerebelo dejando expuesto el tallo cerebral y el coágulo formado durante la dislocación (Figura 5c). Posteriormente se realizó un segundo corte de occipital a frontal para separar los dos lóbulos cerebrales y abrir el cráneo (Figura 5d). Se recomienda el uso de tijeras de disección dado que el material congelado es duro lo que resulta en un riesgo para el uso de bisturí. Con unas pinzas de presión Crile se extrajo un hemisferio para colocarlo en buffer TE 1x con 1% de RNA lither para conservarse en congelación (Figura 5e). El otro hemisferio fue macerado con nitrógeno líquido en morteros estériles congelados previamente y mantenidos en hielo durante todo el procedimiento (Figura 5f). El material ya macerado se colocó en tubos estériles para realizar la extracción de RNA (Figura 5g y h).

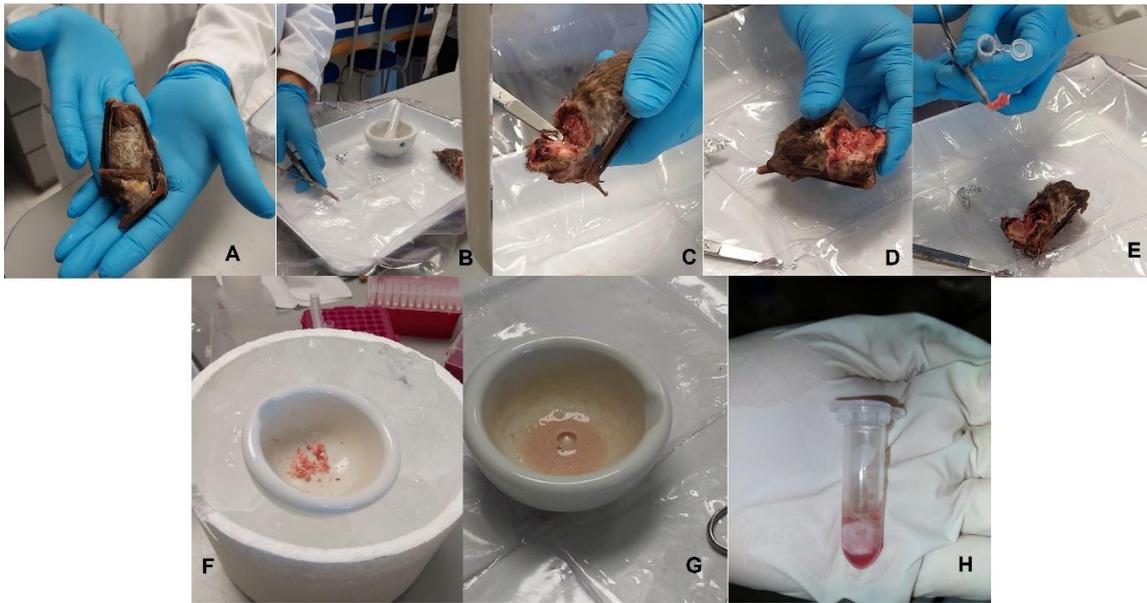


Figura 5. A) Murciélago vampiro congelado, B) Material de trabajo estéril, C), Corte transversal-occipital, D) Corte frontal-occipital, E) Extracción de lóbulo para respaldo, F) Maceración en nitrógeno de lóbulo restante, G) Macerado para extracción, H) Macerado en buffer de extracción con inactivador de RNAsa al 1%.

8.4 Extracción de RNA

Antes del inicio de la extracción, todos los reactivos y alícuotas a utilizar se mantuvieron en refrigeración y durante esta, las muestras y demás reactivos se conservaron en hielo. Adicionalmente, todas las muestras se prepararon con inactivador de RNAsa al 1 % (RNAlater-SIGMA). La muestra fue macerada en nitrógeno líquido y colocada en microtubos enfriados previamente en el mismo líquido. Para la extracción se utilizaron dos protocolos similares uno haciendo uso del fenol cloroformo alcohol isoamílico y el otro con Trizol (SIGMA), no obstante, ambos están basados y adaptados del protocolo de extracción de RNA orientado a plantas de Yockteng et al. (2013). Para el protocolo del fenol cloroformo alcohol isoamílico primeramente se añadió 600 μ L del mismo a una concentración 25:24:1 y 600 μ L de CTAB 1x mas 1 μ L de β -mercaptoetanol a la muestra macerada. Posteriormente se mezcló por inversión hasta lograr una solución lechosa regresando al hielo inmediatamente. Acto seguido se procedió a añadir al tubo 20 μ L de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó a 37°C por una hora.

Para el protocolo con Trizol (SIGMA), una vez macerada la muestra, se agregó 1 mL de este junto con 10 μ L de DNAsa libre de RNAsas. El microtubo se mezcló cuidadosamente por inversión hasta formar una solución lechosa teniendo la precaución de regresar unos segundos el microtubo al hielo para conservar la temperatura y se incubó 30 minutos a 37°C. Al llegar a esta fase ambos protocolos usan la misma metodología a partir de este punto. Sin importar que protocolo se usó en la fase temprana de la extracción se añadió al tubo 100 μ L de NaCl y 400 μ L de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1). El tubo fue mezclado igualmente de manera cuidadosa y posteriormente centrifugado a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo de 1.5 mL estéril. Un volumen de cloroformo:álcohol isoamílico (24:1) fue agregado y mezclado nuevamente para llevarlo a otro ciclo de centrifugación a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Una vez realizado esto, se recuperó la fase acuosa y fue colocada en un nuevo tubo estéril. A lo recuperado se le añadió $\frac{1}{4}$ (100 μ L) de volumen de isopropanol y $\frac{3}{4}$ de volumen de LiCl 4M (300 μ L). El tubo se mezcló nuevamente por inversión y se dejó precipitar durante toda la noche a -20°C. Una vez concluido el paso anterior el tubo se sometió a un ciclo de centrifugación a 13,000 rpm durante 20 minutos a 4°C decantando el sobrenadante resultante por completo. Al obtener la pastilla de RNA, se lavó con 1 mL de etanol 70% asegurándose que dicho pellet se desprenda de la pared del tubo durante el lavado. Las muestras fueron nuevamente centrifugadas a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Cuando se obtuvo un pellet muy sucio se procedió a realizar una nueva ronda de lavado con el mismo volumen y porcentaje etanol y mismos ciclos de centrifugación. La pastilla de material genético de cada muestra se dejó secar en la campana de extracción. Una vez seco dicho pellet fue suspendido en 30 μ L de agua libre de RNAsa y almacenado a -20° C para su uso posterior. Cabe resaltar que para la disposición de desechos RPBI se dispuso de un contenedor especial debidamente

etiquetado y rotulado para el vertido de todos los desechos resultado tanto de la extracción como para la limpieza con cloruro de litio.

8.5 Limpieza con cloruro de litio

Para la obtención de RNA con mejor calidad se recurrió a una precipitación con LiCl. Dicho procedimiento está basado en que dicho reactivo no precipita bien proteínas o DNA aunado a que remueve inhibidores de la traducción o síntesis del DNA (Barlow et al., 1963; Cathala et al., 1983). Se usó LiCl de SIGMA con el que se siguió el protocolo indicado según el fabricante y que se especifica a continuación. Al tubo con el pellet resuspendido en agua libre de RNAsas se le añadió un volumen LiCl 4M para ser incubado en hielo durante 1-2 horas. El tubo fue centrifugado a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue decantado completamente. El pellet resultante fue resuspendido en 100 µL de agua libre de RNAsas. A dicha cantidad de agua le fue agregada 0.1 volúmenes de NaOAc 3M (10 µL) y 2.5 volúmenes de etanol 95% (250 µL). El tubo se sometió a un último ciclo de centrifugación a 13,000 rpm a 4°C por 10 minutos cuyo sobrenadante se desechó. Finalmente, el tubo con el pellet fue secado en campana de extracción y una vez seco se resuspendió en 20 µL de buffer TE.

8.6 Retrotranscripción y amplificación

Para esta fase se usó un protocolo de PCR, descrito más adelante, basado en el realizado por Sacramento et al. (1991) que sirvió tanto para RT-PCR como PCR normal. Con el fin de determinar la ausencia/presencia de *Lyssavirus*, fue utilizado un set de primers 001lys y 550B específicos para una región no codificante del genoma de lyssavirus (de acuerdo con el genoma del virus RABV Pasteur (PV), no. de acceso M13215 en GenBank) ubicados dentro del gen N y que cuentan con un extensivo uso para la detección de lyssavirus (Markotter et al., 2006; Coertse et al., 2010; Ukamaka et al., 2020).

Adicionalmente, se usó otro set de primers de actina (ActF y ActR) como control positivo (Tabla 1). Tanto para la retrotranscripción como para la amplificación se utilizaron los reactivos correspondientes (Tabla 2). La RT-PCR se organizó de la siguiente manera: desnaturalización a 93°C por 50 segundos; alineamiento a 56°C para el set de primers de actina y 45°C para los de lyssavirus por 1 minuto; extensión a 72°C por un minuto; y la elongación final a 72°C por ocho minutos. Tanto la desnaturalización, alineamiento, así como la extensión se repitieron 35 ciclos. La PCR anidada se sometió a un procedimiento similar agregando únicamente un periodo inicial de desnaturalización a 92°C por 3 minutos.

Tabla 1. Sets de primers utilizados tanto en RT-PCR como PCR.

Primer	Secuencia nucleotídica 5' - 3'
001lys	ACGCTTAACGAMAAA
550B	GTRCTCCARTTAGCRCACAT
ActF	TACAACCTCCTTGCAGCTCC
ActR	GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC

Tabla 2. Materiales usados en las reacciones de PCR.

Reactivo	Cantidad (1 reacción)
MgCl ₂	1.6 µL
Primer forward	0.7 µL/ 0.5 µL*
Primer reverse	
DNTP's	0.3 µL
Buffer	2.4 µL
Agua ultrapura	0.5 µL
Retrotranscriptasa/Taq polimerasa	0.4 µL
RNA	2-5 µL**

*0.7 para RT-PCR y 0.5 para PCR.

**Cantidad a usarse dependiendo la calidad del RNA extraído.

9 RESULTADOS

9.1 Caracterización poblacional

De los 42 ejemplares colectados en Caltepec 24 fueron hembras y 18 machos. Cinco hembras se encontraban gestantes, 17 estaban lactando y dos eran jóvenes inmaduras. 12 de los machos eran fértiles y seis eran juveniles. Por lo anterior, esta era una cueva de maternidad activa con una población en crecimiento.

De los 61 ejemplares recolectados en Zapotitlán, 32 fueron hembras y 29 machos. Ocho hembras eran gestantes, 12 lactantes y 12 inmaduras. Veinticinco machos eran fértiles y cuatro eran juveniles.

Tabla 3. Estructura poblacional de las colonias de *Desmodus rotundus* analizadas.

CATEGORÍA	N Caltepec	N Zapotitlán	% Caltepec	% Zapotitlán
Hembras Gestantes	5	8	11.90	13.11
Hembras Lactantes	17	12	40.48	19.67
Hembras juveniles	2	12	4.76	19.67
Machos fértiles	12	25	28.57	40.98
Machos juveniles	6	4	14.29	6.57

9.2 Estandarización de los protocolos de aislamiento del RNA

La extracción de RNA se realizó exitosamente con ambos protocolos (estándar y con cloruro de Litio), observándose una mejor calidad del material nucleico extraído con el método del Trizol y obteniéndose productos de calidad suficiente para realizar las amplificaciones. No obstante, de un total de 103 muestras, solo fue posible obtener material de 47 cerebros adultos (28 de Zapotitlán y 19 de Caltepec), lo que se explica por el tratamiento del material biológico (Tabla 4). Es necesario coleccionar las muestras en

nitrógeno líquido y agregar a la brevedad estabilizadores de RNA como el RNAlitter al 1%.

Tabla 4. Cuantificación de calidad y cantidad de RNA extraído. Individuos en rojo representan casos positivos a lyssavirus, AM: adulto macho, AH: adulto hembra, AH/G: adulto hembra gestante, AH/L: adulto hembra lactante.

Caltepec				Zapotitlán			
Individuo	C-DNA (µg/mL)	Pureza	Estadio	Individuo	C-DNA (µg/mL)	Pureza	Estadio
1	22.6	1.16	AH/G	1	10.43	2.48	AM
2	223.9	1.12	AM	2	31.83	1.228	AM
3	77.2	1.4	AM	3	49.87	1.89	AH/L
4	26.02	01.08	AM	4	89.26	1.143	AH
5	39.5	01.08	AM	5	13.62	1.147	AM
6	30.8	1.38	AM	6	49.07	1.174	AM
7	21.17	1.071	AM	7	22.07	1.455	AM
8	31.18	1.354	AH/G	8	1.323	0	AM
9	89.1	1.2	AM	9	5.233	873	AM
10	72.7	1.48	AH/L	10	21.27	1.835	AM
11	12.67	902	AH/L	11	2.839	0	AM
12	26.68	1.062	AM	12	167.1	1.852	AH/L
13	49.7	1.10	AM	13	5.716	1.359	AM
14	33.9	01.01	AH/L	14	26.88	2.270	AM
15	55	01.02	AH/L	15	14.37	1.799	AM
16	80.2	1.16	AH/L	16	17.81	1.756	AM
17	85.6	1.16	AM	17	47.37	1.448	AM
18	113.3	1.13	AH/L	18	8.97	2.826	AM
19	46.5	1.06	AH/L	19	24.94	1.65	AM
				20	4.3	1.87	AH/G
				21	10.31	1.009	AH/L
				22	23.1	1.66	AM
				23	54.5	2	AH/G
				24	42.6	2	AH/L
				25	8.393	1.189	AH
				26	20.28	1.525	AH/G
				27	29.17	1.521	AH
				28	23.79	1.525	AH

9.3 Retrotranscripción

En total se obtuvieron seis casos positivos para RABV, cuatro provenientes de Zapotitlán y dos de Caltepec, solo una hembra gestante dio positivo, el resto eran machos adultos. Así mismo, se obtuvieron productos inespecíficos para la amplificación de Rhabdovirus (RNA viral fragmentado tal como se esperaría con marcadores para la proteína N), pero no para los amplificados para actina (RNA constitutivo), que fueron constantes, lo que valida el control positivo de la técnica. Al respecto, se observa que muchas veces el RNA

extraído no es de la mejor calidad, lo que se ve reflejado en la baja intensidad de las bandas en los geles de agarosa, al igual que una gran cantidad de autómeros en los geles de acrilamida. No obstante, es posible identificar claramente los cDNA correspondientes a la amplificación de lyssavirus cuando se realiza la PCR anidada (Figura 5).

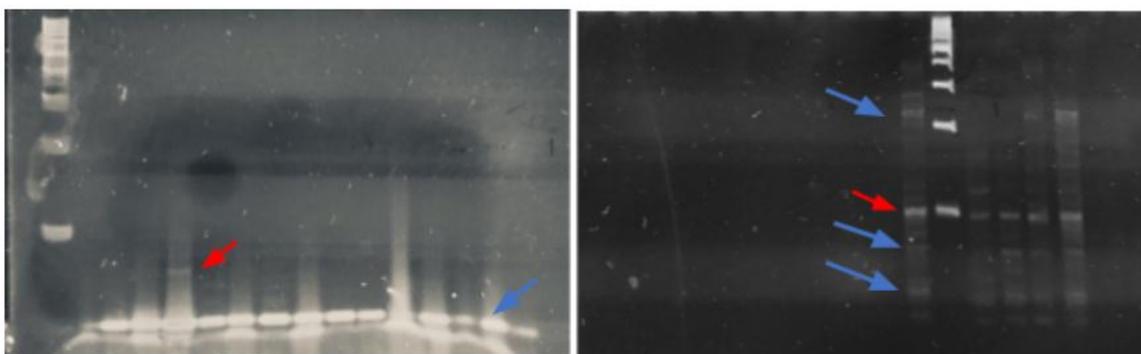


Figura 6. Electroforesis de acrilamida de los productos de PCR anidada. Las flechas indican la banda correspondiente al cDNA de lyssavirus. A la izquierda se indica con una flecha roja el individuo 4 de Caltepec, positivo. A la derecha se muestran los individuos Zapotitlán, el indicador de tamaño y los individuos 6, 15, 17 y 20 positivos para rabia. La flecha azul indica los autómeros y las bandas inespecíficas.

10 DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, se confirma la presencia de lyssavirus en las localidades muestreadas en Puebla, no obstante, es necesario análisis más detallados para conocer de qué especie se trata puesto que los primers utilizados reconocen segmentos en el genoma del virus RABV Pasteur (GenBank, no. de acceso M13215) pero que han sido usados para la detección de otras especies de lyssavirus (Markotter et al., 2006; Coertse et al., 2010) por lo que no se puede aseverar la especie *a priori*, aunque en la zona de estudio únicamente se ha reportado a la especie RABV con tres variantes. Por otra parte, al compararlas con los reportes publicados por SENASICA, sugieren que el brote de rabia paralítica bovina estudiado en el presente trabajo no se trata de un problema aislado. Al

respecto, dicho organismo gubernamental confirmó, en 2019, 34 casos en Puebla (32 provenientes de ganado y 2 de murciélagos hematófagos) y otros 26 en el vecino estado de Hidalgo (todos los casos provenientes de ganado). En 2020 la situación se comportó de manera similar reportando el estado de Puebla 40 casos confirmados (35 de ganado y 5 de murciélagos hematófagos) y 24 para Hidalgo (todos provenientes de ganado). Si bien, la cantidad de casos se ha mantenido de manera similar, es de reconocer que los programas de vacunación, en los que decenas de miles de cabezas de ganado han sido vacunadas, pueden estar dando resultados (SENASICA, 2020).

Lo anterior podría confirmarse porque la presencia del virus en el murciélago vampiro es relativamente infrecuente según los reportes antes referidos. En 2019 se trataron 1821 quirópteros en busca de rabia y solo 3 resultaron positivos (0.16 %) mientras que, en el 2020, 2267 fueron tratados teniendo únicamente 5 individuos positivos (0.22%). No obstante, dichos números pueden deberse a sesgos de muestreo puesto que únicamente se le da atención a las poblaciones que han sido afectadas y a los nidos en dichas zonas, excluyendo cuevas con intercambios. Además, la técnica utilizada fue serológica; por lo que solo se ubicaron casos activos sin considerar los hospederos resistentes portadores que, en nuestro caso, gracias al tipo de técnica; nos permitió identificar de forma eficiente un porcentaje de incidencia del 12.76% (6 casos positivos de 47 cerebros analizados). Por otra parte, se ha documentado el hecho de que los murciélagos vampiros cambian constantemente de cueva, si no hay limitaciones geográficas, lo que facilita la infección de lyssavirus, tal como lo ha señalado Trajano (1996) en donde múltiples poblaciones de *D. rotundus* en el sureste de Brasil tenían frecuentemente intercambios entre sus cuevas, aunque se observó que dichos intercambios ocurrían en un rango bastante limitado.

Tomando en cuenta la estructura poblacional del vector, los resultados indican que la población de Caltepec se trataba de una cueva de maternidad activa con reclutamiento de juveniles, mientras que la población de Zapotitlán era una cueva satélite con preponderancia reproductiva, lo que se sustenta porque la estructura demográfica resultó significativamente distinta ($\text{Chi}^2 = 39.91$, $p = 2.15\text{E}^{-9}$, $gl = 2$) con un porcentaje mayor de hembras lactantes y machos juveniles en Caltepec y de hembras juveniles y machos fértiles en Zapotitlán. En esta última la actividad reproductiva era mayor con visitas activas por parte de machos en busca de eventos reproductivos con la gran cantidad de hembras juveniles de dicha población, y por lo tanto con mayor prevalencia viral dado que el comportamiento sexual de los machos termina por confrontar a los individuos e incrementar el contagio (Tabla 3). Por otro lado, se sabe que entre machos solidarios existen comportamientos de alimentación por regurgitación que también incrementan el contagio (Greenhall, 1965, Crespo et al., 1972, Johnson et al., 2014) y explican las diferencias en la prevalencia.

En relación con la dinámica poblacional involucrada, el mismo autor refiere que los individuos que fueron recapturados varias veces en diferentes cuevas son los machos en edad reproductiva (Trajano, 1996). Es importante señalar este dato puesto que, en las poblaciones muestreadas en el presente trabajo, 5 de los 6 individuos infectados con rabia son adultos machos. Asimismo, Denault y McFarlane (1995) señalan una conducta común entre los quirópteros de esta especie llamada altruismo recíproco. En dicha conducta, dada por la baja fertilidad de la especie y la incapacidad de algunos individuos de conseguir comida, los machos comparten el alimento con otros machos por regurgitación facilitando la infección de rabia. Por el contrario, en las hembras esta conducta tiene lugar en muy rara ocasión. En la mencionada publicación se observó que las hembras nunca comparten el alimento y que es muy poco común que los machos

regurgitan para las hembras aun cuando éstas se lo soliciten. Esto explica los datos de prevalencia preferente entre machos. Esto parece estar respaldado por lo estudiado por Lord (1992) en donde hace referencia que los machos, apenas dejan de ser juveniles o ya no necesitan más atención de parte de la madre, son expulsados de las cuevas principales para unirse a los nidos satélite. Por tanto, sería de gran valor estratégico localizar y eliminar los nidos satélites para evitar la propagación de RABV.

En cuanto a la biología molecular implicada ésta parece estar en concordancia con lo reportado por otros autores: Fischer et al. (2013) y Deubelbeiss et al. (2014) mencionan que los falsos positivos o falsos negativos pueden intervenir en un diagnóstico exitoso de lyssavirus y que son resultado de diversos factores como calidad del RNA, primers, equipo de laboratorio, entre otros, por lo que sugieren que se tenga un control interno para garantizar fiabilidad en los resultados. En el presente trabajo, teniendo en consideración dichas variables, se estableció como control positivo un set de primers de actina mismos que corroboraron que incluso con la fragmentación del RNA, derivado de la extracción y representado por la presencia de autómeros, éste seguía siendo viable para su uso. Sin embargo, la comprobación de la identidad de los amplificados se debe realizar por secuenciación del cDNA obtenido, tanto para la actina como para la proteína N del lyssavirus. Además, la secuencia nos permitirá realizar un análisis epidemiológico para establecer el serotipo de rabia prevalente en la región y su relación con otros serotipos que nos permitan rastrear su origen. No obstante, esto encarece la técnica y el fin sería únicamente de corroboración.

Al respecto, las variantes presentes en México están estrechamente relacionadas con las procedentes de Sudamérica y difieren de los lyssavirus identificados en *Tadarida brasiliensis* (murciélago insectívoro) al norte del país y en Estados Unidos. En conjunto forman un clado independiente de los virus de la rabia identificados en murciélagos

canadienses, europeos, africanos; y de los procedentes de hospederos carnívoros como zorros grises, perros, coyotes de México y Estados Unidos. Sin embargo, existen variantes desconocidas que ocasionalmente se identifican por infecciones de interés clínico, por ejemplo, un caso aislado de un migrante procedente de Oaxaca que fue mordido por una zorra (Velasco-Villa et al., 2008). Es importante señalar que las poblaciones colectadas en nuestro estudio no han sido caracterizadas previamente y el lyssavirus más cercano geográficamente, con identidad obtenida por secuencia del gen N, procede de *T. brasiliensis* colectada en el límite de Hidalgo y Puebla (Figura 6). Sin embargo, dada la consistencia de la relación filogenética de los serotipos de murciélagos vampiros en México procedentes de Tamaulipas, norte de Veracruz, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Estado de México, sur de Veracruz y Oaxaca; así como la cercanía filogenética con los aislados de Sudamérica, suponemos que la identidad de los virus aislados en nuestro estudio corresponderá con dicho serotipo. Los resultados de la secuenciación aún se están esperando ya que fueron enviados para su análisis e identificación.

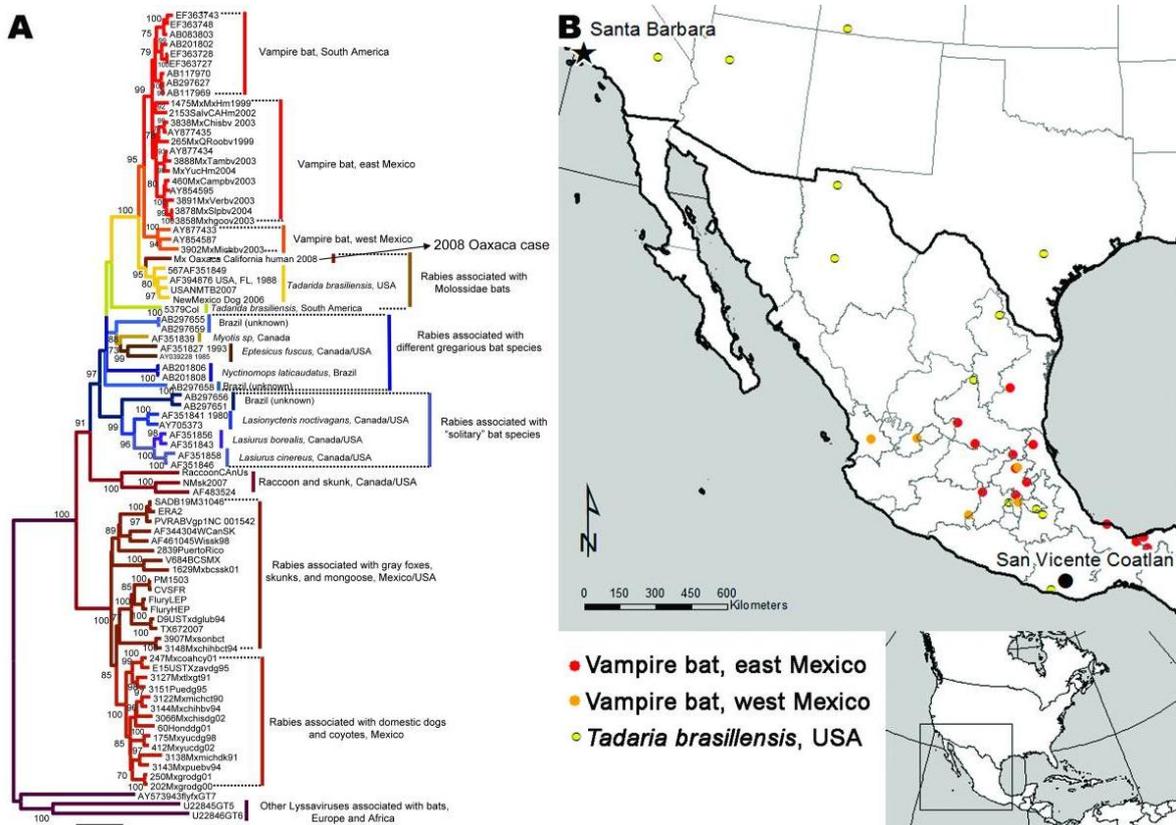


Figura 7. A) Árbol filogenético de nucleoproteína (N) de lyssavirus completos, comparando aislamientos mexicanos, variantes representativas de reservorios carnívoros, procedencias del viejo mundo y un caso de una nueva variante en un inmigrante de Oaxaca. B Mapa con la ubicación de las muestras representativas asociadas con la rabia transmitida por murciélagos vampiro en México y Estados Unidos, además de las procedentes de *Tadarida brasillensis* (Tomado de: Velasco-Villa et al., 2008).

Finalmente, la técnica mostró que la prevalencia es 58 veces mayor que la reportada por las pruebas serológicas al contrastar el 0.22% reportado por SENASICA, (2020) con el 12.76% obtenido en este muestreo, por lo que las acciones usuales para el control de los brotes, no es eficaz para la prevención de rebrotes estacionales en las zonas de incidencia. Esto se ha corroborado en el área de estudio, donde la aplicación de vacunas al ganado, así como la captura-envenenamiento-liberación indistinta de adultos, no ha erradicado los brotes de derriengue con consecución estacional cada tres años. Por ello, la erradicación de machos reproductivos en las colonias de apareamiento con alta incidencia de la infección, así como el drenaje periódico de las poblaciones; resultan acciones para un mejor control de la zoonosis viral a corto, mediano y largo plazo.

12 CONCLUSIÓN

La presencia del virus identificada mediante RT-PCR es hasta 58 veces mayor de lo establecido por pruebas serológicas, particularmente en murciélagos machos reproductivos en las cuevas evaluadas del estado de Puebla. Esto confirma la sensibilidad y eficacia de la prueba RT-PCR para su aplicación de manera rutinaria, específicamente el protocolo de extracción de RNA basado en Trizol.

Los parámetros de retro-transcripción corresponden desnaturalización a 93°C, alineamiento a 45°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto; y la elongación final a 72°C por 8 minutos; datos modificados de la propuesta original de Sacramento et al. (1991). Los amplificadores deben contrastarse con un control positivo, que sugerimos sea actina, al tener un promotor fuerte que garantiza la presencia de RNA mensajeros en las

células de mamíferos, con el siguiente protocolo desnaturalización a 93°C por 50 segundos; alineamiento a 56°C por un minuto, extensión a 72°C por un minuto; y la elongación final a 72°C por 8 minutos.

La estructura demográfica de las poblaciones de murciélagos vampiro difieren significativamente cuando se trata de cuevas de maternidad, con presencia de crías y mayormente hembras gestantes o lactantes, por lo que se infiere que el virus no se propaga fácilmente ante la ausencia de comportamientos de confrontación. Por el contrario, las cuevas satélites con individuos reproductivos tienen a incrementar la presencia viral dado que existen luchas por cópulas o regurgitación de sangre infectada.

13 REFERENCIAS

- Acha, P. (1968). Epidemiología de la rabia bovina paralítica transmitida por los quirópteros. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 64(5): 411-430.
- Albertini, A. A. V., Ruigrok, R. W. H. & Blondel, D. (2011). Rabies Virus Transcription and Replication. *Research Advances in Rabies*, 1: 22. DOI: 10.1016/b978-0-12-387040-7.00001-9
- Araujo D. B., Langoni H., Almeida M. F. & Megid J. (2008). Heminested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus detection in stored and decomposed samples. *BioMed Central Research Notes*, 1: 17
- Aravindh-Babu, R. P., Manoharan, S., Ramadass, P. & Chandran, N. D. J. (2012). Evaluation of RT-PCR Assay for Routine Laboratory Diagnosis of Rabies in Post Mortem Brain Samples from Different Species of Animals. *Indian Journal of Virology*, 23(3): 392–396. DOI: 10.1007/s13337-012-0109-9
- Arellano-Sota, C. (1988). Biology, Ecology, and Control of the Vampire Bat. *Clinical Infectious Diseases*, 10 (Supplement 4): S615–S619. DOI: 10.1093/clinids/10.supplement_4.s615

- Badrane, H. & Tordo, N. (2001). Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *Journal of Virology*, 75: 8096–8104.
- Barlow, J. J., Mathias, A. P., Williamson, R. & Gammack, D. B. (1963). A simple method for the quantitative isolation of undegraded high molecular weight ribonucleic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 13(1): 61-66.
- Becker, D. J., Broos, A., Bergner, L. M., Meza, D. K., Simmons, N. B., Brock-Fenton, M., Altizer, S. & Streiker, D. G. (2020) Temporal patterns of vampire bat rabies and host connectivity in Belize. *Transbound Emergent Diseases*, 1: 1-10. DOI: 10.1111/tbed.13754
- Bourhy, H., Kissi, B. & Tordo, N. (1993). Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virology*, 194(1): 70–81
- Bourhy, H. (2005). Phylogenetic relationships among rhabdoviruses inferred using the L polymerase gene. *Journal of General Virology*, 86(10): 2849–2858. DOI: 10.1099/vir.0.81128-0
- Cathala, G. U. Y., Savouret, J. F., Mendez, B., West, B. L., Karin, M., Martial, J. A. & Baxter, J. D. (1983). A method for isolation of intact, translationally active ribonucleic acid. *Dna*, 2(4): 329-335.
- CDC. (2019). Rabies Homepage. Atlanta, GA. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/rabies/about.html>
- Clark, D. P., Pazdernik, N. J. & McGehee, M. R. (2019). Viruses, Viroids, and Prions. *Molecular Biology*, 6: 749–792. DOI: 10.1016/b978-0-12-813288-3.00024-0
- Chare, E. R., Gould, E. A. & Holmes, E. C. (2003). Phylogenetic analysis reveals a low rate of homologous recombination in negative-sense RNA viruses. *Journal of General Virology*, 84: 2691–2703.

- Coertse, J., Weyer, J., Nel, L. H. & Markotter, W. (2010). Improved PCR methods for detection of African rabies and rabies-related lyssaviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(11): 3949-3955.
- Conzelmann, K. K., Cox, J. H., Schneider, L. G. & Thiel, H. J. (1990). Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology*, 175: 485–499
- Crespo, R. F., Linhart, S. B., Burns, R. J. & Mitchell, G. C. (1972). Foraging Behavior of the Common Vampire Bat Related to Moonlight. *Journal of Mammalogy*, 53(2): 366–368. DOI: 10.2307/1379175
- Debbie, J. G., Andrulonis, J. A. & Abelseth, M. K. (1972). Rabies antibody determination by immunofluorescence in tissue culture. *Infection and Immunity*, 5(6): 902-904.
- Denault, L. K. & McFarlane, D. A. (1995). Reciprocal altruism between male vampire bats, *Desmodus rotundus*. *Animal Behaviour*, 49(3): 855-856.
- Deng, M. Y., Wang, H., Ward, G. B., Beckham, T. R. & McKenna, T. S. (2005). Comparison of Six RNA Extraction Methods for the Detection of Classical Swine Fever Virus by Real-Time and Conventional Reverse Transcription–PCR. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(6): 574–578. DOI: 10.1177/104063870501700609
- Deubelbeiss, A., Zahno, M. L., Zanoni, M., Brügger, D. & Zanoni, R. (2014). Real-time RT-PCR for the detection of Lyssavirus species. *Journal of Veterinary Medicine*, ID 476091, 12 páginas. DOI: 10.1155/2014/476091.
- Dietzgen, R. G., Kondo, H., Goodin, M. M., Kurath, G. & Vasilakis, N. (2017). The family Rhabdoviridae: mono-and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins. *Virus Research*, 227: 158-170.

- Fischer, M., Wernike, K., Freuling, C. M., Müller, T., Aylan, O., Brochier, B. & Hoffmann, B. (2013). A step forward in molecular diagnostics of lyssaviruses—results of a ring trial among European laboratories. *PloS ONE*, 8(3): e58372.
- Gaudin, Y., Ruigrok, R. W. H., Tuffereau, C., Knossow, M. & Flamand, A. (1992). Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology*, 187(2): 627–632. DOI: 10.1016/0042-6822(92)90465-2
- Greenhall, A. M. (1965). Notes on behavior of captive vampire bats. *Mammalia*, 29(4): 1-12. DOI: 10.1515/mamm.1965.29.4.441
- Greenhall, A. M., Schmidt, U. & Lopez-Forment, W. (1971). Attacking Behavior of the Vampire Bat, *Desmodus rotundus*, Under Field Conditions in Mexico. *Biotropica*, 3(2): 136. DOI: 10.2307/2989817
- Heaton, P. R., Johnstone, P., McElhinney, L. M., Cowley, R., O’Sullivan, E. & Whitby, J. E. (1997). Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11): 2762–2766.
- Hematian, A., Sadeghifard, N., Mohebi, R., Taherikalani, M., Nasrolahi, A., Amraei, M. & Ghafourian, S. (2016). Traditional and Modern Cell Culture in Virus Diagnosis. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 7(2): 77–82. DOI: 10.1016/j.phrp.2015.11.011
- InDRE (2017). Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Lineamientos para la vigilancia por laboratorio de rabia. Dirección General de Epidemiología, Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, Secretaría de Salud.
- Iwasaki, T., Inoue, S., Tanaka, K., Sato, Y., Morikawa, S., Hayasaka, D., Moriyama, M., Ono, T., Kanai, S., Yamada, A. & Kurata, T. (2004). Characterization of Oita virus 296/1972 of Rhabdoviridae isolated from a horseshoe bat bearing characteristics of both lyssavirus and vesiculovirus. *Archives of Virology*, 149(6): 1139-1154.

- Jackson, A. O., Dietzgen, R. G., Goodin, M. M., Bragg, J. N. & Deng, M. (2005). Biology of plant rhabdoviruses. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1): 623-660.
- Johnson, N., Aréchiga-Ceballos, N. & Aguilar-Setien, A. (2014). Vampire Bat Rabies: Ecology, Epidemiology and Control. *Viruses*, 6(5): 1911–1928. DOI: 10.3390/v6051911
- Jordan, I. K., Sutter IV, B. A. & McClure, M. A. (2000). Molecular Evolution of the Paramyxoviridae and Rhabdoviridae Multiple-Protein-Encoding P Gene. *Molecular Biology and Evolution*, 17(1): 75–086. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026240
- Juárez-Castillo, L. G. (2012). Dinámica poblacional del murciélago vampiro *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae) en la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo, México. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Kamolvarin N., Tirawatnpong T., Rattanasiwamoke R., Tirawatnpong S., Panpanich T. & Hemachudha T. (1993). Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. *The Journal of Infectious Diseases*, 167(1): 207–210
- Knudson, D. L. (1973). Rhabdoviruses. *Journal of General Virology*, 20 (Supplement): 105–130. DOI: 10.1099/0022-1317-20-supplement-105
- Kumar, P. (2013). Virus Identification and Quantification. Labome. *Mater Methods*, 3: 207. DOI: 10.13070/mm.en.3.207
- Leland, D. S. & Ginocchio, C. C. (2007). Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. *Clinical Microbiology Reviews* 20(1): 49–78. DOI: 10.1128/cmr.00002-06
- López-Santa Cruz, D. I., González, A., Jusayma, A. & Morales, L. M. (2013). Diagnóstico del virus rábico en quirópteros. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 65(1): 119-124.
- Lord, R. D. (1992). Seasonal reproduction of vampire bats and its relation to seasonality of bovine rabies. *Journal of Wildlife Diseases*, 28(2): 292-294.

- Ma, H., Galvin, T. A., Glasner, D. R., Shaheduzzaman, S. & Khan, A. S. (2014). Identification of a novel rhabdovirus in *Spodoptera frugiperda* cell lines. *Journal of Virology*, 88(12): 6576-6585.
- Maclachlan, N. J. & Dubovi, E. J. (2016). Chapter 5: Laboratory Diagnosis of Viral Infections. En: *Fenner's veterinary virology*. 5th Ed. Academic press.
- Markotter, W., Kuzmin, I., Rupprecht, C. E., Randles, J., Sabeta, C. T., Wandeler, A. I. & Nel, L. H. (2006). Isolation of Lagos bat virus from water mongoose. *Emerging Infectious Diseases*, 12(12): 1913.
- Murphy, F A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. R., Mayo, M. A. & Summers, M. D. (1995). *Virus Taxonomy: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 275-288. Springer-Verlag, New York.
- Nadin-Davis, S. A. (2007). Molecular epidemiology. En ‘‘Rabies’’ (A. C. Jackson and W. H. Wunner, eds.), 2nd edn. pp. 69–122. Academic Press, London, UK.
- Nagaraj, T., Vasanth, J. P., Desai, A., Kamat, A., Madhusudana, S. N. & Ravi, V. (2006). Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: Comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. *Journal of Clinical Virology*, 36(1): 17–23. DOI: 10.1016/j.jcv.2006.01.009
- Odell, I. D. & Cook, D. (2013). Immunofluorescence Techniques. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(1): 1–4. DOI: 10.1038/jid.2012.455
- OMS (2018). Organización Mundial de Sanidad Animal. Rabies (Infection with rabies virus and other lyssaviruses), OIE Terrestrial Manual.
- Pang, X. L., Lee, B., Boroumand, N., Leblanc, B., Preiksaitis, J. K. & Yu-Ip, C. C. (2004). Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription-polymerase chain

- reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. *Journal of Medical Virology*, 72(3): 496–501. DOI: 10.1002/jmv.20009
- Rocha, F., Ulloa-Stanojlovic, F. M., Rabaquim, V. C. V., Fadil, P., Pompei, J. C., Brandão, P. E. & Dias, R. A. (2020). Relations between topography, feeding sites, and foraging behavior of the vampire bat, *Desmodus rotundus*. *Journal of Mammalogy*, 101(1): 164-171. DOI: 10.1093/jmammal/gyz177
 - Sacramento, D., Bourhy, H. & Tordo, N. (1991). PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Molecular and Cellular Probes*, 5(3): 229-240.
 - Schneider, M. D. & Furusho, Y. (1966). Immunofluorescence study of wild rabies virus and antibody. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, 30(5): 129.
 - Schnell, M. J., McGettigan, J. P., Wirblich, C. & Papaneri, A. (2009). The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1): 51–61. DOI:10.1038/nrmicro2260
 - SENASICA (2018). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Actividades de vigilancia epidemiológica, prevención y control. Campaña Nacional para la prevención y control de la rabia en bovinos y especies ganaderas NOM- 067- ZOO- 2007, Enero-diciembre 2018. SENASICA, Dirección General de Salud Animal, Dirección de Campañas Zoosanitarias.
 - SENASICA (2019). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Actividades de vigilancia epidemiológica, prevención y control. Campaña Nacional para la prevención y control de la rabia en bovinos y especies ganaderas NOM- 067- ZOO- 2007, Enero-diciembre 2019. SENASICA, Dirección General de Salud Animal, Dirección de Campañas Zoosanitarias.

- SENASICA. (2020). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Actividades de vigilancia epidemiológica, prevención y control. Campaña Nacional para la prevención y control de la rabia en bovinos y especies ganaderas NOM- 067- ZOO- 2007, Enero-diciembre 2020. SENASICA, Dirección General de Salud Animal, Dirección de Campañas Zoonosológicas.
- SENASICA. (2020). Rabia paralítica bovina. Análisis en México. Recuperado de: <https://dj.senasica.gob.mx/AtlasSanitario/storymaps/rpb.html#>
- SENASICA. (2021). Panorama nacional de rabia paralítica bovina. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Revisado el 20 de junio de 2022: https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2021/mayo/PANRabiapara%C3%ADticabovina16-04-21_7f1ec626-2283-4c40-a782-f2d239eb267f.pdf
- Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., Keith, G. & Rougeon, F. (1986). Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 83: 3914–3918
- Trajano, E. (1996). Movements of Cave Bats in Southeastern Brazil, with Emphasis on the Population Ecology of the Common Vampire Bat, *Desmodus rotundus* (Chiroptera). Biotropica, 28(1): 121. DOI:10.2307/2388777
- Ukamaka, E. U., Coetzer, A., Scott, T. P., Anene, B. M., Ezeokonkwo, R. C., Nwosuh, C. I., Nel, L. H. & Sabeta, C. T. (2020). Economic and feasibility comparison of the dRIT and DFA for decentralized rabies diagnosis in resource-limited settings: The use of Nigerian dog meat markets as a case study. PLoS Neglected Tropical Diseases, 14(2): e0008088.
- Velasco-Villa, A., Messenger, S. L., Orciari, L. A., Niezgodá, M., Blanton, J. D., Fukagawa, C. & Rupprecht, C. (2008). Identificación of New Rabies virus variant in

- Mexican immigrant. *Emerging Infectious Diseases*, 14(12): 1906-1908. DOI: 10.3201/eid1412.080671
- Villa-Ramírez, B. (1976). Biología de los murciélagos hematófagos. En: Moreno-Chan R. (1976). *Ciencia veterinaria*. Vol 1. Mexico City: Universidad Nacional Autónoma de México, 1976: 103
 - Voigt, C. C. & Kelm, D. H. (2006). Host preference of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*: Chiroptera) assessed by stable. *Journal of Mammalogy*, 87(1): 1–6. doi:10.1644/05-mamm-f-276r1.1
 - Wacharapluesadee, S. & Hemachudha, T. (2010). Ante- and post-mortem diagnosis of rabies using nucleic acid-amplification tests. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 10(2): 207–218. DOI:10.1586/erm.09.85
 - Walker, P. J., Dietzgen, R. G., Joubert, D. A. & Blasdell, K. R. (2011). Rhabdovirus accessory genes. *Virus research*, 162(1-2): 110-125.
 - Wunner, W. H. (2003). Rabies Virus. *Rabies*, 15: 23–77. DOI: 10.1016/b978-012379077-4/50004-3
 - Yockteng, R., Almeida, A. M., Yee, S., Andre, T., Hill, C. & Specht, C. D. (2013). A method for extracting high- quality RNA from diverse plants for next- generation sequencing and gene expression analyses. *Applications in Plant Sciences*, 1(12): 1300070.
 - Zarza, H., Martínez-Meyer, E., Suzán, G. & Ceballos, G. (2017). Geographic distribution of *Desmodus rotundus* in Mexico under current and future climate change scenarios: Implications for bovine paralytic rabies infection. *Veterinaria México OA*, 4(3): 10-25. DOI: 10.21753/vmoa.4.3.390

- Zhang, Y., Hung, T., Song, J. & He, J. (2013). Electron microscopy: essentials for viral structure, morphogenesis, and rapid diagnosis. *Science China Life Sciences*, 56(5): 421–430. DOI: 10.1007/s11427-013-4476-2
- Zhao, C., Li, Z., Yan, B., Harrison, T. J., Guo, X., Zhang, F. & Wang, Y. (2007). Comparison of real-time fluorescent RT-PCR and conventional RT-PCR for the detection of hepatitis E virus genotypes prevalent in China. *Journal of Medical Virology*, 79(12): 1966–1973. DOI: 10.1002/jmv.21040