

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y
CONSERVACIÓN**



TESIS

**Prevalencia de *Lyssavirus* en *Desmodus rotundus*
en cuatro refugios dentro de la Reserva de la Biosfera
Tehuacán-Cuicatlán, Puebla.**

Para obtener el grado en

Maestra en Ciencias en Biodiversidad y Conservación

PRESENTA

Biól. Cynthia Nicolás Sánchez

DIRECTOR

Dr. Pablo Octavio Aguilar

CO-DIRECTOR

Dr. Alberto Enrique Rojas Martínez

Mineral de la Reforma, Hgo., México., Agosto de 2024



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

School of Engineering and Basic Sciences

Área Académica de Biología

Department of Biology

Mineral de la Reforma, Hgo., a 16 de agosto de 2024

Número de control: ICBI-AAB/539/2024

Asunto: Autorización de impresión.

MTRA. OJUKY DEL ROCIO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

El Comité Tutorial del nombre del producto que indique el documento curricular del programa educativo de posgrado titulado "Prevalencia de *Lyssavirus* en *Desmodus rotundus* en cuatro refugios dentro de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, Puebla.", realizado por la sustentante **Cynthia Nicolas Sánchez** con número de cuenta **280389** perteneciente al programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que el sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

El Comité Tutorial



Dr. Pablo Octavio Aguilar
Vocal

Dr. Alberto Enrique Rojas Martínez
Presidente

Dr. Raúl Ortiz Pulido
Secretario

Dra. Sylvia Martínez Hernández
Suplente

LFRP/CIAF

Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 40063, 40064 y 40065
aab_icbi@uaeh.edu.mx, maritzal@uaeh.edu.mx



uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Pablo Octavio Aguilar, cuya sabiduría, paciencia y dedicación han sido fundamentales en mi formación. Su disposición, interés y tolerancia para adentrarse en el estudio de los murciélagos han enriquecido significativamente mi trabajo.

Mi más profunda gratitud al Dr. Alberto E. Rojas Martínez, por compartir su vasto conocimiento y experiencia en el estudio de los murciélagos. Su inagotable paciencia, compromiso y esfuerzo fueron esenciales para la realización de este proyecto.

Extiendo mi agradecimiento a los miembros de mi comité, la Dra. Sylvia Martínez Hernández y el Dr. Raúl Ortiz Pulido, por sus valiosos consejos y aportaciones, que contribuyeron de manera significativa al desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Mario Adolfo García Montes, le reconozco su invaluable apoyo en el laboratorio y su disposición para compartir su conocimiento. Su paciencia y habilidad para explicar de manera clara, amena y divertida, fueron de gran ayuda durante este proceso.

Mi más sincero agradecimiento a mi familia, cuyo apoyo incondicional y respeto por mis decisiones han sido un pilar en este proceso. Su confianza en mí fue, es y será, crucial para superar cada desafío.

Agradezco a la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán por brindarme la oportunidad de desarrollar mi proyecto en sus áreas protegidas, así como a los pobladores de Coatepec y Tilapa, quienes nos recibieron con gran hospitalidad y disposición durante el trabajo de campo.

Al Centro Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), agradezco la beca otorgada para la realización de este proyecto. Asimismo, agradezco al Posgrado del Área Académica de Biología (UAEH), por la oportunidad de realizar mi investigación en sus instalaciones y por las atenciones recibidas, las cuales han facilitado mi desarrollo académico y profesional.

Al equipo, Chinacu team, les agradezco las horas compartidas en el campo, llenas de esfuerzo, experiencias y risas, que hicieron de este trabajo una experiencia más enriquecedora.

A Pinito Saavedra Suárez, gracias por sus consejos siempre oportunos y por alentarme a seguir adelante en momentos cruciales. A Erick Andablo Amador, por su apoyo, sus consejos y los momentos de alegría a la distancia. A Felipe Zamudio Nicolás, por su motivación y su valiosa ayuda con su experiencia en las letras.

A mis amigos y compañeros de la maestría, les agradezco por acompañarme en este camino, por sus consejos, y por la generosidad al compartir sus conocimientos y experiencias. Cada risa, lágrima y emoción vivida ha sido parte integral de este logro.

Agradezco a mis amigos Mario, Enrique, Danny, Manuel, y Aura, por compartir todas esas horas de estudio, brindándome siempre apoyo y consejos. Su amabilidad al abrirme las puertas de su hogar, acompañada de su distintivo aire de calma y risas, ha sido invaluable.

Expreso mi gratitud al colectivo "Al rescate del Río" por su constante apoyo y respeto a mis decisiones, incluso estando lejos del proyecto.

Finalmente, quiero reconocer a todas las personas cuya contribución, aunque no mencionada explícitamente, ha sido valiosa en este proceso. Si me he olvidado de alguien, por favor, sepan que su apoyo y amistad han sido profundamente apreciados y no pasan desapercibidos. Cada uno de ustedes ha jugado un papel importante en este logro, y les estoy sinceramente agradecida.

¡GRACIAS TOTALES!

INDICE

INDICE DE FIGURAS	6
INDICE DE TABLAS	7
ABREVIATURAS.....	8
1 RESUMEN	10
2 INTRODUCCIÓN	10
3 ANTECEDENTES	13
3.1 Generalidades del virus	13
3.1.1 Taxonomía.....	13
3.1.2 Morfología e infección	14
3.1.2.1 Morfología.....	14
3.1.2.2 Infección.....	15
3.2 Generalidades del vector	17
3.2.1 Taxonomía.....	17
3.2.2 Morfología e infección	17
3.2.2.1 Morfología.....	17
3.2.2.2 Infección.....	18
3.3 Diagnóstico molecular.....	19
3.4 Trabajos previos	20
4 HIPÓTESIS	21
5 JUSTIFICACIÓN	21
6 OBJETIVO GENERAL.....	22
7 OBJETIVOS PARTICULARES	23
8 METODOLOGÍA.....	23
8.1 Sitio de estudio	23
8.2 Colecta de material	24
8.3 Extracción de RNA	26
8.4 RT-PCR.....	27
8.4.1 Síntesis de DNAc.....	28
8.4.2 Amplificación por PCR anidada.....	28
8.4.3 Prevalencia.....	29
8.4.4 Análisis de correspondencia	30
8.5 Edad y Tablas de vida	30
9 RESULTADOS	33
10 DISCUSIÓN	46
11 CONCLUSIONES	52
12 REFERENCIAS.....	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama ilustrativo del virión de rabdovirus y su estructura (Tomado y modificado de Walker et al., 2018).....	15
Figura 2. Mecanismo general de infección para el virus de la rabia 1: Unión de la glucoproteína G al receptor de acetilcolina. 2: Liberación de la nucleocápside por fusión de la membrana viral con el endosoma. 3: Liberación del RNA, traducción de la información del genoma viral y transcripción de la información genética gracias a la RNA polimerasa que reconoce la cadena negativa del RNA (proteína L). 4: Ensamble de la glucoproteína G a la membrana del hospedero, translocación del virión en el sistema acoplado de membranas y ensamble final del virión para su liberación por gemación (Tomado y modificado de Schnell et al., 2009).....	16
Figura 3. Ilustración sobre la morfología del murciélago vampiro común (<i>Desmodus rotundus</i>) (Tomado de Osorio-Rodríguez & Saldaña-Vázquez, 2019).	18
Figura 4. Mapa de ubicación de sitios de muestreo. Elaboración propia.	24
Figura 5. Incisivo de murciélago vampiro. Medidas de dentina (D) y cemento (C). (Foto: Cynthia Nicolás Sánchez).....	31
Figura 6. Individuos infectados en la RBTC, Puebla. a) Composición general de los individuos infectados independientemente del sexo. b) Incidencia de la infección en la población considerado el sexo. HA (Hembras adultas), MA (machos adultos), HRN (hembras recién nacidas).	35
Figura 7. Organismos infectados por refugio. Azul (Infectados activos), naranja (infectados inactivos), gris (individuos sanos).	36
Figura 8. Análisis de correspondencia de las localidades y estado reproductivo con respecto a la infección. HRG (Hembra Reproductiva Gestante), HRL (Hembra Reproductiva Lactante), HRPL (Hembra Reproductiva Post Lactante), MREs (Macho Reproductivo Escrotado), HNR (Hembra No Reproductiva Inactiva), MNRIng (Macho Adulto No Reproductivo), MNRAbd (Macho Adulto No Reproductivo Abdominal), HJ (Hembra Juvenil), MJ (Macho Juvenil), HRN (Hembra Recién Nacida).....	37
Figura 9. Mapa de distribución de forrajeo de <i>Desmodus rotundus</i> , para dos localidades de Puebla. Elaboración propia.....	38
Figura 10. Modelo de regresión lineal del desgaste de dentina y la edad calculada.	39
Figura 11. a) Curva de supervivencia. b) Tasa de mortalidad	41
Figura 12. a) Curva de supervivencia. b) Tasa de mortalidad	43
Figura 13. a) Curva de supervivencia. b) Tasa de mortalidad.	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers utilizados para retrotranscripción y amplificación (Coertse et al., 2010).....	28
Tabla 2. Parámetros estimados para las Tablas de vida (Castillo-Lara et al., 2018).	32
Tabla 3. Cantidad de individuos colectados, con su respectivo estado reproductivo.	34
Tabla 4. Tabla de vida calculada para el refugio Las Escaleras. Cats: Categorías por años. ..	40
Tabla 5. Tabla de vida calculada para el refugio Las Peñas Güeras. Cats: Categorías por años.	42
Tabla 6. Tabla de vida calculada para el refugio El Sabino.....	44

ABREVIATURAS

μL	Microlitro
ActF	Actina forward
ActR	Actina reverse
CIB-UAEH	Centro de Investigaciones Biológicas- Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DNAc	<i>Desoxirribonucleic acid codified</i> (Ácido desoxirribonucleico codificante)
DNTP's	<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i> (Desoxinucleotido Trifosfatos)
ELISA	<i>Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay</i> (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
HRG	Hembra Reproductiva Gestante
HNR	Hembra no Reproductiva
HJ	Hembra Juvenil
HRL	Hembra Reproductiva Lactante
HRPL	Hembra Reproductiva Post Lactante
HRN	Hembra Recién Nacida
IA	Infectado activo
II	Infectado inactivo
Ind	Individuos
IOEBS	<i>International Office of Epizootics, Biological Standards Commission</i> (Oficina internacional de la comisión de estándares biológicos para epizoonosis)
LiCl	Cloruro de Litio
lys	<i>Lyssavirus</i>
M	Molar
MJ	Macho Juvenil
MNRAbd	Macho Reproductivo Abdominal
MREs	Macho Reproductivo Escrotado
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MNRIng	Macho Reproductivo Inguinal
mL	Mililitro
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOAc	Acetato de Sodio
NOM	Norma Oficial Mexicana
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
RABV	Virus de la rabia
RBTC	Reserva de la Biosfera Tehuacán – Cuicatlán
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
RNP	Complejo de ribonucleoproteína
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	<i>Retro transcription PCR</i> (PCR retrotranscrito)

S	Sano
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad
TE	Tris-EDTA
TVE	Tablas de Vida Estáticas
UK	<i>United Kindom</i> (Reino Unido)
USA	<i>United States of America</i> (Estados Unidos de América)

1 RESUMEN

La rabia es una enfermedad transmisible y mortal causada por un virus perteneciente al género *Lyssavirus*. *Desmodus rotundus* (murciélago vampiro común) es el principal vector de la rabia silvestre. La dinámica de sus poblaciones implica movimientos recurrentes, colonización de cuevas cercanas al ganado y un comportamiento reproductivo donde los machos mantienen un harem al cual defienden de machos jóvenes que buscan eventos reproductivos. El objetivo de este trabajo fue identificar la incidencia diferencial de *Lyssavirus* entre categorías demográficas del vector y entre cuatro refugios en la reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, Puebla. Para ello se utilizó la técnica de retro transcripción en muestras de todos los individuos colectados y la asignación a grupos de edad, determinados por el desgaste en la dentina de los incisivos, para construir tablas de vida estáticas. Los resultados indican que los refugios más cercanos al ganado tienen una incidencia mayor del virus, en particular de los adultos reproductivos, que tienen una mayor frecuencia de infección que el resto de las categorías, destacando que las hembras superan en casos a los machos. Estos datos son importantes para delimitar las acciones de control del vector necesarias para evitar derrengue y ocasionalmente casos de rabia en humanos.

2 INTRODUCCIÓN

La rabia es una enfermedad zoonótica causada por un virus de la familia Rhabdoviridae, del género *Lyssavirus*; la cual causa una encefalitis infecciosa, transmisible y de alta mortalidad, que tiene la capacidad de afectar a los mamíferos y a algunas aves. La rabia puede manifestarse en dos ciclos epidemiológicos: el urbano y el silvestre, en el primero los principales transmisores son los animales domésticos, siendo el perro el principal reservorio. Por su parte, en el silvestre, los hospederos y

transmisores pueden ser murciélagos, mapaches, coyotes, zorrillos, zorros, entre otros, siendo los murciélagos los principales transmisores del virus (Aguilar-Romero, 2014; Sánchez et al., 2019).

De acuerdo con SENASICA (2022), el número de casos de rabia parálitica bovina reportados en 2022, para la república mexicana fueron 87, siendo Chiapas el estado con más reportes (13), seguido de Hidalgo con 11 casos, Veracruz con nueve, Puebla y Campeche con ocho reportes. Estos valores ubican al estado de Hidalgo como el cuarto lugar en incidencia de la enfermedad.

De conformidad con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-067-ZOO-2007 (DOF, 2011), por medio de la Dirección de Campañas Zoonositarias se sabe que, en el país, del 2001 a 2010, la prevalencia anual de la rabia parálitica bovina se ha incrementado en 1.83%, pasando de 3.80 a 5.63%. De igual forma se evalúa que las pérdidas económicas anuales son de aproximadamente 500 millones de pesos.

A pesar de que la rabia en murciélagos puede presentarse tanto en especies hematófagas como no hematófagas (Carrera et al., 2006), en América Latina es *Desmodus rotundus* (É. Geoffroy St.-Hilaire, 1810) la especie considerada como la principal transmisora y portadora del virus de la rabia (RABV). Estos organismos se alimentan de la sangre de diversas especies de mamíferos, incluyendo ganado y fauna silvestre, lo que favorece la transmisión del RABV a través de la saliva cuando muerden y se alimentan de sus presas (Becker et al., 2021). La destrucción del medio ambiente, principalmente por la deforestación y el aumento en la ganadería extensiva, ha propiciado el incremento de las poblaciones de *D. rotundus* y lo ha convertido en una plaga importante, debido a que el crecimiento en la cantidad de cabezas de ganado les brinda mayor cantidad de alimento de acceso continuo y con menos riesgo (López & Mandujano, 2016). Por lo tanto, la alimentación de estos murciélagos provoca problemas de salud veterinaria y un daño económico para los ganaderos.

Algunos estudios sugieren que los murciélagos infectados pueden no presentar sintomatología y sobrevivir a la exposición del RABV, adquiriendo una respuesta inmunitaria que perdura aproximadamente 12 meses y se sospecha que los machos jóvenes son los animales que dispersan la enfermedad entre colonias, dependiendo de la densidad de murciélagos que habitan en ellos; debido a su comportamiento agresivo al buscar cópulas y a su capacidad de movimiento entre refugios (Scheffer et al., 2022; Bazán, 2020). Estas características hacen que *D. rotundus* sea un reservorio del RABV, y favorecen la dispersión y persistencia del virus entre refugios cercanos (Becker et al., 2021; Carrera et al., 2006).

Existen diversos métodos moleculares para el diagnóstico y la diferenciación de *Lyssavirus*, uno de ellos es la PCR en tiempo real, el cual se usa para amplificar y al mismo tiempo cuantificar moléculas de DNA y DNAc (DNA codificante). Esta prueba consiste en la detección de productos de PCR por medio de señalización de fluorescencia. La PCR en tiempo real resulta ser de gran utilidad en investigaciones científicas, así como en el diagnóstico e identificación de enfermedades (Aguilar-Romero, 2014; Fischer et al., 2012).

La prevalencia del virus en las poblaciones de los reservorios varía entre 0.25% y 8% pero depende de la sensibilidad de la herramienta molecular utilizada para la detección, así como la forma en que se colectan los organismos (Beattie et al., 2022; Korytar et al., 2022; O'Connor et al., 2022; Romero-Barrera et al., 2021; Wray et al., 2017).

La técnica de control del murciélago vampiro consiste en la captura y liberación de los murciélagos tratados con vampiricida, un veneno aplicado en su piel, que, al ser lamido por otros murciélagos, logra disminuir su población; sin embargo, comúnmente no se da seguimiento al número de individuos muertos en las colonias, y no se registra la estructura poblacional del murciélago. No obstante, la cantidad de cabezas de ganado infectadas, si se registra con precisión, debido a que permite

dar un seguimiento a las acciones de prevención. Por lo anterior, los resultados del manejo son parciales y significan, normalmente, la reincidencia de la enfermedad después de uno o dos años de la acción correctiva (Aguilar-Romero, 2014; Castillo, 2015).

Con base en la información consultada, se espera que los machos tengan una mayor incidencia de individuos infectados y que existan diferencias en la prevalencia de estos individuos entre cuevas de maternidad con relación a los refugios periféricos (Bazán, 2020). De ser así, los machos serían los dispersores de la enfermedad, y la llevarían a los refugios cercanos infectando a sus pobladores. Además, de existir diferencias entre las colonias, la cueva con mayor prevalencia podría ser considerada la fuente emisora, mientras que las otras colonias serían el sumidero para el padecimiento. El presente trabajo busca evaluar refugios cercanos que se encuentran en el estado de Puebla, para determinar si existe un intercambio de organismos infectados entre las colonias y su relación con la prevalencia de la enfermedad en la región.

3 ANTECEDENTES

3.1 Generalidades del virus

3.1.1 Taxonomía

La rabia es causada por un virus neurotrópico, perteneciente al Orden Mononegavirales, familia *Rhabdoviridae* (griego: *rhabdos*, varilla), la cual incluye 40 géneros de virus con genomas de RNA monocatenario de sentido negativo, siendo ecológicamente diversos con miembros que infectan plantas o animales, incluidos mamíferos, aves, reptiles o peces (Walker et al., 2018).

Dentro de estos géneros infecciosos, el virus de la rabia pertenece al género *Lyssavirus* (del griego: *Lyssa*, la diosa de la ira o la locura), este se encuentra en constante expansión y se divide en 17 especies, los cuales se distribuyen en casi todo el mundo, excepto en la Antártida y varias islas aisladas,

cabe destacar que solo dos especies (*mokola* e *ikoma*) no han sido relacionados directamente con infecciones de murciélagos. Sin embargo, los análisis evolutivos y la relación entre virus y hospederos, sugieren que todos los *Lyssavirus*, se originaron en quirópteros (Banyard et al., 2014).

3.1.2 Morfología e infección

3.1.2.1 Morfología

Visto a través de microscopía electrónica, el virus de la rabia tiene un virión en forma de bala o bastoncillo, de aproximadamente 100–460 nm de longitud y 45–100 nm de diámetro (Walker et al., 2018). Se encuentra conformado por un genoma de RNA monocatenario de sentido negativo, que en el extremo se encuentra cubierto por una envoltura vírica con formas de espículas, mientras que en el interior se encuentra cubierto por una nucleocápside en forma helicoidal (Rupprecht, 1996).

Estructuralmente el virión tiene cinco proteínas importantes: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glicoproteína (G) y RNA polimerasa (L). El núcleo interno del virión se encuentra conformado por la nucleoproteína (N) unida al RNA genómico, asociadas a la RNA polimerasa (L) y a la fosfoproteína (P), lo cual conforman el complejo de ribonucleoproteína (RNP), el cual se encuentra rodeado por la proteína matriz (M) y la glicoproteína (G) (Figura 1) (Walker et al., 2018; Wunner, 2007).

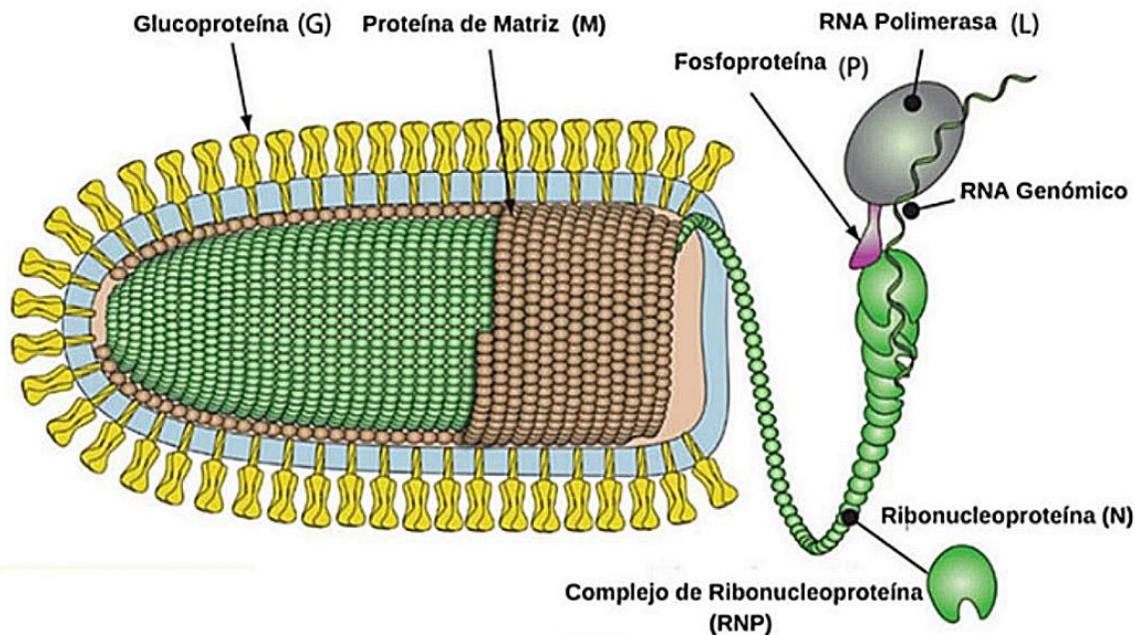


Figura 1. Diagrama ilustrativo del virión de Rabdovirus y su estructura (Tomado y modificado de Walker et al., 2018)

3.1.2.2 Infección

El ciclo de vida del virus de la rabia se puede dividir en tres etapas generales, en primera el virión se une al receptor de acetilcolina, propio de células nerviosas y musculares; que reconoce a la proteína G, lo cual permite la entrada a la célula por endocitosis, posteriormente la membrana vírica se fusiona con la membrana endosomal, liberando en el citoplasma la nucleocápside, que incluye el RNA genómico, y las proteínas N, L y P. En la segunda etapa se lleva a cabo la transcripción, la replicación y la síntesis de proteínas. Para finalizar, en la última etapa la proteína G se inserta en la membrana de la célula huésped, donde se lleva a cabo el ensamblaje con la proteína M, y la RNP, una vez unidos estos elementos mediante el mecanismo de gemación se liberan los viriones del RABV (Davis et al., 2015; Schnell et al., 2009), (Figura 2).

El ciclo de infección comienza con la exposición del tejido (usualmente muscular) al RABV, esto debido a mordeduras o contacto salival de algún organismo infectado. Una vez dentro del tejido la

infección avanza por el sistema nervioso periférico, hasta llegar a la médula espinal donde se multiplican y avanzan por el sistema nervioso central, para invadirlo, posteriormente se propaga a múltiples órganos incluidas las glándulas salivales y las córneas (Daroff & Aminoff, 2014).

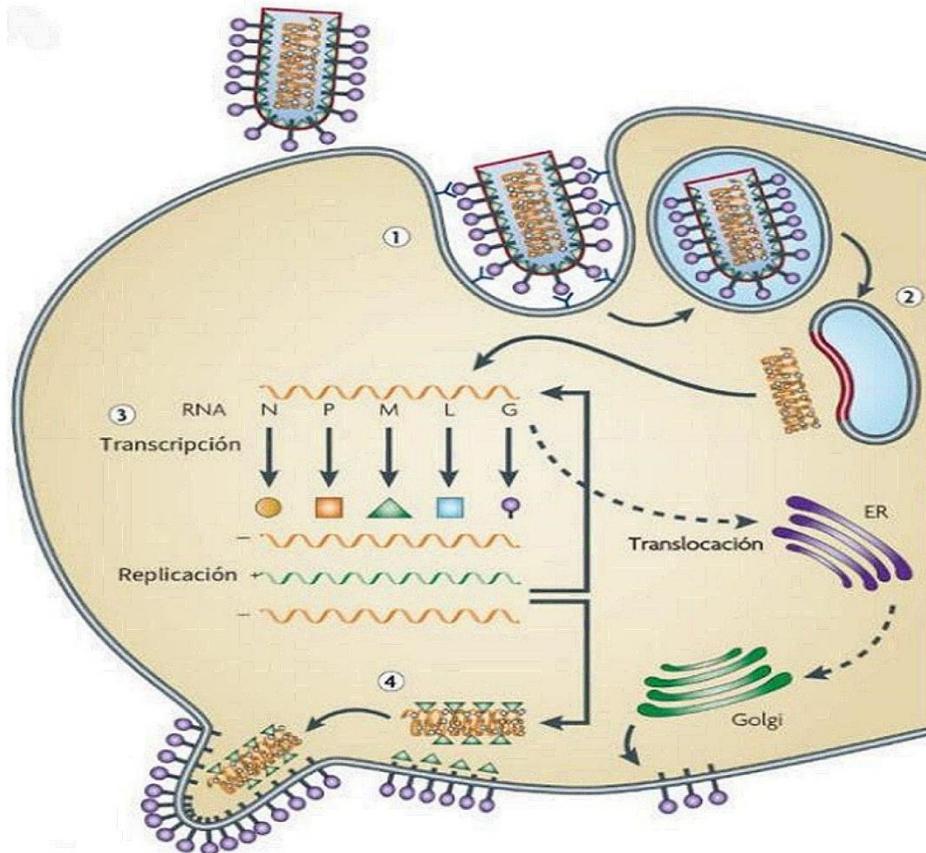


Figura 2. Mecanismo general de infección para el virus de la rabia 1: Unión de la glucoproteína G al receptor de acetilcolina. 2: Liberación de la nucleocápside por fusión de la membrana viral con el endosoma. 3: Liberación del RNA, traducción de la información del genoma viral y transcripción de la información genética gracias a la RNA polimerasa que reconoce la cadena negativa del RNA (proteína L). 4: Ensamble de la glucoproteína G a la membrana del hospedero, translocación del virión en el sistema acoplado de membranas y ensamblaje final del virión para su liberación por gemación (Tomado y modificado de Schnell et al., 2009).

3.2 Generalidades del vector

3.2.1 Taxonomía

Los murciélagos son reconocidos como reservorios de múltiples virus zoonóticos, entre ellos algunos *Lyssavirus*. En América Latina el principal transmisor y reservorio de este virus silvestre es el murciélago vampiro común, perteneciente al Orden Chiroptera, familia *Phyllostomidae*, subfamilia *Desmodontinae*, que incluye tres especies hematófagas, *Diaemus youngi*, *Diphylla eucaudata* y *Desmodus rotundus* (Scheffer et al., 2022)

3.2.2 Morfología e infección

3.2.2.1 Morfología

El murciélago vampiro común es un murciélago puede llegar a medir de 69 a 90 mm de longitud total, pesando entre 25 y 40 gr. Este organismo se caracteriza por tener un par de incisivos filosos, carecer de cola, y presentar una hoja nasal rudimentaria, igualmente presenta un pulgar que se encuentra muy desarrollado, que le permite confiere la capacidad de saltar, trepar y tener una locomoción cuadrúpeda. Del mismo modo podemos identificar que en el labio inferior tienen una hendidura con forma de “V” (Osorio-Rodríguez & Saldaña-Vázquez, 2019).



Figura 3. Imagen de la morfología del murciélago vampiro común (*Desmodus rotundus*) (fotografía propia).

3.2.2.2 Infección

El mecanismo de infección es a través de la saliva del individuo infectado, al alimentarse de su presa, el vector realiza una pequeña herida con los incisivos, posteriormente comienza a lamer, alimentándose de aproximadamente 20 ml de sangre por noche, en su saliva tienen un anticoagulante y un analgésico lo que permite que la sangre siga fluyendo continuamente sin ser detectado por la presa (Juárez-Castillo, 2012; Osorio-Rodríguez & Saldaña-Vázquez, 2019).

Es importante mencionar que existen aspectos ecológicos que lo hacen ser el principal reservorio del virus de la rabia silvestre. Una de las más importantes es su alimentación basada en sangre, además de que tienen desplazamientos que van desde 20 km hasta 100 km diarios, lo que favorece la dispersión de la rabia; del mismo modo, dentro de las colonias los contagios son altos, pues son de ámbitos gregarios, formando grupos de 10 hasta 200 individuos, donde tienen relaciones sociales importantes como el acicalamiento y la regurgitación. Finalmente, sus eventos reproductivos tienden a ser agresivos y territoriales, donde las hembras sufren mordeduras por parte de los machos, mientras que

los machos juveniles son desplazados, o sufren agresiones y heridas por la competencia sexual (Osorio-Rodríguez & Saldaña-Vázquez, 2019; Silva et al., 2019).

3.3 Diagnóstico molecular

Actualmente el diagnóstico molecular del virus de la rabia se ha convertido en un importante apoyo epidemiológico, tanto para detectar reservorios, así como cuadros epidemiológicos, que favorecen a la prevención de infecciones virales.

Existen diversos métodos moleculares para el diagnóstico de la rabia, tales como: PCR, inmunofluorescencia directa, cultivo celular, inoculación en ratones, inmunohistoquímica y ELISA. Una de las pruebas más utilizadas es la PCR, que son pruebas sensibles para la detección de RNA de *Lyssavirus*, teniendo como ventaja principal que no requieren la presencia del virus activo. Otra de las pruebas más utilizadas es la de la inmunofluorescencia directa, que es una herramienta muy específica para detectar el antígeno de la rabia en la piel y otros tejidos frescos; sin embargo, en las primeras etapas de la enfermedad puede dar falsos negativos (IOEBSC, 2018). Cada una de estas pruebas tiene sus ventajas y desventajas basadas principalmente en la eficacia del diagnóstico, así como en el costo y el equipo requerido para realizarlas (i.e., conocimiento, infraestructura y material).

La técnica de detección basada en RT-PCR, es capaz de identificar el virus en muestras con avanzado estado de descomposición, o incluso con años de almacenamiento, que previamente habían resultado negativas con la prueba de inmunofluorescencia (David et al., 2002). Además, permiten identificar menor cantidad de partículas virales en estructuras específicas del encéfalo en el diagnóstico post mortem, que ayuda a establecer que tan temprana fue la infección (Dettinger et al., 2022). Además, esta prueba no tiene falsos positivos, es hasta 10 veces más sensible que la inmunofluorescencia en cuanto a la cantidad de partículas virales y permite separar segmentos de mensajeros de la proteína N o

N-L parciales (Wacharapluesadee et al., 2011), lo que significa que es posible saber si el virus está activo o no tanto por el tamaño de los amplificadores como por la cantidad de RNA detectado por las pruebas con mayor sensibilidad (RT-PCR en tiempo real; Faye et al., 2017).

3.4 Trabajos previos

En el año 2019, la dirección de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, recibió varios reportes por la presencia de animales muertos por derrengue. En este año, se cuantificó una elevada tasa de mortalidad que incluía vacas, chivos y borregos. Cerca de algunas localidades de la reserva se han detectado cuatro refugios con más de 30 murciélagos vampiro cada uno, mismos que se encuentran separados por aproximadamente 30 kilómetros, y dada la alta movilidad diaria de los murciélagos, se sospecha que existe un intercambio de murciélagos entre ellos.

Como respuesta a la infección mencionada en el 2019, en mayo del mismo año, se realizó un control poblacional en la localidad de Coatepec, municipio de Caltepec, Puebla, en la Cueva llamada el Sabino, dando como resultado la desaparición de los contagios de rabia en la zona hasta el momento. Del mismo modo, se obtuvieron datos de la incidencia del RABV en la cueva del Sabino, con hasta un 12.76 % de individuos infectados, mayormente machos reproductivos (Ortega, 2022). Posteriormente se localizó la Cueva de Chemo, el túnel de las Escaleras, y las Peñas Güeras, refugios en los que habitan colonias importantes de *D. rotundus*. Sin embargo, no se conoce el estado de incidencia del virus en estos lugares, lo cual representa una limitación para la creación de metodologías eficaces para el control de la rabia en la zona de riesgo. Asociado a lo anterior, es relevante mencionar que en diciembre de 2022 fueron reportados casos de rabia en humanos que terminaron en la muerte de dos infantes que fueron mordidos por murciélagos. Una vez dado a conocer el caso, los pobladores de las comunidades de estudio indicaron estar preocupados por lo reportado, pues mencionaron falta de servicios médicos cercanos a

las localidades afectadas y poca accesibilidad de vacunas y de profilaxis antirrábica (Akustic-noticias, 2022; Octavio-Aguilar, 2023).

4 HIPÓTESIS

De acuerdo con reportes previos, sabemos que 12.76 % de los murciélagos vampiro en la cueva del Sabino tenían rabia, en particular los machos adultos. Se sabe también que la infección está activa, dado que se presentaron casos de derrengue en la zona durante los últimos tres años. Por lo anterior, si los murciélagos infectados se intercambian entre las colonias, debido a sus hábitos reproductivos y alimenticios, se esperaría que las colonias ubicadas en cuevas cercanas y con fuentes de alimentación disponible tuviesen prevalencia del virus de la rabia similares al Sabino.

5 JUSTIFICACIÓN

En la región entre Puebla y Oaxaca, la rabia parálitica bovina es un problema constante que requiere ser atendido por los veterinarios de SENASICA, para controlar la enfermedad. La rabia representa un grave problema de salud con repercusiones económicas graves para la población de ganaderos de la zona.

La presencia de rabia puede deberse a que el control de los vampiros ha sido realizado solamente en la Cueva del Sabino, que se encuentra en las orillas de un arroyo temporal y a la que es relativamente fácil de llegar. Por otro lado, en la cueva del Chemo, un refugio que se encuentra a 7 km subiendo por caminos escarpados, no se ha aplicado ningún programa de control de murciélago vampiro por lo intrincado del terreno. Por ello se sospecha que el intercambio de murciélagos entre estas cuevas

es la causa de la prevalencia de la enfermedad en la zona, pues mientras la rabia se controla en el Sabino, eso no se hace en el Chemo, permitiendo que la enfermedad permanezca en la zona.

Por otro lado, en la localidad de Tilapa, se encuentran dos refugios: El Túnel de la Escaleras, ubicado junto a la carretera, aproximadamente a 2 km de distancia de la comunidad; y La Cueva de las Peñas Güeras localizada a 5 km del poblado. La cercanía de ambas cuevas a asentamientos humanos representa un riesgo potencial de salud veterinaria y humana.

Las pérdidas económicas que genera la rabia en el Valle de Tehuacán 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 habitados por otras especies, que son quemados o destruidos; se sabe que se han utilizado gases venenosos, insecticidas, humo, o el uso de sustancias tóxicas (Juárez-Castillo, 2012). Es por ello que es necesario conocer cómo se propaga la rabia entre los refugios y además es necesario realizar acciones preventivas que garanticen el control del murciélago vampiro y a su vez de la infección, sin afectar a otras especies que se encuentran en la región.

6 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la prevalencia de *Lyssavirus* en murciélago vampiro (*Desmodus rotundus*) en cuatro refugios dentro de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, pertenecientes al estado de Puebla, mediante RT-PCR; con el fin de detectar la presencia del virus entre las colonias y su distribución dentro de la estructura poblacional.

7 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar la presencia del virus en el vector zoonótico en las colonias evaluadas, mediante RT-PCR, para establecer la prevalencia.
- Comparar la incidencia del virus entre las localidades, mediante análisis de frecuencias; para establecer los radios de distribución.
- Determinar la distribución del virus en la estructura demográfica de las colonias, a partir de la edad de los murciélagos mediante análisis dentario y Tablas de Vida Estáticas, para establecer las categorías con mayor riesgo de contagio o propagación.

8 METODOLOGÍA

8.1 Sitio de estudio

El área de estudio se localiza en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, en el estado de Puebla, en las localidades de Santiago Coatepec, municipio de Caltepec, y San José Tilapa, municipio de Coxcatlán (Figura 4). En Coatepec, con una población humana de 684 habitantes, la vegetación es semidesértica, determinada por el clima, que presenta lluvias durante el verano y una temperatura media anual entre 24° y 25° C y una precipitación media anual menor de 500 mm. En este lugar los pobladores se dedican principalmente a la producción y comercialización de pitahaya, a la ganadería (caprina, ovina, bovina y equina) y a la producción de mezcal (Esparza & García, 2013; INEGI, 2020).

El segundo sitio, perteneciente al municipio de Coxcatlán, colinda al sur con el estado de Oaxaca. En el sitio predomina un clima semiseco con lluvias en verano, con una temperatura media anual de 24.2° C y una precipitación media anual de 447.7 mm. En la zona se desarrollan actividades

como el cultivo de caña de azúcar, maíz, melón y sandía, además en esta localidad se práctica esporádicamente la ganadería bovina y caprina (Olalde-Estrada, 2015; Hernández-Trejo, 2017).

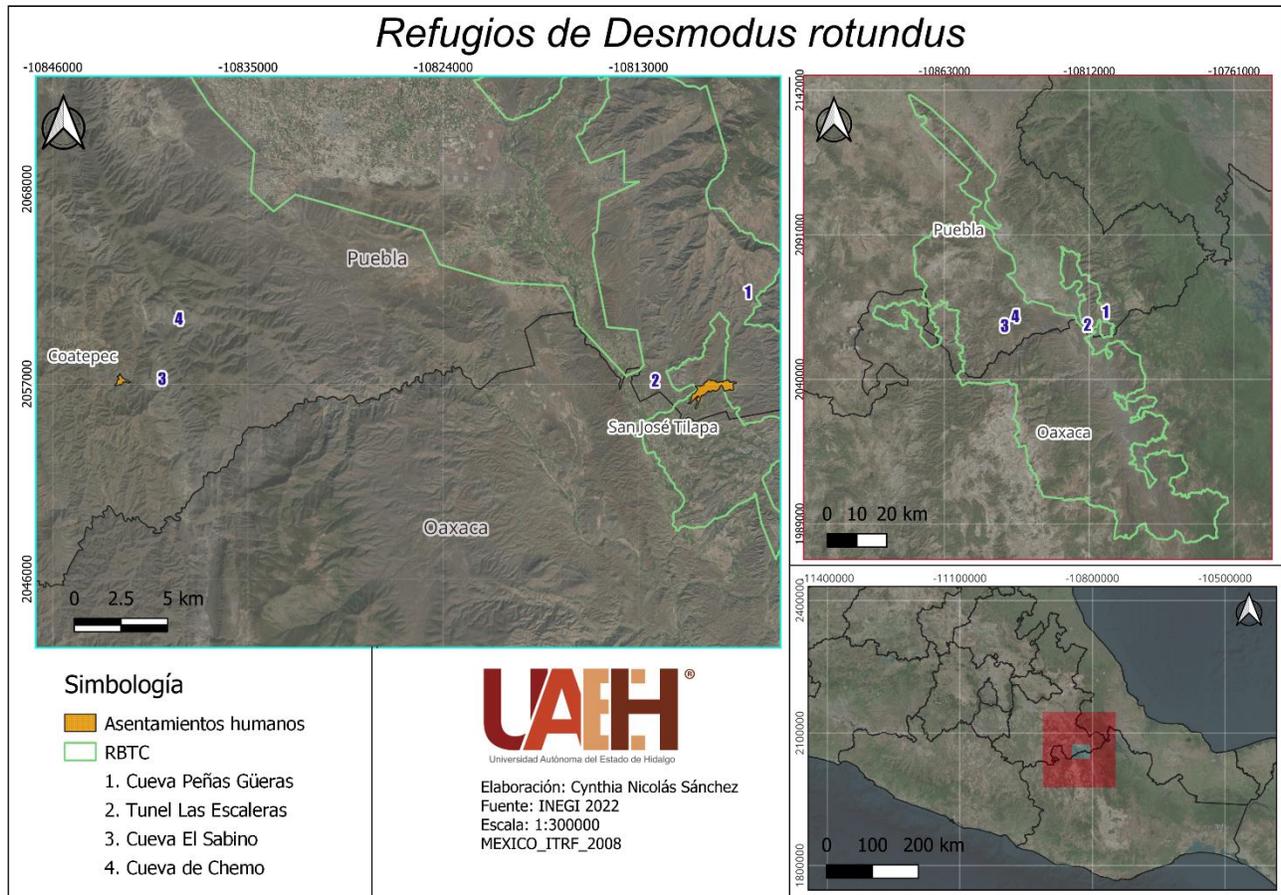


Figura 4. Mapa de ubicación de sitios de muestreo. RBTC: Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán. Elaboración propia.

8.2 Colecta de material

Para realizar esta investigación se llevaron a cabo dos salidas de campo, la primera se realizó del 23 al 25 de abril de 2022, en las cuevas “El Sabino” y “El Chemo”, ubicadas en el municipio de Caltepec. Mientras que del 4 al 8 de julio del mismo año, se llevó a cabo la segunda salida de campo, donde se colectaron individuos de los refugios “Túnel Las Escaleras” y “Las Peñas Güeras”, ubicados en el municipio de Coxcatlán, Puebla.

Con la finalidad de capturar la mayor cantidad de murciélagos vampiro, antes del anochecer, fueron colocadas dos redes de niebla, una de seis metros en la entrada de las cuevas, y una de tres metros en el interior de los refugios, todas fueron revisadas cada 30 minutos. Los individuos fueron sacados de la red utilizando guantes de carnaza, los individuos fueron seleccionados y sacrificados, posteriormente se colocaron en recipientes de plástico y fueron mantenidos con hielo. A los ejemplares les fueron tomadas las siguientes medidas: longitud del antebrazo, edad, sexo, condición reproductiva y peso corporal.

Para estimar la edad se observaron a contraluz las articulaciones de las falanges de las alas, determinando tres categorías:

- Jóvenes: cuando se observan dos anillos cartilagosos de crecimiento en las articulaciones de las alas.
- Subadultos: cuando las articulaciones están parcialmente osificadas y se observa una región transparente entre las articulaciones.
- Adultos: cuando están completamente osificadas las articulaciones y son opacas.

La condición reproductiva se definió mediante la observación de estructuras reproductivas. En el caso de las hembras, la vagina, considerándose como “No reproductivas” aquellas con la vagina cerrada, y como “Receptivas o Reproductivas”, a las que presentaban la vagina inflamada. Igualmente se revisaron las glándulas mamarias, considerando un tamaño pequeño que indicaban inactividad reproductiva; mientras que cuando se presentaban de un tamaño medio y una coloración oscura, indicaban que podían estar desarrollándose para un período de lactancia (si estaban preñadas) o ser poslactantes con las glándulas mamarias grandes, pero sin leche. Las hembras lactantes se determinaron cuando las glándulas estaban turgentes, de coloración rosácea, y que al ser presionadas secretaban leche. Adicionalmente y por medio de la palpación del vientre, se examinó si se encontraban en gestación. En

cuanto a los machos, se determinó la posición de los testículos, abdominales, inguinales o escrotados (Torres-Flores et al., 2012).

Los ejemplares colectados fueron colocados en hielo y llevados hasta el laboratorio de genética del CIB-UAEH, para realizar las pruebas de RNA y detectar la presencia de la rabia en estos ejemplares.

8.3 Extracción de RNA

La obtención de RNA se realizó mediante el protocolo de Coertse et al. (2010) y Yockteng et al. (2013). A dicho protocolo se le realizaron algunas modificaciones a partir de Sacramento et al. (1991) y Promega Corporation (2016), para una mejor obtención de material genético. Es importante mencionar que todo el material (reactivos, alícuotas y muestras) se mantuvieron en refrigeración y durante el proceso de extracción se colocaron en hielo para evitar pérdida de estabilidad del RNA.

En un gabinete de bioseguridad clase II Thermo Forma® (Thermo Fisher Scientific, USA) se realizó una disección cerebral y se colocó el encéfalo en un microtubo (enfriado previamente en nitrógeno líquido), y adicionando RNA later® al 1% (Sigma-Aldrich, UK) para su conservación a 4°C.

Cada muestra de cerebro se maceró con nitrógeno líquido en el gabinete de bioseguridad indicado arriba, hasta que la muestra tomó un aspecto polvoso, luego se agregó 1 mL de TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, UK), para verterlo en un microtubo de 2 mL, al cual se le agregó 10 µL de DNAasa (Promega®, UK) para ser incubado a 37°C durante 30 minutos. Al concluir este tiempo, se añadieron 100 µL de NaCl y 400 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), mezclando cuidadosamente por inversión y centrifugando a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se extrajeron los microtubos de la centrífuga y se colocaron inmediatamente en hielo, a continuación, se realizó la recuperación de la mayor parte de la fase acuosa, que se transfirió a un nuevo microtubo de 2 mL (Las cantidades posteriores dependen del volumen de recuperación, lo cual se mencionará como “volumen”).

Después se agregó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y se llevó a otro ciclo de centrifugado a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Al finalizar este proceso, se realizó la recuperación de la fase acuosa en un microtubo de 2 mL, al que se le agregó ¼ de volumen de isopropanol y ¾ de volumen de LiCl 4M. Cada tubo se mezcló por inversión y se dejó precipitar toda la noche a -20°C. Al siguiente día, se centrifugaron los microtubos a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, al término del ciclo, y con mucho cuidado de no perder la pastilla generada (pellet), se decantó por completo el sobrenadante. Seguidamente, los microtubos con solo el pellet en su interior se secaron en una campana de extracción y después fueron suspendidos en 100 µL de agua ultrapura estéril.

Una vez suspendido se agregó 0.1 volúmenes (10 µL) de NaOAc 3M y 1 volumen (100 µL) de LiCl 4M, luego se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, y nuevamente sin perder la pastilla, se llevó a cabo la decantación de la fase acuosa, repitiendo este proceso de lavado hasta que el pellet perdió la coloración rosa, acto seguido se suspendido en 30 µL de agua ultrapura. Cabe recalcar que todos los desechos fueron depositados en bolsas marcadas para manejo de residuos peligrosos, con una previa esterilización por luz UV durante una hora y con manejo de RPBI posterior de acuerdo a la normativa vigente NOM-067-ZOO-2007 (DOF, 2011).

8.4 RT-PCR

Con la finalidad de determinar la presencia/ausencia del *Lyssavirus* en cada muestra se usó la técnica RT-PCR en dos pasos (síntesis de DNAc y amplificación por PCR), usando primers específicos para *Lyssavirus* y primers de Actina que sirven como control positivo (Tabla 1).

Para poder deshacerse de los loops del RNA, se realizó un tratamiento basado en Promega Corporation, (2016) en el que se colocaron los tubos con 3 µL RNA, agregando los 2 µL de primers (001lys, 550B, ActF, ActR) y 7 µL de agua ultrapura. Se mezclaron, y se incubaron a 70°C durante siete

minutos, al culminar el tiempo inmediatamente se colocan en hielo, para evitar que se vuelvan a formar los loops.

Tabla 1. Primers utilizados para retrotranscripción y amplificación (Coertse et al., 2010).

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

8.4.1 Síntesis de DNAc

Se realizó una mezcla de RNA extraído, primers y reactivos, agregando al tubo del tratamiento, 1 μ L retrotranscriptasa, 1 μ L de DNTP's, y 2 μ L de RNA extraído. Esta mezcla se realizó una para *Lyssavirus* y otra para Actina. La RT-PCR de *Lyssavirus* se ejecutó mediante un ciclo térmico de 90 minutos a 42°C (Sacramento et al., 1991). Mientras que la de actina se realizó con el ciclo térmico: 37°C durante 60 min, 85°C durante 5 min, 37°C por 10 min, 72°C durante 5 min y finalmente almacenada 4°C.

8.4.2 Amplificación por PCR anidada

De igual forma, se hizo una mezcla de DNAc extraído del paso anterior, primers y reactivos, agregando 2-5 μ L del DNAc, 1.6 μ L de MgCl₂ (25 mM), 1 μ L de primer forward, 1 μ L del reverse (10 μ M), 0.5 μ L de dNTP's (10 mM), 2.4 μ L de buffer (5x), 0.5 μ L de dH₂O y 0.4 μ L (2U) de GoFlexi Taq DNA polimerasa (Promega®, UK) para un total de 12.4 μ L por tubo de reacción con el siguiente ciclo térmico: 5 minutos a 95°C, 35 ciclos (de 55 s a 94°C, 50 segundos a 45°C para *Lyssavirus* y 58°C para actina, 1 minuto a 72°C) y 8 min a 72°C de extensión final. Ambas técnicas se realizaron en un termociclador

punto final Artik® (Thermo Fisher Scientific, EU). Los amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% y teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/mL.

8.4.3 Prevalencia

Una vez obtenidos los datos de presencia o ausencia del virus, se construyó una base de datos en donde se clasifico a los individuos con respecto a su edad y condición reproductiva quedando de la siguiente manera:

- Hembra Reproductiva Gestante (**HRG**)
- Hembra Reproductiva Lactante (**HRL**)
- Hembra Reproductiva Post Lactante (**HRPL**)
- Hembra Adulta No Reproductiva (**HNR**)
- Hembra Juvenil (**HJ**)
- Hembra Recién Nacida (**HRN**)
- Macho Adulto Reproductivo Escrotado (**MREs**)
- Macho Adulto No Reproductivo Inguinal (**MNRIng**)
- Macho Adulto No Reproductivo Abdominal (**MNRAbd**)
- Macho Juvenil (**MJ**)

Igualmente se agruparon por el tipo de infección presentada, estableciendo tres categorías:

- Sano (**S**): Sin bandeo.

- Infectado activo (**IA**): Presencia de múltiples bandas que representan la presencia fragmentos parciales del RNA mensajero necesarios para la síntesis de proteínas virales e integración de los viriones.
- Infectado inactivo (**II**): Presencia de una sola banda, lo que representa que el individuo estuvo infectado en algún momento por lo que conserva una copia del RNA genómico viral sin transcritos intermedios requeridos para la síntesis del proteoma viral.

8.4.4 Análisis de correspondencia

Mediante los datos de las localidades, estado reproductivo y tipo de infección, se creó una tabla de frecuencias que fue procesada en el programa Statistica (StatSoft Inc., 2004) para realizar un análisis de correspondencia y de esta manera comparar la incidencia del virus entre localidades y grupos. Con la finalidad de observar el posible intercambio de organismos entre los refugios, así como el riesgo que existe para las localidades humanas cercanas a estos, se creó una base de datos con las coordenadas de los refugios, y junto con la capa de asentamientos humanos fueron exportadas al programa QGIS 3.28.2, con lo que se realizó un mapa y con la herramienta buffer se crearon radios de forrajeo de 20 km de distancia (Sotalín, 2015; Scheffer et al., 2022).

8.5 Edad y Tablas de vida

Para la determinación de la edad real de los organismos se utilizó la medida del índice de desgaste de dentina, el cual se basa en la relación dentina-cemento de los incisivos de los murciélagos vampiro (Núñez & Viana, 1997). Para ello en la campana de flujo laminar se extrajeron los dientes superiores de cada individuo, después con ayuda de un microscopio estereoscópico se retiraron las encías

y otros dientes, dejando únicamente los incisivos, que fueron guardados en microtubos con alcohol al 70%.

Los incisivos limpios se colocaron sobre una hoja milimétrica y con un microscopio estereoscópico les fue tomada una fotografía. Estas imágenes fueron exportadas al programa Imagej (Schneider et al., 2012) donde se les asignó una escala, con respecto a un milímetro, seguido de esto se tomaron las medidas de la dentina y el cemento.

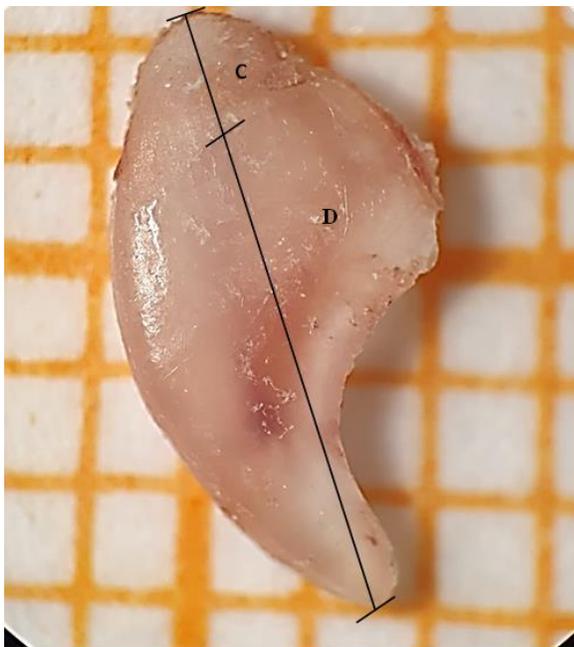


Figura 5. Incisivo de murciélago vampiro. Medidas de dentina (D) y cemento (C). (Foto: Cynthia Nicolás Sánchez).

Posteriormente las medidas se incluyeron en una base de datos y se calcularon los índices de desgaste de dentina (Núñez & Viana, 1997):

$$\text{Relación cemento – dentina} = \frac{\text{Cemento}}{\text{Dentina}} \times 100$$

$$\text{Porcentaje de dentina} = \frac{\text{Dentina}}{(\text{Cemento} + \text{Dentina})} \times 100$$

Para poder obtener el número de categorías y el intervalo por año se utilizó la regla de Sturges, que tiene como ecuación:

$$k=1+\log_2(N)$$

Donde: k= número de categorías.

N= número de muestras.

Una vez categorizados los individuos por edad y los datos del índice de porcentaje de dentina se realizó una regresión lineal.

A partir de la edad calculada se construyó una Tabla de vida estática la cual se generó mediante el cálculo de distintos aspectos poblacionales (Tabla 2):

Tabla 2. Parámetros estimados para las Tablas de vida (Castillo-Lara et al., 2018; Álvarez-Hernández, et. al.)

Parámetros	Representa	Cálculo
X	Individuos por categoría de edad.	Frecuencias por categoría de edad.
m_x	Fecundidad.	Número de hembras nacidas en promedio por categoría de edad.
D_x	Proporción de individuos muertos.	$l_x - l_{x+1}$ o bien $n_x - n_{x+1}$
l_x	Proporción de individuos supervivientes que entran en la clase x, con respecto al número inicial de individuos.	$\frac{n_x}{n_0}$
Q_x	Tasa de mortalidad.	$\frac{n_x}{n_x + 1}$
p_x	Proporción de individuos supervivientes con respecto al número total de individuos.	$1 - Q_x$
R_0	Tasa de reproducción de cada generación.	$\sum l_x m_x$
T_G	Tiempo generacional	$\frac{\sum x l_x m_x}{\sum l_x m_x}$
r	Tasa de crecimiento poblacional <i>per capita</i>	$r \approx \frac{(\ln R_0)}{T_G}$
λ	Tasa intrínseca de crecimiento poblacional	$\lambda = e^r$
n_x	Número de individuos por clase de edad	

n0	Número de individuos de la clase 0	
----	------------------------------------	--

Una vez construidas las Tablas de vida se realizaron las gráficas de supervivencia (Lx) y de mortalidad (dx).

9 RESULTADOS

En la primera salida de campo fueron colectados un total de 35 individuos, siendo la cueva de “El Sabino” la que presentó la colonia más abundante con 32 organismos, de los cuales: 11 fueron machos y 21 hembras. Cabe destacar que la mayoría de las hembras se encontraban en diferente estado reproductivo, encontrando 13 gestantes, dos lactantes, una post lactante, y cinco no reproductivas (incluyendo una cría). Mientras que, en los machos, 10 estaban reproductivos y sólo uno no reproductivo. En la cueva “El Chemo” se obtuvieron sólo tres individuos, dos de ellos hembras reproductivas (una gestante y una post lactante) y un macho reproductivo.

En la segunda salida de campo fueron colectados un total de 30 individuos, encontrando 17 organismos en “Las Peñas Güeras”, de los cuales: siete fueron machos y 10 hembras. La mayor parte de las hembras se encontraban en algún estado de reproducción (dos gestantes y cuatro lactantes) además cuatro no reproductivas (incluyendo dos crías). Mientras que en los machos: dos se encontraban reproductivos y cinco no reproductivos. En el “Túnel Las Escaleras”, se capturaron 13 individuos: dos de ellos hembras lactantes, una hembra no reproductiva, seis machos reproductivos y cuatro no reproductivos (Tabla 3). Sin embargo, las capturas en este sitio fueron bajas en comparación con la abundancia observada en su interior, esto se debe a que en este refugio existen tres salidas donde fueron colocadas redes de niebla, no obstante, debido al tamaño y forma de las salidas, no se lograron cubrir completamente, lo cual permitió que varios organismos logaran escapar.

Tabla 3. Cantidad de individuos colectados, con su respectivo estado reproductivo y porcentaje respecto al total de individuos por cueva.

	Cueva el Sabino	Cueva del Chemo	Túnel las escaleras	Peñas Güeras
HRG	13 (40.625%)	1 (33.33%)	0	2 (11.8 %)
HRL	2 (6.25%)	0	2 (15.4 %)	4 (23.5 %)
HRPL	1 (3.125%)	1 (33.33%)	0	0
MREs	10 (31.25%)	1 (33.33%)	6 (46.2%)	2 (11.8%)
HNR	4 (12.5%)	0	1 (7.7%)	2 (11.8%)
MNRIng	1 (3.125%)	0	0	2 (11.8%)
MNRAbd	0	0	1 (7.7%)	3 (17.6%)
HJ	0	0	0	0
MJ	0	0	3 (23.1%)	0
HRN	1 (3.125%)	0	0	2 (11.8%)
TOTAL	32	3	13	17

Dónde: HRG (Hembra Reproductiva Gestante), HRL (Hembra Reproductiva Lactante), HRPL (Hembra Reproductiva Post Lactante), MREs (Macho Reproductivo Escrotado), HNR (Hembra No Reproductiva), MNRIng (Macho Adulto No Reproductivo Inguinal), MNRAbd (Macho Adulto No Reproductivo Abdominal), HJ (Hembra Juvenil), MJ (Macho Juvenil), HRN (Hembra Recién Nacida).

Mediante el diagnóstico molecular RT-PCR se obtuvieron un total de 65 muestras de cerebro, de las cuales el 18% (12 individuos) correspondieron a individuos infectados, siendo la mayoría (ocho organismos) infectados activos, mientras que para la infección inactiva se diagnosticaron cuatro organismos (Figura 6a). Las hembras mostraron un número mayor de individuos infectados (ocho organismos), mientras que en los machos cuatro individuos estuvieron infectados (Figura 6b). Respecto al estado de la infección (activo e inactivo) y al estado reproductivo de los murciélagos, se observó que el mayor porcentaje de infección se encuentra en hembras adultas, tanto activa (cinco casos) como inactiva (dos casos), después se encuentran los machos adultos con dos casos activos y dos inactivos y, finalmente, una hembra recién nacida con infección positiva activa cuya madre tenía la infección activa.

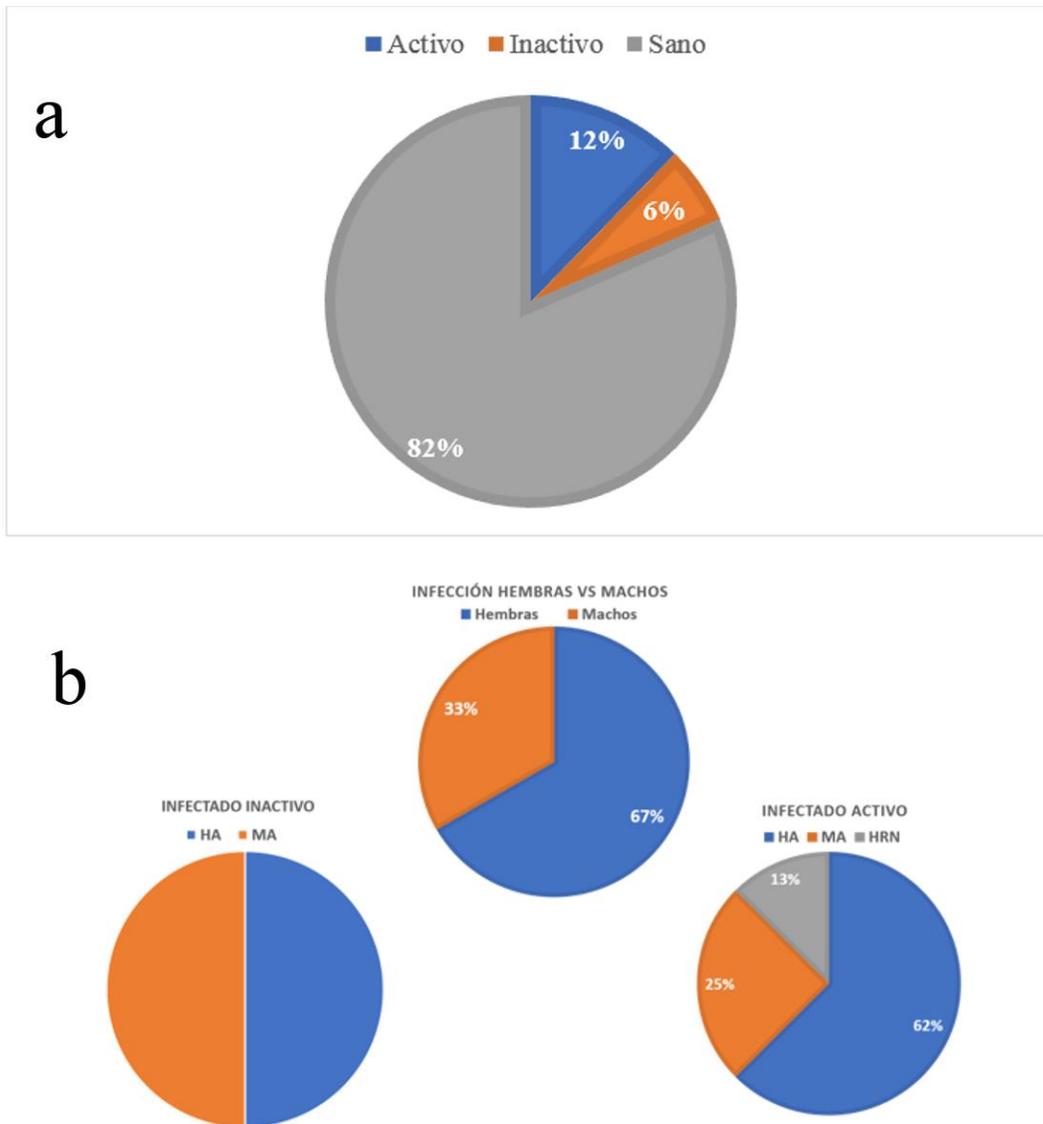


Figura 6. Individuos infectados en la RBTC, Puebla. a) Composición general de los individuos infectados independientemente del sexo. b) Incidencia de la infección en la población considerado el sexo. HA (Hembras adultas), MA (machos adultos), HRN (hembras recién nacidas).

De esta manera, como se muestra en la Figura 7, se pudo identificar la prevalencia del virus, tanto por región como por refugio, siendo los de Coatepec los que tienen mayor cantidad de organismos infectados, obteniendo así en la cueva “El Sabino” (32 ind. totales): cinco individuos infectados activos (16%) y tres infectados inactivos (9%). Mientras que en la cueva “El Chemo” (tres individuos totales), se registró un individuo infectado activo (33%) y un infectado inactivo (33%). Así mismo, en los refugios

de la localidad de Tilapa, se destaca la baja densidad de individuos infectados, siendo el “Túnel las Escaleras” (13 ind. totales) donde todos los murciélagos se diagnosticaron como sanos; mientras que en “Las Peñas Güeras” (17 ind. totales) se registraron dos animales infectados activos (12 %).

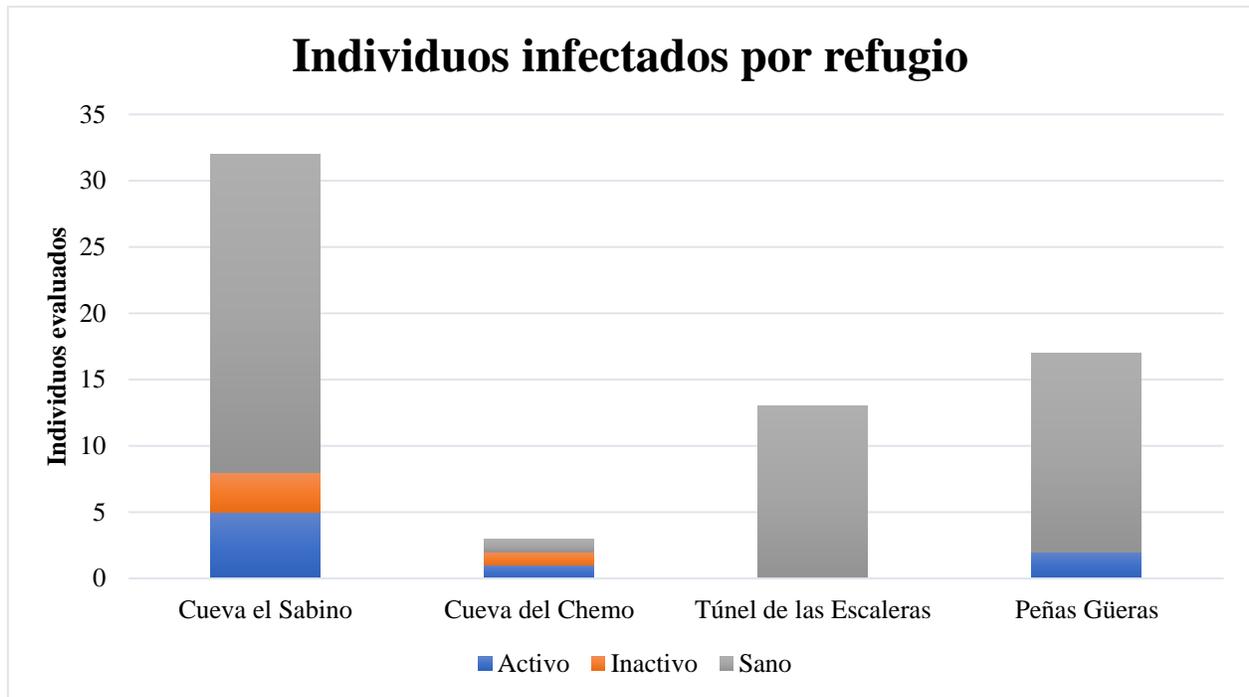


Figura 7. Organismos infectados por refugio. Azul (Infectados activos), naranja (infectados inactivos), gris (individuos sanos).

El análisis de correspondencia (Figura 8) basado en el uso de los datos de las localidades, estado reproductivo y tipo de infección, dicha evaluación permitió la diferenciación de tres grupos importantes. El primero corresponde a los grupos con mayor riesgo de infección (letras rojas), donde se puede observar tanto a hembras como a machos en estado de reproducción activo (HRG, HRL, HRPL, MREs); el segundo grupo (letras de color naranja) comprende a los organismos adultos inactivos (HNR, MNRIng, MNRAbd); mientras que el último grupo (letras de color verde) se encuentra conformado por los individuos juveniles inactivos (MJ, HJ, HRN). Es importante mencionar que estos últimos dos grupos son los que tienen menor riesgo de infección. También se puede apreciar que, en comparación con

Tilapa, donde la mayoría de los organismos están sanos, Coatepec es el sitio con mayor infección, tanto de individuos activos como inactivos.

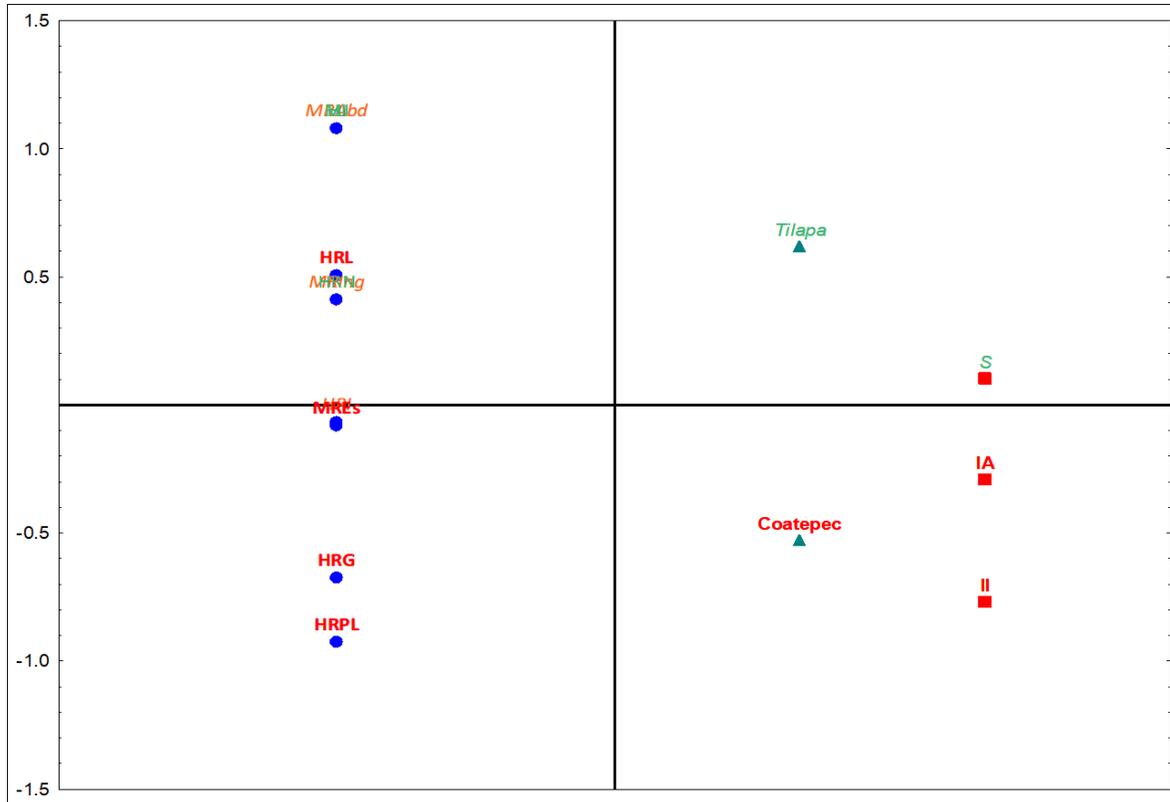


Figura 8. Análisis de correspondencia de las localidades y estado reproductivo con respecto a la infección. HRG (Hembra Reproductiva Gestante), HRL (Hembra Reproductiva Lactante), HRPL (Hembra Reproductiva Post Lactante), MREs (Macho Reproductivo Escrotado), HNR (Hembra No Reproductiva), MNRIng (Macho Adulto No Reproductivo Inguinal), MNRAbd (Macho Adulto No Reproductivo Abdominal), HJ (Hembra Juvenil), MJ (Macho Juvenil), HRN (Hembra Recién Nacida).

Se realizó un mapa (Figura 9) que ilustra un radio de forrajeo de 20 km, respecto a las localidades muestreadas, mostrando la posibilidad de contacto entre individuos de la localidad de Tilapa y Coatepec.

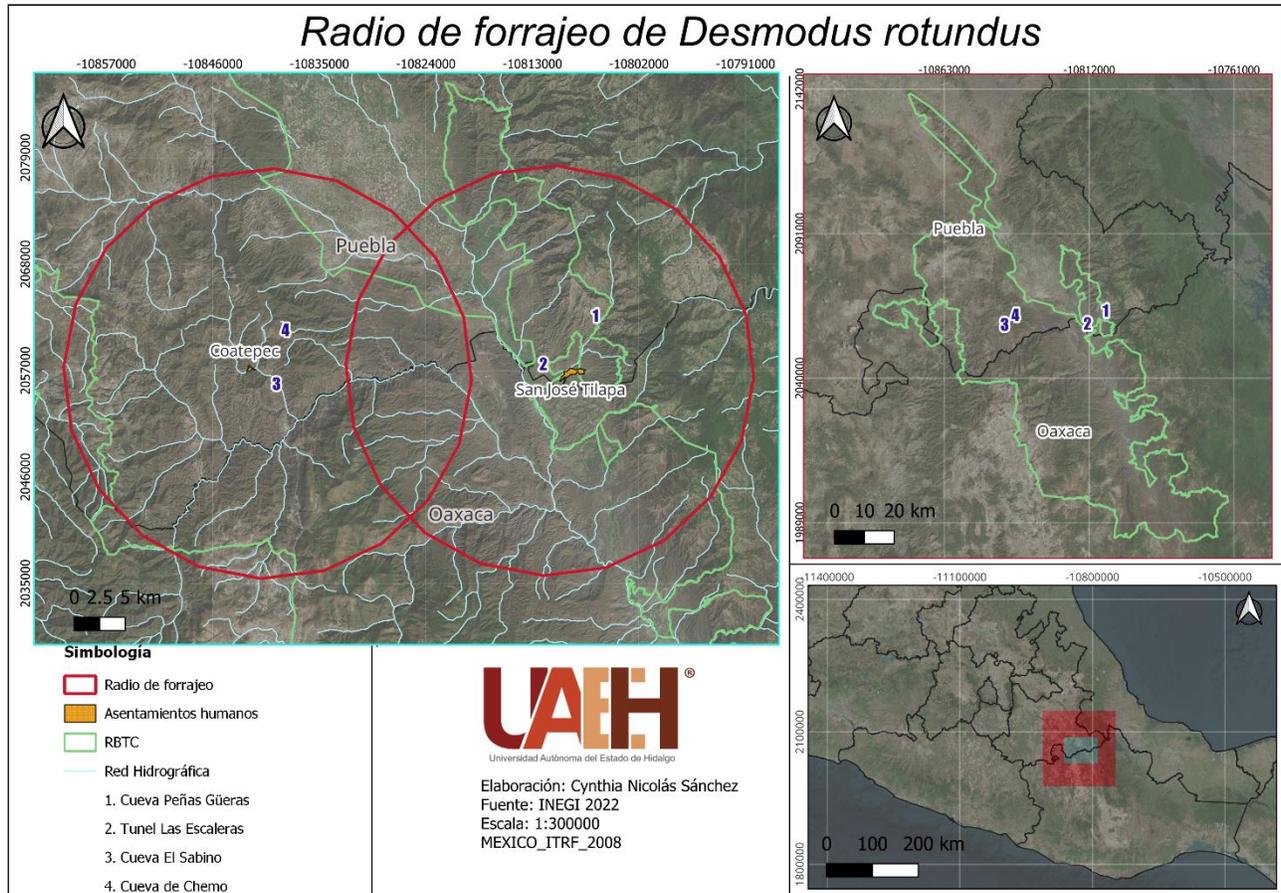


Figura 9. Mapa de posible área de forrajeo de *Desmodus rotundus*, para dos localidades de Puebla. Elaboración propia.

Como podemos observar en la Figura 10 mediante el uso de un modelo de regresión lineal y de un análisis de índice de desgaste de dentina, se estimó que la mayor edad obtenida para los murciélagos fue de 22 años, que corresponde a una hembra adulta lactante, mientras que la edad mínima fue de un año, este corresponde a una hembra no reproductiva.

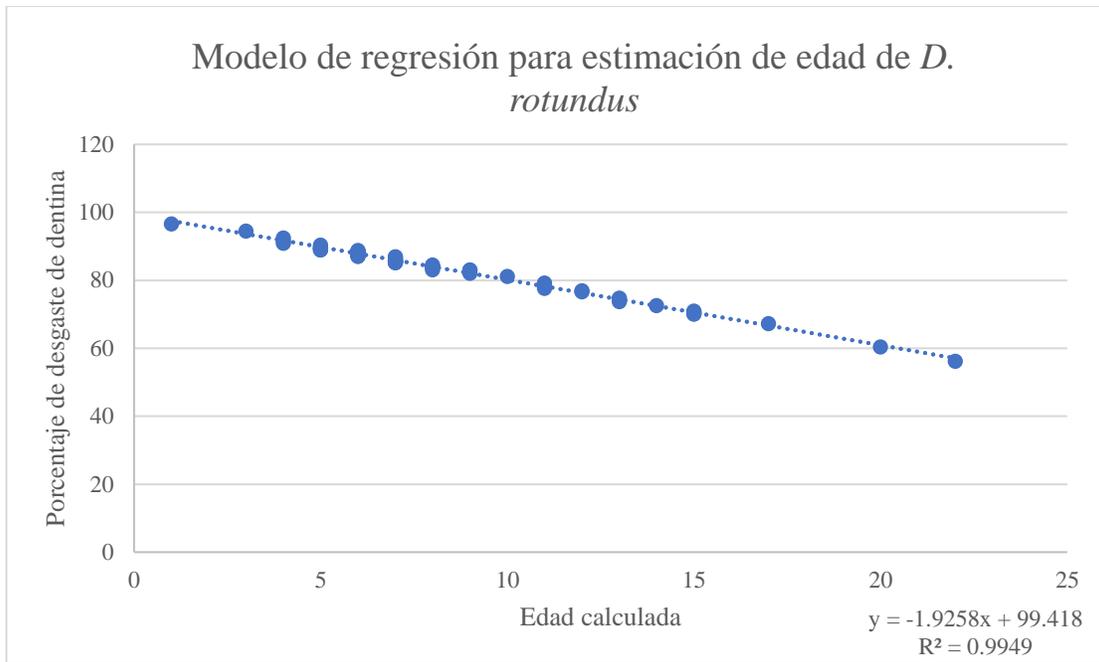


Figura 10. Modelo de regresión lineal del desgaste de dentina y la edad calculada.

La Tabla de vida del refugio de Las Escaleras (Tabla 4) mostro que la población se encuentra decreciendo ($\lambda=0.46$), con una tasa reproductiva neta muy baja ($R_0= 0.40$), lo que equivale a decir que cada hembra deja 0.40 crías que alcanzarán la etapa reproductiva. El tiempo generacional también es bajo, alcanzando solo 1.17 categorías, con solo dos eventos reproductivos registrados en la categoría de 7 y 22 años. El análisis indica que la mx (componente reproductivo) se inicia desde los siete años en adelante, conservando una constante biológica de una cría por hembra. En esta población, debido al error de muestreo asociado con el escape de individuos por vías alternas, es posible que se esté subestimando la tasa de crecimiento poblacional.

Al realizar la gráfica de curva de supervivencia, se puede apreciar que corresponde al tipo tres. Donde los organismos más jóvenes mueren con mayor frecuencia (Fig. 11a). La Figura 11b muestra un primer pico de mortalidad en los primeros dos años de vida, seguido de un segundo pico alrededor de

los seis o siete años de edad. Después de esta edad, los individuos sobreviven hasta aproximadamente los 15 años donde nuevamente observamos un aumento en la mortalidad.

Tabla 4. Tabla de vida calculada para el refugio Las Escaleras. Cats: Categorías por años.

Cats.	X	mx	Dx	lx	Dx	Qx	px	lxmx	Xlxmx	Ro	0.40
0	15	0	6.5	1	0.4333	0.4333	0.5666	0	0	G	1.17
4	8.5	0	6	0.5666	0.4	0.7058	0.2941	0	0	r	-0.79
5	2.5	0	0	0.1666	0	0	1	0	0	λ	0.46
6	2.5	0	0.5	0.1666	0.0333	0.2	0.8	0	0		
7	2	0.5	1	0.1333	0.0666	0.5	0.5	0.0666	0.1333		
8	1	1	0	0.0666	0	0	1	0.0666	0.0666		
9	1	1	0	0.0666	0	0	1	0.0666	0.0666		
11	1	1	0	0.0666	0	0	1	0.0666	0.0666		
15	1	1	0	0.0666	0	0	1	0.0666	0.0666		
22	1	1	1	0.0666	0.0666	1	0	0.0666	0.0666		

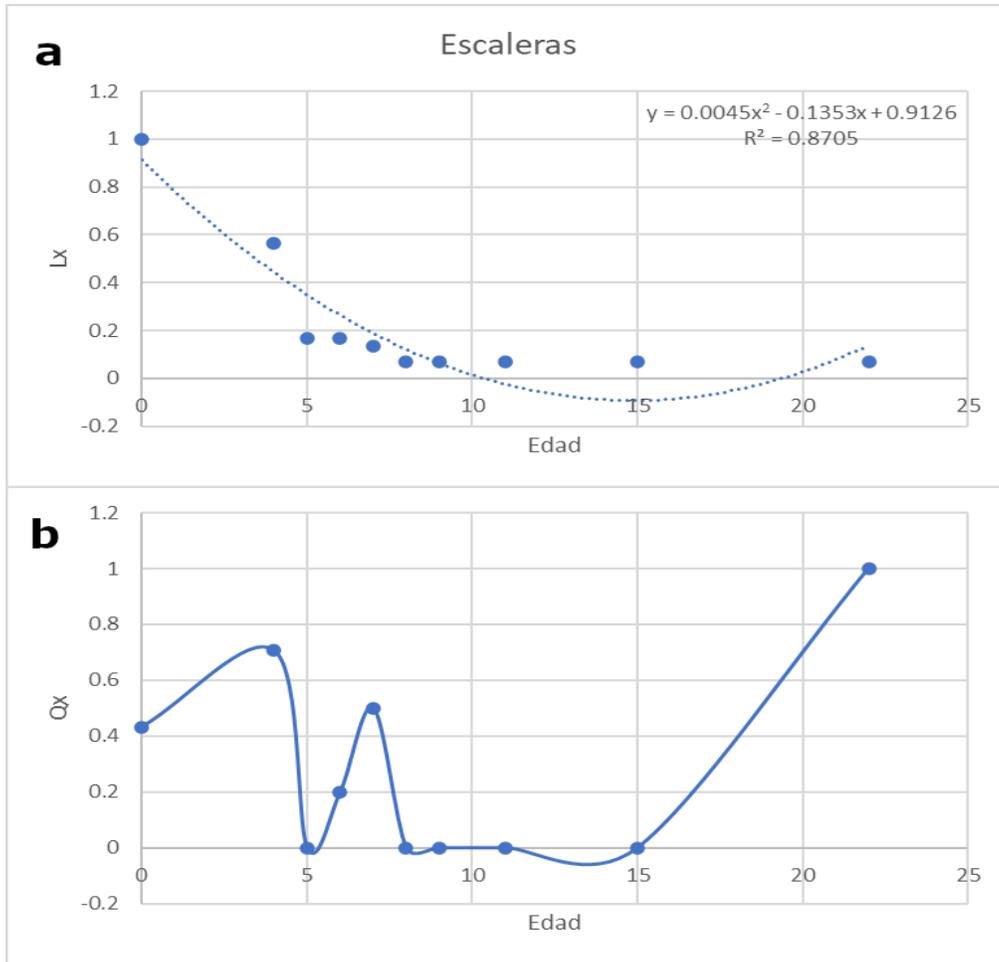


Figura 11. a) Curva de supervivencia. b) Tasa de mortalidad, de la cueva Las Escaleras, Tilapa, Puebla. Ver Tabla 2 para detalles de las variables usadas.

Por otro lado, de la Tabla de vida del refugio Las Peñas Güeras (Tabla 5) mostró un incremento en la población del 6% ($\lambda=1.06$). En este refugio, la tasa reproductiva neta fue de 1.55 individuos, por lo que cada hembra deja al final de su vida al menos otros 1.55 murciélagos que alcanzarán su etapa reproductiva. El tiempo generacional es alto alcanzando casi ocho categorías ($G = 7.46$), por lo que hay una alta supervivencia y transición entre años, con eventos reproductivos desde el primero, que se sostienen a lo largo de todas las etapas.

De acuerdo con la Figura 12a, la curva de supervivencia también es de tipo tres. Al contrastarla con la tasa de mortalidad, podemos notar que también existen picos de mortalidad alrededor de los dos y siete años y que los individuos que sobreviven mantienen longevidades altas (Fig. 12b).

Tabla 5. Tabla de vida calculada para el refugio Las Peñas Güeras. Cats: Categorías por años.

Cats.	X	mx	Dx	lx	Dx	Qx	Px	lxmx	Xlxmx	Ro	1.55
0	27	0	13	1	0.481481	0.481481	0.518518	0	0	G	7.46
1	14	1	6.5	0.518518	0.240740	0.464285	0.535714	0.5185185	7.2592592	r	0.06
2	7.5	1	3.25	0.2777777	0.120370	0.433333	0.566666	0.2777777	2.0833333	λ	1.06
3	4.25	1	1.125	0.157407	0.041666	0.2647058	0.7352941	0.1574074	0.6689814		
5	3.125	1	0.125	0.115740	0.0046296	0.04	0.96	0.1157407	0.3616898		
6	3	2	0	0.111111	0	0	1	0.2222222	0.6666666		
7	3	1	1.666666	0.111111	0.0617283	0.5555555	0.4444444	0.1111111	0.3333333		
9	1.333333	0	0	0.049382	0	0	1	0	0		
13	1.333333	1	0	0.0493827	0	0	1	0.049382	0.065843		
15	1.333333	2	1.333333	0.049382	0.049382	1	0	0.098765	0.131687		

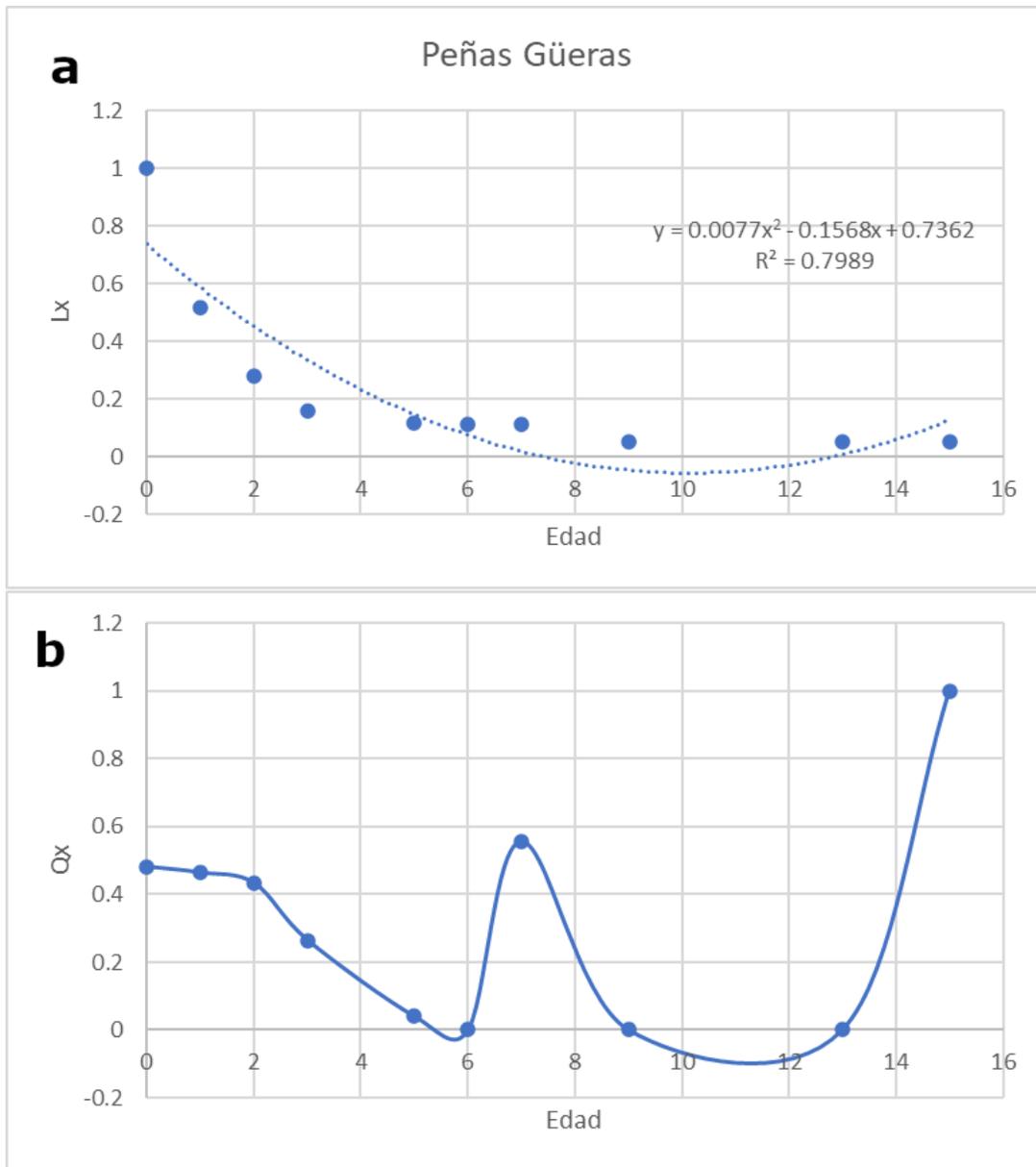


Figura 12. a) Curva de supervivencia. b) Tasa de mortalidad de la cueva Las Peñas Güeras, Tilapa, Puebla. Ver Tabla 2 para detalles de las variables usadas.

Por lo que refiere al refugio El Sabino (Tabla 6), mostro un incremento en la población del 5% ($\lambda=1.05$). En este refugio, la tasa reproductiva neta fue de 1.33 individuos. El tiempo generacional

también alcanza casi seis categorías ($G = 5.51$), con eventos reproductivos desde los cinco años que se sostienen a lo largo de todas las etapas posteriores.

La curva de supervivencia de este refugio también es de tipo tres (Fig. 13a), lo que coincide con la tasa de mortalidad que muestra máximos de mortalidad en las primeras etapas de vida y posteriormente en la etapa reproductiva, alrededor de los siete u ocho años. Aunque hay otros picos de mortalidad, estos son muy bajos hasta los 15 años donde se vuelve a incrementar la tasa de mortalidad (Fig. 13b).

Tabla 6. Tabla de vida calculada para el refugio El Sabino

Cats.	X	mx	Dx	lx	dx	Qx	px	Lxmx	Xlxmx	Ro	1.33
0	52	0	26	1	0.5	0.5	0.5	0	0	G	5.51
4	26	0	16	0.5	0.30769230	0.61538461	0.38461538	0	0	r	0-05
5	10	2	5.25	0.19230769	0.10096153	0.525	0.475	0.38461538	3.84615384	λ	1.05
6	4.75	4	0.25	0.09134615	0.00480769	0.05263157	0.94736842	0.36538461	1.73557692		
7	4.5	2	0	0.08653846	0	0	1	0.17307692	0.77884615		
8	4.5	3	1.75	0.08653846	0.03365384	0.38888888	0.61111111	0.25961538	1.16826923		
9	2.75	0	0.75	0.05288461	0.01442307	0.27272727	0.72727272	0	0		
10	2	1	0	0.03846153	0	0	1	0.03846153	0.07692307		
11	2	2	0.25	0.03846153	0.00480769	0.125	0.875	0.07692307	0.15384615		
12	1.75	1	0.12	0.03365384	0.00240384	0.0714285	0.9285714	0.03365384	0.05889423		
13	1.6	2	0	0.03125	0	0	1	0.0625	0.1015625		
14	1.62	1	0.12	0.03125	0.00240384	0.07692307	0.92307692	0.03125	0.05078125		
15	1.5	1	0	0.02884615	0	0	1	0.02884615	0.04326923		
17	1.5	0	1.5	0.02884615	0.00961538	1	0	0	0		
20	1	1	1	0.01923076	0.01923076	1	0	0.01923076	0.01923076		

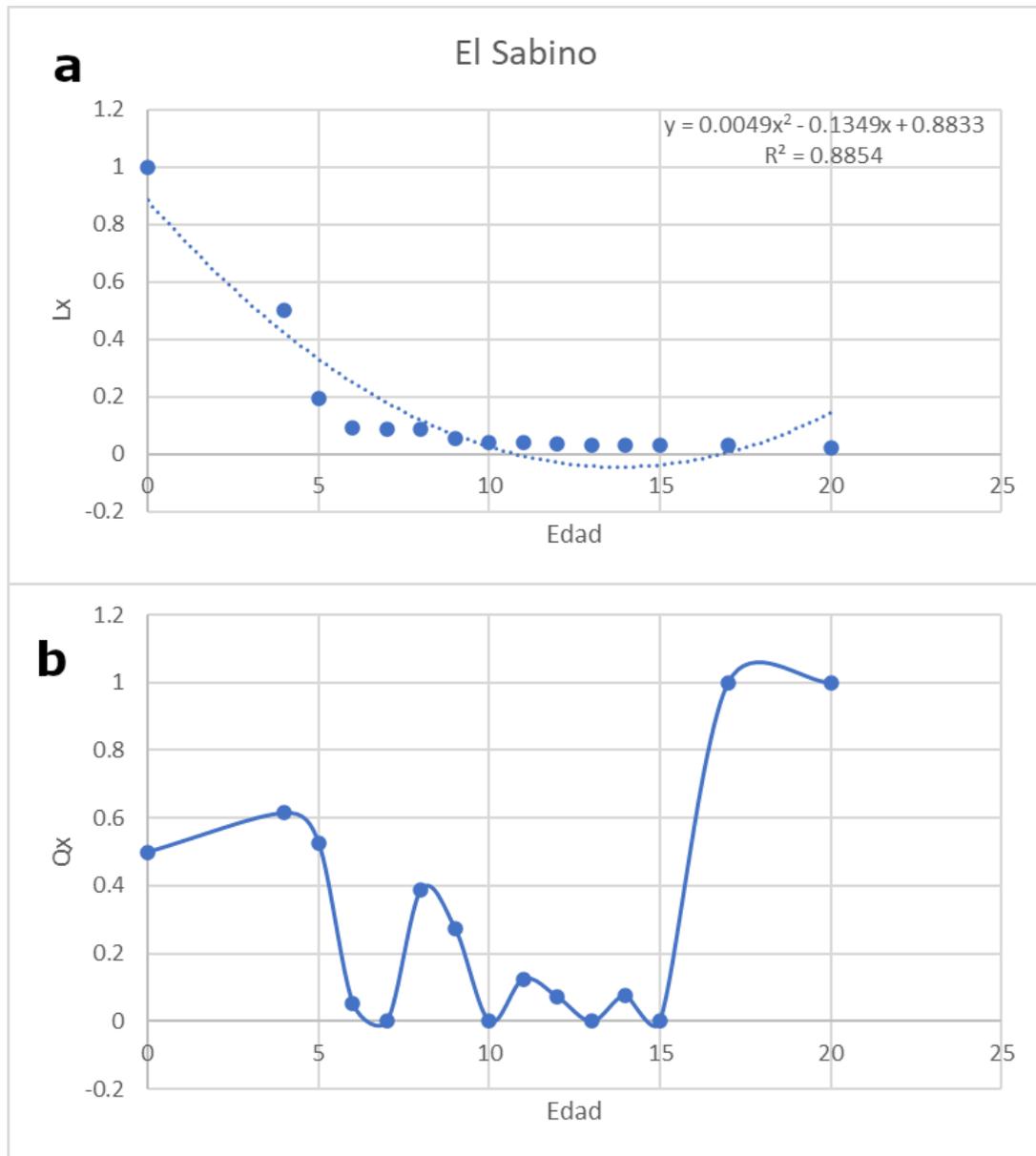


Figura 13. a) Curva de supervivencia. b) Tasa de mortalidad de la cueva El Sabino, Coatepec, Puebla. Ver Tabla 2 para detalles de las variables usadas.

Respecto al refugio de El Chemo, en esta cueva, debido a la escasa captura (tres individuos), los cálculos demográficos no tienen significado biológico. Este refugio no tiene una población de vampiros estructurada.

10 DISCUSIÓN

Con base en los datos obtenidos, se estimó una prevalencia del 18% de *Lyssavirus* en un total de 65 muestras del cerebro de los murciélagos, pertenecientes a las localidades de Coatepec y Tilapa, de la región de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, Puebla. Esta estimación es mayor que la reportada para el Sabino en 2018 (12.78%) y en otros estudios, para Guerrero (3%), Guatemala (1%), Perú (10%), Argentina (0.96%) y Colombia (13%) (Romero-Barrera et al., 2021; Ellison et al., 2014; Blackwood et al., 2013; Johnson et al., 2014; Betancur et al., 2016). Sin embargo, el reporte oficial sobre la prevalencia en la región de Puebla durante el periodo de estudio fue de solo 0.99 % (SENASICA, 2022). Esta discrepancia en los resultados oficiales con relación a nuestro trabajo, se atribuye al tipo de pruebas utilizadas por SENASICA para la detección del virus, basadas en reacciones serológicas que tienden a ser menos sensibles que la RT-PCR utilizada en este estudio (Wang et al., 2019). En cuanto a la discrepancia temporal con la prevalencia en el Sabino (12.78% en 2018 y 18% en nuestro estudio), el incremento en la prevalencia se puede deber al “vaciado”, por la eliminación de individuos, y recolonización posterior con individuos infectados procedentes de los refugios periféricos, esto ya se ha reportado como consecuencia de las técnicas de control poblacional (Rocke et al., 2023).

Es importante mencionar que los pobladores informaron, en años anteriores, de la muerte de animales por rabia, los cuales no se observan en los registros oficiales proporcionados por SENASICA. Esto se debe a que los pobladores no reportan la presencia de animales enfermos. Probablemente debido a la dificultad que les representa realizar un reporte oficial (i.e., por transporte, recopilación de evidencias, preservación de la muestra, costo, entre otras situaciones mencionadas por los afectados). Así como la falta de comprensión sobre la importancia de estos informes para la identificación, delimitación y seguimiento de áreas de riesgo de infección por rabia. Por lo tanto, la planificación de campañas de vacunación ganadera basadas en la estimación de la prevalencia de rabia en esta región,

requieren un seguimiento puntual para Coatepec, así como sugerir concientización en la gente para reportar cualquier caso sospechoso.

En cuanto a la prevalencia diferencial entre colonias, se observó que la cueva del Sabino en la localidad de Coatepec; mostró la mayor tasa de infección, con ocho casos positivos de 32 individuos evaluados (Coatepec 31.25% vs Tilapa 6.66%). Este hallazgo contrasta con los resultados obtenidos por Ortega (2022) en su estudio de presencia de virus de la rabia en el mismo sitio, donde se registraron solo dos individuos infectados. Probablemente las diferencias observadas están relacionadas con diferencias en el procedimiento de manejo del material biológico por parte nuestro estudio del autor y las estrategias de control del vector por envenenamiento en la zona; además, el posible recambio entre refugios cercanos, siempre que encuentren uno de los refugios principales vacío; podría permitir la recolonización con adultos jóvenes en etapas reproductivas con alta probabilidad de estar enfermos o de contagiar a las hembras con quienes forman los harems (Johnson et al., 2014; Streicker et al., 2012). Esto también explicaría el recambio en la prevalencia entre los sexos, aumentando la cantidad de hembras infectadas.

De acuerdo con las distancias entre sitios, se esperaba que existiera intercambio de individuos entre colonias, y por lo tanto semejanza en la incidencia en estados reproductivos similares. Sin embargo, solo se observó similitud en casos entre las cuevas de Coatepec (El Sabino y El Chemo), donde hay registros de hatos de ganado que pueden estar en riesgo de contagios por mordeduras, pues es donde se encontró la mayor incidencia de esta enfermedad. Ambas cuevas se encuentran en la misma cuenca hidrográfica, y la distancia entre ellas podría ser recorrida fácilmente por un murciélago en una noche. En este caso, la población fuente aparentemente es la del Sabino, en la que existe una población bien estructurada. Por el contrario, en las cuevas de Tilapa, es decir Peñas Güeras y Las Escaleras, las cuencas hidrológicas en la región se conectan de forma intrincada y sin accesos directos, de tal manera que la colonia de las Peñas Güeras, que por su estructura demográfica debería de ser la población fuente, parece

que no tiene intercambio con la colonia de Las Escaleras, por lo que se mantiene aislada, y es probable que en esta última comunidad no haya habido brotes de rabia durante mucho tiempo.

Cabe señalar que los murciélagos vampiro tienen patrones de movimiento dependientes del forrajeo en áreas circundantes a sus refugios. Al mapear tentativamente estos movimientos, se identificaron varias localidades con fuentes probables de alimento dentro de un radio de 20 km, área estimada de cobertura para alimentación de este murciélago, aunque se ha mencionado que los machos en su búsqueda de refugios temporales y cópulas pueden recorrer distancias de hasta 100 km (Silva et al., 2019). La alta movilidad de la especie plantea problemas de salud pública, debido a que aumenta la probabilidad de contacto entre murciélagos y poblaciones humanas, sobre todo en zonas ganaderas (caprino, ovino, porción y vacuno). Sin embargo, Torres-Mejía et al. (2021) mencionan que los murciélagos vampiro prefieren acortar sus incursiones a distancias menores a los 5 km, e incluso se les pueden localizar mucho más cerca (518.65 ± 11.33 m) siempre que existan refugios adecuados y fuentes de alimentación. Lo anterior resalta la importancia de comprender la dinámica de las poblaciones de estos animales, el movimiento de estos murciélagos y el riesgo de infección en las poblaciones humanas.

En otros sitios, la presencia de ganado de libre pastoreo ha maximizado las áreas de ocupación, el tamaño poblacional y la fecundidad de los murciélagos hematófagos en los refugios, por lo que se han colonizado ambientes que, “en lo general”, podrían no ser favorables para el mantenimiento de las colonias de estos murciélagos (Zarza et al., 2017). Sin embargo, el abundante alimento disponible, la ausencia de peligros para alimentarse y de fácil acceso fácil, permite a estos organismos incursionar en refugios poco usuales y de baja calidad, tales como viviendas abandonadas, huecos de árboles e iglesias (Johnson et al., 2014; Torres-Mejía et al., 2021). En la región de Coatepec, se nos ha informado sobre la presencia de aproximadamente 200 animales vacunos que se dispersan en áreas cercanas a la

comunidad. Además, en las proximidades de los hogares humanos de la comunidad, se suelen encontrar alrededor de 80 burros, 50 caballos y 200 chivos. Esta situación ocasiona que los murciélagos vampiro tengan acceso al alimento durante todo el año, lo que promueve su reproducción en cualquier temporada, sin necesidad de esperar a que las condiciones alimenticias sean favorables.

En este estudio se destaca la diferencia en la incidencia de rabia entre hembras y machos, siendo las hembras las más infectadas. Este hallazgo podría estar relacionado con sus relaciones sociales, puesto que estos organismos mantienen una estructura reproductiva con formación de harems, en donde existe un macho dominante que se aparea con varias hembras; igualmente tienen comportamientos reproductivos agresivos, donde la hembra puede recibir mordeduras del macho dominante. Por otra parte, los hábitos altruistas de acicalamiento entre individuos y la regurgitación de sangre, principalmente para alimentar a las hembras con cría, que no pueden salir a alimentarse (Pérez, 2017), colocan a las hembras adultas como el grupo que está en mayor riesgo de infecciones, que podrían ser transmitida por los machos dominantes y los juveniles portadores seroprevalentes (Streicker et al., 2012).

Es importante destacar el caso de la hembra que fue capturada con su cría, ambas resultaron positivas para la infección activa por rabia. Esto sugiere que la transmisión del virus podría ocurrir por vía placentaria o a través de la leche materna, tal como se ha observado en el estudio realizado por Abarca-Jiménez (2012), donde bajo una inoculación experimental se detectó la presencia del virus rábico en fetos y en las glándulas mamarias.

La información resultante del análisis demográfico, así como, del análisis de correspondencia entre las variables de localidad, estado reproductivo de los organismos y tipo de infección, muestra algunos patrones interesantes que pueden estar relacionados con la mortalidad y la infección por el virus de la rabia en *D. rotundus*. Cuando se evalúan las Tablas de Vida por refugio, notamos una variación en la tasa de reproducción y la estructura de edad de las poblaciones. En

particular, en el refugio de Las Escaleras, la tasa de reproducción es baja, hay signos de disminución poblacional ($\lambda < 1$) y un aumento en las muertes en los primeros años de vida. Esto podría estar relacionado con la técnica de captura utilizada en este estudio, puesto que este refugio se caracteriza por ser un túnel que dispone de tres posibles salidas y, a pesar de los esfuerzos por cubrir las tres salidas con redes de niebla, es muy probable que varios individuos logaran escapar, dando una falsa idea de reducción poblacional.

Es importante destacar que en todos los refugios existen diferencias en las curvas de supervivencia, pero los picos de mortalidad son similares en todos los refugios, encontrando los más altos alrededor de los 6-7 años de edad, lo que coincide con el inicio de la etapa reproductiva, de acuerdo con el tiempo generacional de estos organismos. Según Medellín (Com. Pers; 12 al 14 de abril 2023), los vampiros no viven más de siete años, más los trabajos de Juárez-Castillo (2012), Romero-Almaraz et al. (2006) y nuestros datos corroboran una edad máxima mayor a 20 años, dependiendo del contexto del refugio. La observación de Medellín coincide con el pico de mortalidad identificado en el análisis demográfico; en otras palabras, la estimación de la edad máxima puede ser producto de una observación puntual en etapas reproductivas.

Los individuos reproductivos inician con comportamientos de riesgo (i.e., peleas, mordidas, intercambio de individuos entre refugios, harems, entre otros), por lo que la vía de infección inicia entre los machos, con las agresiones durante la lucha por la dominancia de los harems, lo que podría generar mordeduras entre ellos. Esto último permitiría la propagación de la infección macho-macho. Simultáneamente, las hembras pueden resultar mordidas por los machos dominantes, creando una vía de infección macho-hembra que incrementa la incidencia de rabia entre las hembras de los harems, lo que podría explicar el 10% de mortalidad en una colonia (Johnson et al., 2014; Fuchs et al., 2017; Rocke et al., 2023). Lo anterior coincide con el cambio de prevalencia de machos a hembras en el periodo

evaluado (2018-2022), lo que sugiere una recolonización de machos juveniles infectados procedentes de refugios periféricos.

De manera complementaria, mediante el análisis de correspondencia, identificamos un "semáforo de infección" que señala a Coatepec, así como a los machos y las hembras en estado reproductivo, como los más susceptibles a la infección por el virus de la rabia. Esto respalda la tendencia que hemos observado sobre los picos de mortalidad en etapas reproductivas en los diferentes refugios y la mayor infección en individuos fértiles o reproductivos. Estos análisis refuerzan la importancia de estudiar la dinámica de la población y el comportamiento social de estos murciélagos, para abordar la prevención de la rabia en esta especie, y por tanto, la propagación y la transmisión de este virus.

Para entender mejor este resultado es importante destacar que, los análisis de correspondencia se basan en una matriz de promedios recíprocos, no en correlaciones de ningún tipo. Entonces, la exclusión no se traduce en un componente o correlación múltiple como el caso de los análisis de correlaciones canónicas o componentes principales; sino en dos tratamientos cuyos casos no se mezclan. En cambio, el eje Y se compone por las categorías, que también son excluyentes entre sí (ningún individuo pertenece a más de una categoría), por lo que retiene tiene más variación. En otras palabras, los ejes de este análisis no deben ser abordados como la suma de la variación de un conjunto de individuos, sino como la asociación excluyente entre tratamientos. Así, un caso (e. j. una hembra infectada) solo podrá pertenecer a un conjunto dentro del sitio, de forma específica (James & McCulloch, 1990). De esta manera, el eje X representa las variables que alimentan la matriz: infección (sano, infectado activo, infectado inactivo), el sitio (Tilapa y Coatepec) y el estado de actividad (machos, hembras, estado de gestación, etc.), todas asociables sobre el eje Y, donde confluyen los tratamientos a comparar y donde los individuos solo pueden ser asignados a una conjunción entre las tres variables de la matriz.

11 CONCLUSIONES

El virus de la rabia se encontró en el 18% de los murciélagos analizados, que representan una prevalencia elevada con respecto a otros trabajos. Sin embargo, no es homogénea en las colonias evaluadas, esto podría indicar un efecto de la estructura demográfica cambiante del vector sobre la prevalencia, siendo las hembras las más contaminadas, como resultado de una recolonización después del manejo en 2018, inicialmente por machos infectados, procedentes de refugios periféricos y propagando en su actividad reproductiva el virus a las hembras.

Las localidades con mayor prevalencia tienen particularidades en cuanto a la disponibilidad de alimentos, lo que parece incrementar el riesgo de transmisión de la enfermedad en radios menores a los 20 km.

La estructura demográfica de las colonias evaluadas mostró un patrón diferencial en la infección, preferentemente de hembras en etapa reproductiva, con mayor mortalidad en períodos con actividad sexual.

12 REFERENCIAS

- Abarca-Jiménez, D. A. (2012). Determinación de la presencia de anticuerpos circulantes contra rabia en vampiros comunes (*Desmodus rotundus*), de la región pacífico central, en Costa Rica. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Aguilar-Romero, R. de J. (2014). Estimación de la Diversidad de Murciélagos del Área Natural Protegida Sierra de Navachiste y su relación con la presencia del virus de la Rabia. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. México.

- Akustic-noticias (2022). Exhorta investigador de UAEH a acudir con expertos para manejo de murciélago hematófago. Consultado 27/03/2024 URL: <https://acustiknoticias.com/2022/08/exhorta-investigador-de-uaeh-a-acudir-con-expertos-para-manejo-de-murcielago-hematofago/>
- Álvarez Hernández, S., Ibañez Laura, A., Bravo-Núñez, E. (2015). Ecología de poblaciones. Universidad Autónoma Metropolitana. Pág. 63-68.
- Banyard, A., Evans, J., Luo, T. & Fooks, A. (2014). *Lyssaviruses* and Bats: Emergence and Zoonotic Threat. *Viruses*, 6(8), 2974–2990. <https://doi.org/10.3390/v6082974>
- Bazán, W. V. (2020). Epidemiología molecular de la rabia silvestre en el Perú, periodo 1997-2015. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Medicina.
- Beattie, I., Schofer, D., McGregor, G., Lee, M. J., Lee, L. K. F., Humsworth, C. G. & Byers, K. A. (2022). An investigation of bat mortality in British Columbia, Canada. *Canadian Journal of Zoology*, 100(7), 464-473. <https://doi.org/10.1139/cjz-2021-0230>
- Becker, D. J., Broos, A., Bergner, L. M., Meza, D. K., Simmons, N. B., Fenton, M. B., Altizer, S. & Streicker, D. G. (2021). Temporal patterns of vampire bat rabies and host connectivity in Belize. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(2), 870–879. <https://doi.org/10.1111/tbed.13754>
- Betancur, C., Calderón, A. & Rodríguez, V. C. (2016). Presencia de virus rábico en murciélagos hematófagos en Colombia (Ciénaga de Oro y Sahagún, Córdoba). *Biosalud*, 15(1), 17-24. <https://doi.org/10.17151/biosa.2016.15.1.3>
- 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. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences, 110(51), 20837-20842.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1308817110>

- Carrera, N., Quevedo, N., Urbieta, S., San Miguel de Vera, M. C. & Irala, L. (2006). Rabia en murciélagos frugívoros e insectívoros - Villa Florida- Departamento de MisionesParaguay-2006. Revista del Instituto de Medicina Tropical, 3(1), 7-14.
- Castillo, J. J. G. (2015). Distribución geográfica del riesgo de rabia humana transmitida por el murciélago vampiro (*Desmodus rotundus*) en el estado de San Luis Potosí. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Castillo-Lara, P., Octavio-Aguilar, P. & De-Nova, J. (2018). *Ceratozamia zaragozae* Medellín-Leal (Zamiaceae), an endangered Mexican cycad: New information on population structure and spatial distribution. Brittonia, 70, 155–165. <https://doi.org/10.1007/s12228-017-9513-1>
- 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. <https://doi.org/10.1128/jcm.01256-10>
- Daroff, R. B. & Aminoff, M. J. (2014). Rabies Virus. In: Encyclopedia of the Neurological Sciences (2.^a ed). Págs, 1027–1030). <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780123851581/encyclopedia-of-the-neurological-sciences>
- David, D., Yajobson, B., Rotenberg, D., Dveres, N., Davidson, I. & Stram, Y. (2002). Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. Veterinary Microbiology, 87(2), 111-118. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00041-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00041-X)

- Davis, B. M., Rall, G. F. & Schnell, M. J. (2015). Everything You Always Wanted to Know About Rabies Virus (But Were Afraid to Ask). *Annual Review of Virology*, 2(1), 451–471. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055157>
- Dettinger, L., Gigante, C. M., Sellard, M., Seiders, M., Patel, P., Orciari, L. A., Yager, P., Lte, J., Regec, A. Li, Y. & Xia, D. (2022). Detection of Apparent Early Rabies Infection by LN34 Pan-*Lyssavirus* Real-Time RT-PCR Assay in Pennsylvania. *Viruses*, 14(9), 10.3390/v14091845. <https://doi.org/10.3390/v14091845>
- DOF (2011). Norma Oficial Mexicana NOM-067-ZOO-2007. Campaña nacional para la prevención y control de la rabia en bovinos y especies ganadera. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5190251&fecha=20/05/2011
- Ellison, J. A., Gilbert, A. T., Recuenco, S., Moran, D., Alvarez, D. A., Kuzmina, N., Garcia, D. L., Peruski, L. F., Mendonça, M. T., Lindblade, K. A. & Rupprecht, C. E. (2014) Bat Rabies in Guatemala. *PLoS Neglected Tropical Diseases.*, 8(7), e3070. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003070>
- Esparza, L. A. & García, L. A. (2013). Implementación de un programa de desarrollo de nuevos productos a partir de pitahaya. Universidad Iberoamericana Puebla. <http://hdl.handle.net/20.500.11777/201>
- Faye, M., Dacheux, L., Weidmann, M., Diop, S. A., Loucoubar, C., Bourhy, H., Sall, A. A. & Faye, O. (2017). Development and validation of sensitive real-time RT-PCR assay for a broad detection of rabies virus. *Journal of Virological Methods*, 243, 120-130. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.12.019>

- Fischer, M., Hoffmann, B., Freuling, C. M., Müller, T. & Beer, M. (2012). Perspectives on molecular detection methods of *Lyssaviruses*. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschr*, 125(5–6), 264–271.
- Fuchs, J., Holzer, M., Schilling, M., Patzina, C., Schoen, A., Hoenen, T., Zimmer, G., Martz, M., Weber, F., Muller, M. A. & Kochs, G. (2017). Evolution and antiviral specificities of interferon-induced MX proteins in bats against Ebola, influenza, and other RNA viruses. *Journal of Virology*, 91(5), e00361. <https://doi.org/10.1128/JVI.00361-17>
- Hernández-Trejo, A. (2017). Estructura de la comunidad vegetal de cuatro zonas de selva baja caducifolia sujetas a disturbio en el Ejido San José Tilapa, Coxcatlán Puebla (México). Artrópodos terrestres en Coxcatlán, Puebla, México. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 86 pp.
- INEGI. (2020). México en cifras. <https://www.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/>
- IOEBS. (2018). International Office of Epizootics. Biological Standards Commission & International Office of Epizootics. Biological Standards Commission. Manual de Animales Terrestres. En: Rabia (infección por el virus de la rabia y otros *Lyssavirus*). Págs, 1–38. Office international des épizooties. <https://www.oie.int/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/#ui-id-2>
- James, F. C. & McCulloch, C. E. (1990). Multivariate analysis in ecology and systematics: Panacea or Pandora's box?. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21, 129-166.
- Johnson, N., Aréchiga-Ceballos, N. & Aguilar-Setien, A. (2014). Vampire bat rabies: ecology, epidemiology and control. *Viruses*, 6(5), 1911-1928. <https://doi.org/10.3390/v6051911>

- 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. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Korytar, L., Ondrejková, A., Drazovská, M., Zemanová, S. & Prokes, M. (2022). Serological survey of Lyssaviruses in synanthropic bats and human exposure to bats in Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 29(1), 44-49. <https://doi.org/10.26444/aaem/146208>
- López, T-M. E., & Mandujano, S. (2016). Primer registro fotográfico de murciélagos hematófagos *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae) alimentándose de *Odocoileus virginianus* (Artiodactyla: Cervidae) en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, México. *Mammalogy Notes*, 3(1), 17–19. <https://doi.org/10.47603/manovol3n1.17-19>
- Núñez, A. & Viana, M. (1997). Comparación de métodos para la determinación de edad en el vampiro común *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Revista de Biología Tropical*, 45(3), 1237-1242.
- O'Connor, T. W., Finlaison, D. S. & Kirkland, P. D. (2022). What can we learn from over a decade of testing bats in New South Wales to exclude infection with Australian bat Lyssaviruses? *Australian Veterinary Journal*, 100(4), 172-180. <https://doi.org/10.1111/avj.13143>
- Octavio-Aguilar, P. (2023). Recent rabies cases in Latin America are not isolated. *Salud Pública de México*, 65(4): 322. <https://doi.org/10.21149/14588>
- Olalde-Estrada, I. (2015). Ecología de Abejas en Sitios de Selva Baja Caducifolia Sujetos a Disturbio del Ejido San José Tilapa, Coxcatlán, Pue. (México) Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 128 pp.

- Ortega, Z. H. U. (2022). Evaluación de la presencia de Rhabdovirus mediante retrotranscripción en dos poblaciones de murciélago vampiro (*Desmodus rotundus*) del Estado de Puebla. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Osorio-Rodríguez, A. N., & Saldaña-Vázquez, R. A. (2019). Control poblacional del murciélago vampiro (*Desmodus rotundus*) en México: ¿Qué tan efectiva es para reducir los casos de rabia bovina? Antropización: Primer Análisis Integral, 405-414, [10.22201/ib.9786073020305e.2019.c21](https://doi.org/10.22201/ib.9786073020305e.2019.c21)
- Pérez, R. (2017). Estrés oxidante en dos especies de murciélagos vampiros: *Desmodus rotundus* y *Diphylla ecaudata* como modelos para el estudio del envejecimiento. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- Promega Corporation. (2016). M-MLV Reverse Transcriptase Protocol. https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/m-mlv-reverse-transcriptase-protocol.pdf?rev=9e0bafab791145b9928f4231d4b6eacf&sc_lang=en
- Rocke, T., Streicker, D. & Leon, A. (2023). Management of vampire bats and rabies: past, present, and future. En: History of Rabies in the Americas: From the Pre-Columbian to the Present, Volume I: Insights to Specific Cross-Cutting Aspects of the Disease in the Americas. Págs, 199-222. Cham: Springer International Publishing.
- Romero-Almaraz, M. L., Aguilar-Setién A. & C. Sánchez-Hernández (2006). Murciélagos benéficos y vampiros: características, importancia, rabia, control y conservación. AGT Editor, S. A., México. 213 pp.
- Romero-Barrera, C. E., Osorio-Rodríguez, A. N., Juárez-Agis, A. (2021). Distribución, abundancia, control y registros de casos de murciélagos vampiro, *Desmodus rotundus* (E.

Geoffroy), infectados de rabia en ambientes pecuarios de Guerrero, México. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 7(1). <https://doi.org/10.30973/aap/2021.7.0071005>

- Rupprecht, E. (1996). Rhabdoviruses: Rabies Virus. En S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology* (4.^a ed., p. 61). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8618/>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0890-8508\(91\)90045-1](https://doi.org/10.1016/0890-8508(91)90045-1)
- Sánchez, M. de P., Díaz-Sánchez, O. A., San Miguel, R. A., Ramírez, A. & Escobar, L. (2019). Rabia en las Américas, varios desafíos y Una Sola Salud: artículo de revisión. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(4), 1361-1381. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i4.17149>
- Scheffer, K. C., Barros, R. F., Iamamoto, K., Mori, E., Asano, K. M., Lima, J. Y. O., García, A. I. E., Cunha Neto, R. S. & Fahl, W. O. (2022). *Desmodus rotundus* – biología y comportamiento. En *Open Science Research III* (pp. 505–529). Editora Científica Digital.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675 <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2260>
- SENASICA (2022). Informe semanal del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (2017-2022). <https://dj.senasica.gob.mx/SIAS/Statistics/SaludAnimal/VigilanciaEpid>
- Silva, A. B., de la Torre, M. R., & Grajales, J. G. (2019). Derrengue (Rabia paralítica bovina) y el murciélago hematófago. *Ciencia y Mar*, 23(68), 87-96.

- Sotalín, L. R. (2015). Seguimiento Epidemiológico De Brotes De Rabia Bovina Presentados Durante Los Años 2009 A 2013 En La Provincia De Sucumbíos. Tesis de licenciatura. Universidad Técnica De Cotopaxi Unidad Académica De Ciencias Agropecuarias Y Recursos Naturales.
- StatSoft Inc. (2004) STATISTICA (Data Analysis Software System), Version 7.
- Streicker, D. G., Recuenco, S., Valderrama, W., Benavides, J. G., Vargas, I., Pacheco, V., Condori, R. E., Montgomery, J., Rupprecht, C. E., Rohani, P. (2012). Ecological and anthropogenic drivers of rabies exposure in vampire bats: implications for transmission and control. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1742), 3384-3392. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0538>
- Torres-Flores, J. W., López-Wilchis, R. & Soto-Castruita, A. (2012). Dinámica poblacional, selección de sitios de percha y patrones reproductivos de algunos murciélagos cavernícolas en el oeste de México. *Revista de Biología Tropical*, 60 (3), 1369-1369. <https://doi.org/10.15517/rbt.v60i3.1814>
- Torres-Mejía, X., Pérez-Rivero, J. J., Olvera-Vargas, L. A., Barragán-Hernández, E. A., Martínez-Maya, J. J. & Aguilar-Setién, A. (2021). La coexistencia de *Desmodus rotundus* con la población humana en San Luis Potosí, México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 12(3), 694-704. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i3.5670>
- Wacharapluesadee, S., Phumesin, P., Supavonwong, P., Khawplod, P., Intraut, N. & Hemachudha, T. (2011). Comparative detection of rabies RNA by NASBA, real-time PCR and conventional PCR. *Journal of Virological Methods*, 175(2), 278-282. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.05.007>

- Walker, P. J., Blasdell, K. R., Calisher, C. H., Dietzgen, R. G., Kondo, H., Kurath, G., Longdon, B., Stone, D. M., Tesh, R. B., Tordo, N., Vasilakis, N. & Whitfield, A. E. (2018). ICTV Virus Taxonomy Profile: Rhabdoviridae. *Journal of General Virology*, 99(4), 447–448. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001020>
- Wang, Y., Xu, W., Guo, H., Gong, W., He, B., Tu, Z. & Feng, Y. (2019). Evaluation of a universal nested reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of *lyssaviruses*. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (147), e59428. <https://doi.org/10.3791/59428>
- Wray, A. K., Moran, D., López, M. R., Alvarez, D., Navarrete-Macias, I., Liang, E., Simmons, N. B., Lipkin, W. I., Daszak, P. & Anthony, S. J. (2017). Viral diversity, prey preference, and Bartonella prevalence in *Desmodus rotundus* in Guatemala. *EcoHealth*, 13, 761–774. <http://doi.org/10.1007/s10393-016-1183-z>
- Wunner, W. H. (2007). Rabies Virus. En A. C. Jackson & W.H.W. (Eds.), *Rabies* (2.^a ed., pp.23–68). <https://www.sciencedirect.com/book/9780123693662/rabies>
- Yockteng, R., Almeida, A. M., Morioka, K., Alvarez-Buylla, E. R. & Specht, C. D. (2013). Molecular Evolution and Patterns of Duplication in the SEP/AGL6-Like Lineage of the Zingiberales: A Proposed Mechanism for Floral Diversification. *Molecular Biology and Evolution*, 30(11), 2401–2422. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst137>
- 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). <https://doi.org/10.21753/vmoa.4.3.390>