

2017

Eco-epidemiología molecular de la rabia paralítica en la
región centro de México: Guanajuato, San Luis Potosí y
Querétaro.

Isabel Bárcenas Reyes



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Eco-epidemiología molecular de la rabia paralítica
en la región centro de México

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctora en Ciencias Biológicas

Presenta:

MSPAS. Isabel Bárcenas Reyes

Dirigido por:

Dr. Feliciano Milián Suazo

Dra. Elizabeth Loza Rubio

Querétaro 11/dic/2017



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

Eco-epidemiología molecular de la rabia paralítica en la región centro de México: Guanajuato, San Luis Potosí y Querétaro.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta:

MSPAS. Isabel Bárcenas Reyes

Dirigido por:

Dr. Feliciano Milián Suazo
Dra. Elizabeth Loza Rubio

SINODALES

<u>Dr. Feliciano Milián Suazo</u> Presidente	 Firma
<u>Dra. Elizabeth Loza Rubio</u> Secretario	 Firma
<u>Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón</u> Vocal	 Firma
<u>Dra. Ma. Concepción Méndez Gómez-Humarán</u> Suplente	 Firma
<u>Dr. Juan Pablo Ramírez Herreón</u> Suplente	 Firma
 <u>Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca</u> Directora de la Facultad	 <u>Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña</u> Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre del 2017
México

RESUMEN

Se realizó un estudio para determinar la relación eco-epidemiológica y molecular de la rabia parálítica bovina (RPB) transmitida por el murciélago hematófago *Desmodus rotundus* a las diferentes especies animales domésticas en la región centro de México: Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí. Se encontró que de un total de 1037 casos presentados en diferentes especies domésticas y silvestres, 911 (87.9%) ocurrieron en San Luis Potosí, 82 (7.9%) en Querétaro y 44 (4.2%) en Guanajuato. El mayor número de casos (85%) ocurrió en bovinos. Una alta proporción de casos en Guanajuato y Querétaro, 77.3% y 42.3% respectivamente, ocurrieron en alturas mayores de 1500 msnm, por lo que se evidenció que la altitud ya no es una limitante para la movilización del murciélago hematófago. Los meses de mayor incidencia fueron de diciembre a marzo y la variante antigénica viral V11, asociada a transmisión por murciélago hematófago fue la más frecuente (173 casos) para los tres estados estudiados. Se observó que la diseminación reciente de la enfermedad a zonas antes libres coincide con la presencia del murciélago y que las zonas de mayor riesgo para la presencia de casos de RPB en la región son, la Huasteca Potosina, el Nordeste de Guanajuato y la Sierra Gorda de Querétaro. Las condiciones ambientales que mayormente influyen en su distribución son la temperatura y la precipitación pluvial. La filogenia basada en la secuenciación del genoma completo de cuatro cepas del virus de la rabia (VR) provenientes de bovino indicó que la propagación de la rabia parálítica en la región es local, su distribución se asocia al *Desmodus rotundus* y, que regiones recientemente infectadas de Querétaro tienen focos de infección ajenos a la Sierra Gorda, zona endémica del estado. Se demostró que el uso del genoma completo es una mejor herramienta para explicar la relación epidemiológica de las cepas que las secuencias parciales de genes específicos.

(Palabras clave: Epidemiología, Rabia, *Desmodus rotundus*, Genoma).

ABSTRACT

An eco-epidemiologic and molecular study was conducted to evaluate the relationship between bovine paralytic rabies (BPR) transmitted by the vampire bat *Desmodus rotundus* to the different domestic animal species in the states of Guanajuato (Gto), Querétaro (Qro) and San Luis Potosí (SLP), and the environmental conditions. From total of 1037 cases presented in different domestic and wild species, 911 (87.9%) were from San Luis Potosí, 82 (7.9%) from Querétaro, and 44 (4.2%) from Guanajuato. A geospatial analysis showed that recent disease dissemination to previous free areas agrees with the presence of the vampire bat *Desmodus rotundus*. The areas with the higher risk for cases are the "Huasteca Potosina", the northeast of Guanajuato and the "Sierra Gorda" in Queretaro. Environmental conditions that influence case distribution are temperature and pluvial precipitation. The largest amount of cases (85%) occurred in cattle. Guanajuato and Queretaro reported the highest proportion 77.3% and 42.3% respectively of cases at altitudes above 1500 masl, showing that altitude is not longer a restriction for the distribution of the vampire bat. The highest incidence of cases was during the period between December and March, and the most frequent viral antigenic variant was V11 (173 cases), which is associated with transmission by the vampire bat. The phylogentic analysis based on the complete genomic sequence of four rabies virus (RV) strains from cattle showed that the spread of paralytic rabies in the region is local, and that the distribution matches the distribution of *Desmodus rotundus*. This is the first study where using the rabies virus whole genome showed that sequencing is a highly accurate tool to explain the epidemiological relationship and this is more useful than sequencing only some genes or fragments.

(Key words: Epidemiology, Rabies, *Desmodus rotundus*, Genome).

Dedicatorias

A mi esposo David: Por compartir mis demencias, arriesgar lo cierto por lo incierto y volar conmigo. Por hacerme vibrar por los sueños. Por el sentido del humor que le pones a mis días, por estar a mi lado en cada comienzo y esfuerzo superando las adversidades. Gracias por acompañarme hasta en lo inesperado y motivar mis planes de vida. Por darme apoyo, comprensión, y tu dedicación para seguir adelante. Eres gran cómplice de este trabajo.

A mi hija Anita: Por la gran fortuna de tenerte en mi vida. Por enseñarme a cultivar mis sueños, apoderarme de ellos y a vivir cada hora con buen ánimo dando lo mejor de mí. Gracias por tus abrazos, besos, caricias y sonrisas. Cada palabra tuya es una sabiduría oportuna. Llenas todos mis sentidos. Eres una hermosa mujercita.

A mi mamá Mago: Por ofrecerme siempre tus manos llenas de amor, por acompañar mis ideas y metas, por tus besos y abrazos de todos los días, por transmitirme tu gran sabiduría y enseñarme a ser una persona segura y fuerte. Por creer en mí, en todo lo que puedo hacer y lograr. Por tu inmenso apoyo y esfuerzo del día a día en este proyecto. Gracias, por cuidar, vigilar y atesorar en tu ser lo más valioso que tengo, mi hija. Gracias, muchas gracias por ayudarme, incansablemente, a cumplir este reto. Eres todo un ejemplo de mujer.

A mi papá Gonzalo: Por impulsarme a ir en busca de mis objetivos, ser el poeta, consejero, amigo y formador de mi vida. Por decirme siempre que debo disfrutar de los éxitos y de mis planes. Por enseñarme la virtud del esfuerzo para poder alcanzar los ideales.

A mi hermano Gonzalo, un compañero extraordinario de vida: Por compartir y ser parte de este instante, por ser esa voz de razón y verdad en la cotidianidad del día. Siempre recordándome que se puede hacer algo mejor y justo para trascender.

A mis amigos lejanos y cercanos:

Por compartir conmigo la vida paso a paso. Por su paciencia, las palabras de aliento, su ternura, su alegría y compañerismo. Gracias por recordarme que siempre hay que seguir adelante y que aún hay mucho para construir en la vida. Gracias por brindarme siempre una mano abierta y generosa. Por enseñarme que cada día es un ejemplar único y grandiosamente inesperado para descubrir y conquistar el mundo.

Mar eterno.

Digamos que no tiene comienzo el mar

Empieza donde lo hallas por vez primera

y te sale al encuentro por todas partes

José Emilio Pacheco.

Agradecimientos

Dr. Feliciano Milián Suazo: Gracias por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección, ser un guía y gran amigo. Por ayudarme a persistir y no desfallecer cuando de alcanzar objetivos e ideas se trata. Por compartirme su conocimiento, experiencia profesional y consejo durante el desarrollo de este proyecto. Por confiar en mí y contribuir en gran medida a mi formación como investigadora. Agradezco también el facilitar siempre los medios suficientes para poder realizar todas las actividades planteadas durante esta tesis. Por estar conmigo hasta el final.

Dra. Elizabeth Loza Rubio: Gracias por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección, por el apoyo, disponibilidad, criterio y aliento, ha sido un privilegio contar con su orientación, guía y ayuda profesional y científica. Le agradezco también permitirme trabajar parte de este proyecto en el CENID-Microbiología en palo alto, ciudad de México. Gracias por fortalecer este trabajo y por la amistad que me brindó.

Dr. Germinal J Cantó Alarcón: Gracias por la orientación, su importante aporte y buenos consejos que influyeron en el pensamiento y desarrollo de esta tesis, por motivarme a dar siempre lo mejor de mí. Gracias por las discusiones tanto a nivel científico como personal que sin duda enriquecen este trabajo. Por su solidaridad, confianza y gran amistad.

Dra. Ma. Concepción Méndez Gómez-Humaran: Gracias por su disponibilidad y generosidad para compartir su experiencia y amplio conocimiento durante el desarrollo de esta tesis. Por el surgimiento de una amistad y las palabras de apoyo y fortaleza. Mi más sincero agradecimiento

Dr. Juan Pablo Ramírez Herrejón: Gracias por cada momento dedicado para el desarrollo de esta tesis, por esas charlas de carácter científico y personal que claramente han sido enriquecedoras en los dos ámbitos. Gracias por su amistad

Índice

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos.....	v
Índice.....	vi
Índice de cuadros	viii
Índice de figuras	ix
CAPÍTULO I	1
1.1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II	4
II. ANTECEDENTES	4
2.1. Panorama de la rabia parálítica bovina en las Américas.....	4
2.2. Panorama de la Rabia Parálítica Bovina en México.....	5
2.3. Epidemiología de la rabia parálítica bovina en México.....	7
2.4. Epidemiología espacial en rabia parálítica bovina.....	8
2.4.1. Sistemas de información geográfica (SIG).....	9
2.4.2. Modelo de nicho ecológico.....	10
2.4.3. Geoestadística.....	11
2.4.3.1. Distribución espacial y modelaje de nicho ecológico para rabia parálítica bovina.....	11
2.5. Epidemiología molecular de la rabia parálítica bovina en México	14
2.6. Factores moleculares y enfoques ecológicos en la epidemiología de la rabia parálítica.....	16
2.7. Los murciélagos.....	18
2.7.1. <i>Desmodus rotundus</i>	18
2.8. El virus de la rabia en poblaciones de murciélago <i>D. rotundus</i>	20
CAPÍTULO III	23
3.1. JUSTIFICACIÓN	23
CAPÍTULO IV	25
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	25

CAPÍTULO V	26
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
CAPÍTULO VI	27
CAPÍTULO VII	35
CAPÍTULO VIII	40
8.1. DISCUSIÓN	40
CAPÍTULO IX	45
9.1. CONCLUSIONES.....	45
10.1. LITERATURA CITADA	46

Índice de cuadros

1. Casos anuales de rabia paralítica en los estados de Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí, México, 2001-2013.....	30
2. Casos de Rabia Paralítica en ganado y animales silvestres, según la altura sobre el nivel del mar, registrados en Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí, México, 2001-2013.....	30
3. Access Genbank numbers and epidemiological information of rabies virus strains included in the phylogenetic analysis with four Mexican strains obtained from cattle in Mexico.	37
4. Genetic similarity between four rabies virus Mexican strains isolated from cattle in the State of Querétaro, Mexico.....	38

Índice de figuras

1. Canal endémico de casos de rabia paralítica en la región central de México, 2008-2013	30
2. Zonas de riesgo de presentación de casos de rabia paralítica por municipio en los estados de Guanajuato (2008 - 2013), Querétaro (2005 – 2013) y San Luis Potosí (2001-2013).....	31
3. Zonas de probable presentación de casos de rabia paralítica transmitida por <i>Desmodus rotundus</i> , Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí, 2001 - 2013.....	32
4. Phylogenetic tree of the relationship between four rabies virus strains from Querétaro, Mexico and those with 90% similarity obtained from the Genbank by using MEGA 6.....	38

CAPÍTULO I

1.1. INTRODUCCIÓN

La rabia es una enfermedad zoonótica letal cosmopolita causada por un virus neurotrópico del género *Lyssavirus* de la familia *Rhabdoviridae* (Mochizuki et al., 2011) (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>). Esta enfermedad afecta a cualquier animal de sangre caliente, causa una encefalomiелitis fatal y, en el ganado se caracteriza por parálisis del tren posterior. La rabia ha sido erradicada de muchos países: Reino Unido, Escandinavia, Australia, Nueva Zelanda y Japón entre otros; sin embargo, es prevalente en países en desarrollo en Asia, América y África (Kalita et al., 2014). La mayoría de los casos de rabia se deben a la infección por el virus de la rabia clásica (VR) del genotipo uno, pero, hay trece *Lyssavirus* que causan rabia en murciélagos (OMS, 2013).

Los *Lyssavirus* que causan esta enfermedad están bien adaptados a sus huéspedes (Hayman et al., 2016). La rabia es una zoonosis y en todo el mundo causa aproximadamente 60, 000 muertes anualmente (Hampson et al., 2011; Singh et al., 2017).

Según el tipo de reservorio, la rabia presenta dos ciclos epidemiológicos: el ciclo urbano, que afecta a perros, gatos y otras especies animales en estrecho contacto con el hombre, y el ciclo silvestre, que involucra reservorios como zorrillos y quirópteros. El Murciélago hematófago, *Desmodus rotundus* (*D. rotundus*), es considerado uno de los reservorios naturales más importantes del virus de la rabia (VR) en América Latina. Este quiróptero se localiza en las áreas tropicales y subtropicales, desde el norte de México hasta el norte de Argentina y Chile y transmite la enfermedad al ganado, principalmente bovino, en donde se le conoce también como Rabia Paralítica Bovina (RPB) (Da Rosa et al., 2006; Loza-Rubio et al., 2012). Por lo que la rabia en murciélagos es un problema limitado a América Latina (Velasco-Villa et al., 2006; Streicker et al., 2012; Johnson et al., 2014 y Escobar et al., 2015).

El genoma del VR es ARN monocatenario de sentido negativo, con aproximadamente 12 Kb, que codifica cinco genes en el orden: 3'-N-P-M-G-L-5' (Johnson et al., 2014). La caracterización parcial del genoma del VR usando los genes N, G y P, ha sido útil en la epidemiología molecular de la rabia para facilitar el desarrollo de pruebas genéticas rápidas a fin de identificar aislados virales provenientes de murciélago vampiro y definir ciclos epidemiológicos (Johnson et al., 2014). La secuenciación y la obtención de la filogenia de estos genes han permitido conocer su historia evolutiva, patrones de transmisión y relación del virus con su reservorio, como la influencia de la evolución y propagación en el tiempo en algunas áreas geográficas (Badrane et al., 2001; Jiao et al., 2011; Matsumoto et al., 2011; Nadin-Davis, 2013 y Seetahal et al., 2013). Estudios recientes han usado secuencias del genoma completo del VR para detectar un mayor número de polimorfismos (0-34), además de obtener una mejor diferenciación de las cepas virales que circulan en un área geográfica determinada (Nadin-Davis et al., 2017).

El comportamiento epidemiológico de la rabia transmitida por *D. rotundus* al ganado está relacionado con el hábitat, diversidad y dinámica de las comunidades de murciélagos, y grado de áreas geográficas perturbadas (Torres et al., 2014). Los análisis espacio-temporal han determinado que las áreas de mayor riesgo para la rabia bovina se encuentran en la proximidad de ríos y carreteras. Actualmente la RPB tiene una distribución irregular, relacionada con extensas áreas deforestadas, grandes rebaños de ganado y actividades antropogénicas (Kobayashi et al., 2008). La comprensión de factores ambientales, sociales y su relación con la forma en la que la enfermedad se mantiene en los quirópteros dentro de extensiones es pertinente al plantear estrategias dirigidas a reducir el riesgo de la transmisión de la RB por *D. rotundus* al ganado bovino (Lee et al., 2012).

En México, los casos de RPB han incrementado y la enfermedad es cada vez más frecuente en regiones tradicionalmente consideradas libres (Hidalgo, 2005; Balsamo et al., 2010). De acuerdo a reportes oficiales del Sistema de Vigilancia Epidemiológica (SIVE) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), el promedio de focos de RPB reportados

del 2011 al 2013 fue de 209 casos, predominando en estados con clima tropical o semitropical, como Chiapas, Hidalgo, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán. No obstante, se considera que esta enfermedad está subreportada, debido a la falta de laboratorios especializados suficientes para el diagnóstico, muchos casos ocurridos en campo no son registrados.

En México, el número de casos de rabia en ganado varía mucho de un año a otro, sin una tendencia clara en la prevalencia de la enfermedad. Muchos de estos casos son transmitidos por *D. rotundus* (Johnson et al., 2014).

En la región centro de México, que involucra a los estados de Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí, se sabe que por ejemplo en la Huasteca potosina se presenta año con año un considerable número de casos de RPB por mordedura de murciélago hematófago. Esta zona colinda con la Sierra Gorda de Querétaro, donde la enfermedad es endémica desde el 2005, generando la hipótesis de que la enfermedad se está diseminando. En los últimos años han ocurrido casos de rabia en el semidesierto del estado de Querétaro, donde la enfermedad no era conocida. Por lo tanto, incrementar el conocimiento ecológico, molecular y epidemiológico del comportamiento de la RPB transmitida por el murciélago hematófago a las diferentes especies animales domésticas en los estados de Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí, para detectar eslabones susceptibles de modificación de la cadena epidemiológica de la enfermedad para mejorar su control.

CAPÍTULO II

II. ANTECEDENTES

2.1. Panorama de la rabia paralítica bovina en las Américas.

Desde la introducción del ganado doméstico en el Nuevo Mundo, la rabia transmitida por murciélagos vampiro, ha sido un factor que ha limitado a la industria ganadera de América Latina (Massad et al., 2001; Belotto et al., 2005). Además, existe una disminución en la producción de carne de 39.7 kg por animal al año (Schmidt et al., 1979) y aumento de las infecciones bacterianas secundarias por causa de la mordedura de murciélago vampiro (Kuzmin et al., 2007). Aún no hay un consenso sobre los efectos de la pérdida de sangre en el ganado (Lee et al., 2012). Las cifras de mortalidad en bovinos por rabia en los distintos países de América, difieren considerablemente. En los años sesenta más de 500, 000 bovinos murieron a causa de la enfermedad transmitida por quirópteros (Arellano-Sota, 1988). Con el inicio de métodos de control de murciélagos y vacunas para el ganado bovino, después de 38 años, se obtuvo una reducción del 99% en el número de casos (Mayen, 2003; Kuzmin et al., 2007; PAHO, 2007). Sin embargo, éstas son sólo estimaciones conservadoras. Actualmente, no se dispone de cifras de vacunación de los 18 países de América Latina afectados por RPB (Lee et al., 2012); No obstante, se estima que las pérdidas económicas anuales por esta enfermedad continúan superando los 30 millones de dólares.

La distribución geográfica de la enfermedad ha ido en incremento paulatinamente (Lee et al., 2012), con la participación del murciélago vampiro, principalmente. Así, el mayor desafío para el control de la RPB en América es este vector (Massad et al., 2001 y Delpietro et al., 1996). Estudios de epidemiología espacial y ambiental han tratado de identificar áreas geográficas con alto riesgo de transmisión y los posibles factores ambientales relacionados con la aparición de la enfermedad en aquellas regiones donde un gran número de animales y *D. rotundus* co-ocurren, ya que la ganadería, principalmente bovinos, representa la fuente primaria de alimento para los vampiros, sobre todo en los países de

América Central y México. Altas densidades de ganado bovino por Km² y el hábitat adecuado favorecen la presencia del vector (Lee et al., 2012).

La tipificación genética del VR por anticuerpos monoclonales contra la nucleoproteína o glicoproteína viral, ha permitido discriminar las variantes antigénicas asociadas a vampiros. Análisis basados en la comparación de las secuencias genómicas del VR se han expandido para inferir la variación del virus a través del tiempo y el espacio. En la última década diversas investigaciones han descrito aspectos ecológicos y moleculares para explicar el fenómeno completo sobre el comportamiento epidemiológico de la RPB en el continente americano.

En relación al diagnóstico de la rabia, la participación de los laboratorios ha sido crucial para la confirmación de un caso positivo por la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD), que es la prueba de referencia a nivel mundial (NOM-067-ZOO-2007). Difícilmente se diferencia que la rabia en bovinos sea producida por otros animales infectados, sean terrestres o aéreos. Sin embargo, procedimientos inmunológicos utilizados en la caracterización viral basados en el empleo de anticuerpos monoclonales y, más recientemente, los análisis de secuenciación genética, han permitido generalizar que la mayoría de los casos de rabia en bovinos, en la América Tropical, se deben a la transmisión de *D. rotundus*, aunque, se han encontrado murciélagos de todo tipo de dieta infectados del VR (Escobar et al., 2015).

2.2. Panorama de la Rabia Paralítica Bovina en México.

En México el ciclo epidemiológico preponderante de la RPB es el rural, en él cual el murciélago hematófago transmite el VR al ganado y ocasionalmente al humano y otros animales. El 82% de los casos de rabia en animales en México ocurre en el ganado bovino (Blanton et al., 2012). Muchas áreas geográficas, particularmente en aquellas que son hábitat normal para *D. rotundus*, resultan ser zonas susceptibles. Estas áreas de alto riesgo incluyen zonas a lo largo del Golfo de México y la Costa del Pacífico (Lee et al., 2012). Actualmente existe un

incremento en el número de casos de rabia transmitidos por *D. rotundus* en zonas antes libres, así como su distribución potencial en áreas geográficas que tienen una alta densidad de ganado bovino por Km² y un hábitat adecuado para la presencia de vampiros (Ramírez-Romero et al., 2014). Sin embargo, el número de casos de rabia en ganado fluctúa ampliamente de un año a otro, sin una tendencia clara en la prevalencia de la enfermedad.

México tiene un inventario de 23 millones de cabezas de ganado bovino, de las cuales 19 millones son destinadas a la producción de carne y el resto a la producción de leche (Peel et al., 2011). Más de un millón de cabezas se exporta anualmente a Estados Unidos, principalmente del Norte de México (Huntsinger y Starrs, 2006). La gran mayoría de los animales engordados en los lotes de México provienen de regiones tropicales y subtropicales de México y Centroamérica, donde la población de murciélago vampiro y la RPB son endémicas (Peel et al., 2011).

En la última década se han reportado casos confirmados de RPB en el ganado en regiones que tienen distancias geográficas lejanas a zonas endémicas, sin las condiciones ambientales adecuadas para el establecimiento de los vampiros (Lee et al., 2012), contradiciendo la creencia de que el vampiro no puede vivir en zonas con altitudes mayores a los 1,500 msnm ó en climas semidesérticos. Resultados de la caracterización del VR han permitido identificar variantes antigénicas en quirópteros, V3, V5 y V11, para murciélago hematófago *D. rotundus*; y V4 y V9, para murciélago insectívoro *Tadarida brasiliensis*.

El vampiro *D. rotundus* también representa un problema para la salud pública. De acuerdo al Programa de Acción Específico, 2007-2012, de la Secretaría de Salud, para rabia y otras zoonosis, en el periodo 2000-2006 se presentaron 23 casos de rabia humana transmitida por fauna silvestre; de éstos, 14 (60 %) fueron ocasionados por agresión de murciélago en poblaciones rurales que residen cerca de nichos ecológicos donde prolifera este tipo de fauna.

2.3. Epidemiología de la rabia parálítica bovina en México.

La RPB es una enfermedad endémica en México y su presencia está asociada a la existencia de *D. rotundus*, que afecta principalmente a los bovinos. De acuerdo con informes oficiales del Sistema de Vigilancia Epidemiológica del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, entre el año 2009 y el 2013 se confirmaron, 1,176 casos fueron 2009 y 2010. En 2011 hubo una disminución, sin embargo, para el 2012 y 2013 hubo un nuevo incremento. Los estados con mayor número de casos fueron: Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Nayarit, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán con el 77.8% del total de los casos. En estos estados, el ganado, en especial las razas cebuínas, conviven con el murciélago vampiro (SIVE, SENASICA).

Al igual que en muchos otros países, en México existe un considerable sub-registro de casos debido, principalmente, a la falta de suficientes laboratorios especializados para realizar el diagnóstico. Además, muchos de los casos que ocurren en áreas rurales, no son registrados por el desconocimiento de la enfermedad por parte de los productores (Lee et al., 2012; Ramírez-Romero et al., 2014). Se considera que, por cada caso de rabia notificado, existen diez que no se informan (Fornes et al., 1974). De acuerdo a reportes de la Dirección de Campañas Zoonositarias, entre los años 2001 y el 2010, la prevalencia de la RPB se incrementó de 3.8% a 5.6%, esto implica que 649,596 cabezas de ganado bovino estaban en riesgo de contraer la enfermedad. Las pérdidas económicas directas anuales estimadas en la ganadería nacional por la muerte de bovinos a causa de esta enfermedad ascienden, aproximadamente, a 500 millones de pesos (NOM-067-ZOO-2007). La enfermedad no tiene una distribución uniforme en los estados afectados, en muchos de ellos existen áreas libres, de baja y de alta endemicidad y otras con brotes epizooticos. Un punto crítico en la incidencia de casos de RPB es el manejo que los productores dan al ganado bovino. En algunas regiones de México se aplican diferentes sistemas de pastoreo extensivo con un considerable movimiento de ganado en primavera y verano, épocas en la que hay mejores agostaderos.

Las estrategias para reducir el número de casos de rabia paralítica bovina son la vacunación al ganado y el control de población del murciélago hematófago. En México la vacunación es limitada, con pocos bovinos inmunizados (Anderson et al., 2012). El control de murciélago hematófago se lleva a cabo de manera selectiva en corrales y refugios. Consiste en que una vez capturados los murciélagos estos son tratados con una pomada vampiricida y luego liberados con el fin de que regresen a sus colonias y, aprovechando su comportamiento gregario y hábitos de acicalamiento, otros murciélagos ingieran el tóxico y así provocar una hemorragia interna en ellos, provocándoles la muerte. Es importante recalcar que aunque los vampiros tratados pueden ubicarse en refugios compartidos con otras especies de murciélagos, estos últimos no son afectados por el producto vampiricida, ya que están bien definidos sus nichos y no tienen una relación estrecha entre especies distintas. Sin embargo, el conocimiento sobre la biología y el comportamiento ecológico del *D. rotundus* es escaso.

En México la diseminación de la enfermedad puede deberse a la migración del vampiro infectado, la presencia de ganado y la estrategia de vacunación. La aparición de casos parece estar más relacionada con la distribución del ganado y del murciélago vampiro (Lee et al., 2012), lo que puede estar asociado a factores ecológicos tales como: Sin embargo, la erradicación de la rabia en quirópteros es actualmente imposible por lo que existe la necesidad de maximizar la eficiencia de la vacunación en las especies ganaderas (Anderson et al., 2012).

2.4. Epidemiología espacial en rabia paralítica bovina.

La epidemiología espacial es la descripción de los patrones espaciales de incidencia y morbi - mortalidad de la enfermedad (Barcellos, 2003). Se refiere al análisis de la distribución espacial de la incidencia de la RPB (Auchincloss et al., 2012; Lawson 2001). La epidemiología moderna, incorpora cada vez más la perspectiva espacial en diseños y análisis de la distribución, los factores relacionados con las interacciones huésped-vector-agente y al análisis ambiental

(Pina et al., 2010), usando los sistemas de información geográfica (SIG) y sistemas de posicionamiento global (GPS), que permiten generar estrategias epidemiológicamente informadas.

2.4.1. Sistemas de información geográfica (SIG).

Los SIG son en realidad un sistema integrado por equipos, programas, métodos, personas y aspectos institucionales para recolectar, almacenar, analizar datos digitalizados o referencias geográficas. (Ascuntar-Tello et al., 2016). Los SIG constituyen una herramienta útil al identificar áreas geográficas o poblaciones expuestas a un determinado evento para establecer zonas de riesgo y el análisis de datos ecológicos (Lawson, 2001; Elliott y Wartenberg, 2004; Singh et al., 2015; Lawson et al., 2016). Los SIG favorecen la organización y visualización de datos, la generación de mapas a partir de coordenadas geográficas, consulta espacial sobre sitios geográficos con propiedades específicas de un determinado evento, análisis espacial usando niveles de información (capas) a fin de evidenciar patrones que infieran un significado a partir del cruce de datos, la previsión mediante el modelaje de escenarios para evaluar la ocurrencia de eventos naturales en condiciones similares ó diferentes.

Los SIG responden a preguntas de localización, condición, tendencia, ruta, patrones, modelado espacial de epidemias y transmisión espacial de enfermedades (Eliott et al., 2000). En la actualidad se han desarrollado muchos paquetes de SIG, algunos de licencia abierta como Open Jump, Grass, GvSIG Desktop y UDIG. Otros de carácter comercial como ArcGIS, los cuales han ido incursionando en el campo de la salud (Ascuntar-Tello et al, 2015).

2.4.2. Modelo de nicho ecológico.

Los SIG han tenido gran influencia en el desarrollo del modelaje de nicho ecológico. Un Modelo de nicho ecológico es la caracterización de los factores bióticos y abióticos con los cuales un organismo se relaciona en un tiempo y espacio determinado (Grinnell, 1917; Hutchinson 1959). Su implicación es para inferir áreas de distribución potencial de las especies con base a la estimación de los factores ambientales que dan forma a las distribuciones espaciales de los organismos (Naoki, 2006). Esta integración en la salud pública y la epidemiología permite comprender la geografía, analizar las relaciones entre los factores ambientales y la ecología de los vectores o la transmisión de enfermedades pasadas, actuales y emergentes (Escobar et al., 2015).

Los modelos de predicción utilizan dos tipos de información, datos primarios y secundarios, sitios de colecta u observación de la especie de interés y la información de clima, topografía o medio ambiente del área donde se quiere predecir la distribución de la especie de interés. Esto permite interpolar o extrapolar, a partir de observaciones puntuales sobre el espacio, similar a la previsión a través del tiempo, con el fin de predecir la ocurrencia de una especie para lugares donde se carece de datos. Lo que genera un mapa predictivo (Peterson y Vieglais, 2001).

En el modelaje de nicho ecológico se utilizan dos enfoques básicos, el primero es para predecir el potencial geográfico de una especie invasora en una nueva región con base a información sobre sus preferencias de hábitat en su área de distribución natural y, la segunda, es el uso de la información en donde se ha establecido en su nuevo rango para identificar lugares aún no invadidos que pueden estar en riesgo (Beerling et al., 1995; Peterson y Robins, 2003). Si la especie cuyo hábitat potencial está siendo pronosticado es un organismo de la enfermedad que afecta a los animales o los seres humanos, o su vector o huésped, entonces la predicción espacial de su distribución potencial sirve para los objetivos de salud pública y es compatible con los estudios epidemiológicos

(Kelly y Meentemeyer, 2002), consolidándose el campo de la epidemiología espacial.

2.4.3. Geoestadística.

La geo estadística es una herramienta que sirve para analizar y predecir los valores de una variable que se muestra en el espacio de una forma continua que utiliza el método de interpolación. Debido a su aplicación orientada a los SIG, también se podría definir como la estadística relacionada con los datos geográficos. El desarrollo de los SIG y la aplicación de la geo estadística ha supuesto un nuevo impulso al análisis de la distribución espacial aplicada a la ecología de las enfermedades, principalmente aquellas transmitidas por vectores (Parra-Heano, 2010). La geo-estadística utiliza el Krigeaje, estimador espacial, que estima valores de puntos circundantes conocidos (Schabenberger et al., 2017).

El Krigeaje es un método de predicción espacial utilizando una interpolación media móvil ponderada para producir una predicción lineal espacial óptima (Schabenberger et al., 2017). Los valores reflejan las distancias entre la ubicación para la cual un valor se está prediciendo y las ubicaciones con valores medidos. Esto proporciona un mejor estimador lineal no sesgado.

2.4.3.1. Distribución espacial y modelaje de nicho ecológico para rabia paralítica bovina.

Las Zoonosis, especialmente la rabia silvestre, plantean un reto importante debido a la poca disponibilidad de información de la población de los vectores y hospederos animales involucrados. Esto hace que la epidemiología espacial tenga mayor utilidad, ya que brinda información de difícil obtención con otros métodos

(Recuenco et al., 2008). Diversos estudios en la epidemiología de la rabia silvestre han mencionado que es de particular relevancia identificar factores naturales y antropogénicos que influyen en la prevalencia de la infección en las poblaciones y colonias de murciélagos (Streiker et al., 2012). Así, el planteamiento y la aplicación del control de la RPB, están directamente vinculados a la distribución espacial y dinámica de los elementos contenidos en un área geográfica determinada tales como: temperatura, vegetación, cambios climáticos, uso de la tierra, actividades económicas y antropogénicas (Recuenco et al., 2008; Kostyrka, 2015). Se ha sugerido que los enfoques basados en el paisaje y el nicho son un complemento importante para evaluar los efectos del medio ambiente y del paisaje sobre la distribución del VR (Escobar et al., 2015).

Los sistemas de vigilancia epidemiológica de la RPB son frecuentemente la única fuente disponible de datos de muchos países de América Latina, y suelen ser de gran apoyo por tener series de tiempo útiles para modelaje espacio-temporal y predictivos, a pesar de que sus bases de datos no representen el 100% de los casos. El modelaje espacial para RPB debe combinar métodos y conocimientos de geografía, epidemiología, salud pública, estadística, ecología, virología, demografía, medio ambiente, biología animal, y en algunos casos sociología, antropología y economía (Recuenco et al., 2009).

En los últimos años, en América Latina se han realizado estudios enfocados a la distribución geográfica de los brotes de RPB transmitida por quirópteros utilizando datos espacio-temporales de casos de rabia en ganado bovino para predecir el tiempo y el lugar de futuras transmisiones. El modelaje espacial del paisaje ha permitido evaluar las condiciones bióticas y abióticas asociadas con la incidencia de RPB en Colombia. Esto ha permitido inferir que los cambios en la incidencia de casos de rabia en ganado pueden deberse a las variaciones climáticas anuales que afectan al *D. rotundus* y a la ubicación geográfica de los territorios y sus características fisiográficas tales como el clima, hidrografía, relieve y altitud, así como a la plasticidad ecológica que tienen los murciélagos (Brito-Hoyos et al., 2013; Escobar et al., 2015; Streicker et al., 2016), sobre todo en aquellas áreas geográficas donde la RPB es endémica y el principal

transmisor es el murciélago vampiro (Kobayashi et al., 2007). Otros estudios han usado el modelaje de nicho ecológico, para predecir la distribución potencial actual de *D. rotundus* y la distribución futura de la especie para los años 2030, 2050 y 2080 con base a los escenarios climáticos y densidad de ganado bovino por km² (Lee et al., 2012). Lo que ha determinado que el hábitat adecuado para *D. rotundus* ocurre en la mayor parte de México y América Central, así como porciones de Venezuela, Guyana, las tierras altas brasileñas, el oeste de Ecuador, el norte de Argentina y el este de los Andes en Perú, Bolivia y Paraguay. Se ha reportado que no es probable que *D. rotundus* se expanda a los Estados Unidos debido a la inadecuada "estacionalidad de la temperatura" (Lee et al., 2012). Por otra parte, se ha sugerido que la propagación espacial de la rabia está influenciada por el sexo de los vampiros (Streicker et al., 2016).

En México se han utilizado los SIG para conocer la distribución del murciélago hematófago *D. rotundus*, con base a los focos de RPB notificados. Así se ha reportado que las poblaciones de vampiros van desde el norte de Tamaulipas y Sonora, hasta la frontera sur del país, además, se ha identificado la distribución geográfica de las principales variantes antigénicas y linajes genéticos del virus de la rabia asociada a murciélagos. Se ha determinado que las barreras geográficas naturales tales como la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre Occidental podrían estar jugando un papel importante en el aislamiento geográfico en los linajes del VR asociados a poblaciones de vampiros del este de México, con los que circulan en el oeste (Nadin-Davis & Loza-Rubio, 2006). Estudios basados en el modelaje de nicho ecológico han referido que en la región centro de México, en los estados de Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí la RPB se ha extendido a regiones anteriormente libres de esta enfermedad y que las características ambientales, precipitación pluvial y la altura sobre el nivel del mar, no limitan la presentación de casos (Bárcenas-Reyes et al., 2015). Un estudio previo determinó que la estacionalidad de la precipitación pluvial y el incremento en el padrón granadero son factores que influyen en la distribución de la RPB en la Sierra Gorda y el Semidesierto de Querétaro (Bárcenas-Reyes, 2013). En la misma perspectiva, otros estudios refieren que los pronósticos climáticos futuros

predicen un hábitat adecuado para *D. rotundus*, y que las áreas con grandes porciones de ganado en riesgo de presentar rabia transmitida por este quiróptero incluyen a México (Lee et al., 2012). Sin embargo, son pocos los estudios relacionados con los factores individuales y poblacionales que impulsan la transmisión del VR en murciélagos vampiro al ganado. A pesar del conocimiento de la dispersión del murciélago y el compromiso de las campañas de control para la prevención y la erradicación de la RPB, los patrones de movimiento de los murciélagos infectados aún no han sido determinados. En parte porque las distancias de dispersión de los murciélagos infectados y el tamaño de las colonias son desconocidos (Streicker et al., 2016).

2.5. Epidemiología molecular de la rabia paralítica bovina en México

Es a principios de los noventa que se empiezan a publicar estudios epidemiológicos sobre aislados de rabia mexicanos, que en su mayoría corresponden a caracterizaciones antigénicas (De Mattos et al., 1999; Velasco-Villa et al., 2002). Recientemente se han publicado estudios de epidemiología molecular de aislados de rabia que datan de los años noventa a la fecha (Aréchiga, 2012).

El uso de la biología molecular como herramienta en la epidemiología de la RPB en México ha permitido inferir sus principales reservorios, las regiones endémicas y la diseminación de la enfermedad mediante el estudio de la diversidad genética del virus rábico (Velasco-Villa et al., 2006).

El genoma del virus de la rabia es de tipo ARN monocatenario y sentido negativo, de aproximadamente 12 kb, que codifica cinco genes en el orden: 3´- N - P - M - G - L -5´ (Nucleoproteína, matriz y glicoproteína, y proteínas no estructurales, fosfoproteínas y ARN- polimerasa dependientes) (Tordo, 1996). Las secuencias parciales de los genes N y G han sido utilizadas para reconocer los 13 genotipos virales (Bourhy et al., 1993; Guyatt et al., 2003). En México, mediante la comparación de secciones del gen que codifica para la nucleoproteína del virus

rábico aislado en su mayoría de ganado bovino, se han identificado variantes antigénicas asociadas a su reservorio: V1 (perro), V3, V5 y V11 (murciélago hematófago), V8 y V10 (mapaches), V7 (zorros), V4 y V9 murciélagos insectívoros (*Tadarida brasiliensis*). Las variantes antigénicas asociadas a vampiros han sido encontradas con una alta frecuencia en el ser humano y el ganado, representando el mayor problema para México en la salud pública y animal. Con base a lo reportado en otros estudios, la mayoría de los casos parece ser debido a la V11, y en menor proporción la V3, variantes que circulan en vampiros de México. Dichas variantes tienen polimorfismos que ya han sido reportados (Nadin-Davis y Loza-Rubio 2006).

Actualmente la V11 del VR tiene una distribución continua que abarca las zonas tropicales y subtropicales a lo largo del Golfo de México hasta la península de Yucatán, más las planicies subtropicales del este del Istmo de Tehuantepec dentro de los estados de Chiapas y Oaxaca. La distribución y la diseminación de los casos RPB en México son el producto del movimiento gradual de las poblaciones de murciélago vampiro realizado por la expansión de la industria ganadera o situaciones de estrés ecológico (Loza-Rubio et al., 1996; Velasco-Villa et al., 2006). La importancia del papel que tiene la ecología ante la variación genética del VR radica en su evolución. El virus rábico muestra fuerte conservación y existe una buena correlación entre los criterios genéticos y geográficos que indican una lenta evolución. La epidemiología de la rabia se ve influenciada por la dinámica de infección que tienen los *Lyssavirus* con la distribución local, abundancia, demografía, comportamiento ecológico, dispersión e interacción con otras especies de hospederos (Hayman et al., 2013).

En las últimas dos décadas la generación de datos de secuencias de nucleótidos para colecciones de *Lyssavirus* se han sometido a métodos de análisis filogenéticos, que intentan definir la estructura taxonómica de este género y predecir las relaciones evolutivas de las cepas que circulan hoy en día. Los enfoques coalescentes pueden dar una idea de las características demográficas de los brotes virales. Además hay que considerar que las actividades antropogénicas han ayudado al movimiento de las especies que sirven como

huésped o reservorio lo que facilita la transferencia del virus entre los continentes por las características topográficas de los paisajes lo que puede influir de manera significativa en la velocidad y el grado de propagación de la enfermedad (Brunker et al., 2012).

2.6. Factores moleculares y enfoques ecológicos en la epidemiología de la rabia paralítica.

Los enfoques ecológicos y moleculares son necesarios para la comprensión y el control exitoso de la rabia. Dado que es un virus de ARN circulante entre múltiples huéspedes, vectores y reservorios (Kostyrka, 2015; Rico et al., 2015). En el comportamiento epidemiológico de la RPB, existen factores tales como interacciones dentro y entre las diferentes especies hospederas y el ambiente. Por otro lado la comprensión molecular de la evolución genética del virus de la rabia es crítica, debido a la ausencia de actividad de la polimerasa que corrige errores, lo que resulta en una alta tasa de mutación por generación, por lo que las poblaciones del virus rábico cuenta con variantes antigénicas asociadas a tipos de reservorios. Para determinar el comportamiento evolutivo y adaptativo del virus rábico en diferentes hospederos se han comparado secuencias de nucleótidos de la nucleoproteína (N) y glicoproteína (G). El gen N se elige porque codifica una función interna implicada en la regulación de la transcripción y la replicación del virus, factor importante en la adaptación del virus al huésped. El gen G, es importante porque codifica una proteína externa relacionada con la patogenicidad, que reacciona con los receptores celulares del virus de la rabia (Bourhy et al., 1999; Dietzschold et al., 1983). Estos dos genes se conservan generalmente con pocas sustituciones de aminoácidos. Sin embargo, esto no excluye que los cambios genéticos permitan la adaptación a otros huéspedes, pero como son muy limitados, es probable que los factores ecológicos expliquen mejor la transmisión cruzada de especies del virus rábico. La ecología intra-huésped del virus de la rabia se ha explicado a través de las restricciones selectivas en el gen G, debido a que la replicación viral no sólo ocurre en células neuronales ya que se ha hipotetizado que permite la entrada a diversos tipos celulares (Holmes et al., 2002). Esto significa que el virus de la rabia puede saltar

antigénicamente, lo que relaciona a los factores genéticos y ecológicos. Esto debido a la ecología extra-huésped, que se refiere a la densidad y especies susceptibles, puede ser una causa inmediata que desencadene saltos antigénicos de especies.

Los factores moleculares y ecológicos de la transmisión entre especies han sido de interés en el estudio epidemiológico de la rabia transmitida por murciélagos, particularmente la transmisión de especies cruzadas (Bourhy et al., 2008). Un estudio reciente basado en la caracterización molecular del gen P, una región relativamente divergente del virus rábico y que puede modular interacciones entre el virus y el hospedero por vía de numerosas características estructurales variables, perteneciente a una cepa de zorrillo mexicano reveló que las dos variantes asociadas a zorrillo que circulan en México, V8 y V10, son evolutivamente distintas. Se ha propuesto que las cepas de rabia circulando en hospederos terrestres de América surgieron a partir de quirópteros hospederos (Rupprecht et al., 2011) y se ha documentado el potencial para el surgimiento de nuevas cepas de rabia posteriores a la transmisión de esta enfermedad por el murciélago como reservorio, a una población localizada de zorritos (fenómeno denominado "spillover" (Arechiga, 2012). De la misma manera, la variante V8 bien pudo emerger de ciertas cepas de murciélago (Loza-Rubio et al., 2012). De acuerdo con Matsumoto et al., 2011, la clasificación usando secuencias del genoma completo, en lugar de partir de una secuencia parcial de un gen específico, ofrece bases más sólidas e integrales para abordar la evolución del VR. El comportamiento evolutivo no evidencia recombinación en su genoma. Esto hace suponer que los factores ecológicos deben ser objeto de especial atención en el control y la vigilancia epidemiológica.

Se ha propuesto que los datos genéticos proporcionados por la epidemiología molecular y la genética de poblaciones, así como los datos ecológicos o ambientales proporcionados por las redes de epidemiología espacial, sean utilizados para identificar las vías de transmisión viral entre diferentes huéspedes (Biek Et al., 2007).

2.7. Los murciélagos.

Los murciélagos son un grupo de mamíferos diverso con amplia distribución geográfica (Medellín et al., 2000). Pertenecen al orden *Chiroptera*, donde se conocen aproximadamente 1,240 especies organizadas en 18 familias en dos subórdenes: Megachiroptera y Microchiroptera (Chan et al., 2013; Rodhain, 2015; Calisher et al., 2006; Jones et al., 2005; Wibbelt et al., 2010; Calisher, 2015). Los murciélagos proveen servicios ecológicos que benefician a los ecosistemas, la polinización de plantas y flores, la depredación de insectos dañinos a la agricultura y la dispersión de semillas (Pijl, 1957; Fleming et al., 2009; Lobova et al., 2003). La importancia ecológica de los murciélagos se origina a partir de sus hábitos alimenticios, pues es por esta característica que mantienen el equilibrio ecológico en la naturaleza. No obstante, también tienen un papel relevante en la emergencia de virus zoonóticos, pues al menos 60 especies de virus encontrados en alguna especie de murciélago se han relacionado a enfermedades emergentes y re-emergentes (Wong et al., 2007; Rodhain, 2015). Del gran número de especies de murciélagos, solo tres se alimentan de sangre.

El *Desmodus rotundus* también conocido como vampiro común ó de patas pelonas; el *Diphylla ecaudata* o vampiro de patas peludas y el *Diaemus youngi* o vampiro de alas blancas (Aguilar et al., 2006). Pertenecen al suborden Microchiroptera y son especies endémicas de México. Sin embargo, *Diphyllae caudata* y *Diaemus youngi* no son consideradas de importancia en el mantenimiento de la rabia (Brass, 1994; Loza-Rubio et al., 2000).

2.7.1. *Desmodus rotundus*.

Desmodus rotundus es una de estas tres especies propias de América, su distribución va del norte de México a Sudamérica, a lo largo de la Costa Pacífica por Chile y la costa atlántica de Uruguay, hasta el extremo de Brasil (Villa, 1976). Se alimentan de sangre mediante la mordedura en otros vertebrados, en especial

la del bovino y ocasionalmente del hombre. Su tamaño es como el puño de una mano, tiene en el labio inferior una escotadura en forma de V por donde succiona la sangre, su dedo pulgar es bastante largo y le sirve para fijarse a la piel de sus víctimas; el murciélago hematófago extrae 20 ml de sangre en un lapso de 10 a 25 minutos, que es el consumo diario que requiere para su supervivencia (Velasco et al., 2002). Este hábito les ha causado una serie de complicaciones hacia su existencia, el problema aumenta cuando son portadores de la rabia transmitiendo el virus a diferentes especies animales, incluso al humano (Gándara et al., 2006). Cabe señalar que esta especie sirve como reservorio del VR. Los murciélagos hematófagos viven en muy diversos lugares, algunos de ellos naturales y otros contruidos por el ser humano tales como cuevas, alcantarillas, cavernas o arboles huecos. Es común encontrarlo en ambientes y refugios muy variados, donde suele ser la única especie, o bien, coexistir con murciélagos inofensivos (Sánchez, 2004; López et al., 2007). Sin embargo, nunca es la especie más abundante en un refugio compartido.

La abundancia local de *D. rotundus* se ve favorecida por el incremento del número de cabezas de ganado en el campo. Se considera que el área de pastoreo y el establecimiento de sus colonias son puntos clave en la ecología del *D. rotundus*. Es habitual que su área de pastoreo abarque de 5 a 8 km alrededor de su refugio. Se ha reportado que éste quiróptero puede viajar en busca de alimento hasta 15 ó 20 km de distancia respecto a su refugio. También es conocido que algunos machos llegan a viajar hasta 100km en busca de nuevas colonias y hembras. El tamaño de las colonias varía de 500 hasta 5,000 individuos, pero en general son relativamente pequeñas que van de 10 hasta 200. El número de individuos de una colonia depende de la disponibilidad del alimento, el espacio y de las condiciones micro climáticas de los refugios (Fornes, 1974). De Thoisy et al (2016), estimó un tamaño poblacional promedio de 25 individuos, con un rango de 5 a 60. Se ha observado que *D. rotundus* es una especie gregaria y de poca actividad migratoria. El *D. rotundus* se reproduce todo el año y no presenta incrementos estacionales de nacimientos, lactancia o preñez (Quintana y Pacheco, 2007). Se ha observado que existe un máximo de reproducción en la

estación lluviosa o al inicio de ésta (Carrasco-Rueda, 2011). El tamaño de la camada es de una sola cría por parto (Bernard, 2005), con un periodo de gestación de siete meses (Suzán, 2005). De Thoisy et al (2016), observaron que en todo el año tienen actividad reproductiva, con una proporción sexual de un macho por cada hembra.

2.8. El virus de la rabia en poblaciones de murciélago *D. rotundus*.

D. rotundus tiene un papel preponderante en la diseminación de la rabia al ganado y al humano. En América Latina los asentamientos humanos y las prácticas agrícolas y ganaderas alteran el hábitat del vampiro (Belotto et al., 2005; Jones et al., 2013). Estas perturbaciones ecológicas del vampiro tienen efecto sobre la circulación del virus, lo que explica el comportamiento epidemiológico extensivo de la rabia silvestre (Bastiani et al., 2012).

En América Latina se han documentado al menos tres variantes antigénicas del VR asociadas al vampiro: V3, V5 y V11. La mayoría de los casos son por V11, aunque se han identificado casos por V3 en vampiros mexicanos a lo largo del Océano Pacífico y el Golfo de México (Loza-Rubio et al., 1996; Nadin-Davis y Loza-Rubio, 2006).

El virus de la rabia puede mantenerse dentro de las poblaciones de murciélagos hematófagos con una probabilidad muy baja de desarrollar una infección letal. Sin embargo, lo más probable es que la mayoría de las exposiciones son subclínicas e inmunizantes, lo que permite la persistencia viral a largo plazo en las colonias de una especie con una lenta tasa de reproducción, estas infecciones inmunizan al vampiro previniendo la extinción de la colonia y la persistencia del virus. Se estima que la probabilidad de que un vampiro desarrolle infección letal es del 10% (Blackwood et al., 2013). Se cree que los huéspedes originales de todos los Lyssavirus son murciélagos. El virus de la rabia clásica ocurre en murciélagos en las Américas (Beranová, 2016).

En México se ha estudiado una gran cantidad de virus de la rabia relacionados con murciélagos. Estos se han obtenido principalmente de animales domésticos, ganado, seres humanos y en bajos números de diferentes especies de murciélagos. Los virus de la rabia asociados a murciélagos en México tienen mucha similitud con virus que actualmente se encuentran circulando de forma enzoótica en las mismas o diferentes especies de murciélagos en otros países de América (Cisterna et al., 2005; Smith, 2002; Yung et al., 2002; Ito et al., 2001). La distribución generalizada del murciélago vampiro, de México a Argentina, junto con un mecanismo para la transmisión de especies cruzadas (comportamiento obligatorio de alimentación de sangre) crea altas cargas económicas, sociales y de salud pública de la rabia en toda la región.

Aunque la vacunación post-exposición de los seres humanos y la vacunación pre-exposición de ganado están disponibles y son eficaces, no se practican a gran escala (Sodre et al., 2010; Schneider et al., 2009). En cambio, el control de la rabia transmitida por murciélagos vampiros utiliza el control de la población de murciélagos. La eliminación de vampiros para reducir el riesgo de transmisión del virus de la rabia hace realmente poco para detener la diseminación de la rabia y puede, por el contrario, incrementarla (Blackwood et al., 2013). La eficacia de estos programas ha sido cuestionada por estudios de campo que demuestran que prácticas agresivas tales como el uso de explosivos en cuevas obligan a los vampiros infectados a moverse a otras colonias y a otras regiones, donde el virus inicia un nuevo ciclo de infección (Arellano-Sota et al., 1988).

Por otro lado, se ha mencionado que el tamaño de la colonia no es un buen predictor de la prevalencia de la rabia. Esto porque la eliminación del vampiro no reduce la transmisión ya que el virus de la rabia pasa periodos de incubación suficientemente largos en murciélagos en hibernación, lo que permite que la infección pase de un año al siguiente, favoreciendo el estado epidémico de la rabia (George et al., 2011). En la mayoría de los países de América Latina se han utilizado los anticoagulantes para el control de poblaciones de murciélagos vampiro. En México su uso está indicado en las recomendaciones nacionales en respuesta a un brote de enfermedad. Sin embargo, las poblaciones de murciélago

han aumentado con el tiempo (Jonhson et al., 2014). A partir de los años setenta, la rabia estaba presente en aproximadamente el 65% del área habitada por el murciélago vampiro común y actualmente es casi el 100% de esta área la que muestra rabia parálítica bovina (SENASICA).

CAPÍTULO III

3.1. JUSTIFICACIÓN

El problema de la rabia transmitida por murciélago hematófago *D. rotundus* representa un riesgo para las poblaciones humanas y el ganado bovino, principalmente. Actualmente ha sido documentado el número de casos de rabia transmitidos por este vector en zonas antes libres, así como su distribución potencial en los países de América Latina. En México la rabia se mantiene como un problema de salud pública y de ganadería. El número de casos no presenta una tendencia clara en la prevalencia de la enfermedad. Muchos de los casos, en particular los de ganado, son transmitidos por el murciélago vampiro.

El fenómeno epidemiológico de la rabia es complejo debido a la gran diversidad de reservorios distribuidos en los dos ecosistemas que definen los dos ciclos epidemiológicos de la rabia, urbano y silvestre. La vacunación ha sido una de las principales estrategias para el control de la rabia en las regiones de alto riesgo del país y se ha logrado reducir el riesgo de presencia de casos de rabia urbana, pero no ha sido así para la rabia transmitida por vampiro. La falta de conocimiento sobre el comportamiento ecológico del vector y su relación con la transmisión inter-específica del virus en los distintos ecosistemas del país, ha limitado el control de la enfermedad.

En México, como en otros países, se han realizado estudios filogenéticos basados en secuencias parciales del gen N, G y el P, lo que ha mostrado evidencia sobre los patrones moleculares y de distribución geográfica del virus en sus diferentes tipos de reservorios naturales y huéspedes susceptibles, así como la diversidad entre las variantes antigénicas del virus y su papel epidemiológico. Se ha sugerido que la secuenciación del genoma completo, puede ser una mejor herramienta para incrementar el conocimiento sobre los cambios microevolutivos del virus en sus hospederos y reservorios naturales.

Esta tesis plantea un análisis basado en el comportamiento epidemiológico de la enfermedad en la región, la estructura filogenética del virus y los patrones ecológicos que posiblemente determinen la distribución geográfica de los linajes genealógicos encontrados. Los resultados de este trabajo generarán un conocimiento más amplio y sólido sobre la epidemiología de la enfermedad en la región, que podrán ser interpretados para un mejor diagnóstico, una mejor estrategia de vacunación y mejores acciones para el control de la rabia parálitica bovina en el Bajío e incluso en México.

CAPÍTULO IV

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación eco-epidemiológica y molecular del virus de la rabia bovina en el murciélago hematófago y las diferentes especies animales domésticas en los estados de Guanajuato, Querétaro y San Luís Potosí.

CAPÍTULO V

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la incidencia de casos de rabia transmitida por murciélago hematófago en las diferentes especies ganaderas.
2. Determinar zonas de riesgo de diseminación de rabia paralítica en la región.
3. Aislar y secuenciar los virus aislados del murciélago/vampiro y de otras especies animales, especialmente bovinos.
4. Establecer la filogenia de cepas del virus de la rabia paralítica bovina en Querétaro, Guanajuato y San Luís Potosí.
5. Comparar la resolución filogenética de la secuencia del genoma completo con secuencias parciales de los genes N, P y G de cepas mexicanas del virus de la rabia.

CAPÍTULO VI

Comportamiento epidemiológico de la rabia paralítica bovina en la región central de México, 2001-2013

Isabel Bárcenas-Reyes, Elizabeth Loza-Rubio, Horacio Zendejas-Martínez, Hugo
Luna-Soria, Germinal J. Cantó-Alarcón y Feliciano Milián-Suazo

Revista Panamericana de Salud Pública. 2015; 38 (5): 396–402.



Comportamiento epidemiológico de la rabia paralítica bovina en la región central de México, 2001–2013

Isabel Bárcenas-Reyes,¹ Elizabeth Loza-Rubio,²
Horacio Zendejas-Martínez,¹ Hugo Luna-Soria,¹
Germinal J. Cantó-Alarcón¹ y Feliciano Milián-Suazo¹

Forma de citar Bárcenas-Reyes I, Loza-Rubio E, Zendejas-Martínez H, Luna-Soria H, Cantó-Alarcón GJ, Milián-Suazo F. Comportamiento epidemiológico de la rabia paralítica bovina en la región central de México, 2001–2013. *Rev Panam Salud Publica*. 2015;38(5):396–402.

RESUMEN

Objetivo. Determinar la distribución geoespacial de los casos de rabia paralítica bovina transmitida por *Desmodus rotundus* en los estados de Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí, México.

Métodos. Estudio epidemiológico transversal a partir de los casos notificados por las campañas estatales de control de la rabia paralítica bovina en Guanajuato (2008–2013), Querétaro (2005–2013) y San Luis Potosí (2001–2013). Se confirmaron los casos por inmunofluorescencia directa. Se elaboraron mapas de distribución de los casos por año y por especie, mediante el software ArcMap versión 10.1. Para identificar áreas con condiciones apropiadas para la presencia de casos se combinaron las variables bioclimáticas con los casos georreferenciados, mediante el programa MaxEnt versión 3.3.3.

Resultados. Se registraron 1 037 casos, de los cuales, 911 (87,9%) ocurrieron en San Luis Potosí, 82 (7,9%) en Querétaro y 44 (4,2%) en Guanajuato. Del total, 87,4% ocurrió en alturas menores de 1 500 msnm. En Guanajuato y Querétaro, 77,3% y 42,3% de los casos, respectivamente, ocurrieron en alturas mayores de 1 500 msnm. Los meses de mayor incidencia fueron de diciembre a marzo. La variante antigénica viral V11 fue la más frecuente (173 casos), presente en los tres estados estudiados. En el canal endémico, el promedio de casos semantiene en la zona de seguridad de enero a marzo, pero de abril a junio excede la mediana. La distribución espacial de los casos muestra la diseminación reciente de la enfermedad, lo que coincide con la presencia del murciélago vampiro.

Conclusiones. La rabia paralítica bovina se ha extendido a regiones anteriormente libres de esta enfermedad. Las características ambientales y la altura sobre el nivel del mar no limitan la presentación de casos. Se debe mantener un monitoreo constante para la detección oportuna de casos. La vacunación se debe realizar antes del comienzo de las lluvias, sin esperar la aparición de brotes.

Palabras clave Rabia; quirópteros; zoonosis; bovinos; México.

¹ Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México. La correspondencia se debe dirigir a Isabel Bárcenas-Reyes; correo electrónico: ibr.mvz@hotmail.com

² Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología (CENID-M), Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), México, D.F., México.

La rabia es una enfermedad zoonótica letal, causada por un virus neurotrópico del género *Lyssavirus*, familia Rhabdoviridae (1), que afecta a cualquier animal de sangre caliente, excepto las aves. Esta enfermedad presenta dos

ciclos, cada uno con diferentes reservorios: el urbano, que afecta a perros, gatos y otros animales que viven en contacto estrecho con el hombre; y el silvestre, que se concentra principalmente en dos reservorios terrestres —zorrillos y

mapaches— y uno aéreo —los quirópteros— (2, 3). En América Latina, el murciélago hematófago *Desmodus rotundus* es actualmente el principal reservorio y transmisor del virus al ganado y a los humanos (4–6). Se estima que 70 000 personas mueren anualmente en el mundo infectados por este virus (3).

En México, la rabia urbana se ha reducido significativamente durante la última década gracias al control canino intensivo y las campañas de vacunación; sin embargo, la rabia transmitida por animales silvestres, en especial por quirópteros, ha ido en aumento (4). Los ataques por *D. rotundus* al ganado son cada vez más frecuentes, incluso en regiones que por décadas se habían considerado libres de esta enfermedad (7).

La rabia parálitica bovina (RPB) es una forma de presentación de la enfermedad en bovinos y otras especies domésticas, caracterizada por la parálisis del tren posterior. Esta enfermedad es endémica en muchas áreas de México, principalmente donde coincide la presencia de ganado bovino con la del murciélago *D. rotundus*. En general, se han notificado focos en 24 de las 31 entidades federativas de México: por la costa del Pacífico desde el sur de Sonora hasta Chiapas, y por la costa del Golfo de México desde el sur de Tamaulipas hasta la Península de Yucatán (8). De acuerdo con informes oficiales del Sistema de Vigilancia Epidemiológica del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, entre los años 2011 y 2013 se registraron como promedio 209 focos de RPB anuales, principalmente en los estados con clima tropical o subtropical: Chiapas, Hidalgo, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán. En estos estados, el ganado, en especial las razas cebuínas, conviven con el murciélago vampiro (8, 9).

Al igual que en muchos otros países, en México existe un considerable subregistro de casos debido, principalmente, a la falta de suficientes laboratorios especializados con capacidad para realizar el diagnóstico. Además, muchos de los casos que ocurren en áreas rurales no son registrados por el desconocimiento de la enfermedad por parte de los productores (8, 10). Se considera que por cada caso de rabia notificado, existen diez que no se informan (11).

Se ha establecido que además de los factores ambientales —temperatura y nivel de precipitación pluvial, entre

otros—, hay factores biológicos —presencia de ganado y otros reservorios— y socioeconómicos —deforestación, urbanización e intensificación de la actividad agrícola y ganadera— que influyen en la presencia de los murciélagos vampiros (12–15) y en la ocurrencia de casos (13–15). La distribución de estos quirópteros es cada vez más amplia.

En el caso de los estados Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí, ubicados en la región central de México, el número de casos de RPB transmitida por *D. rotundus* ha ido en aumento y se ha extendido a zonas tradicionalmente libres de esta enfermedad. Esto ha llevado a la necesidad de estudiar con mayor detalle el comportamiento de la enfermedad y su relación con las condiciones ambientales, biológicas y socioeconómicas que influyen directamente en el hábitat del murciélago hematófago y de su hospedero principal, el ganado bovino (16).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la distribución geoespacial de los casos de RPB transmitida por *D. rotundus* y su relación con la precipitación pluvial, la temperatura ambiental y la altura sobre el nivel del mar en los estados Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio epidemiológico transversal a partir de la información contenida en las bases de datos de casos notificados por las campañas estatales de control de la RPB entre 2008 y 2013 en Guanajuato, 2005 y 2013 en Querétaro y 2001 y 2013 en San Luis Potosí. La información epidemiológica relacionada con los casos de RPB abarcó datos del lugar (estado, municipio, coordenadas geográficas y altura sobre el nivel del mar), fecha de detección (mes y año), datos del animal (número del caso, especie, sexo y edad) y variante antigénica del virus. La información sobre el nivel de precipitación pluvial y la temperatura se tomó de Bioclim (<http://www.worldclim.org/bioclim>).

La confirmación de los casos sospechados de rabia se hizo mediante inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales contra la proteína de la nucleocápside viral conjugados con isotiocianato de fluoresceína, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana vigente (17).

Para la proyección de los mapas se unificaron las diferentes formas de georreferenciación de las bases de datos a

coordenadas decimales. Para ello, después de corroborar que los puntos correspondieran al lugar de presentación de los casos, las coordenadas se transformaron de unidades sexagesimales a coordenadas del sistema universal transversal de Mercator (UTM) y a unidades decimales.

Una vez homogenizada la información, se elaboraron mapas de distribución de los casos por año y por especie mediante el *software* ArcMap versión 10.1 (18). Para elaborar el mapa de predicción de riesgo de presentación de casos de la variable regionalizada “número de casos”, se utilizó el método de *krigeaje* ordinario, del programa ArcMap. Este es un método geoestadístico de estimación de puntos que utiliza un modelo de variograma para la obtención de datos y calcula los valores que se darán a cada punto de referencia empleado en la valoración. Esta técnica de interpolación se basa en la premisa de que la variación espacial continúa con el mismo patrón, y los puntos próximos en el espacio tienden a tener valores más parecidos entre sí que con los puntos más distantes. En este método se asume que los datos recogidos de una determinada población se encuentran correlacionados en el espacio (19).

Con el fin de evaluar el comportamiento de la RPB en la región estudiada, se elaboró el canal endémico a partir de las frecuencias mensuales de casos ocurridos en los tres estados para los años 2008–2013. Este canal endémico se basó en el método de la mediana y los cuartiles con números crudos (20).

Para modelar los sitios con condiciones apropiadas para la presencia de casos de rabia en las diferentes especies domésticas y evaluar la importancia de las variables bioclimáticas, estas se combinaron con los casos georreferenciados (21, 22). Para ello se utilizó el programa MaxEnt versión 3.3.3 (23), que se basa en el modelo de máxima entropía. Este método permite detectar asociaciones entre variables ambientales en capas, con formato de sistema de información geográfica y lugares de ocurrencia, y de esta forma estimar la probabilidad de presencia de la especie estudiada en cada pixel del área de trabajo mediante mapas digitales. Este tipo de modelo ha sido útil para identificar áreas de diseminación de enfermedades y su asociación con áreas con condiciones ambientales apropiadas para el hospedero y el vector (24, 25).

De esta forma, se generó un modelo de nicho ecológico que refleja la probabilidad de encontrar las condiciones apropiadas para la ocurrencia de casos de RPB (26).

RESULTADOS

Se registraron 1 037 casos de RPB en diferentes especies animales en los estados de Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí (cuadro 1). En Guanajuato se notificaron 44 casos (4,2% del total) en ocho municipios; el municipio con mayor número de casos fue San Luis de la Paz con 13. En Querétaro se informaron 82 casos (7,9%) en 12 municipios; destacaron Jalpan de Serra y Peñamiller con 15 casos cada uno y Tolimán con 10. En San Luis Potosí se notificaron 911 casos (87,9%) en 42 municipios; Ciudad Valles fue el de mayor incidencia con 142.

De ese total, 881 (84,9%) ocurrieron en bovinos y de ellos, 63,0% correspondió a animales mayores de 6 meses. De los 156 restantes, 51 (32,7%) se registraron en murciélagos hematófagos de la especie *D. rotundus*, 40 (25,6%) en equinos, 25 (16,0%) en zorrillos, 18 (11,5%) en ovinos, 12 (7,7%) en caprinos y 6 (3,9%) en murciélagos insectívoros (*Tadarida brasiliensis*); se registraron también un caso en canino doméstico, uno en murciélago frugívoro, uno en humano y uno en venado cola blanca (2,6%).

En total, 182 casos correspondieron a variantes antigénicas del virus de la rabia propias de murciélagos vampiros: V11 (173 casos), V5 (3 casos) y V3 (2 casos); 2 casos a variantes de murciélagos insectívoros V4 (1 caso) y V9 (1 caso), y 2 casos con una variante propia de zorrillos, V8. Los restantes 855 registros no presentaron información sobre la variante viral. En cuanto a su distribución, en el estado de San Luis Potosí se identificaron todas las variantes virales, en Guanajuato solo la V11 y en Querétaro la V5 y la V11. Al tomar en cuenta la población de animales (bovinos, ovinos, caprinos, porcinos y equinos) según el último censo ganadero, realizado en 2010 (27), la tasa de incidencia de casos en la región fue de 20 por cada 100 000 animales: 1,3 en Guanajuato, 10,5 en Querétaro y 58,9 en San Luis Potosí.

De los 1 030 casos que informaron la altitud del sitio de ocurrencia, 900 (87,4%) se presentaron en localidades de hasta 1 500 msnm y 130 (12,6%) en áreas con altitudes mayores; la proporción de casos registrados en altitudes superiores

a los 1 500 msnm fue mayor en Guanajuato (77,3%) y Querétaro (42,3%) (cuadro 2). La mayor cantidad de casos se presentó en los meses de enero, febrero y marzo, con 111, 103 y 103 casos, respectivamente; mientras, los de menor frecuencia fueron abril, mayo y julio, con 63, 51 y 67 casos, respectivamente.

Según el canal endémico, la notificación de casos se mantuvo en la zona de seguridad durante los meses de enero a marzo (época de seca), debido a que el promedio no excedió el cuartil de la mediana. Sin embargo, no fue así para los meses de abril —también considerado época de seca—, mayo y junio —época de lluvia—, cuando el promedio de casos superó el valor de la mediana para ese

período, es decir, el promedio de casos se ubicó en la zona de alarma (figura 1). Según el pronóstico —calculado a partir del valor de la mediana—, la mayor frecuencia de los casos debe ocurrir en los meses de enero, febrero, junio, septiembre y diciembre.

La distribución espacial de los casos por año mostró dispersión en el nordeste del estado de San Luis Potosí —en la llamada Huasteca Potosina—, el nordeste del estado de Querétaro —ocupado por la Sierra Gorda—, el altiplano de San Luis Potosí y el nordeste del estado de Guanajuato (<http://gaia.inegi.org.mx/mdm6>) (figura 2). En los años más recientes, también se observó la presencia de casos en regiones antes libres de la

CUADRO 1. Casos anuales de rabia parálitica en los estados de Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí, México, 2001–2013^a

Estado	Año													Total
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	
Guanajuato					9	3	8	3	8	13	12	4	4	44
Querétaro							7	3	4	26	16	6	82	
San Luis Potosí	10	98	121	93	79	49	48	68	76	73	98	48	50	911
Total	10	98	121	93	88	52	56	78	87	90	136	68	60	1 037

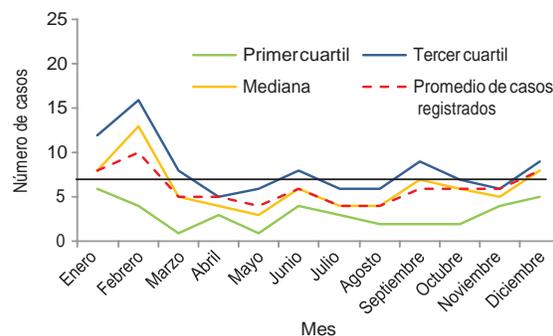
^a Las campañas estatales de control de la rabia parálitica generaron datos a partir de 2001 en San Luis Potosí, 2005 en Querétaro y 2008 en Guanajuato.

CUADRO 2. Casos de rabia parálitica en ganado y animales silvestres, según la altura sobre el nivel del mar, registrados en Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí, México, 2001–2013

Estado	< 1 500 msnm		> 1 500 msnm		Total
	No.	%	No.	%	
Guanajuato	10	22,7	34	77,3	44
Querétaro	45	57,7	33	42,3	78
San Luis Potosí	845	93,1	63	6,9	908
Total	900	87,4	130	12,6	1 030

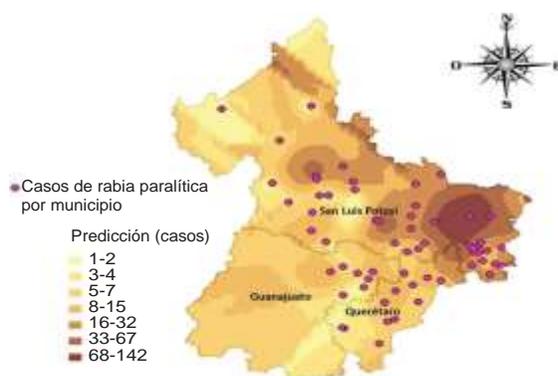
Nota: No se informó la altitud de siete casos: 4 de Querétaro, 2 de San Luis Potosí y 1 de Guanajuato.

FIGURA 1. Canal endémico de casos de rabia parálitica en la región central de México, 2008–2013



Nota: elaborado a partir de las frecuencias mensuales de casos para los años 2008–2013, según las bases de datos de casos notificados por las campañas estatales de control de la rabia parálitica en Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí.

FIGURA 2. Zonas de riesgo de presentación de casos de rabia parálitica por municipio en los estados de Guanajuato (2008–2013), Querétaro (2005–2013) y San Luis Potosí (2001–2003)



enfermedad, lo que indica su diseminación. Así ocurre en Querétaro, donde a partir de la notificación del primer caso en la Sierra Gorda en 2005 se han registrado casos en la región del semidesierto y los valles centrales. La distribución de los casos de rabia parálitica en las diferentes especies domésticas coincidió con la distribución de los casos identificados en murciélagos, lo que confirma la importancia de este vector en la diseminación de la enfermedad.

Según los mapas de riesgo, obtenidos a partir de la distribución de los casos y la interpolación por el método de *kriging*, la zona de mayor riesgo se ubica en la Huasteca Potosina, la Sierra Gorda de Querétaro y el nordeste de Guanajuato. Entre las zonas de menor riesgo, pero con presencia de casos, están la región central de San Luis Potosí, el semidesierto y los valles centrales de Querétaro, y el nordeste de Guanajuato (figura 2).

Según el mapa de probabilidad estimada de encontrar las condiciones apropiadas para la presencia de casos de rabia parálitica en diferentes especies ganaderas (figura 3), la Huasteca Potosina presenta la mayor probabilidad de ocurrencia de casos, seguida por la región central que colinda con la Sierra Gorda de Querétaro, por un lado, y el nordeste de Guanajuato, por el otro. Los municipios que se encuentran en el altiplano de San Luis Potosí y en el valle central de Querétaro también se encuentran en riesgo de presentar casos de rabia. El modelo de nicho ecológico tuvo un ajuste

de 0,84, lo que indica que se logró una buena sensibilidad con un elevado poder de predictibilidad (26, 28). La temperatura mínima de los meses más fríos fue la variable que mejor predijo la distribución de la enfermedad. Otras variables, como la temperatura media y el promedio de precipitaciones de los meses más cálidos y los meses más húmedos, pueden también influir en la presencia de casos de rabia.

DISCUSIÓN

La mayoría de los casos registrados en la base de datos fue en ganado bovino, causados por la mordedura de *D. rotundus*. El empleo de períodos diferentes de notificación para los estados estudiados —San Luis Potosí desde 2001, Querétaro desde 2005 y Guanajuato desde 2008—, se debe a que la implementación de la campaña de control de la RPB no comenzó al mismo tiempo y a que en alguno de estos estados no se informó la enfermedad hasta que el número de casos se consideró suficientemente importante. Además, la falta de comunicación entre los servicios de salud y agropecuario pudo haber impedido que se informara oportunamente la presencia de casos, lo que puede haber llevado a minimizar el problema y a la subnotificación (29).

En concordancia con el hecho de que las condiciones climáticas y la presencia de ganado favorecen la distribución del vector, la mayor frecuencia de casos se observó en la Huasteca Potosina, donde

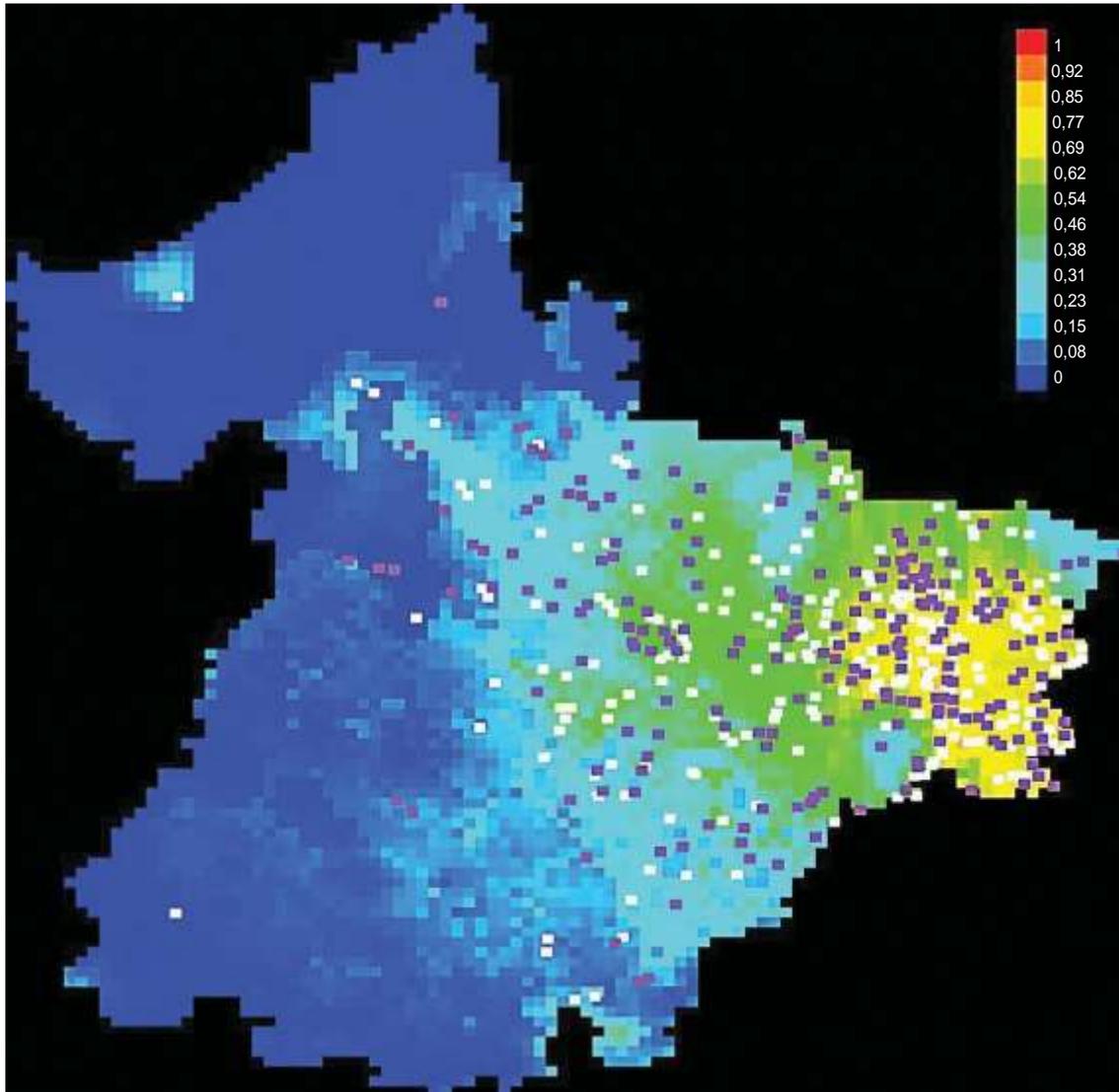
hay condiciones que favorecen la presencia del vector —la precipitación pluvial anual fue de 996,5 mm a 2 508 mm, la temperatura media anual fue de 25,3 °C y hay abundancia de ríos— (30, 31) y la población de ganado —534 547 cabezas— es muy superior a la de los otros dos estados incluidos en este estudio. Se estima que en áreas de alta densidad de murciélagos vampiros, un mismo bovino puede recibir hasta 12 mordeduras en una noche y alimentar hasta a cuatro de estos hematófagos a la vez (32).

Aunque la RPB está considerada una enfermedad propia de zonas con una altitud menor de 1 500 msnm, por ser el hábitat del vector (33, 34), se ha encontrado que este puede vivir en altitudes de hasta 3 600 msnm (35). Los presentes resultados corroboran esta afirmación, aunque queda aún por comprobar si esto obedece únicamente a la disponibilidad de alimento (36).

Según el canal endémico, los meses de enero, abril y octubre son los de mayor riesgo, debido a que el promedio de casos puede alcanzar valores de epidemia. Por lo tanto, la vacunación del ganado debe aplicarse entre julio y septiembre. Aunque todavía es necesario profundizar en este tema, se ha demostrado que la vacunación previa a la exposición puede ser más eficiente y rentable que el control de los murciélagos hematófagos (37, 38). La Norma Oficial Mexicana NOM-067-ZOO-2007 (17) establece que se debe vacunar al ganado en áreas endémicas al mes de nacido, con aplicaciones de refuerzo cuando cumplan tres y seis meses. Con este esquema se asegura la inmunización de los animales recién nacidos y durante la época de pastoreo (38). En las estrategias de vacunación es esencial considerar el ciclo reproductivo del murciélago hematófago —gestación en época de lluvias y lactancia de agosto a noviembre—, que está asociado con una mayor demanda de alimento y, en consecuencia, con un mayor número de ataques al ganado, lo que lleva a un mayor riesgo de ocurrencia de casos. Cabe recordar que en la variabilidad en el número de casos también influyen las condiciones climáticas que afectan al ciclo de vida del vector (14, 39).

El manejo que los productores dan al ganado bovino desempeña un papel importante en la incidencia de la RPB. En algunas regiones de México se aplican diferentes sistemas de pastoreo extensivo y algunos de ellos generan un

FIGURA 3. Zonas de probable presentación de casos de rabia paralítica transmitida por *Desmodus rotundus*, Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí, 2001–2013



Nota: La escala de colores indica las condiciones para la presencia de la especie (1: más favorable; 0: menos favorable). Los puntos blancos indican la ubicación de los casos de entrenamiento; los puntos violetas indican los lugares de prueba del modelo.

considerable movimiento de ganado en primavera y verano, épocas en la que hay mejores agostaderos. En la región de estudio, este trasiego se realiza de marzo a agosto, mientras que de julio a septiembre los animales se recluyen en corrales para su reproducción y la producción de leche. Es probable que estas prácticas influyan en la mayor o menor exposición del ganado al ataque del murciélago vampiro en ciertas épocas del año.

El modelo de máxima entropía para determinar el efecto de diferentes varia-

bles climáticas sobre la presencia de casos de rabia paralítica en la región de estudio reveló que las temperaturas medias, la precipitación anual durante los meses más cálidos y los meses más húmedos fueron las variables que mejor predijeron la diseminación de la enfermedad en la zona estudiada. Esto coincide con otros estudios, que sugieren que *D. rotundus* no tolera los climas fríos ni las bajas temperaturas del invierno, específicamente cuando son menores de 10 °C (40). No obstante, en este trabajo se

detectó la presencia de casos de rabia paralítica en el semidesierto de Querétaro, que no presenta las condiciones climáticas más apropiadas para la presencia del murciélago vampiro. Esta alteración de su hábitat natural y la colonización de nuevas regiones pudiera deberse a la presencia de ganado y ciertas características topográficas favorables del terreno, como la presencia de minas y cuevas de reciente creación (41).

Al analizar estos resultados, se debe tener en cuenta que la información de los

casos de rabia se basó en fuentes secundarias, por lo que puede haber un subregistro. Además, dado que los datos no provienen de un muestreo aleatorio, los resultados no son estadísticamente representativos de toda la población y la región estudiada, por lo que se deben tomar con cautela y su extrapolación es limitada.

No obstante, estos resultados demuestran que en la región central de México la RPB se está extendiendo a regiones que hasta hace poco tiempo se encontraban libres de esta enfermedad. Esto puede deberse a la migración del vampiro, la presencia de ganado y la propagación del virus. Se ha confirmado también que la especie *D. rotundus* es capaz de adaptarse a diferentes ecosistemas que le permitan alimentarse y sobrevivir, lo que también puede haber influido en la diseminación de la enfermedad. Así, la aparición de casos está relacionada con la distribución

del ganado y del murciélago vampiro, lo que puede estar asociado con diversas condiciones ambientales. Sin embargo, otro posible factor puede ser la urbanización de zonas rurales, que implica una mayor presencia de ganado, y cambios en las condiciones ambientales, que favorecen una mayor distribución del vector.

Se deben desarrollar estudios más profundos, específicos e interdisciplinarios para entender mejor la epidemiología, tanto del vector como del virus de la RPB. Las estrategias de control de la RPB deben tomar en cuenta que las características ambientales y la altura sobre el nivel del mar, por sí mismas, no son limitantes para la presentación de casos de la enfermedad. Por lo tanto, se recomienda mantener un monitoreo constante para la detección oportuna de casos cuando existan condiciones favorables para el vector y haya presencia de ganado, además de los antecedentes de casos en regiones cerca-

nas. Finalmente, la vacunación con la más amplia cobertura, antes del comienzo de las lluvias, debe ser oportuna y aplicarse de manera inteligente y programada, sin esperar la aparición de brotes.

Agradecimientos. Se agradece a los Comités de Fomento y Protección Pecuaria de los estados de Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí por la información proporcionada sobre casos de rabia, en especial, a los licenciados Calíope Bazaldúa Cuellar e Ignacio Amezcua Orozco, y al Dr. Carlos I. Urbano Carranza.

Conflicto de intereses. Ninguno.

Declaración. Las opiniones expresadas en este manuscrito son responsabilidad de los autores y no reflejan necesariamente los criterios ni la política de la RPSP/PAJPH y/o de la OPS.

REFERENCIAS

- Wunner WH. Rabies virus. En: Jackson AC, Wunner WH, eds. Rabies, 2.^a ed. Ontario: Elsevier; 2007. Pp. 23–69.
- World Health Organization. Rabies. Geneva: WHO; 2012. Disponible en: www.who.int/rabies/en/ Acceso el 5 de agosto de 2015.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. Sanidad animal en el mundo. [Sitio en Internet]. París: OIE; 2013. Disponible en: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/portal-sobre-la-rabia/> Acceso el 5 de agosto de 2015.
- Loza-Rubio E, Rojas AE, Banda RVM, Nadin-Davis SA, Cortez GB. Detection of multiple strains of rabies virus RNA using primers designed to target Mexican vampire bat variants. *Epidemiol Infect.* 2005; 133:927–34.
- Guerra MA, Curns AT, Rupprecht CE, Hanlon CA, Krebs JW, Childs JE. Skunk and raccoon rabies in the eastern United States: temporal and spatial analysis. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(9):1143–50.
- Schneider MC, Romijn PC, Uieda W, Tamayo H, da Silva DF, Belotto A, et al. Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America? *Rev Panam Salud Publica.* 2009;25(3):260–9.
- Hidalgo-Díaz MA. La rabia: una zoonosis mortal. *Rev Digit CENIAP Hoy.* 2005;7. Disponible en: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/ceniaphoy/articulos/n7/arti/hidalgo_m/arti/hidalgo_m.htm Acceso el 5 de agosto de 2015.
- Lee DN, Papes M, Van Den Bussche RA. Present and potential future distribution of common vampire bats in the Americas and the associated risk to cattle. *PLoS One.* 2012;8:e42466.
- Peel DS, Mathews KH Jr, Johnson RJ. Trade, the expanding Mexican beef industry, and feedlot and stocker cattle production in Mexico. Washington, D.C.: U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service; 2011. Disponible en: <http://www.ers.usda.gov/Publications/LDP/2011/08Aug/LDPM20601/ldpm20601.pdf> Acceso el 5 de agosto de 2015.
- Ramírez-Romero R, González Báez A, Nevárez Garza AM, Rodríguez Tovar LE. Informe de tres casos de rabia paralítica y babesiosis bovina en el municipio de Aldama, Tamaulipas. *Vet Mexico.* 2011; 42(4):331–8.
- Fornes A, Lord RD, Kuns ML, Largui OP, Fuenzalida E, Lazara L. Control of bovine rabies through vampire bats control. *J Wildl Dis.* 1974;10(4):310–6.
- Delpietro HA, Russo RG. Aspectos ecológicos de la agresión del vampiro y de la rabia paralítica en la Argentina y análisis de las propuestas efectuadas para su control. *Rev Sci Tech Int Epizoot.* 1996; 15(3): 971–84.
- Seetahal JFR, Velasco-Villa A, Allicock OM, Adesiyun AA, Bissessar J, Amour K, et al. Evolutionary history and phylogeography of rabies viruses associated with outbreaks in Trinidad. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(8):e2365.
- Brito-Hoyos DM, Brito Sierra E, Villalobos Álvarez R. Distribución geográfica del riesgo de rabia de origen silvestre y evaluación de los factores asociados con su incidencia en Colombia, 1982–2010. *Rev Panam Salud Publica.* 2013;33(1):8–14.
- Escobar LE, Peterson AT, Favi M, Yung V, Pons DJ, Medina Vogel G. Ecology and geography of transmission of two bat-borne rabies lineages in Chile. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(12):e2577.
- Ávila-Flores R, Medellín RA. Ecological, taxonomic, and physiological correlates of cave use by Mexican bats. *J Mammal.* 2004;85:675–87.
- México, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Norma Oficial Mexicana NOM-067-ZOO-2007. Campaña nacional para la prevención y control de la rabia en bovinos y especies ganaderas. Diario Oficial de la Federación 2011 mayo 20. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=20856> Acceso el 5 de agosto de 2015.
- Environmental Systems Research Institute. ArcGIS Desktop: Release 10. Redlands, CA: ESRI; 2011.
- Matheron G. La teoría de las variables regionalizadas y sus aplicaciones. En: Los Cuadernos del Centro de Morfología Matemática de Fontainebleau. Fascículo 5. París: Centro de Geostatística de la Escuela de Minas de París; 1970. P. 125.
- Jaramillo AC, Martínez MJ. Epidemiología veterinaria. México, D.F.: El Manual Moderno; 2010.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A. The WorldClim interpolated global terrestrial climate surfaces, version 1.3. Berkeley: University of California; 2004.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A. Very high resolution interpolated climate surface for global land areas. *Int J Climatol.* 2005;25:1965–78.
- Young N, Carter L, Evangelista, P. A MaxEnt model v. 3.3.3 tutorial (ArcGIS v10).

- Fort Collins, CO: Natural Resource Ecology Laboratory, Colorado State University and the National Institute of Invasive Species Science. 2011.
- Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE. Maximum entropy modeling of species geographic distribution. *Ecol Modell*. 2006; 190:231–59.
 - Peterson AT. Ecologic niche modeling and spatial patterns of disease transmission. *Emerging Infect Dis*. 2006;12:1822–6.
 - Phillips SJ. A brief tutorial on Maxent. New York: American Museum of Natural History; 2011. Disponible en: <https://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent/tutorial/tutorial.doc> Acceso el 5 de agosto de 2015.
 - Peterson AT. Ecological niche modeling and understanding the geography of disease transmission. *Vet Ital*. 2007;43:393–400.
 - Kotait I, Gonçalves CA, Peres NF, Souza MCAM, Targueta MC. Controle da raiva dos herbívoros. Manual Técnico do Instituto Pasteur. Sao Paulo: Instituto Pasteur; 1998.
 - Miranda AO, Núñez SE, Bogado F, Acosta RS, Báez NE. Los murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*), vida en cautiverio. Corrientes: Universidad Nacional del Nordeste. 2005.
 - Aguirre VM, Negrete JJ. Adaptación del murciélago hematófago en el Estado de Hidalgo. México, D.F.: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; 2010. Disponible en: http://www.conasamexico.org.mx/conasa/docs/18a_reunion/salon6diamartes1200a1500/Victor_Manuel_Aguirre_Duarte.pdf Acceso el 5 de agosto de 2015.
 - Voigt CC, Kelm DH. Host preference of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*; Chiroptera) assessed by stable isotopes. *J Mammal*. 2006;87:1–6.
 - Suzán G. *Desmodus rotundus*. En: Ceballos G, Oliva G, ed. Los mamíferos silvestres de México. México, D.F.: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica; 2005. Pp. 986.
 - Quintana NH, Pacheco VT. Identificación y distribución de los murciélagos vampiros del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2007;24(1):81–8.
 - Martins FM, Templeton AR, Pavan AC, Kohlbach BC, Morgante JS. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. *BMC Evol Biol*. 2009;9:294.
 - Silva JA, Moreira EC, Haddad JPA, Sampaio IBM, Modena CM, Tubaldini MAS. Distribuição temporal e espacial da raiva bovina em Minas Gerais, 1976–1997. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2001;53:263–27.
 - Almaraz ML, Setián A. Murciélagos benéficos y vampiros, características, importancia, rabia, control y conservación. México, D.F.: Editorial AGT Editor; 2006.
 - Anderson A, Shwiff S, Gebhardt K, Ramirez AJ, Shwiff S, Kohler D, et al. Economic evaluation of vampire bat (*Desmodus rotundus*) rabies prevention in Mexico. *Transbound Emerg Dis*. 2012; 61:140–6.
 - Oliveira AND, Andrade MCR, Silva, MVD, Moura WCD, Cortez-Contreiras E. Immune response in cattle vaccinated against rabies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95:83–8.
 - Rifakis PM, Benítez JA, Rodríguez-Morales AJ, Dickson SM, De la Paz-Pineda J. Ecoepidemiological and social factors related to rabies incidence in Venezuela during 2002–2004. *Int J Biomed Sci*. 2006; 2(1):3–7.
 - Greenhall AM, Joermann G, Schmidt U. *Desmodus rotundus*. Mammalian species. 1983;202:1–6.
 - Gomes MN, Monteiro AMV, Lewis N. Landscape risk factors for attacks of vampire bats on cattle in São Paulo, Brazil. *Prev Vet Med*. 2010;93(2–3):139–46.

Manuscrito recibido el 12 de febrero de 2015.
Aceptado para publicación, tras revisión, el 29 de julio de 2015.

ABSTRACT

Epidemiological trends in bovine paralytic rabies in central Mexico, 2001–2013

Objective. To determine the geospatial distribution of bovine paralytic rabies cases transmitted by *Desmodus rotundus* in the Mexican states of Guanajuato, Querétaro, and San Luis Potosí.

Methods. This was a cross-sectional epidemiological study based on cases reported during statewide campaigns for the control of bovine paralytic rabies in Guanajuato (2008–2013), Querétaro (2005–2013) and San Luis Potosí (2001–2013). All cases were confirmed by direct immunofluorescence. Maps showing the distribution of cases by year and species were constructed using ArcMap version 10.1. To identify areas where conditions favor the appearance of cases, bioclimatic variables were combined with georeferenced cases using MaxEnt version 3.3.3.

Results. Of the 1037 cases recorded, 911 (87.9%) occurred in San Luis Potosí, 82 (7.9%) in Querétaro, and 44 (4.2%) in Guanajuato. Of the total number of cases, 87.4% occurred at altitudes of less than 1500 meters above sea level. In Guanajuato and Querétaro, 77.3% and 42.3% of the cases, respectively, occurred at altitudes greater than 1500 meters above sea level. Peak incidence was recorded from December to March. The V11 anti-genic variant of the virus was the most common (173 cases); it was found in all three states. In the endemic channel, the average number of cases remains within the security zone from January to March but exceeds the median value from April to June. The spatial distribution of cases shows that the disease has spread recently, which correlates with the presence of the vampire bat.

Conclusions. Bovine paralytic rabies has spread to areas that were formerly free of the disease. Environmental characteristics and the altitude above sea level do not limit the appearance of cases. Constant monitoring should be conducted for early case detection. Vaccination should take place before the rainy season starts, without waiting for outbreaks to occur.

CAPÍTULO VII

Whole genome sequence phylogenetic analysis of four Mexican rabies virus isolated from cattle

Isabel Bárcenas-Reyes, Elizabeth Loza-Rubio, Germinal J. Cantó-Alarcón, J. Luna-Cozar, A. Eníquez-Vázquez, R.J. Barrón-Rodríguez y F. Milián-Suazo

Research in Veterinary Science 113 (2017): 21-24.



Contents lists available at ScienceDirect

Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc

Whole genome sequence phylogenetic analysis of four Mexican rabies viruses isolated from cattle

I. Bárcenas-Reyes^a, E. Loza-Rubio^b, G.J. Cantó-Alarcón^{a,*}, J. Luna-Cozar^a, A. Enríquez-Vázquez^c, R.J. Barrón-Rodríguez^b, F. Milián-Suazo^a

^a Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Av. de las Ciencias S/N Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui, C. P. 76230 Querétaro, Mexico

^b CEND-M-INIFAP, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Carretera México-Toluca, km 15.5, C.P. 05110 México D.F., México

^c LPAC - Laboratorio de Patología Animal Calamanda, el Marques, Querétaro, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Rabies
Desmodus rotundus
 Mexico
 Epidemiology
 Cattle

ABSTRACT

Phylogenetic analysis of the rabies virus in molecular epidemiology has been traditionally performed on partial sequences of the genome, such as the N, G, and P genes; however, that approach raises concerns about the discriminatory power compared to whole genome sequencing. In this study we characterized four strains of the rabies virus isolated from cattle in Querétaro, Mexico by comparing the whole genome sequence to that of strains from the American, European and Asian continents. Four cattle brain samples positive to rabies and characterized as AgV11, genotype 1, were used in the study. A cDNA sequence was generated by reverse transcription PCR (RT-PCR) using oligo dT. cDNA samples were sequenced in an Illumina NextSeq 500 platform. The phylogenetic analysis was performed with MEGA 6.0. Minimum evolution phylogenetic trees were constructed with the Neighbor-Joining method and bootstrapped with 1000 replicates. Three large and seven small clusters were formed with the 26 sequences used. The largest cluster grouped strains from different species in South America: Brazil, and the French Guyana. The second cluster grouped five strains from Mexico. A Mexican strain reported in a different study was highly related to our four strains, suggesting common source of infection. The phylogenetic analysis shows that the type of host is different for the different regions in the American Continent; rabies is more related to bats. It was concluded that the rabies virus in central Mexico is genetically stable and that it is transmitted by the vampire bat *Desmodus rotundus*.

1. Introduction

Rabies, a lethal zoonotic disease caused by a neurotropic virus from the *Lyssavirus* genus, affects all kind of warm-blooded animal species (Mochizuki et al., 2011). According to the reservoir, rabies presents two epidemiological cycles: the urban cycle that affects dogs, cats and other animal species in close contact with man, and the sylvatic cycle, involving reservoirs such as skunks and bats. *Desmodus rotundus* is the most important natural reservoir of the rabies virus in the tropical and subtropical areas, from the north of Mexico to the north of Argentina and Chile (Delpietro et al., 1992; Da Rosa et al., 2006; Kobayashi et al., 2008; Loza-Rubio et al., 2012).

Rabies virus is transmitted to humans and cattle, primarily by bites and scratches from infected animals. Transmission routes are through saliva, neurological tissues, mucosal and viral aerosolized particles (Nadin-Davis and Loza-Rubio, 2006; Burnett, 2015). Transmission

between species of bats is relatively common due to occasional aggressive encounters in the roosts or during flight (Piñero et al., 2012). Transmission of the virus to mesocarnivores such as lynx and domestic cats occurs through ingestion of dead bats during hunt (Theimer et al., 2017).

In humans, rabies is responsible for about 60,000 deaths worldwide each year (Hampson et al., 2011; Organización Mundial de la Salud (OMS), 2013). Since 2000, vampire bats have been the leading cause of human rabies in Latin America and the Caribbean (Schneider et al., 2007; Mochizuki et al., 2011). Currently, rabies is considered a neglected disease but it is a major public health problem, as both an emerging and a re-emerging disease (Rupprecht et al., 2002; Blanton and Rupprecht, 2008).

Recent phylogenetic studies of molecular epidemiology are based on the N nucleoprotein, and the G glycoprotein genes to explain virus circulation in endemic areas (Nadin-Davis et al., 2012; Itou et al.,

* Corresponding author.

E-mail address: gcanto07@uaq.mx (G.J. Cantó-Alarcón).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.08.004>

Received 28 October 2016; Received in revised form 25 May 2017; Accepted 3 August 2017
 0034-5288/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1

Access Genbank numbers and epidemiological information of rabies virus strains included in the phylogenetic study with four Mexican strains obtained from cattle in Mexico.

Region	Origin	Host	Year of isolation	Access number GenBank
North America Mex	0638CattleAcatlanfgo-Qro.Mex	Cattle associated to <i>D. rotundus</i>	2014	
	328CattleColonaQro.Mex	Cattle associated to <i>D. rotundus</i>	2014	
	0987E.MuertesQro.Mex	Cattle associated to <i>D. rotundus</i>	2014	
	4225CattleJajpasQro.Mex	Cattle associated to <i>D. rotundus</i>	2013	
	Mexico	Cattle associated to <i>D. rotundus</i>	2009	JQ685936.1
North America USA	Mexico	Human	2009	JQ685953.1
	Arizona USA	Insectivorous Bat (<i>Tadarida brasiliensis</i>)	2003	JQ685905.1
South America	USA	Insectivorous Bat (<i>L. noctivagus</i>)	1983	AY705373
	USA	Insectivorous Bat (<i>Eptesicus fuscus</i>)	2004	JQ685933.1
	USA	Insectivorous Bat (<i>Eptesicus fuscus</i>)	1999	JQ685923.1
	Argentina	Insectivorous Bat (<i>Tadarida brasiliensis</i>)	1997	EU293116.1
Southeast Asia	Brazil	Cattle	2012	KM594041.1
	Brazil	Insectivorous Bat (<i>Myotis nigricans</i>)	2010	KM594032.1
	Brazil	frugivorous Bat (<i>Artibeus liternus</i>)	2011	AB519641.1
	Brazil	Hematophagous Bat (<i>Desmodus rotundus</i>)	2011	AB519642.1
	Brazil	Hematophagous Bat (<i>Desmodus rotundus</i>)	2013	KM594042.1
	Brazil	Hematophagous Bat (<i>Desmodus rotundus</i>)	2013	KM594040.1
	Brazil	Cattle	2012	KM594043.1
	Brazil	Cattle	2006	AB618035.1
	French Guyana	Dog bitten by <i>D. rotundus</i>	1990	EU293113.1
	French Guyana	Hematophagous Bat (<i>Desmodus rotundus</i>)	2010	KU523255.1
	Paraiha, Sao Jose de Eapinhan, Brazil	Ovine	2007	AB618036.1
Western Europe	India	Human	2006	EF437215
	Thailand	Human	1983	EU293121.1
Western Europe	France	Fox	1991	EU293115
	France	Insectivorous Bat (<i>Eptesicus serotinus</i>)	2008	EU626551.1

2016). This methodology has been used to explain the epidemiology of rabies in many countries (Nadin-Davis and Loza-Rubio, 2006;

Velasco-Villa et al., 2008; de Novaes-Oliveira et al., 2010; Piñero et al., 2012; Condori-Condori et al., 2013; Ellison et al., 2014). However, using partial sequences the information is limited and small changes relevant on the evolution and the epidemiology of the virus cannot be determined (Matsumoto et al., 2011). Although useful for some purposes, the discriminatory power of the single gene approach for viral typing is lower than that using WGS. A recent study showed that strains differences based on SNP number are almost absent (range 0–3 SNP) when single gene sequencing was used, making strains indistinguishable; in contrast, based on WGS most sequence pairs exhibited at least one SNP difference (range 0–34 SNP), providing a much better differentiation of strains (Nadin-Davis et al., 2017). The potential of WGS may reveal genetic differences between RV strains that influence host tropism and pathogenicity (Yu et al., 2014). Insufficient information on the epidemiology and dynamics of the RV has hampered the establishment of appropriate measures to control this disease (Warrilow et al., 2002; Faber et al., 2004; Kuzmin et al., 2008; Nagaraja et al., 2008; Matsumoto et al., 2011 and Hanke et al., 2016).

Studies on the genetic diversity and phylogeographic structure of the rabies virus associated with vampires in Mexico have shown that the disease remains in marginal foci in subpopulations of vampires, and that their gradual spread is by the sporadic movement of bats because of ecological stress or natural geographic barriers (Avila-Flores and Medellín, 2004; Johnson et al., 2014; Ito et al., 2016). It has been observed that, depending on time and geographical location, rabies takes a different form that is related to the nature of the antigenic variant (Almaraz and Setién, 2006). Most studies supporting these premises, however, are based on partial analysis of the virus genome; therefore, the purpose of this study was to characterize the whole genome sequence of four Mexican rabies virus strains from cattle and compare them to whole genome sequences with those from other countries in the American, Europe and Asian continents reported in GenBank.

2. Materials and methods

Four brain samples, positive to rabies by fluorescent antibodies (FA) obtained from cattle in 2014, and characterized as genotype 1, AgV11 (vampire bat variant), were used in the study. Samples were provided by the official Animal Pathology Laboratory at Calamanda, in the State of Queretaro, Mexico. Confirmation of suspected cases of rabies was done by direct immunofluorescence with monoclonal antibodies against the viral nucleocapsid protein conjugated with fluorescein isothiocyanate (Aubert, 1982; Barrat and Aubert, 1995; Bastida-González et al., 2016). Three of these samples came from the State of Queretaro, and one from the neighboring State of Hidalgo. To isolate the virus, cattle brains were first suspended in a 20% solution containing 2% of bovine albumin, and then macerated. The macerate was centrifuged at 1500 ×g for 20 min and kept at – 70 °C overnight. A sample of 0.030 ml was taken from the supernatant and inoculated into 1-day old albino mice (Bioterio Mexico, Mexico City). Total RNA was extracted directly from the mice brain tissue by the Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) method, according to manufacturer's recommendations.

A cDNA sequence was generated by reverse transcription PCR (RT-PCR) using oligo dT and MMLV (ROCHE). The cDNA samples were submitted to the Biotechnology Institute at the National Autonomous University of Mexico, in the State of Morelos for sequencing in an Illumina NextSeq 500 platform according to the manufacturer's instructions. The complete genome of the rabies virus was reconstructed by mapping the read against the reference genome of isolate BR-DR1 (GenBank number AB519642.1). The assembly was performed with two different assemblers (Velvet and ABYSS) (Cha and Bird, 2016), the best result was chosen. The fragments were organized and joined to build a single sequence.

A BLAST analysis was performed to identify RV sequences in the GenBank (NCBI, 2014; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) with at least 90% similarity with the four Mexican strains. Twenty-two were obtained, 12 from South America, two from Mexico, four from North America, two from Asia, and two from Western Europe (Table 1). To compare sequences, an alignment analysis was performed with the Multiple Sequence Alignment method in Clustal W version 1.83, a software from the Bioinformatics Center at Kyoto University ([22](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

Table 2
Genetic similarity between four rabies virus Mexican strains isolated from cattle in the State of Querétaro, Mexico.

Strains	0987CattleE.MontesQroMex	0635CattleAcatlanHgo-QroMex	0328CattleColonQroMex	4225CattleJalpanQroMex
0987CattleE.MontesQroMex	100	96	93	93
0635CattleAcatlanHgo-QroMex	96	100	96	95
328CattleColonQroMex	93	96	100	98
4225CattleJalpanQroMex	93	95	98	100

www.genome.jp/tools/clustalw/) (Table 2).

The Phylogenetic analyses were performed with MEGA, Version 6.0 (Tamura et al., 2013). Minimum evolution phylogenetic trees were constructed with the Neighbor-Joining method, bootstrapped with 1000 replicates. Phylogenetic trees were also built using the Kimura-2 parameter. The bat virus EU626551.1EBL1 from Western Europe was used as the root outgroup strain. The cophenetic correlation to describe the consistency of the phylogenetic tree was performed with the cophenetic function in the statistical package R, version 3.3.1 (Paradis, 2011; Cardona et al., 2013; Peixoto et al., 2014; Team, 2016).

3. Results

Three large and seven small clusters were formed with the 26 sequences. The largest cluster grouped strains from South America: eight from Brazil and two from the French Guyana; three isolated from cattle, four from *D. rotundus*, one from a sheep, one from a dog and one from the *A. lituratus* bat. The second cluster grouped five strains, all from Mexico. The Mexican strain JQ685953.1HumMex, reported in a different study (Kuzmin et al., 2012), isolated from a human being was related to the cattle strains, but it grouped in a different branch. The third cluster included three strains from the United States of America (USA), two in the same, and one in a different branch. In separated branches were located, one strain from USA, isolated from *T. brasiliensis argentina*, one from Brazil, isolated from *Myotis brazil*, one from Thailand, isolated from a human being, one from Western Europe, isolated from a Fox, and one from India, isolated from a human being (Fig. 1).

The phylogenetic analysis revealed that the host is different for the two regions of North America, where the main reservoirs are the insectivorous bats *E. fuscus*, *L.noctivagans* and *T. brasiliensis*. In Central

America and the South America regions the main reservoir is *D. rotundus*. Strains reported in Brazil are also associated to the insectivorous bat *Myotis* spp. (Ito et al., 2003). In Argentina and Brazil the viral strains circulate in *T. brasiliensis*, but are different from each other. Strains in Western Europe and Southeast Asia are related to humans and foxes.

To evaluate the performance of WGS and that of partial sequences with the N, P and G genes in explaining genetic relationship between virus strains, individual phylogenetic trees were built with 1000 iterations in bootstrapping. Twenty two out of the 23 internal nodes had bootstrap values higher than 90% in the tree generated with WGS, only two of the nodes had bootstrap values higher than 70% with the N gene sequence, 13 nodes had higher than 90% bootstrap values with the G gene sequence, and only 12 had bootstrap values higher than 90% in the P gene sequence (Data not shown).

4. Discussion

In this study the complete genome sequence of four rabies virus isolated from cattle in central Mexico were characterized by comparison with 22 RV isolates reported in the GenBank. The phylogenetic analysis revealed that all Mexican RV strains cluster together, suggesting that the infecting strain is endemic and genetically stable in the State of Querétaro.

The Mexican strain, JQ685953.1HumMex reported in the GenBank grouped in the same cluster with our four Mexican strains, suggesting that it came from the central region of Mexico, while the strain JQ6859363.1CattleD.rotundusMex also from Mexico must probably come from a different region, since it forms a different branch in the dendrogram. Strain 0635CattleAcatlanHgo-QroMex is similar to strain 328CattleColonQro.Mex; however, they come from two neighboring states (Hidalgo and Querétaro), suggesting that the spread of rabies is local and that the distribution is associated with the same reservoir *D. rotundus* (Smith et al., 2005). In general, the 26 RV strains cluster according to geographic distribution. The four Mexican strains, 0987, 4225, 0635 and 328, as expected, are more related to those found in South America, suggesting a common ancestor. Indeed, Mochizuki et al. (2011) have reported that the genotype 1 is widely spread in bats in Latin America.

The phylogenetic tree shows that the strain circulating in the Sierra Gorda (4225), an endemic area of rabies in cattle and in *D. rotundus* in the State of Queretaro is different from those found in the central valley, suggesting that this last region has different source of infection. This makes sense, between the Sierra Gorda and the valley regions there is a natural barrier composed of mountains that makes movement of either, cattle or bats between regions difficult. Further WGS analysis involving a larger number of RV isolates from cattle, and ideally also from bats, may provide information to better understand the epidemiology of the disease and to establish control measures with high probabilities of success.

The WGS bootstrapping tree was compared to that of N, P and G single gene trees. This analysis shows that the best phylogenetic resolution is achieved with the WGS dataset since 22 out of 23 of the internal nodes had bootstrap values higher than 90%. However, the G and P single gene sequences also showed a good phylogenetic resolution since 13, and 12 of the tree internal nodes respectively had



Fig. 1. Phylogenetic tree of the relationship between four rabies virus strains from Querétaro, Mexico and those with 90% similarity obtained from the Genbank using MEGA 6.

bootstrap values higher than 90%, suggesting these as good target genes for phylogenetic studies when WGS is not available. Our results agree with those of Nadin-Davis et al. (2017) who found that by using WGS, 16 internal nodes had bootstrap values higher than 75% while data sets of the single gene N, P and G sequences, contained only two, zero and one respectively internal nodes with this value.

5. Conclusion

A complete genome sequence analysis of rabies virus strains from cattle in central Mexico shows that the circulating virus in the region is genetically stable and that it is transmitted by the vampire bat *D. rotundus*. It was shown that the source of infection for cattle in the central valley of Queretaro come from out the state. Mexican strains are more similar to those from south and North America, than to those from Europe and Asia, suggesting a common ancestor for rabies in the new world.

Acknowledgement

This research was partially supported by the Research Support Fund from the Autonomous University of Querétaro (FNV201408) (FOFI-UAQ), Mexico.

References

- Almaraz, M.L., Setién, A., 2006. Murciélagos Benéficos y Vampiros, características, importancia, caza, control y conservación. AGT EDITOR, Mexico (1, 2, 4-7, 10-16, 56-60, 75-80, 97-100).
- Aubert, M.F.A., 1982. Sensibilité et fidélité du diagnostic de rage au laboratoire. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 5, 369-376.
- Avila-Flores, R., Medellín, R.A., 2004. Ecological, taxonomic, and physiological correlates of cave use by Mexican bats. *J. Mammol.* 85, 675-687.
- Barrat, J., Aubert, M.F.A., 1995. Diagnostic de la rage animale en France de 1991 à 1993, bilan de CNEVA laboratoire d'études sur la rage et la pathologie des animaux sauvages en France. *Rev. Méd. Vét.* 146, 561-566.
- Bastida-González, F., Ramírez-Hernández, D.G., Chavira-Suárez, E., Lam-Padilla, E., Zárate-Segura, P., 2016. Development of primer pairs from molecular typing of rabies virus variants present in Mexico. *BioMed. Res. Int.* 2016, 1-15.
- Blanton, J.D., Rupprecht, C.E., 2008. Travel vaccination for rabies. *Expert Rev. Vaccines* 7, 613-620.
- Burnett, M.W., 2015. Rabies: 2015 update. *J. Spec. Oper. Med.* 15 (3), 105.
- Cardona, G., Mir, A., Roselló, F., Rotger, L., Sánchez, D., 2013. Cophenetic metrics for phylogenetic trees, after Sokal and Rohlf. *BMC Bioinform.* 14, 3.
- Cha, S., Bird, D.M., 2016. Optimizing k-mer size using a variant grid search to enhance de novo genome assembly. *Bioinformatics* 32 (2), 36.
- Condori-Condori, R.E., Strecker, D.G., Caberas-Sánchez, C., Velasco-Villa, A., 2013. Zoonotic and epizootic rabies associated with vampire bats. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1463.
- Da Rosa, E.S., Kotait, I., Barbosa, T.F., Carriari, M.L., Brandão, P.E., Pinheiro, A.S., Ferreira, M., 2006. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1197-1202.
- Delpietro, H.A., Marchevsky, N., Smoets, E., 1992. Relative population densities and predation of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) in natural and cattle-raising areas in north-east Argentina. *Prev. Vet. Med.* 14, 13-20.
- Ellison, J.A., Gilbert, A.T., Recuenco, S., Moran, D., Alvarez, D.A., Kuzmina, N., Rupprecht, C.E., 2014. Bat rabies in Guatemala. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (7), e3070.
- Faber, M., Pulmanunahakul, R., Nagao, K., Promrak, M., Rice, A.B., Kopróvski, H., Schöel, M.J., Drexler, B., 2004. Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Hampson, K., Cleaveland, S., Briggs, D., 2011. Evaluation of cost-effective strategies for rabies post-exposure vaccination in low-income countries. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5 (3), 1-11. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000982>. (e982).
- Hankie, D., Preuling, C.M., Fischer, S., Hueffer, K., Hundertmark, K., Nadin-Davis, S., Beer, M., 2016. Spatio-temporal analysis of the genetic diversity of arctic rabies viruses and their reservoir hosts in Greenland. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (7), e004779.
- Ito, M., Ito, T., Shoji, Y., Sakai, T., Ito, F.H., Ami, Y.T., Takasaki, T., Kume, I., 2003. Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Gen. Virol.* 26, 317-330.
- Ito, T., Fukayama, T., Mochizuki, N., Kobayashi, Y., Deberaldini, E.R., Carvalho, A.A., Sakai, T., 2016. Molecular epidemiological tracing of a cattle rabies outbreak lasting less than a month in Rio Grande do Sul in southern Brazil. *BMC Res. Notes* 9 (1), 1.
- Johmann, N., Aréchiga-Ceballos, N., Aguilar-Setien, A., 2014. Vampire bat rabies: ecology, epidemiology and control. *Viruses* 6, 1911-1928.
- Kobayashi, Y., Sato, G., Mochizuki, N., Hirano, S., Ito, T., Carvalho, A.A., Albas, A., Santos, H.P., Ito, F.H., Sakai, T., 2008. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. *BMC Vet. Res.* 4, 44.
- Kuzmina, I.V., Wu, X., Tordo, N., Rupprecht, C.E., 2008. Complete genomes of Aravan, Khujand, Irkut and West Caucasian bat viruses, with special attention to the polymerase gene and non-coding regions. *Virus Res.* 136, 81-90.
- Kuzmina, I.V., Shi, M., Orciari, L.A., Yager, P.A., Velasco-Villa, A., Kuzmina, N.A., Rupprecht, C.E., 2012. Molecular inferences suggest multiple host shifts of rabies viruses from bats to mesocarnivores in Arizona during 2001-2009. *PLoS Pathog.* 8, e1002786.
- Loza-Rubio, E., Rojas-Anaya, E., López, J., Olivera-Flores, M.T., Gómez-Lim, M., Tapia-Pérez, G., 2012. Induction of a protective immune response in rabies virus in sheep after oral immunization with transgenic maize, expressing the rabies virus glycoprotein. *Vaccine* 30 (37), 5551-5556.
- Matsumoto, T., Ahmed, K., Wintalaratne, G., Yamada, E., Nanayakkara, S., Perera, D., Kurunayake, D., Nishizawa, A., 2011. Whole-genome analysis of a human rabies virus from Sri Lanka. *Arch. Virol.* 156, 659-669.
- Mochizuki, N., Kobayashi, Y., Sato, G., Hirano, S., Ito, T., Ito, F.H., Sakai, T., 2011. Determination and molecular analysis of the complete genome sequence of two wild-type rabies viruses isolated from a haematophagous bat and a frugivorous bat in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.* 73, 759-766.
- Multiple Sequence Alignment CLUSTALW - GenomeNet. <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>.
- Nadin-Davis, S.A., Loza-Rubio, E., 2006. The molecular epidemiology of rabies associated with chiropteran hosts in Mexico. *Virus Res.* 117 (2), 215-226.
- Nadin-Davis, S.A., Sheen, M., Wandeler, A.L., 2012. Recent emergence of the Arctic rabies virus lineage. *Virus Res.* 163 (1), 352-362.
- Nadin-Davis, S.A., Colville, A., Trenby, H., Birk, R., Ham, L., 2017. Application of high-throughput sequencing to whole rabies viral genome characterisation and its use for phylogenetic re-evaluation of a raccoon strain incursion into the province of Ontario. *Virus Res.* 232, 123-133.
- Naganjo, T., Madhusudana, S., Desai, A., 2008. Molecular characterization of the full-length genome of a rabies virus isolate from India. *Virus Genes* 36, 449-459.
- NCBI Resource Coordinators, Adang, A., Agarwal, R., Barrett, T., Beck, J., Benson, D.A., Biez, X., 2014. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 42 (Database issue), D7-D17. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1146>.
- de Novaes-Oliveira, R., de Souza, S.P., Lobo, R.S.V., Castillo, J.G., Macedo, C.I., Camieli, P., Carriari, M.L., 2010. Rabies virus in insectivorous bats: implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. *Virology* 405, 352-360.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2013. Nota descriptiva N° 99. Rabia. Disponible en. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/es/>.
- Paradis, E., 2011. Analysis of Phylogenetics and Evolution with R. Springer Science & Business Media.
- Peixoto, F.P., Braga, P.H.P., Cianciaruso, M.V., Diniz-Filho, J.A.F., Brito, D., 2014. Global patterns of phylogenetic beta diversity components in bats. *J. Biogeogr.* 41, 762-772.
- Piñero, C., Dolmen, F.G., Beltrán, F., Martínez, L., Novaro, L., Russo, S., Gisterna, D.M., 2012. High diversity of rabies viruses associated with insectivorous bats in Argentina: presence of several independent emplacements. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1635.
- Rupprecht, C.E., Hanson, C.A., Hemachudha, T., 2002. Rabies re-examined. *Lancet Infect. Dis.* 2, 327-343.
- Schneider, M.C., Belotto, A., Adé, M.P., Hendricks, S., Leães, L.F., Rodrigues, M.J.D.F., Correa, E., 2007. Current status of human rabies transmitted by dogs in Latin America. *Cad. Saude Publica* 23, 2049-2063.
- Smith, D.L., Waller, L.A., Russell, C.A., Childs, J.E., Real, L.A., 2005. Assessing the role of long-distance translocation and spatial heterogeneity in the raccoon rabies epidemic in Connecticut. *Prev. Vet. Med.* 71, 225-240.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30 (12), 2725-2729.
- Team, R.C.R., 2016. A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Thelmer, T.C., Dyer, A.C., Keeley, B.W., Gilbert, A.T., Bergman, D.L., 2017. Ecological potential for rabies virus transmission via scavenging of dead bats by mesocarnivores. *J. Wildl. Dis.*
- Velasco-Villa, A., Messenger, S.L., Orciari, L.A., Niergoda, M., Blanton, J.D., Fukagawa, C., 2008. New rabies virus variant in a Mexican immigrant. *Emerg. Infect. Dis.* 14 (12), 1906-1908.
- Warrilow, D., Smith, L.L., Harrower, B., Smith, G.A., 2002. Sequence analysis of an isolate from a fatal human infection of Australian bat lyssavirus. *Virology* 297, 109-119.
- Yu, F., Zhang, G., Zhong, X., Han, N., Song, Y., Zhao, L., Cui, M., Rayner, S., Fu, Z.F., 2014. Comparison of complete genome sequences of dog rabies viruses isolated from China and Mexico reveals key amino acid changes that may be associated with virus replication and virulence. *Arch. Virol.* 159, 1593-1601.

CAPÍTULO VIII

8.1. DISCUSIÓN

Los reportes sobre los casos de rabia paralítica bovina tuvieron diferentes periodos, en San Luis Potosí desde 2001, Querétaro desde 2005 y Guanajuato desde 2008. Esta diferencia puede tener dos razones: 1) a que la implementación de la campaña de control de la enfermedad inició en diferentes tiempos, o bien, 2) a que en alguno de estos estados no se informó de la enfermedad hasta que el número de casos se consideró suficientemente grande para tomar acciones.

El número de casos fue considerablemente mayor en el estado de San Luis Potosí, en específico en la Huasteca Potosina, en comparación a los otros dos estados. Esto puede tener su explicación debido a que las condiciones climáticas de esta región favorecen la distribución del vampiro vector de la enfermedad, y a que la densidad de ganado es también mucho mayor. En la Huasteca Potosina la precipitación pluvial anual va de los 996.5 mm a los 2 508 mm, la temperatura media anual es de 25.3 °C con abundancia de ríos y una población de ganado de 534,547 cabezas (Aguirre et al., 2010; Voigt et al., 2006), muy superior a la de los otros dos estados. Se estima que en áreas de alta densidad de murciélagos vampiro, un mismo bovino puede recibir hasta 12 mordeduras en una noche y alimentar hasta a cuatro de estos quirópteros a la vez (Suzán, 2005). Aunque la RPB está considerada como una enfermedad propia de zonas con altitud menor a los 1 500 msnm (Voigt, 2006; Quintana et al., 2007), existen reportes de que puede vivir en altitudes de hasta 3,600 msnm (Silva et al., 2001). Nuestros resultados confirman esta aseveración, aunque queda por comprobar si esto obedece únicamente a la disponibilidad de alimento o algún otro factor (Almaraz y Setién, 2006).

De acuerdo a los resultados del canal endémico realizado en este estudio, los meses de enero, abril y octubre son los de mayor riesgo para la presentación de casos, debido a que el promedio puede alcanzar valores de epidemia. Estos mismos resultados sugieren que la vacunación del ganado debería aplicarse entre

julio y septiembre de cada año. Aunque hacen falta estudios, se ha demostrado que la vacunación previa a la exposición puede ser más eficaz y rentable que el control de los murciélagos hematófagos (Anderson et al., 2012; Oliveira y Andrade, 2000). La Norma Oficial Mexicana NOM-067-ZOO-2007 establece que en áreas endémicas el ganado se debe vacunar al mes de nacido, con refuerzo a los tres y seis meses. Con este esquema se asegura la inmunización de los animales recién nacidos y durante la época de pastoreo, cuando el riesgo de infección se incrementa (Oliveira y Andrade, 2000).

En las estrategias de vacunación es esencial considerar el ciclo reproductivo del murciélago hematófago, la gestación en época de lluvias, y el periodo de lactancia de agosto a noviembre. Esto asociado a una mayor demanda de alimento y, en consecuencia, a un mayor número de ataques al ganado. El manejo que los productores dan al ganado bovino desempeña un papel importante en la incidencia de la RPB. En algunas regiones de México se aplican diferentes sistemas de pastoreo extensivo, que generan un considerable movimiento de ganado en primavera y verano, épocas en la que hay mejores agostaderos. En la región de estudio, este trasiego se realiza de marzo a agosto, mientras que de julio a septiembre los animales se recluyen en corrales para su reproducción y la producción de leche. Es probable que estas prácticas influyan en la mayor o menor exposición del ganado al ataque del murciélago vampiro en ciertas épocas del año.

El modelaje espacial de máxima entropía para determinar el efecto de diferentes variables climáticas sobre la presencia de casos de rabia paralítica en la región de estudio reveló que las temperaturas medias y la precipitación anual durante los meses más cálidos y los meses más húmedos, fueron las variables que mejor predijeron la diseminación de la enfermedad en la zona estudiada. Esto coincide con estudios que sugieren que *D. rotundus* no tolera los climas fríos ni las bajas temperaturas del invierno, específicamente cuando son menores de 10 °C (Greenhall et al., 1983). No obstante, en este trabajo se detectó la presencia de casos de rabia paralítica en el semidesierto de Querétaro, que no presenta las condiciones climáticas más apropiadas para la presencia del vampiro. Esta

alteración de su hábitat natural y la colonización de nuevas regiones pudiera deberse a la presencia de ganado y características topográficas favorables del terreno, como la presencia de minas y cuevas (Gomes et al., 2010).

Es pertinente considerar que la información de los casos de rabia se fundamentó en bases de datos secundarias, donde un subregistro es probable. Además, dado que los datos no provienen de un muestreo aleatorio, los resultados no son estadísticamente representativos de toda la población y la región estudiada, por lo que su extrapolación puede ser limitada. No obstante, estos resultados demuestran que en la región central de México la RPB se está extendiendo a regiones que hasta hace poco se encontraban libres. Esto puede deberse a las perturbaciones ecológicas del vampiro, que tienen un efecto sobre la dinámica adaptativa y la circulación del virus, lo que en parte explica el comportamiento epidemiológico extensivo de la rabia silvestre (Bastiani et al., 2012).

En este estudio, la secuencia del genoma completo del VR de cuatro aislamientos virales de ganado proveniente del centro de México, se comparó con 22 aislados de los virus de la rabia reportados en el GenBank. El análisis filogenético mostró que todos los virus provenientes de México se agrupan, lo que sugiere que la cepa infectante es endémica y genéticamente estable en la región. No fue posible averiguar de dónde provienen las cepas mexicanas JQ685953HumMex y JQ685936.1CattleD.rotundusMex reportadas en el GenBank; sin embargo, el hecho de que la primera agrupa en la misma rama del árbol filogenético, con las cuatro cepas mexicanas, sugiere que proviene de la región central de México, mientras que el segundo, que agrupa en una rama diferente seguramente procede de una región lejana. La cepa 0635cattleAcatlanHgo-QroMex es similar a la cepa 328CattleColonQro.Mex; que provienen de dos estados vecinos, Hidalgo y Querétaro, lo que sugiere que la propagación de la rabia es local y la distribución está asociada con el mismo reservorio, *D. rotundus* (Smith et al., 2005). El árbol filogenético mostró que la cepa que circula en la Sierra Gorda, zona endémica de la rabia en el ganado y en *D. rotundus* en el estado de Querétaro, es diferente de la del valle central, lo que sugiere que esta

última región puede tener diferentes fuentes de infección. Esto tiene sentido ya que entre la Sierra Gorda y las regiones del valle existe una barrera natural compuesta de montañas que hace difícil el movimiento del ganado y del murciélago; sin embargo, hay dos estados vecinos, el Estado de San Luis Potosí y el Estado de Hidalgo, que tienen áreas endémicas de rabia con una gran historia de casos, y que mantienen un constante intercambio de animales con el estado de Querétaro.

Al incluir las 26 cepas del virus de la rabia en el mismo análisis, se observó que los principales grupos fueron formados por cepas de diferentes hospederos (ganado, ovejas y murciélagos) en diferentes regiones geográficas: América del Sur y del Norte, Europa Occidental y el Sudeste Asiático. La cercanía genética que tienen las cuatro cepas mexicanas incluidas en el estudio 0987, 4225, 0635 y 0328, con las encontradas en América del Sur, sugiere un antepasado común.

La comparación de las cuatro secuencias del genoma del virus de la rabia aislado de cerebro de bovino proveniente de Querétaro con las reportadas en el Genbank, muestran que la distribución de las cepas tiene características geográficas diferentes para el virus de la rabia y sus hospederos. Esto es posiblemente debido a la adaptación al huésped y a la transmisión inter-especie, que es rara vez detectada (Streiker et al., 2010).

El análisis filogenético usando las 22 cepas localizadas en el GenBank con 90% o más de similitud con las cepas mexicanas proporciona ocho grupos localizados en diferentes regiones geográficas y con diferentes hospederos. Por ejemplo, el grupo de América del Sur en el árbol genético incluye cepas obtenidas de ganado vacuno, ovejas, perros y diferentes tipos de murciélagos. Esto es consistente con otros estudios basados en la filogenia del virus rábico realizada con los genes N y G (Nadin-Davis y Loza-Rubio, 2006; Nadin-Davis et al., 2006; Hao et al., 2016). Sin embargo, en el árbol genético se observó que el virus de la rabia tiene mayor diversidad genética en los murciélagos, independientemente del tipo de dieta o hábitat natural. Esto coincide con la propuesta de Real et al. (2005) Acerca de la epidemia de rabia en expansión, resulta a menudo muy rápida entre

las poblaciones de vida silvestre en todas las regiones de Europa y América del Norte; sin embargo, en el caso de México, las cuatro cepas que circulan en la Sierra Gorda y los valles centrales de Querétaro tienen una alta proporción de similitud, y presentan al murciélago hematófago como el principal reservorio. Lo que demuestra que *D. rotundus* sigue siendo el principal vector y transmisor del virus de la rabia para el ganado en América Latina (Barbosa et al., 2008).

La comparación de nuevas secuencias y secuencias reportadas en el GenBank, sugiere que, además del comportamiento evolutivo conservado del virus de la rabia, las mutaciones puntuales en el genoma que se producen durante la replicación pueden ser el resultado de micro procesos evolutivos que se asocian con el tipo de deformación encontrado en diferentes cepas (Appolinário et al., 2015). Esto es evidente para las cepas mexicanas, donde la formación de taxones en linajes particulares es lenta, representada por una rama larga y muy pocas ramas en el árbol filogenético. La relación entre los linajes de América del Sur y México revela que varios linajes experimentaron una explosión de formación de linaje al mismo tiempo. Por lo tanto, la importancia de monitorear el virus de la rabia a lo largo de la secuenciación del genoma completo es porque se ha demostrado en estudios previos que la recombinación homóloga del virus de la rabia es posible (Liu et al., 2011).

CAPÍTULO IX

9.1. CONCLUSIONES

Este estudio demuestra que la RPB se ha extendido a regiones anteriormente libres de esta enfermedad en los estados de Guanajuato, San Luis Potosí y Querétaro, y que el principal vector de transmisión del VR al ganado es el murciélago hematófago, *D. rotundus*. Se ha confirmado también que este quiróptero es capaz de adaptarse a diferentes ecosistemas que le permitan alimentarse y sobrevivir. Así, la tendencia de diseminación de la enfermedad está influenciada por el comportamiento ecológico del murciélago *D. rotundus* y la distribución de ganado bovino asociada a regiones libres, donde la temperatura y la precipitación pluvial favorezcan una mayor distribución del vector. Se ha demostrado que la distribución del murciélago vampiro y la distribución de casos de RPB en los tres estados, ya no está limitada a lugares que se encuentren en zonas con altitud menor a los 1500 metros sobre el nivel del mar. Es recomendable mantener un monitoreo constante para la detección oportuna de casos cuando existan condiciones favorables para la presencia del vector y presencia de ganado, además de los antecedentes de casos en regiones cercanas. Se sugiere que la vacunación con la más amplia cobertura, debe realizarse antes del comienzo de las lluvias.

A través de la tipificación genética del genoma completo del VR se pudo conocer que la cepa viral circulante en la región es genéticamente estable, y que la fuente de infección para el ganado en el valle central de Querétaro posiblemente proviene de otros estados. Las cepas mexicanas son más parecidas a las del sur y norte de América, que a las de Europa y Asia, lo que sugiere un ancestro común para la rabia en el nuevo mundo. Se confirmó que el uso de la secuencia del genoma completo del VR tiene una mejor resolución filogenética. No obstante, los genes P y G son una buena opción para estudios filogenéticos del VR, cuando la secuencia del genoma completo no está disponible.

CAPÍTULO X

10.1. LITERATURA CITADA

- Aguilar L. M. S, Camargo W. R, Portella A. S. 2006. La aparición de murciélago vampiro de alas blancas, *Diaemus youngi* (Mammalia, Chiroptera), en el cerrado del Distrito Federal, Brazil. Rev. Bras. Zool. 23: 893-896.
- Aguirre V. M, Negrete J. J. 2010. Adaptación del murciélago hematófago en el Estado de Hidalgo. México, D.F. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; Disponible en: http://www.conasamexico.org.mx/conasa/docs_18a_reunion/salon6diamartes1200a1500/Victor_Manuel_Aguirre_Duarte.pdf
- Almaraz M.L, Setién A. 2006. Murciélagos benéficos y vampiros, características, importancia, rabia, control y conservación. México, D.F. Editorial AGT. EDITOR, S. A. 1, 2, 4-7, 10-16, 75-80, 97-100.
- Anderson A, Shwiff S, Gebhardt K, Ramirez A.J, Shwiff S, Kohler D, et al. 2012. Economic evaluation of vampire bat (*Desmodus rotundus*) Rabies Prevention in Mexico. Transbound Emerg Dis. 61:140–6.
- Appolinário C, Allendorf S.D, Vicente A.F, Ribeiro B. D, da Fonseca C.R, Antunes J.M, Megid J. 2015. Fluorescent antibody test, quantitative polymerase chain reaction pattern and clinical aspects of rabies virus strains isolated from main reservoirs in Brazil. Braz. J. Infec. Dis. 19, 479-485.
- Arechiga C, 2012. Identificación de una nueva variante de virus de la rabia aislada de cuatíes de nariz blanca (*nasua narica*) de la península de Yucatán relacionada con murciélagos no hematófagos (Doctoral dissertation).
- Arellano S. C. 1988. Vampire bat-transmitted rabies in cattle. Review of Infectious Diseases, 10 (Supplement 4), S707-S709.

- Ascuntar T. J, and Jaimes F. 2016. Ronda clínica y epidemiológica: sistemas de información geográfica (SIG) en salud. *Iatreia*. 29(1), 97-103.
- Auchincloss A. H, Gebreab S. Y, Mair C, Roux A. V. D. 2012. A review of spatial methods in epidemiology, 2000–2010. *Annu. Rev. Public. Health*;33:107–22.
- Badrane H, y Tordo N. 2001. Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *J. Virol.* 75(17):8096-104.
- Balsamo G, Ratard R. C, Thoppil D. R, Thoppil M, Pino F. V, Rupprecht C. E, Sprecher A. G, Petersen B. W. 2010. Human rabies from exposure to a vampire bat in Mexico-Louisiana, *MMWR*. 2011;60:1050–1052.
- Barbosa T. F. S, de Almeida-Medeiros D. B, da Rosa E. S. T, Casseb L. M. N, Medeiros R, de Souza-Pereira A, da Costa-Vasconcelos P. F. 2008. Molecular epidemiology of rabies virus isolated from different sources during a bat-transmitted human outbreak occurring in Augusto Correa municipality, Brazilian Amazon. *Virology*. 370, 228-236.
- Barcellos C. 2003. Unidades y escalas en los análisis espaciales en salud. *Rev. Cub. de Salud Pública*. 29 (4), 0-0.
- Bárcenas-Reyes I. 2013. Factores ambientales asociados a la transmisión vampiro-bovino de la rabia paralítica en la sierra gorda de Querétaro (Doctoral dissertation).
- Bárcenas-Reyes I, Loza-Rubio E, Zendejas-Martínez H, Luna-Soria H, Cantó-Alarcón G. J, y Milián-Suazo F. 2015. Epidemiological trends in bovine paralytic rabies in central Mexico, 2001-2013. *Rev. Panam. Salud Pública*. 38(5), 396-402.
- Bastiani C. E, Ramírez N. N, Alegre E. A y Ruiz R. M. 2012. Identificación y caracterización de refugios de quirópteros en la Ciudad de Corrientes, Argentina. *Rev. Vet.* 23:104-109.

- Beerling D, Huntley B, y Bailey J. 1995. Climate and the distribution of *Fallopia japonica*: use of an introduced species to test the predictive capacity of response surfaces. *J. Veg. Sci.* 6, 269–282.
- Belotto A, Leanes L. F, Schneider M. C, Tamayo H, Correa E. 2005. Overview of rabies in the Americas. *Virus Res.* 111(1), 5-12.
- Biek R, Henderson J. C, Waller L. A, Rupprecht C. E, and Real L. A. 2007. “A high-resolution genetic signature of demographic and spatial expansion in epizootic rabies virus”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 7993-7998.
- Blackwood J. C, Streicker D. G, Altizer S, and Rohani P. 2013. Resolving the roles of immunity, pathogenesis, and immigration for rabies persistence in vampire bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110:208 37-20842.
- Blanton J. D, Dyer J, McBrayer, J, and Rupprecht C. E. 2012. Rabies surveillance in the United States during 2011. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 241(6), 712-722.
- Bourhy H, Kissi B, Audry L, Smreczak M, Sadkowska-Todys M, Kulonen K, Tordo N, Zmudzinski J. F. and Holmes E. C. 1999. “Ecology and evolution of rabies virus in Europe”. *J. Gen. Virol.* 80: 2545-2557.
- Bourhy H, Kissi B, and Tordo N. 1993. Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virology.* 194(1), 70-81.
- Bourhy H, Reynes J. M, Dunham E. J, Dacheux L , Larrous F, Huong V. T. Q, Xu G, Yan J, Miranda M. E. G, Holmes E. C. 2008. “The Origin and phylogeography of dog rabies virus”. *J. Gen. Virol.* 89: 2673-2681.
- Brass D. A. 1994. Vampire bats of the American tropics. En: Brass D.A., edit. *Natural History and public health implications.* Ridgefield (Co): Livia Press. 57-82.
- Brito-Hoyos D. M, Brito S. E, Villalobos A. R. 2013. Distribución geográfica del riesgo de rabia de origen silvestre y evaluación de los factores asociados con su incidencia en Colombia, 1982–2010. *Rev. Panam. Salud Pública.* 33(1):8–14.

- Brunker K, Hampson K, Horton D. L, Biek R. 2012. Integrating the landscape epidemiology and genetics of RNA viruses: rabies in domestic dogs as a model. *Randolph. SE. ed. Parasitology.* 139(14):1899-1913.
- Calisher C. H, Childs J. E, Field H. E, Holmes K. V, Schountz T. 2006. Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. *Clin. Microbiol.* 19: 531-545.
- Calisher C. H. 2015. Viruses in bats: a historic review. *Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases.* Wiley, New York. 23-47.
- Carrasco-Rueda F. 2011. Diversity and species composition of bats in forest fragments in the Chanchamayo Province, Junin. University of Florida.
- Chan J. F, To W, Tse K. K. W, Jin H, Yuen K. Y. 2013. Interspecies transmission and emergence of novel viruses: lessons from bats and birds. *Trends in microbiology.* 21:544-555.
- Cisterna D, Bonaventura R, Caillou S, Pozo O, Andreau M. L, Dalla Fontana L, and Novaro L. 2005. Antigenic and molecular characterization of rabies virus in Argentina. *Virus Res.* 109(2). 139-147.
- Da Rosa E. S, Kotait I, Barbosa T. F, Carrieri M. L, Brandão P. E, Pinheiro A. S. 2006. Ferreira M. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 12, 1197-202.
- De Thoisy B, Bourhy H, Delaval M, Pontier D, Dacheux L, Darcissac E, Salmier, A. 2016. Bioecological drivers of rabies virus circulation in a Neotropical bat community. *PLoS neglected tropical diseases.* 10(1) e0004378.
- Delprieto H. A, Russo R. G. 1996. Aspectos ecológicos de la agresión del vampiro y de la rabia parálitica en la Argentina y análisis de las propuestas efectuadas para su control. *Rev. Sci. Tech Off Int Epiz.* 15: 971-984.
- Dietzschold B, Wunner W. H, Wiktor T. J, Lopez A. D, Lafon M, Smith C. L. and Koprowski H. 1983. "Characterization of an antigenic determinant of the

- glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 70-74
- Escobar L. E, Peterson A. T, Favi M, Yung V, and Medina-Vogel G. 2015. Bat-borne rabies in Latin America. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 57(1), 63-72.
- Elliot, P., Wakefield, J. C., Best, N. G., & Briggs, D. J. 2000. Spatial epidemiology: methods and applications. Oxford University Press.
- Elliott P, Wartenberg D. 2004. Spatial epidemiology: current approaches and future challenges. Environ. Health Perspect. 112(9):998–06.
- Escobar L. E, Peterson A. T, Papeş M, Favi M, Yung V, Restif O, and Medina-Vogel G. 2015. Ecological approaches in veterinary epidemiology: mapping the risk of bat-borne rabies using vegetation indices and night-time light satellite imagery. J. Vet. Res. 46(1), 92.
- Fleming T. H, Geiselman C, and Kress W. J. 2009. The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. Annals of Botany. 197.
- Fornes A, Lord R. D, Kuns M. L, Largui O. P, Fuenzalida E, Lazara L. 1974. Control of bovine rabies through vampire bats control. J. Wildl. Dis. 10(4):310–6.
- Gándara G, Sandoval A. N. C, Cienfuegos C. A. H, and Tamayo A. R. 2006. Valoración económica de los servicios ecológicos que prestan los murciélagos " *Tadarida brasiliensis*" como controladores de plagas en el norte de México. Cátedra de Integración Económica y Desarrollo Social, Tecnológico de Monterrey.
- George D. B, Webb C. T, Farnsworth M. L, O'Shea T. J, Bowen R. A, Smith D. L, and Rupprecht C. E. 2011. Host and viral ecology determine bat rabies seasonality and maintenance. Proc. Natl. Acad. Sci. 108:10208-10213.

- Gomes M. N, Monteiro A. M. V, Lewis N. 2010. Landscape risk factors for attacks of vampire bats on cattle in São Paulo, Brazil. *Prev. Vet. Med.* 93(2–3):139–46.
- Greenhall A. M, Joermann G, Schmidt U. 1983. *Desmodus rotundus*. Mammalian species. 202:1–6.
- Grinnell J. 1917. Field tests of theories concerning distributional control. *Am. Nat.* 51: 115–128.
- Guyatt K. J, Twin J, Davis P, Holmes E. C, Smith G. A, Smith I. L, Mackenzie J. S, Young P. L. 2003. A molecular epidemiological study of Australian bat Lyssavirus. *J. Gen. Virol.* 84, 485–496.
- Hampson K, Cleaveland S, and Briggs D. 2011. Evaluation of Cost-Effective Strategies for Rabies Post-Exposure Vaccination in Low-income Countries. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5: 3, 982.
- Hao L. I, Guo Z. Y, Zhang J, Tao X. Y, Zhu W. Y, Qing T. A. N. G, and Liu H. T. 2016. Whole Genome Sequencing and Comparisons of Different Chinese Rabies Virus Lineages Including the First Complete Genome of an Arctic-like Strain in China. *Biomed. Environ. Sci.* 29(5), 340-346.
- Hayman D. T. S, Bowen R. A, Cryan P. M, McCracken G. F, O’Shea T. J, Gilbert A, Webb C. T, Wood J. L. 2013. Ecology of Zoonotic Infectious Diseases in Bats: Current Knowledge and Future Directions. *Zoonoses and Public Health.* 60(1):2-21.
- Hayman D. T. S, Fooks A. R, Marston D. A, Garcia-R J. C. 2016. The Global Phylogeography of Lyssaviruses - Challenging the 'Out of Africa' Hypothesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10(12): e0005266.
- Hidalgo D. M. A. 2005. La rabia una zoonosis mortal, revista digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela. en: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/ceniaphoy/articulos/n7/arti/hidalgo_m/arti/hidalgo_m.htm.

- Holmes E. C, Woelk C. H, Kassis R. and Bourhy H. 2002. "Genetic Constraints and the adaptive evolution of rabies virus in nature". *Virology*. 292: 247-257.
- Huntsinger L, Starrs P. F, 2006. Grazing in arid North America: a biogeographical approach. *Sécheresse*. 17, 219–233.
- Hutchinson G. E. 1959. Homage to Santa Rosalia, or why are there so many kinds of animals? *Am. Nat.* 93:145–159
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2016. en: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- Ito M, Arai Y. T, Itou T, Sakai T, Ito F. H, Takasaki T, Kurane I. 2001. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: Identification of two reservoirs, dog and vampire bats. *Virology*. 284:214-222.
- Jiao W, Yin X, Li Z, Lan X, Li X, Tian X, and Liu J. 2011. Molecular characterization of China rabies virus vaccine strain. *J. Virol.* 8(1), 521.
- Johnson N, Aréchiga-Ceballos N, Aguilar-Setien A. 2014. Vampire bat rabies: ecology, epidemiology and control. *Viruses*. 6, 1911-1928.
- Jones B. A, Grace D, Kock R, Alonso S, Rushton J, Said M. Y and Pfeiffer D. U. 2013. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110:8399-8404.
- Jones K. E, Bininda-Emonds O. R. P, Gittleman J. L. 2005. Bats, clocks, and rocks: diversification patterns in Chiroptera. *Evol.* 59:2243-2255.
- Kalita J, Bhoi S. K, Bastia J. K, Lashkar S, Mahadevan A, and Misra U. K. 2014. Paralytic rabies: MRI findings and review of literature. *Neurol. India.* 62(6), 662.
- Kelly M, and Meentemeyer R. K. 2002. Landscape dynamics of the spread of sudden oak death. *Photogramm. Eng. Remote Sensing.* 68, 1001–1009.

- Kobayashi Y, Sato G, Mochizuki N, Hirano S, Itou T, Carvalho A. A, Albas A, Santos H. P, Ito F. H, Sakai T. 2008. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. *BMC Vet. Res.* 4, 44.
- Kostyrka G. 2015. Interspecies transmission and viral epidemics: integration of molecular and ecological approaches in the epidemiology of two RNA viruses (1989-2010s).
- Kuzmin I. V, Rupprecht C. E. 2007. Bat rabies. In: Jackson A. C, Wunner W. H, editors. *Rabies*. San Diego: Academic Press. pp. 259–307.
- Lawson A. B. 2001. *Statistical methods in spatial epidemiology*. Chichester: John Wiley and Sons.
- Lawson A. B, Banerjee S, Haining R. P, Ugarte M. D. 2016. *Handbook of Spatial Epidemiology*. Florida: CRC Press.
- Lee D. N, Papes M, Van Den Bussche R. A. 2012. Present and potential future distribution of common vampire bats in the Americas and the associated risk to cattle. *PLoS One*.8:e42466..
- Liu W, Liu Y, Liu J, Zhai J, Xie Y. 2011. Evidence for inter- and intra-clade recombinations in rabies virus. *Infect. Genet. Evol.* 11: 1906–1912.
- Lobova T. A, Mori S. A, Blanchard F, Peckham H, and Charles-Dominique P. 2003. Cecropia as a food resource for bats in French Guiana and the significance of fruit structure in seed dispersal and longevity. *Am. J. Bot.* 90:388-403.
- López R. 2007. Reemergencia de la rabia en el Perú. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública.* 24(1), 3-4.
- Loza-Rubio E, Vargas G. R, Hernández E, Batalla D, Aguilar-Setién A. 1996. Investigation of rabies virus strains in Mexico with a panel of monoclonal antibodies used to classify Lyssaviruses. *Bulletin of PAHO.* 30: 31.

- Loza-Rubio E, de Mattos C. C. Aguilar-Setién A. y de Mattos C. A. 2000. Aislamiento y caracterización molecular de un virus rábico, obtenido de un murciélago no hematófago en la ciudad de México. *Vet. Méx.* 31(2):147-152.
- Loza-Rubio E, Rojas-Anaya E, López J, Olivera-Flores, M. T, Gómez-Lim, M, Tapia-Pérez, G. 2012. Induction of a protective immune response to rabies virus in sheep after oral immunization with transgenic maize, expressing the rabies virus glycoprotein. *Vaccine.* 30(37), 5551-5556.
- Massad E, Coutinho, F. A. B, Burattini M. N, Sallum P. C, and Lopez L. F. 2001. A mixed ectoparasite-microparasite model for bat-transmitted rabies. *Theor. Popul. Biol.* 60(4), 265-279.
- Matsumoto T, Ahmed K, Wimalaratne O, Yamada K, Nanayakkara S, Perera D, Karunanayake D, Nishizono A. 2011. Whole-genome analysis of a human rabies virus from Sri Lanka. *Arch. Virol.* 156, 659-669.
- Mayen F. 2003. Haematophagous bats in Brazil, their role in rabies transmission, impact on public health, livestock industry and alternatives to an indiscriminate reduction of bat population. *J. Vet. Med. Series B.* 50(10), 469-472.
- Mochizuki N, Kobayashi Y, Sato G, Hirano S, Itou T, Ito F.H, Sakai T. 2011. Determination and molecular analysis of the complete genome sequence of two wild-type rabies viruses isolated from a haematophagous bat and a frugivorous bat in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.* 73, 759-766.
- Nadin-Davis S. A, Loza-Rubio E. 2006. The molecular epidemiology of rabies associated with chiropteran hosts in Mexico. *Virus Res.* 117(2), 215-226.
- Nadin-Davis S. A. 2013. *Molecular epidemiology.* AC Jackson. Rabies, 3rd Edition. Oxford, UK: Acad. Press/Elsevier. 123-178.
- Nadin-Davis S. A, Colville A, Trewby H, Biek R, and Real L. 2017. Application of high-throughput sequencing to whole rabies viral genome characterisation

and its use for phylogenetic re-evaluation of a raccoon strain incursion into the province of Ontario. *Virus Res.* 232, 123-133.

Naoki K, Gómez M, López R, Meneses R, Vargas J. 2006. Comparación de modelos de distribución de especies para predecir la distribución potencial de vida silvestre en Bolivia. *Ecología en Bolivia* 41(1): 65-78.

Norma Oficial Mexicana NOM-067-ZOO-2007. Campaña nacional para la prevención y control de la rabia en bovinos y especies ganaderas.

Oliveira A. N. D, Andrade M. C. R, Silva, M. V. D, Moura W. C. D, Cortez-Contreiras E. 2000. Immune response in cattle vaccinated against rabies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 95:83–8.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Nota descriptiva N° 99. Rabia. Marzo de 2013. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/es/>

Pan American Health Organization, Veterinary Public Health Program. 2007. Epidemiological surveillance of rabies in the Americas. September Monthly report. 6 p.

Parra-Henao G. 2010. Sistemas de información geográfica y sensores remotos. Aplicaciones en enfermedades transmitidas por vectores. *CES Medicina*, 24(2), 75-89.

Peel D.S, Mathews Jr. K. H, Johnson R. J. 2011. Trade, the expanding Mexican beef industry, and feedlot and stocker cattle production in Mexico. LDP-M-206-01. Economic Research Service USDA.

Peterson A. T, Vieglais D. A. 2001. Predicting species invasions using niche modeling: new approaches from bioinformatics sattack a pressing problem. *Bio. Science.* 51: 363-371.

Peterson A. T. and Robins C. R. 2003. Using ecological-niche modeling to predict Barred Owl invasions with implications for Spotted Owl conservation. *Conserv. Biol.* 17, 1161–1165.

- Pijl L. V. D. 1975. The dispersal of plants by bats (Cheiropterochory). *Acta Bot. Nederlandica*. 6:291-315.
- Pina M. F, Ferreira A. S, Correia R. A. S, Castro O. A. 2010 Epidemiología espacial: nuevos enfoques para viejas preguntas. *Univ Odontol*. Jul-Dic; 29(63):47-65.
- Quintana N. H, Pacheco V. T. 2007. Identificación y distribución de los murciélagos vampiros del Perú. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública*. 24(1):81–8.
- Ramírez-Romero R, Ramírez-Hernández C, García-Márquez L. J, Macedo-Barragán R. J, Martínez-Burnes J, and López-Mayagoitia A. 2014. Bovine diseases causing neurological signs and death in Mexican feedlots. *Trop. Anim. Health Prod*. 46(5), 823-829.
- Real L. A, Russell C, Waller L, Smith D, Childs J. 2005. Spatial dynamics and molecular ecology of North American rabies. *J Hered*. 96, 253-260.
- Rico C. O, Ojeda-Flores R, Sotomayor B. J, Zambrana T. C, Loza-Rubio E, Alonso A, Suzán G. 2015. Viral diversity of bat communities in human-dominated landscapes in Mexico. *Vet. Méx. OA*. 2 (1) :1-22.
- Recuenco S, Eidson M, Cherry B, and Johnson G. 2009. Risk-Based Cost Modelling of Oral Rabies Vaccine Interventions for Raccoon Rabies. *Zoonoses and public health*. 56(1), 16-23.
- Rodhain E. 2015. Bats and Viruses: complex relationships. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique*. 108: 272-289.
- Rupprecht C. E, Turmelle A, and Kuzmin I. V. 2011. A perspective on lyssavirus emergence and perpetuation. *Current opinion Virology*. 1 (16), 662-670.
- Sánchez H. 2004. Prevalence of rabies and LPM paramyxovirus antibody in Non – hematophagous bats captured in the Central Pacific Coast of Mexico. *Ed. Royal Society*. 94: 547- 555 , 659.

- Schabenberger O, and Gotway C. A. 2017. Statistical methods for spatial data analysis. CRC press.
- Schneider M.C, Romijn P.C., Uieda W., Tamayo H., da Silva D.F., Belotto A., da Silva J.B., Leanes L.F. 2009. Rabies transmitted by vampire bats to humans: An emerging zoonotic disease in Latin America? *Rev. Panam. Salud Publica.* 25:260–269.
- Scmhidt K. M, Badger D. D. 1979. Some social and economic aspects in controlling vampire bats. *Proc. Okla. Acad. Sci* 59: 112–114.
- Seetahal J. F. R, Velasco-Villa A, Allicock O. M, Adesiyun A. A, Bissessar J, et al. 2013. Evolutionary History and Phylogeography of Rabies Viruses Associated with Outbreaks in Trinidad. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(8): e2365.
- Silva J. A, Moreira E. C, Haddad J. P. A, Sampaio I. B. M, Modena C. M, Tubaldini M. A. S. 2001. Distribuição temporal e espacial da raiva bovina em Minas Gerais, 1976–1997. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 53:263–27.
- Singh R, Singh K. P, Cherian S, Saminathan M, Kapoor S, Manjunatha R. G. B, and Dhama K. 2017. Rabies–epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Vet. Q.* 37(1), 212-251.
- Smith J. S. 2002. Molecular epidemiology, P.79-111. In Jackson A. C., and W. H. Wunner (ed) *Rabies*. Academic Press.
- Sodre M. M, da Gama A. R, de Almeida M. F. 2010. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 52:75–81.
- Streicker D. G, Recuenco S, Valderrama W, Gomez B. J, Vargas I, Pacheco V, Condori C. R. E, Montgomery J, Rupprecht E, Rohani P, Altizer S. 2012. Ecological and anthropogenic drivers of rabies exposure in vampire bats: implications for transmission and control. In *Proc. R. Soc. B* (Vol. 279, No. 1742, pp. 3384-3392). The Royal Society.

- Streicker D. G, Winternitz J. C, Satterfield D. A, Condori C. R. E, Broos A, Tello C, and Valderrama W. 2016. Host–pathogen evolutionary signatures reveal dynamics and future invasions of vampire bat rabies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201606587.
- Suzán G. 2005. *Desmodus rotundus*. En: Ceballos G, Oliva G, ed. Los mamíferos silvestres de México. México, D.F.: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica. 986.
- Tordo N. 1996. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: Meslin FX, Koprowski, H, editor. *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: WHO. 28-52.
- Torres C, Lema C, Dohmen F. G, Beltran F, Novaro L, Russo S, and Cisterna D. M. 2014. Phylodynamics of vampire bat-transmitted rabies in Argentina. *Mol. Ecol.* 23(9), 2340-2352.
- Velasco-Villa A, Gómez-Sierra M, Hernández-Rodríguez G, Juárez-Islas V, Meléndez-Felix A, Vargas-Pino F, et al. 2002. Antigenic diversity and distribution of rabies virus in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 40:951-8.
- Velasco-Villa A, Orciari L. A, Juárez-Islas V, Gómez-Sierra M, Padilla-Medina I, Flisser A, Rupprecht C. E. 2006. Molecular Diversity of Rabies Viruses Associated with Bats in Mexico and Other Countries of the Americas. *J. Clin. Microbiol.* 44(5), 1697–1710.
- Villa B. 1976. *Biología de los murciélagos hematófagos*. Laboratorio de mastozoología, instituto de Biología UNAM, México DF. 94- 99.
- Voigt C. C, Kelm D. H. 2006. Host preference of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*; *Chiroptera*) assessed by stable isotopes. *J.Mammal.* 87:1–6.
- Wibbelt G, et al. 2010. "Emerging diseases in Chiroptera: why bats?" *Biology letters*. rsbl20100267.

Wong S, Lau S, Woo P and Yuen K. Y. 2007. Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Rev. Med. Virol.* 67-91.

Yung V, Favi M, Fernández J. 2002. Genetic and Antigenic Typing of rabies virus in Chile. *Arch. Virol.* 2197-2205.