

**ESTUDIO PILOTO DE DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA RABIA EN QUIRÓPTEROS
DEL DEPARTAMENTO DEL TOLIMA**

JIMMY FERNANDO CIFUENTES JIMÉNEZ

**Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de
Médico Veterinario y Zootecnista**

Director

NOEL VERJAN GARCÍA

PhD. Inmunología

Coodirector

IANG S. RONDÓN BARRAGAN

PH.D. Applied Marine Biosciences

UNIVERSIDAD DEL TOLIMA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IBAGUÉ- TOLIMA

2018

	UNIVERSIDAD DEL TOLIMA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA	ACTA No. 005
	ACTA SUSTENTACIÓN TRABAJO DE GRADO	Fecha: 27 de Febrero de 2018
		Página 1 de 1

TRABAJO DE GRADO DIRIGIDO

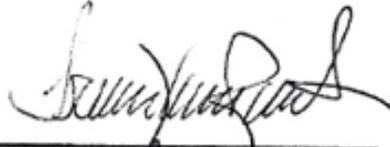
Siendo las 9:30 pm. del martes 27 de febrero de 2018, se reunieron en la Sala de reuniones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad del Tolima, el jurado calificador integrado por los doctores IRMA XIMENA BARBOSA SANCHEZ y FERNELY AUGUSTO PLAZAS HERNANDEZ, con el Co-Director Dr. IANG SCHRONILTGEN RONDON BARRAGAN, para dar su concepto sobre el Trabajo de Grado Titulado: "ESTUDIO PILOTO DE DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA RABIA EN QUIRÓPTEROS DEL DEPARTAMENTO DEL TOLIMA", presentado y sustentado por el estudiante del programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, JIMMY FERNANDO CIFUENTES JIMÉNEZ. Por motivos de fuerza mayor el director del trabajo Dr NOEL VERJAN GARCIA no estuvo presente.

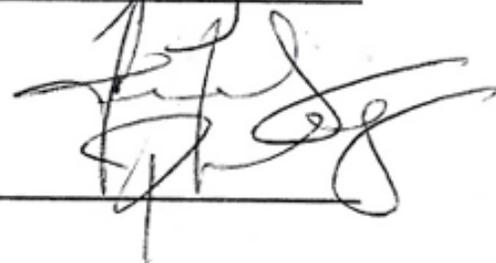
Luego de las correcciones y deliberaciones, el jurado asignó la calificación de:

CUATRO PUNTO SEIS (4.6) SOBRESALIENTE.

En constancia de lo anterior, firman:

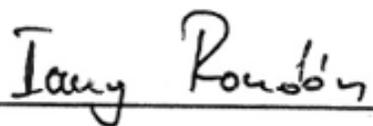
IRMA XIMENA BARBOSA SANCHEZ
JURADO





FERNELY AUGUSTO PLAZAS HERNANDEZ
JURADO

IANG SCHRONILTGEN RONDON BARRAGAN
Co-DIRECTOR



DEDICATORIA

*A Dios, mi familia y a
todos aquellos quienes
contribuyeron a mi
formación como
profesional.*

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos:

A mi familia por el apoyo incondicional y motivación para lograr esta meta.

Al Dr. Noel Verjan García, por sus correcciones pertinentes y orientación precisa al momento de abordar el tema, contribuyendo al desarrollo del proyecto y al desarrollo de mi persona como profesional.

A la Dra. Victoria Rodríguez, por su apoyo y guía durante la realización de experimentos y otras múltiples situaciones que se presentaron durante la ejecución del proyecto.

Al Médico veterinario y zootecnista Gisella Holguín Céspedes, por su tutoría y apoyo durante la ejecución del proyecto.

Al Médico veterinario y zootecnista Rubén Darío Pérez López por el acompañamiento en las capturas y el suministro de muestras.

Al Tecnólogo Ambiental Héctor Efrén Nieto Sánchez por aportar el diseño de las ilustraciones.

Al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) por su apoyo en la ejecución del proyecto.

Al Instituto Nacional de Salud (INS), por el apoyo y suministro de material genético del virus de la rabia.

.

GLOSARIO

AEROFAGIA: proceso de ingestión de aire, que llega al estómago, y causa distensión abdominal.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO: evaluación de la relación de proximidad evolutiva entre distintas especies, reconstruyendo la historia de su diversificación (filogénesis) desde el origen de la vida en la Tierra hasta la actualidad.

AXONES: prolongación neuronal especializada en conducir un impulso nervioso desde una neurona a otra.

CALCAR: estructuras cartilaginosas que salen del tobillo del murciélago.

CALIBRADOR DE VERNIER: cartabón de corredera o pie de rey, es un instrumento de medición de diámetros exteriores, interiores y profundidades.

CLADO: una de las ramificaciones que se obtiene después de hacer un único corte en el árbol filogenético. Empieza con un antepasado común y consta de todas sus descendientes, que forman una única rama en el árbol de la vida.

CLAVE DICOTÓMICA: herramienta que permite identificar a los organismos, alcanzando el nivel de especie, género, familia o cualquier otra categoría taxonómica. Se basa en definiciones de los caracteres morfológicos, macroscópicos o microscópicos; de ella parten dos soluciones posibles, en función de si tienen o no tienen determinado carácter, repitiéndose el proceso de definiciones de características, hasta llegar al organismo en cuestión.

ELECTROFORESIS: técnica para la separación de moléculas, por medio de un campo eléctrico.

ENCEFALITIS: Inflamación del encéfalo debido, generalmente, a una infección vírica.

GEN *HOUSEKEEPING*: es un gen que se expresa de manera constitutiva (se expresa siempre) en todos los tejidos, por lo general son aquellos encargados del metabolismo básico de la célula involucrados en el buen funcionamiento celular.

HIDROFOBIA: miedo al agua.

HOMOGENIZAR: proceso que hace que una mezcla presente las mismas propiedades en toda la sustancia.

ICTIÓFAGO: Se alimenta de peces.

INCLUSION CITOPLASMÁTICA: cualquier tipo de sustancia inerte, que puede acumularse, en este caso en el citoplasma de las células.

INMUNOGLOBULINA (IG): Glucoproteína compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas unidas entre si por puentes disulfuro y dispuestas en forma de Y, que tienen la capacidad de reconocer antígenos y actuar como anticuerpos.

OIE: organización mundial de la sanidad Animal.

OMS: organización mundial de la salud.

PARAPARESIS: parálisis (dificultad o imposibilidad de movimiento) de las extremidades inferiores.

PATAGIO: membrana de piel elástica y resistente que forma la superficie del ala del murciélago, es una extensión de la piel del abdomen que se extiende hasta la punta de los dígitos uniendo las extremidades superiores con el cuerpo.

PELLET: porción de material sedimentado en el fondo de un tubo tras un proceso de centrifugación.

PREVALENCIA: proporción de individuos de un grupo o una población que presentan una característica o evento determinado en un momento o en un período determinado.

PRIMER: secuencia corta de ácido nucleico que sirve como punto de partida para la replicación del ADN, que contiene un grupo 3'hidroxilo libre y su secuencia es complementaria a una fracción de hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.

QUIRÓPTERO: orden de mamíferos placentarios cuyas extremidades superiores se desarrollaron como alas (murciélagos).

RED DE NIEBLA: red de nylon de 2 m de altura por 6, 8 o 12 m de largo la cual es utilizada para atrapar a animales voladores, principalmente aves y murciélagos.

REFUGIO: lugar en el cual habitan colonias de quirópteros ya sea de una o varias especies.

RESERVORIO: reservorio natural o nido se refiere al hospedador de largo plazo de un patógeno que causa una enfermedad infecciosa zoonótica. A menudo ocurre que el hospedador no es afectado por la enfermedad que lleva el patógeno, o permanece asintomático y no está en riesgo su vida.

RNAsas: enzimas (nucleasas) que catalizan la hidrólisis de ARN en componentes más pequeños.

SIALORREA: excesiva producción de saliva.

TERMOCICLADOR: aparato usado en Biología Molecular que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para una reacción en cadena de la polimerasa de amplificación de ADN.

TETRAPARESIA: disminución de la movilidad (paresia) en las cuatro (tetra) extremidades.

TRAGO: lóbulo de piel ubicado en la base de la oreja de los murciélagos, que mejora su capacidad de eco localización.

TUBO EPPENDORF: Pequeño contenedor cilíndrico de plástico, con un fondo cónico y una tapa unida al cuerpo del tubo para evitar su desprendimiento.

ZOONOSIS: enfermedad propia de los animales que incidentalmente puede transmitirse al humano.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	16
1. OBJETIVOS	18
1.1 OBJETIVOS GENERALES	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2. MARCO TEÓRICO	19
2.1 RABIA, LA ENFERMEDAD	20
2.2 PATOGÉNESIS DE LA RABIA	22
2.3 RABIA EN MURCIÉLAGOS	24
2.4 CASOS DE RABIA Y VARIANTES DEL VIRUS EN COLOMBIA.....	26
2.5 DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE LA RABIA	29
2.6 PREVENCIÓN.....	32
3. METODOLOGÍA	34
3.1 UBICACIÓN	34
3.2 TAMAÑO DE LA MUESTRA	35
3.3 MUESTREO.....	35
3.4 IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES.....	38
3.5 SACRIFICIO Y PROCESAMIENTO	39
3.6 EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL.....	40
3.8 PCR SEMIANIDADO (hnRT-PCR.).....	43
4. RESULTADOS	45
4.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE QUIRÓPTEROS	45
4.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	57
5. DISCUSIÓN	58

6. CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES.....	62
REFERENCIAS	63

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Países libres de rabia en el mundo	21
Tabla 2. Especie y ecología de quirópteros positivos al VRAB en Colombia.	29
Tabla 3. Primers utilizados en la detección del virus de la rabia.	45
Tabla 4. Especies de quirópteros capturados en este estudio.	46
Tabla 5. Parámetros morfométricos de quirópteros capturados en el departamento del Tolima (periodo 2014-2016).	47

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Conexión de la rabia silvestre al ecosistema urbano	24
Figura 2. Localización de los municipios muestreados en el estudio	35
Figura 3. Captura de un ejemplar de la especie <i>Saccopteryx bilineata</i> con una red de niebla en el municipio de Mariquita, Tolima	37
Figura 4. Captura en refugio en puente de cataratas de medina Mariquita, Tolima	38
Figura 5. Refugio ubicado en el municipio de Alvarado, Tolima	38
Figura 6. Jaula plegable de contención para quirópteros	39
Figura 7. Diagrama de medidas morfométricas de un murciélago	40
Figura 8. Corte longitudinal sobre cráneo de murciélago, para la obtención de los hemisferios cerebrales	41
Figura 9. Proceso de extracción de ARN total por el método de Tiocianato de Guanidinio - Fenol – Cloroformo	43
Figura 10. Fotografía y representación diagramática de la especie <i>Tadarida brasiliensis</i> .	50
Figura 11. Fotografía y representación diagramática de la especie <i>Artibeus Lituratus</i> .	51
Figura 12. Fotografía y representación diagramática de la especie <i>Carollia perspicillata</i> .	52
Figura 13. Fotografía y representación diagramática de la especie <i>Platyrrhinus dorsalis</i> .	53
Figura 14. Fotografía y representación diagramática de la especie <i>Saccopteryx bilineata</i> .	54
Figura 15. Fotografía y representación diagramática de la especie <i>Saccopteryx leptura</i> .	55
Figura 16. Fotografía y representación diagramática de la especie <i>Molossus molossus</i> .	56
Figura 17: Fotografía y representación diagramática de la especie <i>Desmodus rotundus</i> .	

Figura 18: RT-PCR y hnPCR para la detección del virus de la rabia en muestras de quirópteros.

RESUMEN

La rabia es una enfermedad zoonótica mortal causada por un virus ARN neurotrópico de la familia Rhabdoviridae. La enfermedad se caracteriza por encefalitis y es responsable de múltiples muertes anuales de personas y animales. Los quirópteros son los principales transmisores, reservorios y vectores del virus. En Colombia, un total de 35 casos de rabia humana fueron reportados entre 2000- 2014 de los cuales 29 se relacionaron a quirópteros. La enfermedad es transmitida al humano principalmente por gatos infectados que pudieron haber cazado murciélagos infectados. En el país se ha detectado el virus de la rabia en murciélagos hematófagos y algunos murciélagos urbanos, sin embargo, en el departamento del Tolima se carece de estudios epidemiológicos dirigidos a conocer el estado sanitario de poblaciones de quirópteros en su hábitat natural. El diagnóstico de la rabia se realiza mediante la detección del virus principalmente en tejido nervioso, y se ha descrito la técnica de RT-PCR, como una herramienta de alta sensibilidad y especificidad para su diagnóstico. Estudios epidemiológicos de la rabia, han demostrado que diversas poblaciones de quirópteros son capaces de actuar como vectores y/o reservorios del virus, por lo cual se ha sugerido la vigilancia activa de las poblaciones de murciélagos. Este estudio buscó detectar el virus de la rabia en encéfalo de quirópteros silvestres capturados en algunos municipios del departamento del Tolima a través de la técnica de RT-PCR. Dentro del estudio, se realizó la caracterización morfométrica en 12 especies de quirópteros (n=91). Las muestras analizadas mediante RT-PCR fueron negativas al virus de la rabia. Se concluye que si bien la técnica de RT-PCR es efectiva en la detección del virus de la rabia, la cantidad de partículas virales en tejido de encéfalo de quirópteros clínicamente sanos posiblemente no es suficiente para su detección. Se recomienda ampliar el muestreo de animales y aumentar la cobertura del análisis, así como implementar técnicas diagnósticas complementarias que permitan contrastar los resultados del RT-PCR.

Palabras clave: Chiroptera, enfermedad zoonótica, Rhabdoviridae, variantes genéticas.

ABSTRACT

Rabies is a deadly zoonotic disease caused by a neurotropic RNA virus of the Rhabdoviridae family. The disease is characterized by encephalitis and is responsible for multiple annual deaths of animals and people. Chiroptera are the main transmitters, reservoirs and vectors of the virus. In Colombia, a total of 35 cases of human rabies were reported between 2000 and 2014, of which 29 were related to Chiroptera. The disease is transmitted to humans mainly by infected cats that may have hunted infected bats. In the country, the virus has been detected in hematophagous bats and some urban bats, however, in the department of Tolima, there is not epidemiological studies that allow to know the health status of Chiroptera populations in their natural habitat. The diagnosis of rabies is usually made by detecting virus particles in neurological tissues, and the RT-PCR technique is also described as a tool of high sensitivity and specificity for its diagnosis. Epidemiological studies of rabies, have shown that diverse populations of Chiroptera are able to act as vectors and / or reservoirs of the virus, for which active surveillance of bat populations has been suggested. This study sought to detect the rabies virus in encephalon of wild Chiroptera captured in some towns of the department of Tolima through the RT-PCR technique. Within the study, morphometric characterization was performed on 12 bats species (n = 91). The samples analyzed by RT-PCR were negative to rabies virus. Concluding that although the RT-PCR technique is effective in the detection of rabies virus genetic material, the amount of viral particles in brain tissue of clinically healthy bats may not be sufficient for detection. It is recommended to extend the sampling of animals and increase the coverage of the analysis, as well as implement complementary diagnostic techniques that allow contrasting the results of the RT-PCR.

Key words: Chiroptera, zoonotic disease, Rhabdoviridae, genetic variants.

INTRODUCCIÓN

La rabia es una de las enfermedades zoonóticas más importantes en el mundo causada por un virus de la familia Rhabdoviridae del género Lyssavirus altamente neurotrópico (Condori Condori, Streicker, Sanchez, & Velasco Villa, 2013). La enfermedad fue documentada inicialmente por los antiguos griegos, los cuales acuñaron la palabra *lyssa* que significa "violento", para aquellos perros que padecían la enfermedad. En el año 100 DC, Celsus describió que la saliva del animal mordedor contenía el agente venenoso y recomendó usar sobre la mordedura del perro rabioso agentes cáusticos, succionar o quemar la herida, con el fin de prevenir el desarrollo de la afección (Fleming, 1872).

Las primeras escrituras de la enfermedad, datan de los años 800-700 A.C entre las cuales resalta la *Ilíada* de Homero, la cual describe en sus pasajes a Cerberus, el perro multi cabezas guardián del Hades: "Cerberus manifestó un comportamiento loco y emitió sustancias venenosas de sus mandíbulas", haciendo referencia a la sinología de la enfermedad (Thomsen & Blaisdell, 1994). También se cree que Homero hablaba de la rabia al referirse al "perro-estrella, o perro de Orión", describiendo que esta ejercía una influencia maligna sobre la salud de la humanidad" (Fleming, 1872). En aquel momento se conocía que la enfermedad se presentaba principalmente en los perros, no obstante, también era transmisible al ser humano.

En la actualidad el virus ha sido reportado en animales salvajes de todo el mundo resaltando principalmente los pertenecientes al orden *Carnivora* y *quiróptera*. Se estima que la enfermedad causa cerca de 60.000 muertes humanas anuales, principalmente en áreas rurales de Asia y Africa (OIE, 2017).

El virus de la rabia (VRAB) ha sido aislado y tipificado a partir de una gran cantidad de especies de quirópteros diferentes a las especies con hábitos hematófagos (*Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata*, *Diaemus youngi*). Entre estas especies se reportan insectívoros, frugívoros, y omnívoros. Especies insectívoras como *Tadarida brasiliensis*,

presenta una alta prevalencia del virus y es responsable de varios casos de rabia en Sudamérica, debido a que habita en ciudades donde encuentra refugios, una fuente abundante de alimento y fácilmente entra en contacto con los humanos (Fahl et al., 2015; Nuñez et al., 2008).

En Colombia los principales transmisores del virus son los caninos y quirópteros, portadores de las formas epidemiológicas urbana y silvestre respectivamente, esta última causante de la mayoría de casos de rabia en la última década, como sucedió en el municipio de San Luis, Tolima donde se presentó rabia en humanos, en Honda y Prado se reportó rabia en bovinos, mientras que en Mariquita ocurrió un caso de rabia en un perro, cuyo vector fue un murciélago (INS, 2014).

Así, este estudio piloto de detección del virus de la rabia en quirópteros del departamento del Tolima fue diseñado con el propósito de aportar a la epidemiología del VRAB en la región, donde hasta el presente se carece de estudios epidemiológicos sobre rabia silvestre. El estudio se ejecutó evaluando especies de murciélagos con diferentes hábitos alimenticios, los cuales podrían ser reservorios del virus y probablemente son ignorados en los programas de vigilancia activa del país, al solo centrarse en la captura de *Desmodus rotundus*.

La detección del virus se realizó a través de PCR con transcriptasa reversa y PCR semianidado, por la alta sensibilidad que estas tienen, en comparación con otras técnicas de diagnóstico rutinario, las cuales dependen de la integridad del tejido y donde las muestras que se encuentran en estado de descomposición pueden conducir a falsos negativos (Aravindh Babu, Monoharan, Ramadass, & Chandran, 2012; Szanto, Nadin Davis, Rosatte, & White, 2011).

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVOS GENERALES

Determinar la presencia del virus de la rabia en quirópteros en el Departamento del Tolima.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar el virus de la rabia en muestras de cerebro de quirópteros mediante las técnicas de RT-PCR y PCR semianidado
- Identificar especies de quirópteros en algunas regiones del Tolima asociadas a la presencia del virus.
- Preservar tejidos de quirópteros positivos al virus de la rabia como herramienta para diagnóstico e investigación de la rabia.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 EL VIRUS DE LA RABIA

El virus de la rabia es un virus de ARN perteneciente al orden *Mononegavirales* (Calisher & Ellison, 2012), género *Lyssavirus* de la familia *Rhabdoviridae* (Jackson, 2013). El cual posee forma de bala y mide 75 nm de diámetro y 200 nm de largo (J. G. Williamson, 2010). La familia *Rhabdoviridae* incluye 14 especies acorde a su secuencia genómica, estas especies son: Virus de la rabia (VRAB), Virus de murciélago de los Lagos (LBV), *Mokola virus* (MOKV), *Duvenhage virus* (DUVV), *European bat lyssavirus type 1* (EBLV1), *European bat lyssavirus type 2* (EBLV2), *Australian bat lyssavirus* (ABLV), *Aravan virus* (ARAV), *Khujand virus* (KHUV), *Irkut virus* (IRKV), y *West Caucasian bat virus* (WCBV) *Bokeloh bat lyssavirus* (BBLV), *Ikoma Lyssavirus* (IKOV) y *Shimoni bat virus* (SHIBV). Nueve de las catorce especies de la rabia (DUVV, EBLV1, EBLV2, ABLV, ARAV, KHUV, IRKV, WCBV y BBLV)) han sido aislados en murciélagos insectívoros.

Los miembros del genero *Lyssavirus* fueron divididos en tres filogrupos (I, II y III). El Filogrupo I incluye VRAB, DUVV, EBLV1, EBLV2, ABLV, ARAV, KHUV, IRKV y BBLV (Jackson, 2013; Kuzmin et al., 2010). Filogrupo II incluye LBV y MOKV y SHIBV (Kuzmin et al., 2011) y el Filogrupo III compuesto por WCBV y IKOV (Kuzmin et al., 2010).

El genoma del virus de la rabia consiste aproximadamente de 12 kb de una cadena simple no segmentada de ARN (Sato et al., 2005), que codifica cinco proteínas estructurales: la proteína de la nucleocápside (N), una fosfoproteína (P), proteína de la matriz (M), glicoproteína (G) y un ARN- dependiente de RNA polimerasa (L) en su orden 3'-N-P-M-G-L-5' (Craig Greene, 2012). A pesar de conocer la estructura del virus , no se han establecido parámetros clínicos que permitan diferenciar la enfermedad causada por las diferentes especies de Rhabdovirus (Scheffer et al., 2014).

2.2 RABIA, LA ENFERMEDAD

La rabia se representa como una enfermedad neuro-invasiva caracterizada por encefalitis aguda que consta de una fase de incubación, fase prodrómica y una fase neurológica aguda que concluyendo en la muerte del individuo. La enfermedad posee dos manifestaciones clínicas, una forma furiosa (encefálica) y una forma parálitica (Fooks et al., 2017). La rabia furiosa es la forma más común en la rabia humana, presentándose casi en el 80% de los casos. La rabia parálitica se caracteriza por parálisis flácida en el miembro mordido, que asciende simétrica o asimétricamente, mientras que la rabia furiosa manifiesta hiper-excitabilidad, disfunción autonómica, hidrofobia y aerofagia (Hemachudha et al., 2013; Leung, Davies, & Ellis Hon, 2007).

La rabia es endémica en todos los continentes. El virus clásico tiene una distribución mundial, con excepción de unas pocas naciones insulares, como Gran Bretaña, Irlanda, Nueva Zelanda y Hawái, los continentes de Australia, la Antártica, la Antártida y un número creciente de países de Europa Occidental (Tabla 1) (Black, Lowings, Smith, Heaton, & McElhinney, 2002). La rabia es una enfermedad fatal invariable, particularmente cuando los signos clínicos se han desarrollado. Los animales rabiosos comúnmente muestran cambios neurológicos como agitación, agresividad, confusión mental, hidrofobia, sialorrea, paraparesis y tetraparesia (Mendes et al., 2009).

En Latinoamérica la rabia es clasificada en dos formas epidemiológicas, rabia urbana y silvestre. El murciélago vampiro común (*Desmodus rotundus*) es conocido como el principal reservorio del VRAB a lo largo del área de distribución natural de la especie, desde México hasta América del Sur. El *D. rotundus* se correlacionó con la variante murciélago vampiro del VRAB, la cual es más prevalente que la variante del perro del VRAB en Perú, sin embargo, la prevalencia de cualquier variante del virus de la rabia puede depender de los planes de vacunación locales o regionales contra el virus (Condori Condori et al., 2013).

Tabla 1. Países libres de rabia en el mundo.

Región	Países / Localidades
Africa	Islas Canarias, Cabo Verde, Mayotte, Islas Madeira, Reunión, Santa Helena.
Americas y el caribe	Anguila, Antigua y Barbuda, Argentina, Aruba, Isla Ascensión, Bahamas, Barbados, Bermudas, Islas Vírgenes Británicas, Islas Caimán, Chile, Costa Rica, Dominica, Isla de Pascua, Islas Malvinas, Islas Galápagos, Guadalupe, Jamaica, Martinica, Montserrat, Antillas Holandesas, San Cristóbal y Nieves, Santa Lucía, San Martín, San Vicente y las Granadinas, Georgia del Sur y Sandwich del Sur, Trinidad y Tobago, Islas Turcas y Caicos, Uruguay, Islas Vírgenes británicas y estadounidenses.
Asia y Medio Oriente	Territorio británico del Océano Índico, Chipre, Hong Kong, Japón, Macao, Maldivas, Singapur.
Europa	Albania, Andorra, Austria, Azores, Islas Baleares, Bélgica, Cabrera, Islas del Canal, Córcega, República Checa, Dinamarca, Estonia, Islas Feroe, Finlandia, Formentera, Francia, Alemania, Gibraltar, Ibiza, Islandia, Irlanda, Isla de Man, Italia, Letonia, Liechtenstein, Luxemburgo, Mallorca, Malta, Menorca, Mónaco, Países Bajos, Noruega (excepto Svalbard), Portugal, San Marino, España (excepto Ceuta y Melilla), Suecia, Suiza, Reino Unido.
Oceanía	Samoa Americana, Australia, Isla de Navidad, Islas Cocos, Islas Cook, Fiji, Polinesia Francesa, Guam, Kiribati, Islas Marshall, Micronesia, Nauru, Nueva Caledonia, Nueva Zelanda, Niue, Isla Norfolk, Islas Marianas del Norte, Palau, Papua Nueva Guinea, Islas Pitcairn, Samoa, Islas Salomón, Tahití, Tokelau, Tonga, Tuvalu, Vanuatu, Islas Wake y las Islas del Pacífico de los Estados Unidos, Islas Wallis y Futuna.
Antarctica	Antarctica

Fuente: (Centers for Disease Control and Prevention, 2017)

2.3 PATOGÉNESIS DE LA RABIA

El VRAB puede entrar al organismo por diferentes vías tales como mordedura o arañazos de un animal rabioso, el cual puede permanecer latente cerca del sitio de inoculación durante largos períodos de tiempo.

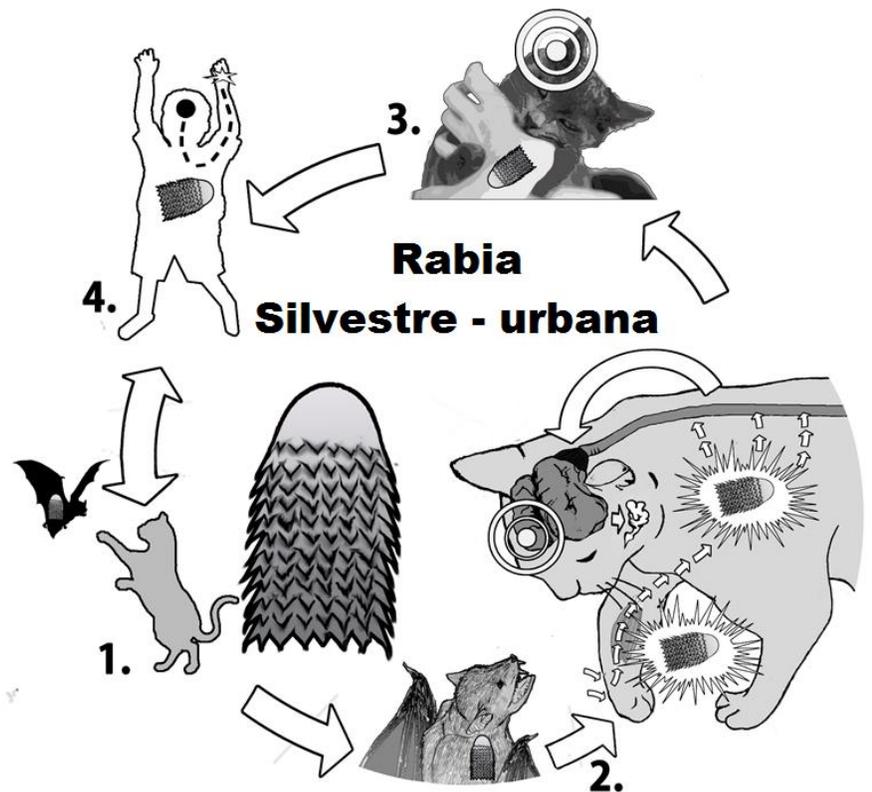
El virus se replica lentamente dentro de las células musculares, hasta que llega a la unión neuromuscular y migra al sistema nervioso central (SNC) (Leung et al., 2007). La glicoproteína viral (proteína G) es esencial para la dispersión transináptica usando los receptores de acetilcolina nicotínicos de las células en las uniones neuromusculares (Stepien, Tripodi, & Arber, 2010). El virus migra a lo largo de los nervios periféricos, en el sistema nervioso central migra a través de transporte axónico retrógrado, a una velocidad de 12 a 100 mm/día (Jackson, 2003), un proceso que se ve facilitado por la proteína viral P dentro de los axones (Dietzschold, Faber, & Schnell, 2003). En el sistema nervioso central, el virus replica en las neuronas induciendo necrosis e inflamación (McKay & Wallis, 2005). Allí el virus se distribuye a otros órganos del cuerpo, alcanzando las glándulas salivales, donde se puede encontrar el virus en altas concentraciones en la saliva, nervios periféricos y otros órganos (Craig Greene, 2012). La excreción del virus en la saliva varía según la especie. En perros se reporta que la excreción del virus en la saliva depende de la dosis inoculada y el periodo de morbilidad (intervalo entre inicio de signos clínicos y muerte del individuo). reportándose que una dosis viral alta genera un periodo de morbilidad corto (menos de un día) con baja cantidad o ausencia del virus en la glándula salival, por el contrario, perros inoculados con bajas dosis virales tendrán un periodo de incubación largo, con altos títulos virales en la glándula salival y altos niveles de excreción por la saliva. Un estudio evaluó el tiempo de excreción de la saliva en perros inoculados con dos cepas virales (Cepa etíope y cepa mexicana). En perros inoculados con la cepa etíope el tiempo de excreción del virus por saliva se inició 13 días antes del inicio de la observación de signos de la enfermedad y hasta tres días posterior a estos, por el contrario con la cepa mexicana el virus inicio la excreción por saliva siete días antes de la presentación de la enfermedad hasta dos días después de estos (Fekadu, Shaddock, & Baer, 1982).

2.4 TRANSMISIÓN

La enfermedad se transmite por lo general de un animal infectado a uno susceptible (Calisher & Ellison, 2012), por la infiltración de la saliva cargada del virus a través de la herida generada por la mordedura, arañazo o por la exposición de la saliva a la superficie de las mucosas (WHO, 2013). También se ha reportado la transmisión por inhalación de aerosoles cargados con el virus en cuevas con una alta población de murciélagos infectados (Mantilla, Sierra, Garcia, & Pradilla, 2010). Otras posibles vías de transmisión incluyen, órganos trasplantados de donantes con rabia no diagnosticada o diagnosticada erróneamente (Chen et al., 2017; Maier et al., 2010; Srinivasan et al., 2005) y la ingestión de leche no pasteurizada de vaca rabiosa, dado que la leche puede contener el virus y teóricamente es posible la transmisión por esta vía (Leedom, 2006).

Sin embargo, en el país la transmisión de la enfermedad se vincula principalmente a los gatos, que debido a su comportamiento predador, cazan murciélagos infectados, contraen la enfermedad y luego la transmiten al humano (INS, 2014) (Figura 1).

Figura 1. Conexión de la rabia silvestre al ecosistema urbano. 1. El gato caza a un murciélago infectado. 2. El gato es mordido, el virus ingresa al cuerpo a través de la herida por infiltración de saliva, y el virus se replica en los músculos periféricos cercanos a la herida y migra al SNC. En el SNC, el virus se distribuye a otros órganos, llegando finalmente a las glándulas salivales. 3. El animal rabioso muestra cambios neurológicos. 4. El animal está predispuesto a atacar a seres humanos u otros animales, infectándolos. El ciclo se repite y causa la muerte del individuo infectado.



Fuente: el autor

2.5 RABIA EN MURCIÉLAGOS

La clase *Mammalia* tiene 5.416 especies, de las cuales 1.120 pertenecen al Orden *Chiroptera* siendo el segundo grupo más grande mamíferos en el planeta (Sodré, Gama, & Almeida, 2010). Los murciélagos tienen una distribución mundial, ausentes sólo en las regiones polares y algunas islas oceánicas. La mayoría de ellos viven en regiones tropicales y subtropicales, aunque pueden ser encontrados en las regiones templadas

(Fahl et al., 2015). Se ha descrito un gran número de especies de murciélagos como reservorios del VRAB, sin embargo, destacan aquellas con hábitos alimenticios insectívoros, los cuales pueden ser encontrados en casi todas las zonas de vida, junto con otras especies de murciélagos de hábitos frugívoros y hematófagos, estos últimos se limitan a América Latina, de los cuales solo el *Desmodus rotundus* es bien conocido como reservorio del VRAB (Johnson, Ceballos, & Setien, 2014).

La mayoría de *lyssavirus* junto con el VRAB tienen murciélagos como reservorios naturales. Los quirópteros, al ser longevos y excepcionalmente sociables conviven en colonias con especies de diferentes hábitos alimenticios, permitiendo tener el virus circulando en ambiente, sometiendo los individuos de la colonia a múltiples exposiciones del VRAB a lo largo de su vida (Turmelle, Jackson, Green, McCracken, & Rupprecht, 2010). Se ha reportado que murciélagos hematófagos, frugívoros e insectívoros pueden transmitir el VRAB (Sodré et al., 2010), y según análisis filogenético, se sabe que existen variantes o linajes de virus específicos por especie, hallando linajes propios de los murciélagos insectívoros, frugívoros, hematófagos entre otros (Allendorf et al., 2012; Fahl et al., 2012)

El virus puede estar presente en diferentes tejidos de los murciélagos, y en particular su presencia está asociado con la cavidad bucal, la saliva y la grasa marrón. El VRAB fue detectado en las especies *Artibeus lituratus* (13), *Myotis nigricans* (4), *Eptesicus furinalis* (5), *Eptesicus diminutus* (1), *Lasiurus blossevillii* (1), y *Lasiurus ega* (2) a través de la técnica de hnRT-PCR en Brasil. El virus se detectó en: lengua (92% y 85%), grasa marrón (82% y 77%), pulmones (62% y 77%), corazón (42% y 77%), estómago (92% y 64%), hígado (38% y 67%), bazo (43% y 27%), vejiga (73% y 88%), riñón (77% and 38%), intestino (77% y 38%), heces (38% y 42%) de murciélagos frugívoros e insectívoros respectivamente. Cabe señalar que el virus se encontró en mayor proporción en el estómago de los murciélagos frugívoros en comparación del murciélago insectívoro, una posible razón, podría ser que los murciélagos infectados defecan sobre las frutas, que luego son comidas por los murciélagos frugívoros, ingiriendo así el virus.

Al contrario, los murciélagos insectívoros debido a sus hábitos alimenticios tuvieron una menor carga viral en estos órganos (Allendorf et al., 2012).

2.6 CASOS DE RABIA Y VARIANTES DEL VIRUS EN COLOMBIA

En Colombia el virus de la rabia se ha agrupado en tres variantes, virus colombiano variante genética I (aislado en Arauca y la región Central del país), virus colombiano variante genética II (aislado en la región del Caribe) y el tercer grupo, que consiste en virus aislados de dos especies de murciélagos insectívoros (*Eptesicus brasiliensis* y *Molossus molossus*), tres caninos domésticos y un humano. La secuenciación de su genoma indicó que los aislamientos agrupados en el tercer grupo fueron variante murciélago del VRAB y este fue el primer hallazgo que asocio a los murciélagos a la rabia en perros y en humanos en Colombia (A Páez, Núñez, García, & Bóshell, 2003). La rabia en Colombia y en otros países latinoamericanos es un problema importante para la economía y la salud pública. Esta enfermedad se categoriza como rabia urbana o silvestre, la cual tiene distintos ciclos epidemiológicos (Andrés Páez et al., 2009; Valderrama et al., 2006). La rabia urbana se transmite generalmente por el perro doméstico, quien es el principal transmisor y reservorio del virus en esta forma epidemiológica, mientras que la rabia silvestre es transmitida por los murciélagos, los cuales transmiten la enfermedad a los bovinos y equinos (A Páez et al., 2003). Las variantes silvestres de la rabia identificados en Colombia son V3 (murciélagos hematófagos), V4 (murciélago insectívoro), V5 (murciélago hematófago) y V8 (zorrillo) (Torro, Martínez, Saad, Díaz, & Vega, 2009). Un estudio que analizó un total de 124 muestras obtenidas de casos de rabia humana y 8 de otras especies de mamíferos dentro del período 1994-2005, permitió caracterizar ocho linajes genéticos (LG), LG1, LG2, LG3, LG4, LG5, LG6, LG7 y LG8 del virus de la rabia. Los análisis filogenéticos de la secuencia parcial del gen de la nucleoproteína determinaron variantes específicas dentro de esos genotipos. El LG4 comprendió la Variante (V) V3 y V8 y una variante no determinado (ND), las cuales se asociaron con murciélagos hematófagos, el LG5 y LG6 consistió en V4 virus asociados con murciélagos *Tadarida brasiliensis*, el LG5 se agrupó de forma independiente. El LG7 y LG8 segregó independientemente dentro de grupos

asociados con colonias de murciélagos insectívoros y murciélagos solitarios, no obstante, la variante es desconocida. Los virus de la rabia aislados de los humanos se agruparon en LG2, LG3 y LG4, correspondían a V1, V3, V8 y ND (Andrés Páez, Velasco Villa, Rey, & Rupprecht, 2007).

El virus de la rabia fue aislado por primera vez a partir de murciélagos en Colombia por Alarcón en 1968, quien reportó el aislamiento de dos cepas del virus de la rabia en murciélagos insectívoros y frugívoros (*Myotis nigricans*, *Lasiurus ega* y *Carollia perspicillata*) capturados en los departamentos de la Guajira, Santander y Antioquia, otras especies de murciélagos como *Glossophaga longirostris*, *Artibeus lituratus palmarum*, *Platyrrhinus helleri* (*Vampyrops helleri*), *Trachops cirrhosus cirrhosus*, *Peroptexys kappleri*, *Phyllostomus hastatus*, *Sacopexis bilineata* y *Molossus molossus*, fueron negativas a la presencia del virus (Alarcon, Osorio, Bernal Cubides, & Lleras Pizarro, 1968).

El perro y el *Desmodus rotundus* son los dos principales reservorios y vectores del virus de la rabia en Colombia, no obstante los murciélagos insectívoros han sido descritos como vectores del virus (Andrés Páez et al., 2007). Las V3 y V4 del virus de la rabia tienen mayor prevalencia en Colombia, y esta situación parece estar influenciada por el aumento en la deforestación que obliga a los murciélagos a hospedarse en zonas urbanas, cuyas estructuras le brindan refugio, causando las interacciones más frecuentes entre humanos y murciélagos, e incrementando el riesgo de transmisión de la enfermedad (Núñez, Bonelo, Hernández Rojas, Zapata Osorio, & Torres Valencia, 2010). En el norte de Colombia, la V4 asociado a los murciélagos frugívoros e insectívoros, se aisló de un perro y un humano (A Páez, Saad, Núñez, & Bóshell, 2005).

En la zona Urbana de Cali, las especies *Carollia perspicillata*, *Artibeus lituratus*, *Eptesicus brasiliensis*, *Myotis nigricans*, *Molossus molossus*, y *Tadarida brasiliensis* fueron reportadas como transmisores del virus de la rabia en el periodo comprendido entre diciembre del 2000 a junio del 2002 (Alberico, Saavedra R, & García Paredes, 2005). El Instituto Nacional de Salud de Colombia ha reportado un número considerable

de casos de rabia silvestre transmitida por murciélagos desde el año 2000. Un total de treinta y cinco casos de rabia humana, veintidós de esos casos fueron transmitidos por murciélagos, ocho por gatos, y cinco por perros. En cuanto a las variantes del virus, dos eran variante VA (atípica), cinco V1 (perros domésticos y salvajes, mangostas y coyotes), veinticuatro V3 (murciélago hematófago), tres V4 (murciélago insectívoro), y uno de los casos V8 (zorrillo) (INS, 2014). Se reportan brotes del VRAB en gran magnitud en Bajo Baudo, Chocó, donde se estableció *al Desmodus rotundus* como el principal causante del VRAB silvestre (Valderrama et al., 2006).

Los brotes de rabia causados por variantes V3 también se han registrado en San Luis de Palenque, Casanare, Floridablanca, y Santander (INS, 2014), En Santander de Quilichao, Cauca, se reportó la transmisión de la rabia al humano por mordedura de gato, el cual actuó como vínculo entre la rabia silvestre y el ecosistema urbano (Paez et al., 2009). Los gatos por lo general se infectan por contacto con murciélagos debido a su comportamiento depredador (Figura 8) (Andrés Páez et al., 2009) y en Encino y Piedecuesta, Santander, se reportaron otros dos casos de rabia humana causada por la V3 transmitida por gato y un murciélago hematófago, respectivamente. Los brotes de rabia causados por la V4 fueron reportados en Roldanillo, Valle del Cauca y en Moniquirá, Boyacá, donde se identificó el murciélago insectívoro *Tadarida brasiliensis* como principal reservorio (Núñez et al., 2010). En Barrancabermeja, Santander un brote fue causado por la VA. La VA del virus de la rabia de origen silvestre también fue responsable de la muerte de un niño que estuvo en contacto con un gato en el municipio de San Luis, Tolima en el 2010 (INS, 2014). En la tabla 2 se listan las especies de murciélagos, de las cuales se ha aislado y/o detectado el virus de la rabia en Colombia.

Tabla 2. Especie y ecología de quirópteros positivos al VRAB en Colombia.

Especie	Ecología	Referencia
<i>Carollia perspicillata</i>	Frugívoro	(Alarcon et al., 1968)
<i>Myotis nigricans</i>	Insectívoro	(Alarcon et al., 1968)
<i>Lasiurus ega</i>	Insectívoro	(Alarcon et al., 1968)

Especie	Ecología	Referencia
<i>Eptesicus braziliensis</i>	Insectívoro	(Andres Páez, Nuñez, García, & Boshell, 2003)
<i>Desmodus rotundus</i>	Hematófago	(Mendes et al., 2009; Paez et al., 2009)
<i>Phyllostomus hastatus</i>	Frugívoro- insectívoro	(Núñez et al., 2010)
<i>Uroderma bilobatum</i>	Insectívoro	(Núñez et al., 2010)
<i>Molossus molossus</i>	Insectívoro	(Núñez, Páez, Hernández, Escobar, & Bonelo, 2012)

2.7 DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE LA RABIA

La rabia siempre debe ser confirmada por pruebas de laboratorio, realizando una necropsia y tomando muestras de tejido del sistema nervioso central, retiradas del cráneo (McElhinney, Marston, Brookes, & Fooks, 2014). El diagnóstico del virus se lleva a cabo mediante la detección de antígenos virales y anticuerpos en contra del virus, detección del virus en tejidos, ácidos nucleicos virales, amplificación de partículas del virus o pruebas serológicas (Jackson, 2011).

2.7.1 Prueba de inoculación en ratón (*mouse inoculation test (MIT)*): Consiste en inocular en ratones via intracerebral, un sobrenadante clarificado homogeneizado de un 10 a 20% (p/v) de material cerebral (incluyendo tronco cerebral, corteza, asta de Ammón, tálamo y bulbo raquídeo) en una solución isotónica bufferada con antibióticos. Se inoculan grupos de 3 a 10 ratones, de 3-4 semanas de edad, y un peso corporal entre 12-14 g. Los ratones son observados por 28 días, cada ratón muerto se examina y se evalúa, buscando detectar el VRAB, por medio de las técnicas descritas para su detección. En el caso de ratones recién nacidos, estos pueden ser evaluados en los días 5, 7, 9 y 11 post inoculación. Cualquiera muertes que se produzca durante los primeros 4 días se consideran como no específica debido al estrés y/o infección bacteriana (OIE, 2013).

2.7.2 Prueba de inmunofluorescencia (*fluorescent antibody test (FAT)*): Es la prueba diagnóstica más utilizada para la detección del virus de la rabia, y es considerada por la OMS y la OIE como la prueba *Gold standard* la cual puede ser utilizada directamente en un frotis. La prueba utiliza inmunoglobulinas purificadas previamente conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC), que se añade a un frotis de tejido cerebral fijado con acetona, preferiblemente hecha de varias partes del sistema nervioso central. FAT proporciona un diagnóstico fiable en 98 a 100% de los casos de todas las cepas del VRAB si se usa un potente anticuerpo conjugado. En los casos de resultados no concluyentes de la FAT, se puede utilizar en conjunto con MIT o cultivo celular para mejorar los resultados, sin embargo, muestras de tejidos descompuestos no deben utilizarse (Wacharapluesadee et al., 2012). FAT se puede aplicar en las secciones frescas o congeladas de tejidos del cerebro, con resultados muy similares (sensibilidad 99,8% y 100% de especificidad) cuando se aplica a tejidos frescos o fijados con formalina (Whitfield et al., 2001).

2.7.3 PCR de transcripción reversa (RT-PCR): Esta técnica se ha descrito como una herramienta sensible y específica para propósitos como el diagnóstico rutinario del VRAB (Aravindh Babu et al., 2012). Consiste en la utilización de una transcriptasa reversa para sintetizar una copia de ADN complementario a partir del ARN viral, seguido del uso de la PCR convencional para amplificar un fragmento del gen del virus (Sambrook & Russell, 2001).

La técnica se puede utilizar para detectar el virus de la rabia en muestras descompuestas que llegan a menudo para su diagnóstico, debido al deterioro por el clima y fluctuaciones en la temperatura durante el transporte y almacenamiento (Biswal, Ratho, & Mishra, 2007). Los resultados positivos en este tipo de muestras son fiables, pero los resultados negativos pueden no ser válidos (McElhinney et al., 2014).

En un estudio al comparar el RT-PCR y el MIT para la detección de virus de la rabia en 95 muestras positivas que se almacenaron durante 4-13 años a -20 y -80 °C, reveló que sólo 32 (33,6%) de las muestras fueron positivas con la prueba de inoculación en ratón,

en cambio el RT-PCR detectó el genoma viral en 62 muestras (65,3%). Las muestras que se almacenaron por un periodo mayor a 10 años dieron 59,7% de positividad por RT-PCR y sólo un 22,1% por el MIT (Cardoso Lopes, Rossignolo Venditti, & Queiroz, 2010).

2.7.4 RT-PCR semianidado (hnRT-PCR): Es una de la técnica más sensible y rápidas para el diagnóstico de la rabia. El método se puede aplicar en animales vivos y muestras recogidas post mortem cuando el cerebro se encuentra en un estado de descomposición. Esto no sólo proporciona la detección rápida de virus, sino que también ofrece el material necesario para la secuenciación de los productos de PCR y la identificación del origen de la cepa y otros análisis epidemiológicos (Smreczak, Orłowska, Trębas, & Żmudziński, 2008). Estudios recientes han desarrollado primers que permiten la tipificación específica de variantes antigénicas del VRAB a partir de la amplificación de fragmentos invariables del gen N mediante el uso de PCR semianidado o PCR en tiempo real, siendo una alternativa a la tipificación rutinaria a partir de la identificación de anticuerpos producidos por el individuo infectado, por medio del test de anti cuerpos fluorescente indirecto (Bastida, Ramírez, Chavira, Lara, & Zárate, 2016).

2.7.5 PCR en tiempo real: Es una prueba alternativa que ha demostrado ser más sensible que la hnRT-PCR y se puede utilizar para ampliar aún más los límites de detección de ARN del VRAB (Fooks et al., 2009). Esta técnica permite evaluar el análisis de la expresión génica, la determinación de la carga viral y la detección de organismos genéticamente modificados (Hoffmann et al., 2009). En esta técnica los primers están diseñados de tal manera que se genera una señal fluorescente sólo cuando estos se incorporan en un producto de amplificación. La detección de secuencias diana se produce mediante el monitoreo de la fluorescencia generada por los fluoróforos intercalados o primers marcados con fluoróforos y usados como sondas específicas (Nazarenko, Bhatnagar, & Hohman, 1997). Este ensayo tiene una sensibilidad y especificidad extrema que le permite la amplificación y cuantificación simultánea de secuencias específicas de ácidos nucleicos haciéndolo excepcional para el diagnóstico de este agente infeccioso (Espy et al., 2006; Nazarenko et al., 1997). La PCR en tiempo

real se comparó con RT-PCR convencional para analizar muestras de saliva de 21 pacientes sospechosos y se encontró que la sensibilidad fue superior (75% vs. 37%) a la ofrecida por RT-PCR (Nagaraj et al., 2006).

2.7.6 Enzimoimmunoensayo (*enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)*): El ELISA es la prueba diagnóstica más utilizada para la rabia, la cual mide inmunoglobulinas específicas, tales como IgM. Consiste en la detección de anticuerpo neutralizantes del VRAB en muestras de suero tomadas del animal sospechoso (Jackson, 2011). La prueba reduce el tiempo, facilita la manipulación y evita el uso de laboratorios con nivel de bioseguridad 2 o 3, no requiere del virus vivo o cultivos celulares y puede ser automatizado. La prueba fue desarrollada para carnívoros domésticos y silvestres y es la única técnica certificada y recomendada por la OIE para la detección del VRAB. Sin embargo, aunque esta prueba puede tener el 100% de especificidad, la sensibilidad estuvo alrededor del 78,2% cuando se evaluaron 593 muestras de carnívoros domésticos (Wasniewski et al., 2013, 2014).

2.8. PREVENCIÓN

La OMS indica que la principal estrategia para la prevención, control y eliminación de la rabia es la vacunación preventiva en los perros y otros animales domésticos. Esta inmunización previa a la exposición puede también ser usada en personas que viven en zonas con alto riesgo de exposición como en zonas rurales o individuos involucrados en actividades como ciclismo, acampar, senderismo y para aquellos que trabajan con el virus de la rabia u otros lyssavirus, o personas involucradas en cualquier actividad que pudiera llevarlos profesionalmente o no a estar en contacto directo con murciélagos, carnívoros y otros mamíferos que puedan ser posibles transmisores del virus (WHO, 2016).

La rabia es una enfermedad que puede prevenirse en un 100% con la vacunación (WHO, 2016). El biológico debe cumplir con los requisitos establecidos por la OIE, protegiendo contra todas las variantes del VRAB, exceptuando MOKV y LBV que generan poca o

ninguna protección cruzada. La OIE define la vacuna contra la rabia como una formulación estándar que contiene una cantidad definida de inmunógenos que deben conferir inmunidad protectora durante al menos 1 año y su uso debe ser determinado de acuerdo a la especie animal a inmunizar.

Hay dos tipos de presentaciones de las vacunas contra la rabia, la forma inyectable indicada para su uso en animales domésticos y la forma oral para los animales salvajes y silvestres que no pueden ser físicamente alcanzados (OIE, 2008). La vacunación oral de la fauna silvestre contra la rabia, ha demostrado ser eficaz para eliminar la enfermedad en varios países europeos (Wasniewski et al., 2013).

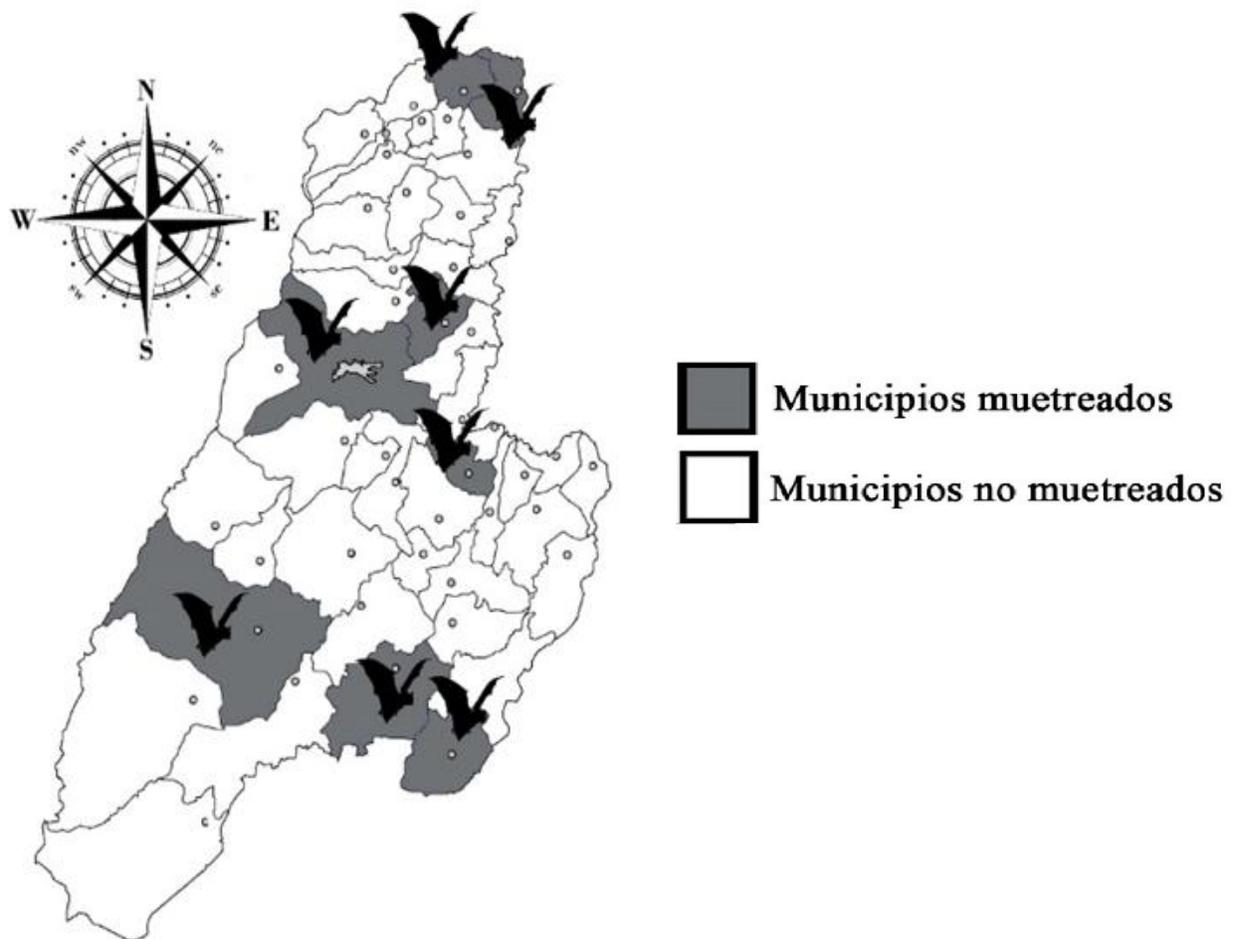
En el caso de un potencial ataque de un animal rabioso, se debe informar inmediatamente a las autoridades sanitarias competentes para iniciar una investigación apropiada (estudio del foco, vacuna antirrábica de perros y gatos de la zona, observación del animal sospechoso, toma y envío de muestras, vigilancia activa institucional). Se recomienda evitar los animales silvestres como mascotas y no manipular o interactuar con animales sospechosos de portar la enfermedad (perros, gatos, ganado vacuno) o manipular quirópteros que se encuentren en el suelo o presenten un comportamiento anormal (Ministerio de salud y protección social, 2014). Las autoridades competentes de cada país deben contar con un sistema de vigilancia activa y programas de vacunación apropiada en las zonas con alto riesgo de exposición a la enfermedad. (OIE, 2008) y en el caso de que una persona no vacunada, sea mordida por un animal rabioso, al individuo se le debe administrar inmunoglobulina antirrábica post exposición (Leung et al., 2007).

3. METODOLOGÍA

3.1 UBICACIÓN

La figura 2 muestra la localización de los diferentes municipios del departamento del Tolima donde se llevó a cabo el muestreo de quirópteros. Los predios muestreados fueron aquellos donde sus propietarios solicitaron el servicio de control de murciélagos hematófagos, por la presentación de mordeduras en animales del lugar.

Figura 2. Localización de los municipios del Departamento del Tolima incluidos en la detección del virus de la rabia en murciélagos del medio natural.



Fuente: el autor

3.2 TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de la muestra se estimó a través de la fórmula descrita previamente (Thrusfield, 2005) con un nivel de confianza del 95%, una precisión o error del 5% y una prevalencia esperada del 5% (Nuñez et al., 2008).

$$n = \frac{Z^2 x p x q}{d^2}$$

Dónde:

z² = coeficiente del nivel de confianza prefijado (1.96², nivel de confianza de 95%)

p = proporción esperada (en este estudio 5% = 0.05)

q = 1- p

d= precisión (en este estudio un 5%; 0.05)

Así, el tamaño de la muestra obtenida a través de dicha fórmula fue de 73, no obstante, para efectos de este trabajo y garantizar una muestra representativa, se tomaron en total 91 quirópteros.

3.3 MUESTREO

El muestreo se llevó a cabo en diferentes municipios del Tolima, durante el periodo comprendido entre el mes de septiembre del 2014 y el mes de marzo del 2017. Se recibió acompañamiento y supervisión de la actividad por parte de funcionarios del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y se abordaron los predios que fueron previamente afectados por mordedura de murciélago en animales domésticos, cuyos propietarios solicitaron al ICA el servicio de control de murciélagos vampiros. Para la captura se procedió a seleccionar un lugar sin presencia de árboles que permitiese hacer un corral provisional, donde se instalaron las redes de niebla a su alrededor.

En dicho corral los animales mordidos debían pasar tres noches, cebando los murciélagos, para que el día de la captura se tuviera certeza de su presencia. El día de la captura los animales se encerraban en horas de la tarde, cuando aún había luz del día, se limpiaba el área al rededor del corral entre 1 y 3 m fuera de este, evitando cualquier basura o rama que pudiese enredarse con las redes de niebla. Las redes se ubicaron a 1 o 1,5 m alrededor del corral, procurando que cubriesen todos los flancos por donde pudiesen ingresar los quirópteros. Una vez oscurecía, se extendían las redes a ras de suelo y se elevaban hasta aproximadamente 2 m de altura, buscando que los cordones longitudinales quedasen tensos y la red formase bolsillos en dirección al corral. Las redes se revisaban cada 30 min y una vez capturado un individuo, este se retiraba de la red evitando lastimarlo (Figura 3) y se colocaba en una jaula diferente según sus hábitos alimenticios (frugívoro, insectívoro, hematófago, carnívoro, nectarívoros), en su defecto sacos de tela. Las redes se recogían a las 12:00 am o según el calendario lunar (ICA, 2004).

Figura 3. Captura de un ejemplar de la especie *Saccopteryx bilineata* con una red de niebla en el municipio de Mariquita, Tolima.



Fuente: el autor

Dado el caso que fuese en un refugio, los animales eran ahuyentados, esperando que quedaran atrapados en redes estratégicamente posicionadas, de allí, éstos eran aislados e introducidos en sus respectivas jaulas.

Figura 4. Captura en refugio en puente de cataratas de medina Mariquita, Tolima.



Fuente: el autor

Figura 5. Refugio ubicado en el municipio de Alvarado, Tolima.



Fuente: el autor

De los individuos capturados, se tomaron murciélagos hematófagos, frugívoros e insectívoros, los cuales se transportaban hasta el laboratorio de biología molecular de la Universidad de la Tolima.

Figura 6. Jaula plegable de contención para quirópteros.



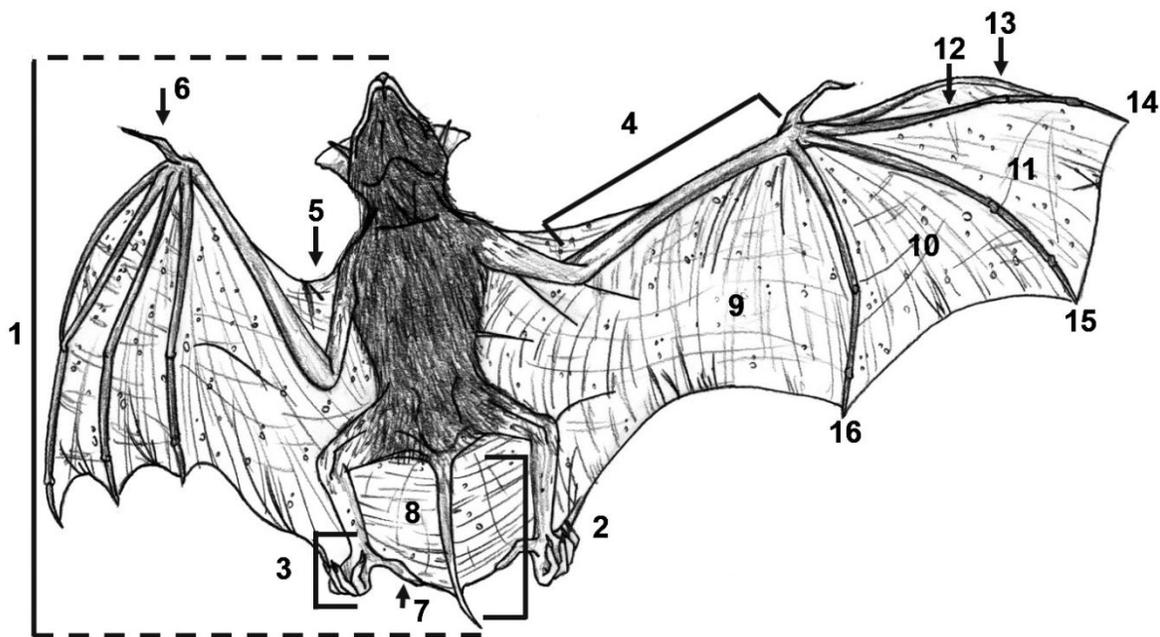
Fuente: el autor

3.4 IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES.

Para la identificación de las especies se utilizaron descripciones y claves dicotómicas basándose en medidas morfométricas tomadas de los individuos con un calibrador de vernier (Fernández, Guerrero, Lord, Ochoa, & Ulloa, 1988; Gardner, 2007). Entre los parámetros morfológicos se obtuvieron datos de longitud total, longitud de cola, oreja, trago, hoja nasal, antebrazo, envergadura, pata con uña, pata sin uña y calcáneo.

Se clasificaron según sus hábitos alimenticios: frugívoro (F), insectívoro (I), hematófago (H), carnívoro (C), nectarívoros (N) (Soriano, 2000) además fueron identificados con su respectivo código de inclusión en el estudio (H01, H02, H03, I04, F05...).

Figura 7. Diagrama de medidas morfométricas de un murciélago. 1. Longitud cabeza cola, 2. Longitud de cola, 3. Longitud de pie, 4. Antebrazo, 5. propatagio, 6. poléz, 7. calcar, 8. uropatagio, 9. plagiopatagio, 10. dactilopatagio, 11. dactilopatagio mayor, 12. dactilopatagio menor, 13. segundo dedo, 14. tercer dedo, 15. cuarto dedo, 16. quinto dedo.



Fuente: el autor

3.5 SACRIFICIO Y PROCESAMIENTO

Los individuos fueron sacrificados de acuerdo a los lineamientos del ICA, donde se procedió a un aturdimiento a bajas temperaturas. En general los quirópteros fueron recibidos en su gran mayoría muertos congelados (ICA, 2004). Los quirópteros que arribaron vivos al laboratorio fueron sacrificados mediante inhalación de éter y posteriormente se tomaban los respectivos datos morfométricos, se proseguía con la disección del cráneo, separando lo de articulación atlanto-occipital y realizando un corte

longitudinal sobre este con una hoja de bisturí quirúrgico N° 24 separando el cráneo a la mitad (Figura 8), una mitad se fijó en formalina bufferada al 3,7 % y de la otra mitad se tomaba una pequeña porción de la medula oblonga (aproximadamente 0.3 - 0.5 mm x 0.3 mm)) la cual se introducían en 250 μ L de reactivo Trizol™ (Invitrogen) para la extracción de ARN total.

Figura 8. Corte longitudinal sobre cráneo de murciélago, para la obtención de los hemisferios cerebrales.



Fuente: el autor

3.6 EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL

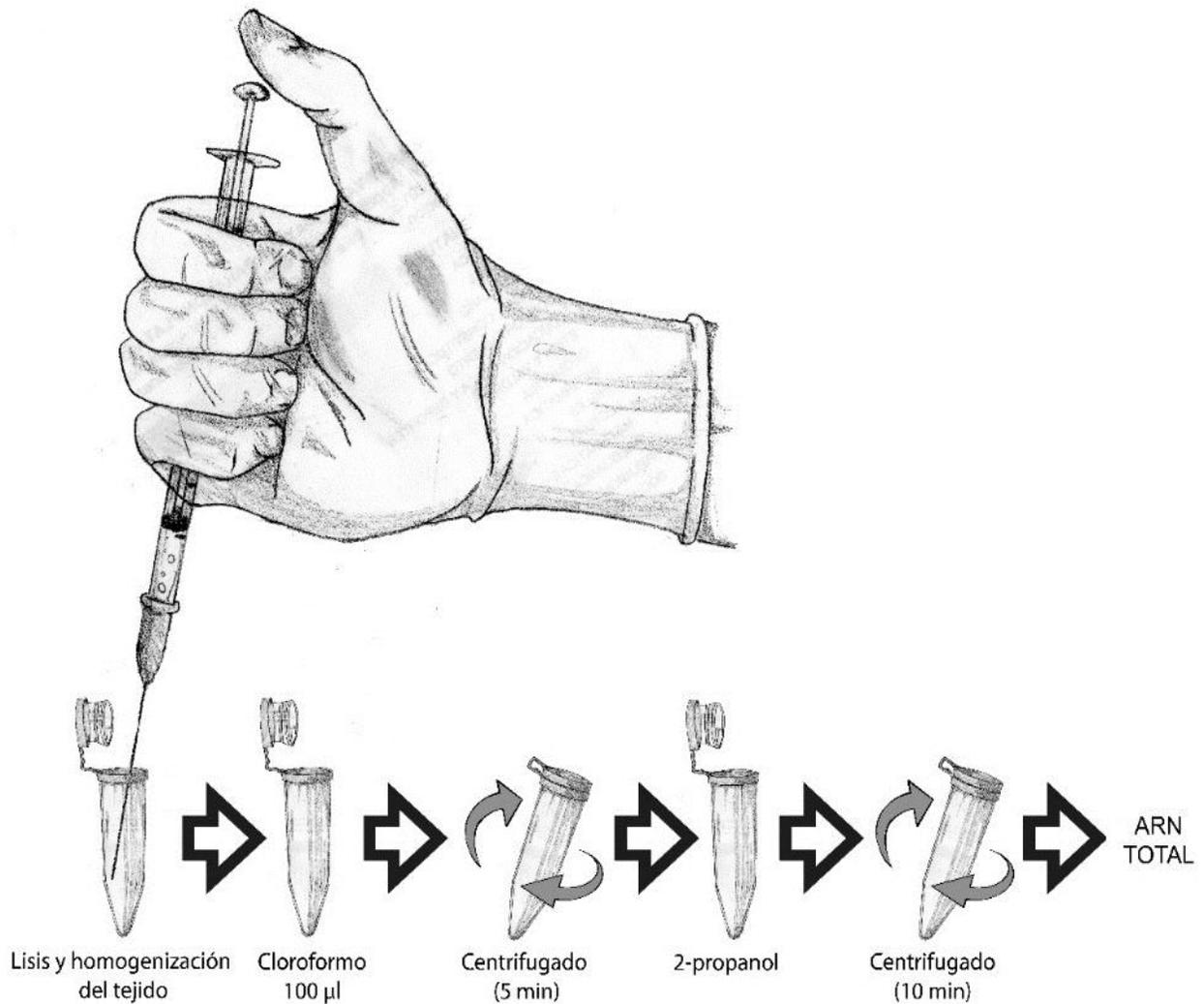
El ARN total se extrajo por medio del reactivo TRizol™ (Invitrogen, USA) dispensando 250 μ L de reactivo en un tubo microtubo de 1.5 -2 mL, en el cual se introducía el fragmento de tejido aproximadamente de 0.3 - 0.5 mm x 0.3 mm de diámetro, homogenizándose el tejido con una jeringa de insulina acoplada a una aguja calibre 21,

succionando el Trizol™ y lisando el tejido con la aguja. Una vez homogenizado se adicionaba 250 µL de Trizol™ y se continuaba hasta su completa homogenización.

El tejido homogenizado en Trizol™ se incubó a temperatura ambiente por 15 min y posteriormente se adiciono 100 µL de cloroformo (causa la desnaturalización de las proteínas volviéndolas solubles en la fase orgánica o interface, mientras que los ácidos nucleicos permanecen en la fase acuosa), y se procedió a mezclar vigorosamente el contenido del tubo, seguido de incubación por otros 5 min a temperatura ambiente.

La suspensión del tejido en Trizol™ + Cloroformo fue centrifugada a 12.000 rpm por 5 min a 4 °C, y el sobrenadante fue colectado en un nuevo vial, rotulados con su respectiva identificación. Posterior a esto se adiciono un volumen igual de 2-propanol y se incubó por 10 min a temperatura ambiente o en su defecto a -20 °C. para precipitar los ácidos nucleicos, seguido de una centrifugación a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C. El pellet fue lavado con 75% etanol (EtOH) preparado con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), el cual reacciona con residuos de histidina de las proteínas e inactivan las RNAsas. El pellet de ácidos nucleicos se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió en 30 µL dDW (*double distilled water*-agua doble destilada), y se almacenó a -20 °C para su conservación y posterior utilización. La concentración de ARN fue cuantificada por medio de un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). En las muestras donde se observó contaminación con ADN, se repetía todo el proceso de extracción con TRIzol™ (Figura 9).

Figura 9. Proceso de extracción de ARN total por el método de Tiocianato de Guanidinio - Fenol - Cloroformo.



Fuente: el autor

3.7 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc). PCR CON TRANSCRIPTASA REVERSA (RT-PCR)

El ADNc se sintetizó a partir de 5 µg de RNA total junto con 1 µl de 50 µM Oligo(dT)20, 1 µl de 10 mM dNTP mix y 10 µl de H₂O DEPC mezclados en un vial de 0,5 ml, la mezcla se incubó a 65°C por 5 min y se llevó a cama de hielo por 1 min.

Se preparó la *cDNA Synthesis Mix* mezclando 2 μ l de 10X RT buffer, 4 μ l de 25 mM MgCl₂, 2 μ l 0.1 M DTT, 1 μ l RNaseOUT™ (40 U/ μ L) y 1 μ l de SuperScript® III RT (200 U/ μ L), de esta mezcla se agregaron 10 μ L al tubo de RNA de la primera mezcla, se homogenizaron gentilmente y se hizo una breve centrifugación, se llevó a incubación por 50 min a 50°C y se terminó la reacción a 85°C por 5 min seguido de cama de hielo. Se colecta todo el producto de la reacción después de un breve centrifugado y se agrega al tubo un 1 μ L de RNase H seguido de incubación a 37°C por 20 min. El ADNc se almacena a -20°C para su posterior uso en un PCR (Invitrogen, 2013).

3.8 PCR SEMIANIDADO (hnRT-PCR.).

Una primera amplificación se llevó a cabo con 2,5 μ l de ADNc agregándole 0,2 mM de cada dNTP, 25 pmols de primers P510, 25 pmols de primers P942, 1,5 mM de MgCl₂, 1 x PCR, 1,25 unidades de *Taq DNA Polymerase* 5U/ μ l (Invitrogen™) y agua ultra pura, completando un volumen final de 50 μ l (Soares et al., 2002). La amplificación se realizó en un termociclador BioRad T100™, tomándose las siguientes condiciones de los ciclos para la amplificación primaria: calentamiento inicial a 95 ° C / 3 min, 35 ciclos a 94 ° C / 30 seg, 55 ° C / 30 seg, 72 ° C / 30 seg y una etapa de extensión final a 72°C 5 minutos (Araújo, Langoni, Almeida, & Megid, 2008).

La amplificación del PCR semianidado se realizó en 2,5 μ l del producto de la primera amplificación como template junto con los primers P510 y P784, con los mismos ciclos térmicos descritos.

Los productos de PCR se corrieron en electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE estándar teñido con bromuro de etidio. Se observaron los geles bajo luz UV y se fotografiaron mediante GDS, buscando observar un resultado positivo en forma de una banda brillante de un tamaño esperado de 606 bp (*1st amplificación*) y 586 bp (*2nd amplificación*)(Rupprecht & Nagarajan, 2015).

Se utilizó el gen *housekeeping* β -Actina como control positivo y de calidad del ADNc.

Tabla 3. *Primers utilizados en la detección del virus de la rabia*

PCR	PRIMER	SECUENCIA	POSICIÓN	PRODUCTO
TRANSCRIPTASA REVERSA	P510-F	ATA GAG CAG ATTTTC GAG ACA GC	510-531	455pb
	P942-R	CCC ATA TAA CAT CCA ACA AAG TG	965-942	
(Soares et al., 2002)				
SEMIANIDADO	P510-F	ATA GAG CAG ATTTTC GAG ACA GC	510-531	299pb
	P784-R	CCT CAA AGT TCT TGT GGA AGA	805-784	
(Soares et al., 2002)				
CONTROL +	β -Actina-F	TGC GTG ACA TCA AGG AGA GAA G		299pb
	β -Actina-R	TGC CAG GGTA CAT TGT GGTA		

4. RESULTADOS

4.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE QUIRÓPTEROS

Las especies identificadas en el estudio se consolidan en la tabla 3, los parámetros morfológicos en la tabla 4. Las especies encontradas en el estudio y aquellas que han sido reportadas como reservorios más probables del VRAB (*Tadarida brasiliensis*) fueron ilustradas detalladamente, con el fin de crear material didáctico para su fácil identificación por parte de los habitantes de la región figuras 9-16.

Tabla 4. *Especies de quirópteros capturados en este estudio.*

Espece	Cantidad	Machos	Hembras
<i>Desmodus rotundus</i>	12	7	5
<i>Molossus ater</i>	3	2	1
<i>Artibeus lituratus</i>	2	1	1
<i>Platyrrhinus dorsalis</i>	13	5	8
<i>Molossus molossus</i>	6	3	3
<i>Saccopteryx bilineata</i>	4	0	4
<i>Saccopterix leptura</i>	5	2	3
<i>Myotis nigricans</i>	3	1	2
<i>Carollia perspicillata</i>	17	6	11
<i>Artibeus jamaicensis</i>	14	8	6
<i>Phyllostomus hastatus</i>	11	4	7
<i>Saccopterix sp</i>	1	0	1
Total	91	39	52

Tabla 5. Parámetros morfométricos de quirópteros capturados en el departamento del Tolima (periodo 2014-2016).

<i>Especie</i>	<i>Sexo</i>	<i>1*</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>W</i>	<i>Origen</i>
<i>D. rotundus</i>	M										Mariquita / los cauchos
<i>D. rotundus</i>	M										
<i>D. rotundus</i>	H										
<i>M. ater</i>	M										
<i>A. lituratus</i>	H										Chaparral/ vereda queso
<i>P. dorsalis</i>	H										
<i>D. rotundus</i>	H										
<i>D. rotundus</i>	M										
<i>D. rotundus</i>	M										Chaparral
<i>M. ater</i>	H										
<i>A. lituratus</i>	M	87		13	7	0,7	72	485	14		
<i>M. molossus</i>	M	65	37	8	4		38	282	9		
<i>S. bilineata</i>	H	52	5	11	3		38	279	10		Chaparral
<i>S. leptura</i>	H	45	5	10	3		37	262	9		
<i>S. bilineata</i>	H	46	4	10	4		42	260	8		
<i>S. leptura</i>	H	48	4	12	3		44	240	6		
<i>P. dorsalis</i>	H	85	9	23	9	16	73	495	18	92,8	Chaparral
<i>S. bilineata</i>	H	55	7	11	4		44	270	8	7,7	
<i>S. leptura</i>	H	53	6	11	4		43	245	10	7,9	
<i>S. leptura</i>	M	40	4	8	2		31	160	11	3,7	
<i>M. ater</i>	M	65	36	10	4		45	271	8	3,3	Ibagué
<i>M. nigricans</i>	H										Mariquita
<i>D. rotundus</i>	M										
<i>P. dorsalis</i>	H										
<i>D. rotundus</i>	H	68		13	3	2	41	318	14	31,1	Chaparral/ vereda tuluni
<i>S. leptura</i>	M	45	4	15	4	x	43	20,4	11	5,35	Alvarado/ vereda caldas viejo
<i>D. rotundus</i>	M	54		10	2	1	53	24	16	24,1	Espinal
<i>C. perspicillata</i>	M	55		15	4	8	39	39	13		

<i>Especie</i>	<i>Sexo</i>	<i>1*</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>W</i>	<i>Origen</i>
<i>C. perspicillata</i>	H	53		16	5	9	38	28	13		
<i>C. perspicillata</i>	H	61		14	4	8	4,1	32	16	18,5	Alvarado/ vereda caldas viejo
<i>C. perspicillata</i>	M	54		9	2	8	3,9	33	18	19,7	
<i>C. perspicillata</i>	H	57		18	7	7	3,8	31	15	16,9	
<i>C. perspicillata</i>	M	53		9	2	8	3,9	32	14	19,3	
<i>C. perspicillata</i>	H	47		14	3	10	3,9	32	12	17,7	
<i>C. perspicillata</i>	H	50		14	3	9	3,9	31,7	13	19,1	
<i>C. perspicillata</i>	H	56		19	3	8	4,1	31	15	18,7	
<i>C. perspicillata</i>	M	47		12	2,5	10	4,1	31,3	13	18,2	
<i>C. perspicillata</i>	H	52		11	2	9	4	30,5	12	17,6	
<i>C. perspicillata</i>	H	49		13	3	70	4	30,7	14	17,7	
<i>D. rotundus</i>	M	68		16	4	3	5,6	34,7	13	31,4	
<i>D. rotundus</i>	H	62		13	3,5	2	5,6	33,2	12	35,9	Natagaima / refugio
<i>M. molossus</i>	H	45		6	1		3,1	20,3	14	10,6	
<i>M. molossus</i>	H	47		6	1		3,1	20,2	13	8,7	
<i>C. perspicillata</i>	M	64		16	5	10	6,3	36,3	15	43,8	
<i>C. perspicillata</i>	M	61		15	5	11	6	36,8	16	38,5	
<i>C. perspicillata</i>	H	62		18	4	9	6,1	35	15	29	
<i>C. perspicillata</i>	H	57		16	5	10	6	34,3	13	39,3	
<i>C. perspicillata</i>	H	63		17	4	8	6,1	35,2	14	32,8	
<i>D. rotundus</i>	H										Alpujarra
<i>Sacopterix sp</i>	M										
<i>P. dorsalis</i>	H	72		9	3	10	70	31,2	15	61,4	Finca el rancho
<i>P. dorsalis</i>	H	84		12	3	10	71	38,7	14	61	N: 05° 12.555'
<i>S. bilineata</i>	H	29	9	6	1		36	18,2	5	3,7	W: 074° 52. 883'
<i>P. dorsalis</i>	H	7		7	3	11	69	37,9	14	60,3	Altitud: 480 msnm
<i>P. dorsalis</i>	H	92		17	3	9	68	38	18	68,1	
<i>P. dorsalis</i>	M	76		15	3	8	69	37,5	15	60	
<i>P. dorsalis</i>	M	61		14	1,3	9	65	29	16	36,8	
<i>M. nigricans</i>	M	43	30	7	1		35	21,5	4	6,4	
<i>P. dorsalis</i>	M	63		14	4	9	68	36	15	61,4	
<i>P. dorsalis</i>	H	67		12	3	6	59	35,8	15	40,9	

<i>Especie</i>	<i>Sexo</i>	<i>1*</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>W</i>	<i>Origen</i>
<i>A. jamaicensis</i>	H	72		16	3	7	58	29,5	9	47,9	
<i>A. jamaicensis</i>	H	52		14	2	5	47	24	12	22,8	
<i>A. jamaicensis</i>	M	62		13	2	9	58	29,7	13	44,7	
<i>A. jamaicensis</i>	H	53		11	2	8	49	26	9	22,1	
<i>A. jamaicensis</i>	M	69		17	3	10	69	35	14	59,5	
<i>A. jamaicensis</i>	M	65		15	3	19	67	35,7	13	55,2	
<i>A. jamaicensis</i>	H	65		14	4	9	69	37,5	13	63,4	
<i>A. jamaicensis</i>	M	70		16	3	10	70	39,2	14	75,2	
<i>A. jamaicensis</i>	H	63		15	3	9	68	38,2	11	67,3	
<i>P. dorsalis</i>	M	70		12	3	11	67	38,5	15	57,5	
<i>P. dorsalis</i>	M	80		13	4	9	69	38	13	60,3	
<i>P. hastatus</i>	M	64		13	3	11	69	36,6	13	62,2	Cataratas de medina
<i>P. hastatus</i>	M	79		16	3	11	68	41	16	47,9	N: 05° 14.684'
<i>P. hastatus</i>	H	71		15	2	9	69	39,3	15	62	W: 074° 53.111'
<i>P. hastatus</i>	H	79		17	3	9	70	35,8	16	62,4	Altitud: 458 msnm
<i>P. hastatus</i>	M	115		20	5	12	88	50	18	115,1	
<i>P. hastatus</i>	M	109		21	4	13	85	49,5	19	113,7	
<i>P. hastatus</i>	H	117		19	4	11	86	46	18	83,2	
<i>P. hastatus</i>	M	67		14	4	9	60	35,4	13	42,2	
<i>P. hastatus</i>	M	62		15	3	9	60	36	14	43,9	
<i>P. hastatus</i>	M	88		20	4	10	89	46,5	15	81,8	
<i>P. hastatus</i>	H	74		12	3	10	85	45,7	17	61,2	
<i>M. molossus</i>	M	50	32	9	2		35	25,8	3	5,5	Honda
<i>M. molossus</i>	H Preñez	48	29	10	2		36	23,7	3,5	4,9	N: 05° 12.996'
<i>M. molossus</i>	M	49	26	7	2		34	22,2	3	6,1	W: 074° 45.805'
<i>M. nigricans</i>	H Preñez	27	31	6	2,5		32	20,6	4,7	3,2	Altitud: 283 msnm
<i>M. nigricans</i>	H	27	30	6	2,5		32,5	20,4	3,8	2,8	
<i>A. jamaicensis</i>	H	67		19	4	11,5	67		14	60,3	
<i>A. jamaicensis</i>	M	74		19	4	11	69		15	65,2	
<i>A. jamaicensis</i>	M	72		16	3	9	66		14	58,7	

<i>Especie</i>	<i>Sexo</i>	<i>1*</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>W</i>	<i>Origen</i>
<i>A. jamaicensis</i>	M	62		16	3	10	68		13	61,4	
<i>A. jamaicensis</i>	M	69		15	3	11,5	67		15	59,5	

* **1.** largo total, **2.** largo de la cola, **3.** largo de la oreja, **4.** largo del trago, **5.** largo de la hoja nasal, **6.** Largo del antebrazo, **7.** Envergadura, **8.** Calcáneo, **W.** peso.

Figura 10. Fotografía y representación diagramática de la especie *Tadarida brasiliensis*.



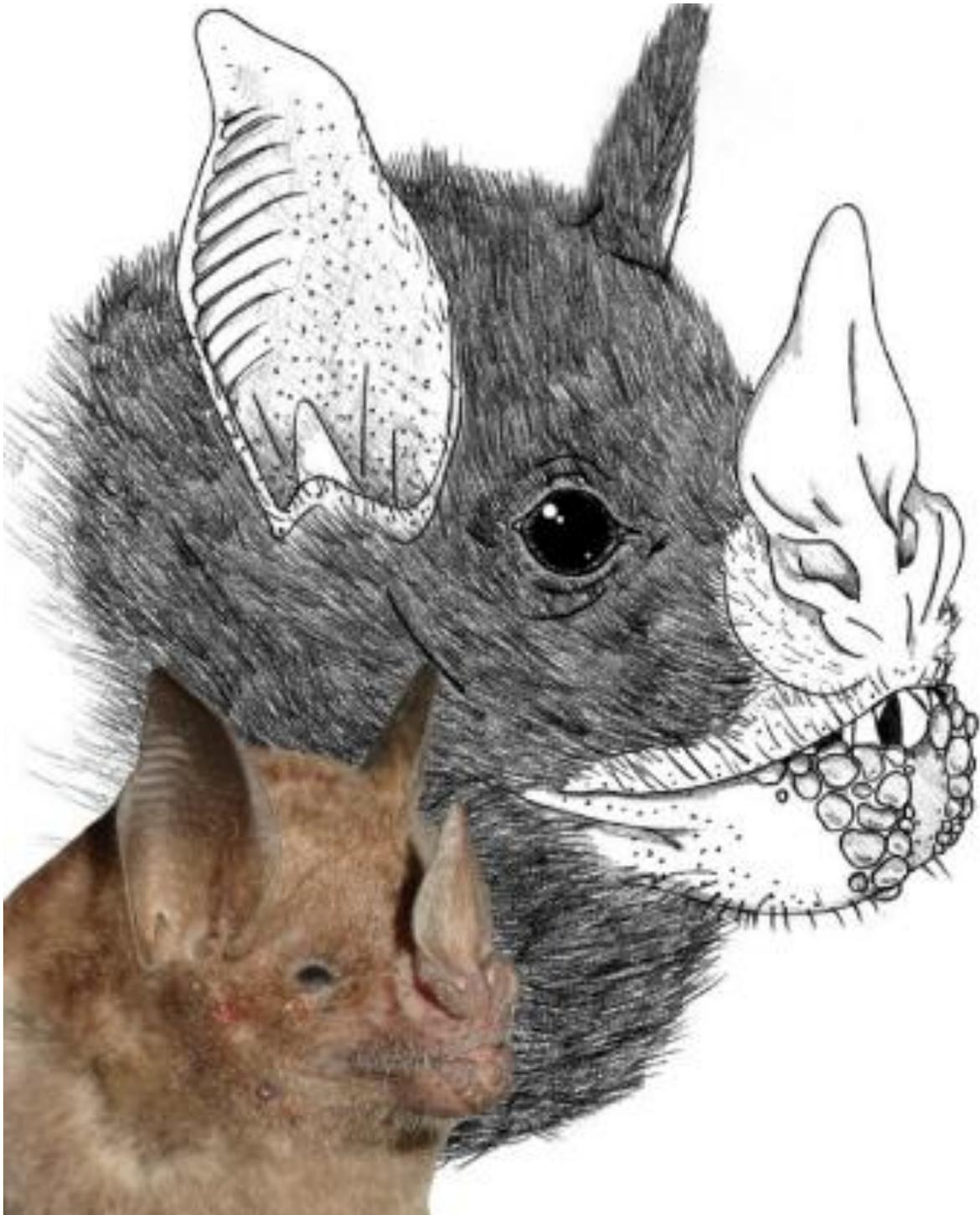
Fuente: el autor

Figura 11. Fotografía y representación diagramática de la especie *Artibeus Lituratus*.



Fuente: el autor

Figura 12. Fotografía y representación diagramática de la especie *Carollia perspicillata*.



Fuente: el autor

Figura 13. Fotografía y representación diagramática de la especie *Platyrrhinus dorsalis*.



Fuente: el autor

Figura 14. Fotografía y representación diagramática de la especie *Saccopteryx bilineata*.



Fuente: el autor

Figura 15. Fotografía y representación diagramática de la especie *Saccopteryx leptura*.



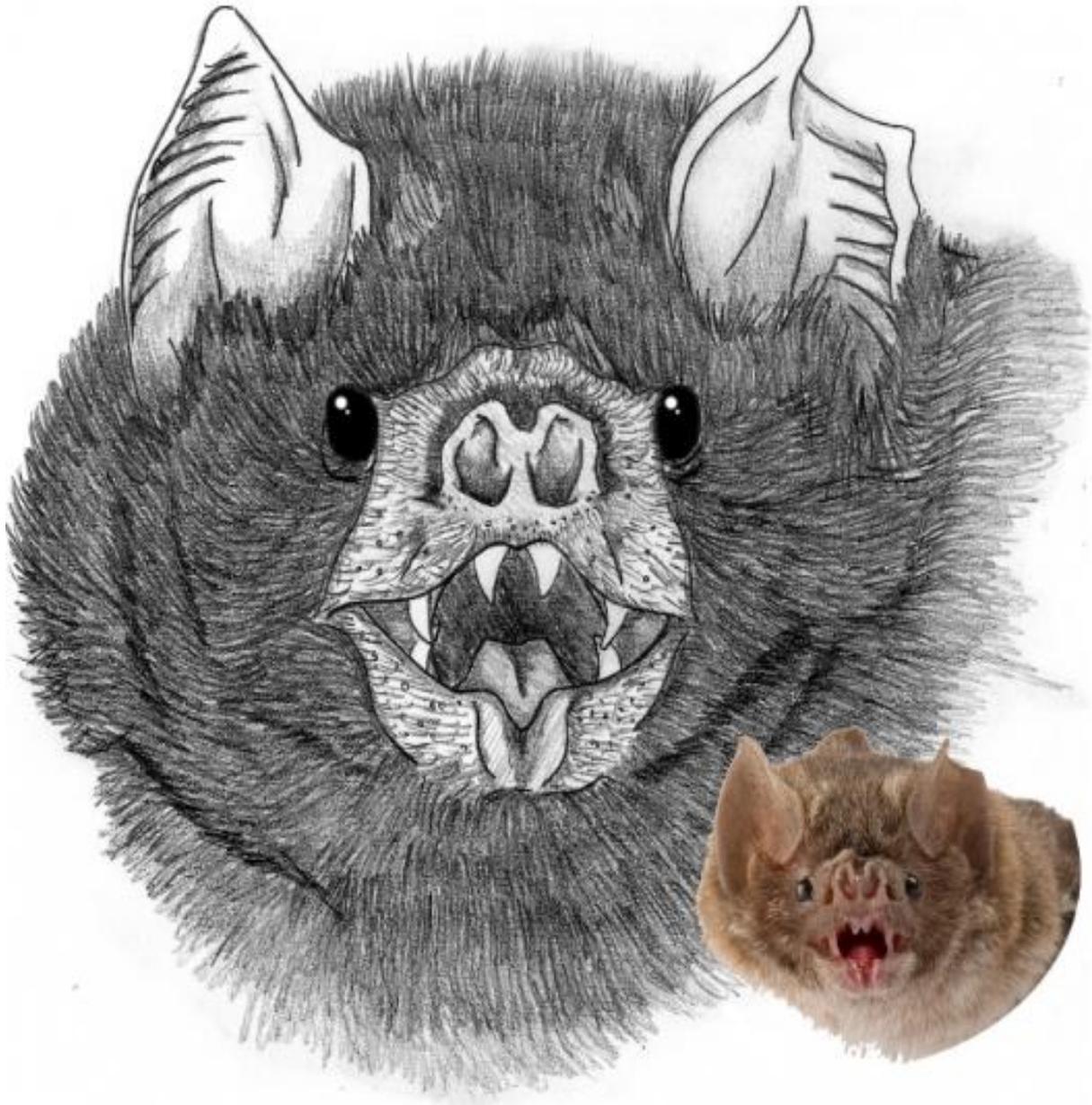
Fuente: el autor

Figura 16. Fotografía y representación diagramática de la especie *Molossus molossus*.



Fuente: el autor

Figura 17: Fotografía y representación diagramática de la especie *Desmodus rotundus*.

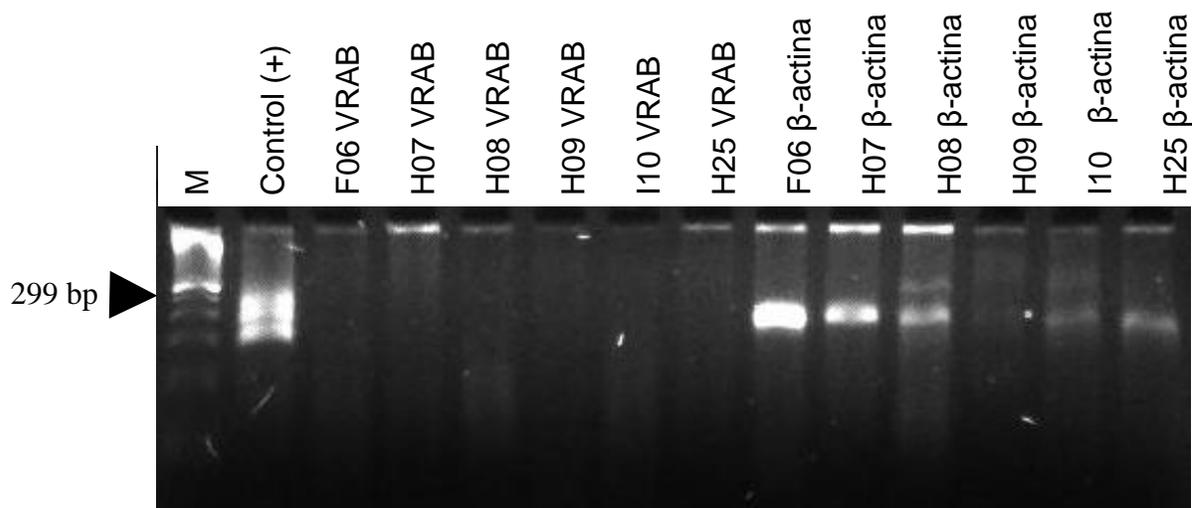


Fuente: el autor

4.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR.

Un total de 93 muestras de encéfalo (cerebro, cerebelo, puente, medula y oblonga) fueron evaluadas por RT-PCR y hn-PCR para la detección del VRAB, no obstante, solo se obtuvo amplificación del fragmento de la nucleoproteína del virus de la rabia en el control positivo. En la figura 17 se observa una imagen representativa de la amplificación del virus de la rabia en el control positivo a través de un PCR semianidado. Un total de 4 murciélagos hematófagos, un insectívoro y un Frugívoro también fueron analizados, los cuales amplificaron el gene β -Actina.

Figura 18. Amplificación de un fragmento del gen de la nucleoproteína del virus de la rabia por hn-PCR en muestras de quirópteros del departamento del Tolima.



Fuente: el autor

5. DISCUSIÓN

Los murciélagos son reservorios del virus de la rabia y en Latinoamérica algunas especies tienen un papel fundamental en la transmisión del virus al humano (Sodré et al., 2010). Los murciélagos insectívoros de América del Norte junto con los insectívoros y frugívoros del Brasil poseen determinados linajes virales que han sido asociados con especies particulares de murciélagos, posiblemente por adaptación al huésped y cuya transmisión entre especies es infrecuente o rara vez detectada (Allendorf et al., 2012; Streicker et al., 2010). En Colombia desde 1968 se aislaron dos cepas de virus en murciélagos insectívoros y frugívoros (Alarcon et al., 1968). No obstante los programas de vigilancia activa y estudios epidemiológicos solo evalúan al *Desmodus rotundus* (Betancurth, Lengua R, & Calderón Rangel, 2015), sesgando los resultados al no evaluar el resto de la población de especies de quirópteros, las cuales son comunes en los ecosistemas de *D. rotundus* y en la interacción con el humano (Alberico et al., 2005) representando un riesgo a la salud pública (INS, 2014).

En el Tolima se han reportado diversos casos de rabia silvestre en animales domésticos durante la última década (INS, 2014), no obstante, en el presente estudio no fue posible detectar mediante el método molecular animales positivos al virus de la rabia. La ausencia de positividad en los individuos muestreados en este estudio se puede deber a diversas razones que incluyen: 1. La rabia tiene una epidemia migratoria en murciélagos hematófagos y la enfermedad se mueve con un patrón ondulatorio a través de las regiones (Delpietro, De Díaz, Fuenzalida, & Bell, 1972). Por delante de la onda, hay baja seroprevalencia y ausencia de virus y a medida que avanza, la presencia de virus disminuye y los murciélagos restantes son predominantemente seropositivos (Johnson et al., 2014). Esta dinámica epidemiológica y comportamiento de la enfermedad sugiere que la epidemia migrante se esté moviendo de norte a sur con presencia en municipios del norte como Mariquita, pasando por el municipio de San Luis y llegando al sur a Chaparral y Prado, no obstante se requieren estudios que permitan el muestreo más riguroso de las diversas especies de quirópteros de la región, una mayor cobertura de

los municipios del Tolima y del país, así como una mayor disponibilidad de recursos económicos para abordar el virus de la rabia y la enfermedad en animales silvestres. 2. Los animales muestreados en este estudio, asumiendo que la muestra fuese representativa para la población presente en los reservorios o nichos de cada municipio, sugiere que la dinámica del virus en la región del Tolima pudiese diferir a lo reportado en otros países como Brasil, donde muchas especies de quirópteros, sino todas fueron positivas al virus. Los resultados sugieren que solo una proporción mínima de quirópteros en cada nicho portarían el virus, dificultando su detección. Además, podría inferirse que al aumentar el tamaño de muestra tendremos mayor posibilidad de capturar un individuo positivo.

3.El virus de la rabia en un murciélago positivo se distribuye predominantemente en los tejidos neurológicos y glándulas salivales (Carneiro et al., 2008), evidenciando disminución en el consumo de sangre (Aguilar Setien et al., 2005), ausencia de agresión, parálisis de las alas, dificultad para caminar y temblores (Aguilar Setien et al., 2005; Almeida et al., 2005). Esto sugiere que los animales clínicamente enfermos probablemente en reducidas ocasiones podrían salir de sus refugios, limitando la probabilidad de su captura. Los quirópteros capturados en el estudio no presentaron comportamientos anómalos compatibles con aquellos descritos en animales clínicamente enfermos, sin embargo, en inoculaciones experimentales del virus en *D. rotundus* se demostró que el desarrollo de la enfermedad dependía de la vía de inoculación y de la dosis de virus.(Johnson et al., 2014) La vía intracraneal induce rabia en todos los receptores, mientras que sólo dosis mayores a 562 dosis letales 50 por vía intracerebral en el ratón causaron enfermedad en la mayoría de los murciélagos inoculados por las rutas intramuscular y subcutánea (Moreno & Baer, 1980). Así los *D. rotundus* y otras especies son capaces de portar el virus en otros tejidos y no mostrar signos clínicos (Favi C, Bassaletti C, López D, Rodríguez A, & Yung P, 2011). Los murciélagos evaluados en este estudio fueron negativos (clínicamente sanos) al virus de la rabia por la técnica de RT-PCR, no obstante, es posible la presencia del virus en tejidos extra-cefálicos, esto no fue evaluado en el presente estudio debido a la limitante del recurso disponible, así como a la premisa de un mayor tropismo nervioso del virus. Por

lo cual no se descarta la presencia del virus en los tejidos no evaluados. Está comprobado que un animal clínicamente sano puede excretar el virus por la saliva después de los 6 días post exposición y mantenerlo excretarlo hasta 2 años manteniéndose asintomático (Aguilar Setien et al., 2005), convirtiendo la glándula salival como un órgano candidato para la detección del virus en animales clínicamente sanos. Estas observaciones deberán ser tenidas en cuenta en investigaciones futuras.

Las muestras de quirópteros obtenidas en este estudio correspondieron a muestras dirigidas al control del murciélago hematófago, al ser estos altamente efectivos en la transmisión de RABV en comparación con otras especies de quirópteros debido a sus hábitos alimenticios (Johnson et al., 2014) El control de esta especie se hace aplicando ungüentos con warfarina a las espaldas de los *D. rotundus* y liberándolos a su entorno, los cuales llegan a la colonia y ponen en contacto los demás individuos al tóxico, matando murciélagos de múltiples especies. En el presente estudio, estas especies no hematófagas vitales para el control de plagas y polinización de los campos no se encontraron portadoras del virus, lo que podría sugerir que este método genera un impacto negativo en el ecosistema de la región al destruir estos individuos. Sin embargo, un estudio llevado a cabo en Perú con una duración de tres años, afirma que estas campañas de sacrificio de *D. rotundus* no lograron reducir la seroprevalencia del virus y tienen un mínimo efecto sobre esta y quizás podría ser contraproducentes para el control de la enfermedad (Blackwood, Streicker, Altizer, & Rohani, 2013). Corroborando que el control de estos animales es casi imposible debido que se desconoce la ubicación de sus refugios y el tamaño de la población de estos individuos. Se sugiere entonces proteger a los animales domésticos por medio de vacunación (Johnson et al., 2014).

6. CONCLUSIONES

No se detectó presencia del virus rábico en los 91 tejidos cefálicos evaluados por medio de las pruebas moleculares RT-PCR y PCR semianidado.

Se identificaron un total de 12 especies de quirópteros entre los cuales hubo individuos con hábitos frugívoros, insectívoros y hematófagos como *Molossus ater*, *Artibeus lituratus*, *Platyrrhinus dorsalis*, *Molossus molossus*, *Saccopteryx bilineata*, *Saccopteryx leptura*, *Myotis nigricans*, *Carollia perspicillata*, *Artibeus jamaicensis*, *Phyllostomus hastatus*, *Saccopteryx sp* y *Desmodus rotundus*. El material fotográfico y su representación diagramática constituye otra herramienta para la identificación de estos animales.

Los tejidos obtenidos en el estudio fueron conservados en formalina bufferada para ser usados en futuras investigaciones.

Todas las especies de quirópteros pueden portar el virus rábico, por lo cual debe evaluarse al menos un individuo de cada especie en los muestreos de rutina, sin embargo, en el Tolima y el país el principal transmisor del virus sigue siendo *el Desmodus rotundus*, ya que las demás especies aún no han demostrado ser una amenaza mayor y a pesar que se conoce de la presencia del virus en la región su detección no es sencilla y requiere de estudios con un tamaño de muestra más representativo que evalúen diferentes tejidos a la vez y que trabajen en conjunto con técnicas de diagnóstico basadas en el uso de anticuerpos y herramientas moleculares.

La detección del virus de la rabia en muestras de cerebro se recomienda en animales que presenten signología de la enfermedad, de lo contrario en animales asintomáticos y/o clínicamente sanos se deben evaluar a la par otros tejidos que puedan albergar el virus, ya que es posible que el virus no se encuentre en el SNC.

RECOMENDACIONES

El presente estudio piloto recomienda que relacionado con los muestreos se debe tener en cuenta que las capturas deben planificarse de acuerdo a las fases lunares, preferiblemente luna llena y procurando que sea en periodos secos dado que si se presenta lluvia estos animales no saldrán a alimentarse, además seguir los lineamientos del ICA para cebar los animales y obtener buenos resultados en la captura.

Se recomienda para el diagnóstico evaluar tejidos cefálicos y extra cefálicos, dándole mayor importancia a la glándula salival junto con el uso de técnicas de diagnóstico basadas en el uso de anticuerpos y herramientas moleculares, ejecutando dichas pruebas en el menor tiempo posible.

También se recomienda, la unificación de esfuerzos que involucre la academia el estado y la empresa privada en el aporte conjunto de recursos que busquen abordar la problemática de la rabia silvestre y urbana en forma articulada y que permitan la formulación y ejecución de proyectos de investigación más robustos y con mayor cobertura, que busquen caracterizar las especies de quirópteros en el departamento, su distribución poblacional y su estado sanitario.

REFERENCIAS

- Aguilar Setien, A., Loza Rubio, E., Salas Rojas, M., Brisseau, N., Cliquet, F., Pastoret, P., ... Kretschmer, R. (2005). Salivary excretion of rabies virus by healthy vampire bats. *Epidemiology and Infection*, *133*(3), 517–522.
<https://doi.org/10.1017/S0950268805003705>
- Alarcon, A., Osorio, E., Bernal Cubides, C., & Lleras Pizarro, A. (1968). Aislamiento De Virus Rabico De Murcielagos En Colombia. *Caldasia*, *10*, 167–172.
- Alberico, M., Saavedra R, C. A., & García Paredes, H. (2005). Murciélagos caseros de Cali (Valle del Cauca - Colombia) House bats of Cali, Colombia. *Caldasia*, *27*(1), 117–126.
- Allendorf, S. D., Cortez, A., Heinemann, M. B., Appolinário Harary, C. M., A.P Antunes, J. M., Gea Peres, M., ... Megid, J. (2012). Rabies virus distribution in tissues and molecular characterization of strains from naturally infected non-hematophagous bats. *Virus Research*, *165*(2), 119–125.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.01.011>
- Almeida, M. F., Martorelli, L. F. A., Caires, C., Sallum, P. C., Durigon, E. L., & Massad, E. (2005). Experimental rabies infection in haematophagous bats *Desmodus rotundus*. *Epidemiol Infect*, *133*, 523–527.
<https://doi.org/10.1017/S0950268804003656>
- Araújo, D. B., Langoni, H., Almeida, M. F., & Megid, J. (2008). Heminested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus detection in stored and decomposed samples. *BMC Research Notes*, *1*, 17.
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-17>
- Aravindh Babu, R. P., Monoharan, S., Ramadass, P., & Chandran, N. D. J. (2012). Evaluation of RT-PCR Assay for Routine Laboratory Diagnosis of Rabies in Post Mortem Brain Samples from Different Species of Animals. *Indian J Virol*, *23*(3), 392–396. <https://doi.org/10.1007/s13337-012-0109-9>
- Bastida, F., Ramírez, D. G., Chavira, E., Lara, E., & Zárata, P. (2016). Development of Primer Pairs from molecular typing of rabies virus variants present in Mexico.

- BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4659470>
- Betancurth, C., Lengua R, J. C., & Calderón Rangel, A. (2015). Determinación del virus rábico en murciélagos hematófagos del Alto Sinú (Córdoba, Colombia). *Veterinaria Y Zootecnia*, 9(2), 1–2. <https://doi.org/10.17151/vetzo.2015.9.1.3>
- Biswal, M., Ratho, R., & Mishra, B. (2007). Usefulness of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of rabies RNA in archival samples. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 60(5), 298–299.
- Black, E. M., Lowings, J. P., Smith, J., Heaton, P. R., & McElhinney, L. M. (2002). A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan™ technology. *Journal of Virological Methods*, 105(1), 25–35. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00062-9](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00062-9)
- Blackwood, J. C., Streicker, D. G., Altizer, S., & Rohani, P. (2013). Resolving the roles of immunity, pathogenesis, and immigration for rabies persistence in vampire bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(51), 20837–20842. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308817110>
- Calisher, C. H., & Ellison, J. . (2012). The other rabies viruses: The emergence and importance of lyssaviruses from bats and other vertebrates. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 10(2), 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2012.01.003>
- Cardoso Lopes, M., Rossignolo Venditti, L. L., & Queiroz, L. H. (2010). Comparison between RT-PCR and the mouse inoculation test for detection of rabies virus in samples kept for long periods under different conditions. *Journal of Virological Methods*, (1–2), 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.11.017>
- Carneiro, A. J. B., Franke, C. R., Stöcker, A., Santos, F. dos, Sá, J. E. Ú. de, Silva, E. M., ... Drexler, J. F. (2008). Rabies virus RNA in naturally infected vampire bats, Northeastern Brazil. *Emerg. Journal of Clinical Microbiology*, 46(4), 1451–1461. <https://doi.org/10.1128/JCM.00016-08>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2017). Rabies-Free Countries and Political Units. Retrieved March 6, 2018, from <https://www.cdc.gov/importation/rabies-free-countries.html>
- Chen, S., Zhang, H., Luo, M., Chen, J., Yao, D., Chen, F., ... Chen, T. (2017). Rabies virus transmission in solid organ transplantation, China, 2015–2016. *Emerging*

- Infectious Diseases*, 23(9), 1600–1602. <https://doi.org/10.3201/eid2309.161704>
- Condori Condori, R. E., Streicker, D. G., Sanchez, C. C., & Velasco Villa, A. (2013). Enzootic and epizootic rabies associated with vampire bats, peru. *Emerging Infectious Diseases*, 19(9), 1463–1469. <https://doi.org/10.3201/eid1809.130083>
- Craig Greene. (2012). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (elsevier, Ed.) (4th Editio).
- Delpietro, H., De Díaz, A. M., Fuenzalida, E., & Bell, J. F. (1972). Determination of the rate of rabies attack in bats. *Boletín De La Oficina Sanitaria Panamericana. Pan American Sanitary Bureau*, 73(3), 222–230. Retrieved from <http://ezproxy.stir.ac.uk/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cmedm&AN=4263044&site=eds-live>
- Dietzschold, B., Faber, M., & Schnell, M. J. (2003). New approaches to the prevention and eradication of rabies. *Expert Rev. Vaccines*, 2(3), 399–406. <https://doi.org/10.1586/14760584.2.3.399>
- Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., ... Smith, T. F. (2006). Real-Time PCR in Clinical Microbiology : Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin. Microbiol. Rev*, 19(1), 165–256. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.165>
- Fahl, W. O., Carnieli Jr, P., Galera Castilho, J., Carrieri, M. L., Kotait, I., Iamamoto, K., ... Brandao, P. E. (2012). Desmodus rotundus and Artibeus spp. bats might present distinct rabies virus lineages. *Braz J Infect Dis*, 16(6), 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.07.002>
- Fahl, W. O., Garcia, A. I. E., Achkar, S. M., Mori, E., Asano, K. M., Iamamoto, K., & Scheffer, K. C. (2015). Rabia transmitida por murciélagos en brasil. *Acta Biol. Colomb*, 20(3), 21–35. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n3.45481>
- Favi C, M., Bassaletti C, Á., López D, J., Rodríguez A, L., & Yung P, V. (2011). Descripción epidemiológica del reservorio de rabia en murciélagos de la Región Metropolitana: Chile. 2000-2009. *Rev Chil Infect*, 28(3), 223–228. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182011000300004>
- Fekadu, M., Shaddock, J. H., & Baer, G. M. (1982). Excretion of rabies virus in the saliva of dogs. *Journal of Infectious Diseases*, 145(5), 715–719.

<https://doi.org/10.1093/infdis/145.2.715>

- Fernández, B., Guerrero, R., Lord, R., Ochoa, J., & Ulloa, G. (1988). *Mamíferos de Venezuela, Lista y claves para su identificación*. Universidad Central de Venezuela (1st ed.). Caracas.
- Fleming, G. (1872). *Rabies and hydrophobia Their history nature causes symptoms and prevention*. London: Chapman and Hall.
- Fooks, A. R., Cliquet, F., Finke, S., Freuling, C., Hemachudha, T., Mani, R. S., ... Banyard, A. C. (2017). Rabies. *Nature Reviews Disease Primers*, 3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.91>
- Fooks, A. R., Johnson, N., Freuling, C. M., Wakeley, P. R., Banyard, A. C., McElhinney, L. M., ... Müller, T. (2009). Emerging Technologies for the Detection of Rabies Virus: Challenges and Hopes in the 21st Century. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(9), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000530>
- Gardner, A. L. (2007). *Mammals of South America. The University of Chicago Press* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Hemachudha, T., Ugolini, G., Wacharapluesadee, S., Sungkarat, W., Shuangshoti, S., & Laothamatas, J. (2013). Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis, and management. *The Lancet. Neurology*, 12(5), 498–513. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70038-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70038-3)
- Hoffmann, B., Beer, M., Reid, S. M., Mertens, P., Oura, C. A. L., van Rijn, P. A., ... King, D. P. (2009). A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: Sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Veterinary Microbiology*, 139, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.034>
- ICA. (2004). *MANUAL DE PROCEDIMIENTOS (CONTROL DE MURCIÉLAGOS HEMATÓFAGOS O VAMPIROS)*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- INS. (2014). *Informe final del evento agresiones por animales potencialmente transmisores de rabia, Colombia 2014*.
- Invitrogen. (2013). SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR.
- Jackson, A. C. (2003). Rabies virus infection: an update. *Journal of Neurovirology*, 9(2), 253–258. <https://doi.org/10.1080/13550280390193975>

- Jackson, A. C. (2011). *Advances in Virus Research Volume 79*. (Margaret Kielian, K. Maramorosch, & T. C., Eds.) (First edit, Vol. 53). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Jackson, A. C. (2013). *Rabies*. (Elsevier Inc, Ed.), *Rabies* (3rd Editio). Canada: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396547-9.00001-8>
- Johnson, N., Ceballos, N. A., & Setien, A. A. (2014). Vampire bat rabies: Ecology, epidemiology and control. *Viruses*, 6(5), 1911–1928.
<https://doi.org/10.3390/v6051911>
- Kuzmin, I. V., Mayer, A. E., Niezgodna, M., Markotter, W., Agwanda, B., Breiman, R. F., & Rupprecht, C. E. (2010). Shimoni bat virus, a new representative of the Lyssavirus genus. *Virus Res*, 149(2), 197–210. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.01.018>
- Kuzmin, I. V., Turmelle, A. S., Agwanda, B., Markotter, W., Niezgodna, M., Breiman, R. F., & Rupprecht, C. E. (2011). Commerson's leaf-nosed bat (*Hipposideros commersoni*) is the likely reservoir of Shimoni bat virus. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 11(11), 1465–1470. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0663>
- Leedom, J. M. (2006). Milk of nonhuman origin and infectious diseases in humans. *Clinical Infectious Diseases*, 43(5), 610–615. <https://doi.org/10.1086/507035>
- Leung, A. K. C., Davies, H. D., & Ellis Hon, K. L. (2007). Rabies: Epidemiology, pathogenesis, and prophylaxis. *Advances in Therapy*, 24(6), 1340–1347.
<https://doi.org/10.1007/BF02877781>
- Maier, T., Schwarting, A., Mauer, D., Ross, R. S., Martens, A., Kliem, V., ... Drosten, C. (2010). Management and Outcomes after Multiple Corneal and Solid Organ Transplantations from a Donor Infected with Rabies Virus. *Clinical Infectious Diseases*, 50(8), 1112–1119. <https://doi.org/10.1086/651267>
- Mantilla, J. C., Sierra, J. C., Garcia, E., & Pradilla, G. (2010). Forma paralitica de un caso de rabia humana trasmitida por murciélago, simulando Síndrome de Guillain Barre: Presentación de un caso de autopsia. *Salud UIS*, 42, 139–151.
- McElhinney, L. M., Marston, D. A., Brookes, S. M., & Fooks, A. R. (2014). Effects of carcass decomposition on rabies virus infectivity and detection. *Journal of Virological Methods*, 207, 110–113. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.06.024>
- McKay, N., & Wallis, L. (2005). Rabies: a review of UK management. *EMJ*, 22(5), 316–

321. <https://doi.org/10.1136/emj.2003.013805>

Mendes, W. da S., Moura da Silva, A. A., Fonseca Neiva, R., Matos Costa, N., Soares de Assis, M., Oliveira Vidigital, P. M., ... Neto, S. J. W. (2009). An outbreak of bat-transmitted human rabies in a village in the Brazilian Amazon. *Rev Saúde Pública*, 43(6), 1075–1077.

Ministerio de salud y proteccion social. (2014). *¿Que es la rabia?*

Moreno, J. A., & Baer, G. M. (1980). Experimental rabies in the vampire bat. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 29, 254 – 259.

Nagaraj, T., Vasanth, J. P., Desai, A., Kamat, A., Madhusudana, S. N., & Ravi, V. (2006). Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: Comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. *Journal of Clinical Virology*, 36, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.01.009>

Nazarenko, I. a, Bhatnagar, S. K., & Hohman, R. J. (1997). A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Research*, 25(12), 2516–2521.

Núñez, C., Bonelo, A., Hernández Rojas, C., Zapata Osorio, J., & Torres Valencia, G. (2010). Dispersión del virus rabia en areas urbanas de Colombia asociada a especies de murciélagos que comparten refugios. *Rev. Asoc. Col. Cienc. Biol*, 22, 68–72.

Núñez, C., Escobar, H., Hernandez, C., Zapata, J., Ospina, N., & Paez, A. (2008). Vigilancia epidemiológica de virus rabia en murcielagos caseros y silvestres, en el departamento del Valle del cauca, Colombia, 1999-2008. In *1 Simposio Nacional de Investigaciones sobre Murcielagos* (pp. 16–17). Bogota D.C.

Núñez, C., Páez, A., Hernández, C., Escobar, H., & Bonelo, A. (2012). Transmisión del virus de la rabia entre murciélagos urbanos del departamento del Valle del Cauca, Colombia, 1999-2008. *Infectio*, 16(1), 23–29. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(12\)70054-1](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(12)70054-1)

OIE. (2008). *Rabies*. Retrieved from http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/RABIES_FINAL.pdf

OIE. (2013). CHAPTER 2.1.13. RABIES. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines*

- for *Terrestrial Animals* - OIE (pp. 1–26).
- OIE. (2017). Portal sobre la rabia. Retrieved October 14, 2017, from <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/portal-sobre-la-rabia/portal-de-comunicaciones/>
- Páez, A., Nuñez, C., García, C., & Boshell, J. (2003). Epidemiología molecular de epizootias de rabia en Colombia , 1994-2002 : evidencia de rabia humana y canina asociada con quirópteros. *Biomedica*, 23, 19–30. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v23i1.1194>
- Páez, A., Nuñez, C., García, C., & Bóshell, J. (2003). Molecular epidemiology of rabies epizootics in Colombia: Evidence for human and dog rabies associated with bats. *Journal of General Virology*, 84(4), 795–802. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18899-0>
- Paez, A., Polo, L., Heredia, D., Nuñez, C., Rodriguez, M., Agudelo, C., ... Moreno, T. (2009). Brote de rabia humana transmitida por gato en el municipio de Santander de Quilichao, Colombia, 2008. *Rev. Salud Pública*, 11(6), 931–943. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-00642009000600009
- Páez, A., Rey, G., Agudelo, C., Dulce, Á., Parra, E., Díaz-granados, H., ... Polo, L. (2009). Brote de rabia urbana transmitida por perros en el distrito de Santa Marta, Colombia, 2006-2008. *Biomedica*, 29, 424–436.
- Páez, A., Saad, C., Núñez, C., & Bóshell, J. (2005). Molecular epidemiology of rabies in northern Colombia 1994-2003. Evidence for human and fox rabies associated with dogs. *Epidemiol Infect*, 133, 529–536. <https://doi.org/10.1017/S0950268805003699>
- Páez, A., Velasco Villa, A., Rey, G., & Rupprecht, C. E. (2007). Molecular epidemiology of rabies in Colombia 1994-2005 based on partial nucleoprotein gene sequences. *Virus Research*, 130(1–2), 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.06.008>
- Rupprecht, C., & Nagarajan, T. (2015). *Current laboratory techniques in rabies techniques in rabies*. (C. Rupprecht & T. Nagarajan, Eds.) (1st Editio). San Diego, CA: Elsevier Inc.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Volume 2* (3rd editio). Cold Spring Harbor Laboratory Press. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90210-6](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(90)90210-6)

- Sato, G., Tanabe, H., Shoji, Y., Itou, T., Ito, F. H., Sato, T., & Sakai, T. (2005). Rapid discrimination of rabies viruses isolated from various host species in Brazil by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Virology*, 33(4), 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.11.015>
- Scheffer, K. C., Iamamoto, K., Asano, K. M., Mori, E., Estevez Garcia, A. I., Achkar, S. M., & Fahl, W. O. (2014). Murciélagos hematófagos como reservorios de la rabia. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 31(2), 302–309. Retrieved from http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000200018&lng=en&nrm=iso&tlng=en%5Cnhttp://www.scielosp.org/pdf/rpmesp/v31n2/a18v31n2.pdf
- Smreczak, M., Orłowska, A., Trębas, P., & Żmudziński, J. F. (2008). Application of Heminested RT-PCR to the Detection of Eblv1 and Classical Rabies Virus Infections in Bats and Terrestrial Animals. *Bull Vet Inst Pulawy*, 52, 15–18.
- Soares, R. M., Bernardi, F., Sakamoto, S. M., Heinemann, M. B., Cortez, A., Alves, L. M., ... Richtzenhain, L. J. (2002). A heminested polymerase chain reaction for the detection of Brazilian rabies isolates from vampire bats and herbivores. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(1), 109–111. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000100019>
- Sodré, M. M., Gama, A. R. da, & Almeida, M. F. de. (2010). Update list of bat species positive for rabies in brazil. *Rev. Inst. Med Trop. Sao Paulo*, 52(2), 75–81. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652010000200004>
- Soriano, P. J. (2000). Functional structure of bat communities in Tropical Rainforests and Andean Cloud Forests. *Ecotropicos*, 13(1), 1–20.
- Srinivasan, A., Burton, E. C., Kuehnert, M. J., Rupprecht, C., Sutker, W. L., Ksiazek, T. G., ... Diseases, R. (2005). Transmission of Rabies Virus from an Organ Donor to Four Transplant Recipients for the Rabies in Transplant Recipients Investigation Team*. *N Engl J Med*, 352(11), 1103–1111. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043018>
- Stepien, A. E., Tripodi, M., & Arber, S. (2010). Monosynaptic Rabies Virus Reveals Premotor Network Organization and Synaptic Specificity of Cholinergic Partition Cells. *Neuron*, 68(3), 456–472. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.10.019>
- Streicker, D. G., Turmelle, a S., Vonhof, M. J., Kuzmin, I. V, McCracken, G. F., &

- Rupprecht, C. E. (2010). Host phylogeny constrains cross-species emergence and establishment of rabies virus in bats. *Science*, 329(5992), 676–679.
<https://doi.org/10.1126/science.1188836>
- Szanto, A. G., Nadin Davis, S. a, Rosatte, R. C., & White, B. N. (2011). Re-assessment of direct fluorescent antibody negative brain tissues with a real-time PCR assay to detect the presence of raccoon rabies virus RNA. *Journal of Virological Methods*, 174(1–2), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.04.009>
- Thomsen, A. G., & Blaisdell, J. (1994). From the fangs of Cerberus: the possible origin of classical beliefs about rabies. *Argos*, 11, 1–8.
- Thrusfield, M. (2005). *Veterinary epidemiology*. (B. Science, Ed.), *Revue d'épidémiologie et de sante publique* (Third Edit, Vol. 39). Oxford, UK: Blackwell Science Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00107-7](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00107-7)
- Torro, G., Martinez, M., Saad, C., Díaz, A., & Vega, R. L. (2009). *Guía práctica para la atención integral de personas agredidas por un animal potencialmente transmisor de rabia* (1st ed.). Bogota D.C. Retrieved from [http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/Rabia/Guia Rabia.pdf](http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/Rabia/Guia%20Rabia.pdf)
- Turmelle, A. S., Jackson, F. R., Green, D., McCracken, G. F., & Rupprecht, C. E. (2010). Host immunity to repeated rabies virus infection in big brown bats. *Journal of General Virology*, 91, 2360–2366. <https://doi.org/10.1099/vir.0.020073-0>
- Valderrama, J., García, I., Figueroa, G., Rico, E., Sanabria, J., Rocha, N., ... Páez, A. (2006). Brotes de rabia humana transmitida por vampiros en los municipios de Bajo y Alto Baudó, departamento del Chocó, Colombia 2004-2005. *Biomédica*, 26, 387–396. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i3.357>
- Wacharapluesadee, S., Tepsumethanon, V., Supavonwong, P., Kaewpom, T., Intarut, N., & Hemachudha, T. (2012). Detection of rabies viral RNA by TaqMan real-time RT-PCR using non-neural specimens from dogs infected with rabies virus. *Journal of Virological Methods*, 184, 109–112.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.05.013>
- Wasniewski, M., Guiot, A. L., Schereffer, J. L., Tribout, L., Mahar, K., & Cliquet, F. (2013). Evaluation of an ELISA to detect rabies antibodies in orally vaccinated foxes and raccoon dogs sampled in the field. *Journal of Virological Methods*, 187,

264–270. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.11.022>

Wasniewski, M., Labbe, a, Tribout, L., Rieder, J., Labadie, a, Schereffer, J. L., & Cliquet, F. (2014). Evaluation of a rabies ELISA as an alternative method to seroneutralisation tests in the context of international trade of domestic carnivores. *Journal of Virological Methods*, 195, 211–220.

<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.10.021>

Whitfield, S. G., Fekadu, M., Shaddock, J. H., Niezgoda, M., Warner, C. K., & Messenger, S. L. (2001). A comparative study of the fluorescent antibody test for rabies diagnosis in fresh and formalin-fixed brain tissue specimens. *Journal of Virological Methods*, 95, 145–151. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00304-4](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00304-4)

WHO. (2013). Frequently Asked Questions on rabies. Retrieved from http://www.who.int/rabies/resources/SEA_CD_278_FAQs_Rabies.pdf?ua=1

WHO. (2016). WHO | About rabies. Retrieved January 25, 2016, from <http://www.who.int/rabies/about/en/>

Williamson, J. G. (2010). *Rabies: Symptoms, Treatment And Prevention*. (J. g. Williamson, Ed.). New york: Nova Science Publishers, Inc. Retrieved from <http://www.novapublishers.com>

	PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 1 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Los suscritos:

Jimmy Fernando Cifuentes Jiménez	con C.C N°	1.069.752.144
Noel Verjan García	con C.C N°	93.449.118
Iang Schroniltgen Rondón Barragán	con C.C N°	86.084.556
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____

Manifiesto (an) la voluntad de:

Autorizar

No Autorizar **Motivo:** _____

La consulta en físico y la virtualización de **mi OBRA**, con el fin de incluirlo en el repositorio institucional de la Universidad del Tolima. Esta autorización se hace sin ánimo de lucro, con fines académicos y no implica una cesión de derechos patrimoniales de autor.

Manifestamos que se trata de una OBRA original y como de la autoría de LA OBRA y en relación a la misma, declara que la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA, se encuentra, en todo caso, libre de todo tipo de responsabilidad, sea civil, administrativa o penal (incluido el reclamo por plagio).

Por su parte la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA se compromete a imponer las medidas necesarias que garanticen la conservación y custodia de la obra tanto en espacios físico como virtual, ajustándose para dicho fin a las normas fijadas en el Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad, en la Ley 23 de 1982 y demás normas concordantes.

La publicación de:

Trabajo de grado	<input checked="" type="checkbox"/>	Artículo	<input type="checkbox"/>	Proyecto de Investigación	<input type="checkbox"/>
Libro	<input type="checkbox"/>	Parte de libro	<input type="checkbox"/>	Documento de conferencia	<input type="checkbox"/>
Patente	<input type="checkbox"/>	Informe técnico	<input type="checkbox"/>		
Otro: (fotografía, mapa, radiografía, película, video, entre otros)					<input type="checkbox"/>

 Universidad del Tolima	PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 2 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Producto de la actividad académica/científica/cultural en la Universidad del Tolima, para que con fines académicos e investigativos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad del Tolima. Con todo, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada con arreglo al artículo 30 de la Ley 23 de 1982. En concordancia suscribo este documento en el momento mismo que hago entrega del trabajo final a la Biblioteca Rafael Parga Cortes de la Universidad del Tolima.

De conformidad con lo establecido en la Ley 23 de 1982 en los artículos 30 “**...Derechos Morales. El autor tendrá sobre su obra un derecho perpetuo, inalienable e irrenunciable**” y 37 “**...Es lícita la reproducción por cualquier medio, de una obra literaria o científica, ordenada u obtenida por el interesado en un solo ejemplar para su uso privado y sin fines de lucro**”. El artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “**los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores**” y en su artículo 61 de la Constitución Política de Colombia.

- Identificación del documento:

Título completo: **ESTUDIO PILOTO DE DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA RABIA EN QUIRÓPTEROS DEL DEPARTAMENTO DEL TOLIMA**

- Trabajo de grado presentado para optar al título de:

MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

- Proyecto de Investigación correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

- Informe Técnico correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

- Artículo publicado en revista:

CES Medicina veterinaria y zootecnia

- Capítulo publicado en libro:

- Conferencia a la que se presentó:

 Universidad del Tolima	PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 3 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Quienes a continuación autentican con su firma la autorización para la digitalización e inclusión en el repositorio digital de la Universidad del Tolima, el:

Día: 02 Mes: Abril Año: 2018

Autores:

Firma

Nombre:	Jimmy Fernando Cifuentes Jiménez		C.C. 1.069.752.144
Nombre:	Noel Verjan García		C.C. 93.449.118
Nombre:	Iang Schroniltgen Rondón Barragán		C.C. 86.084.556
Nombre:			C.C.

El autor y/o autores certifican que conocen las derivadas jurídicas que se generan en aplicación de los principios del derecho de autor.