



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, GINECOLOGÍA, OBSTETRICIA Y
MEDICINA PREVENTIVA

William Valderrama Bazán

**“EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE LA RABIA SILVESTRE EN EL
PERU, PERIODO 1997-2015**

Tesis presentada al Programa de Doctorado de Metodología de la Investigación Biomédica y Salud Pública del Departamento de Pediatría, Ginecología, Obstetricia y Medicina Preventiva de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, como parte de los requisitos para obtención del grado de Doctor en Metodología de la Investigación Médica y Salud Pública.

Director: Prof. Josep Vaqué Rafart

Tokio, Japón

2020

Agradecimientos

“A ti Dios mío, tú que me has dado todo aún sin merecerlo “

Resumen

Probablemente la enfermedad de la rabia es una de las enfermedades más desatendidas por los servicios de salud en aquellos países donde la tienen categorizada como endémica; sin embargo, los estudios realizados por muchos años y los cuales plasmamos en este documento, evidencian que la rabia silvestre transmitida por murciélagos hematófagos es más una enfermedad emergente de curso lento que una enzoótia per se.

La importancia de la rabia no solo radica en el hecho que es una enfermedad mortal para humanos, los animales domésticos y silvestres (de vida libre), para aquellos que hemos tenido la oportunidad de estudiarla, su importancia se centra en la oportunidad que la rabia brinda para poder estudiar la epidemiología de manera integral. La rabia es una enfermedad zoonótica que afecta a un sin número de especies incluyendo el humano, muchos de los reservorios de la rabia son animales silvestres por tanto incorpora en su estudio a muchas disciplinas como la biología, ecología, historia natural, genética, veterinaria, medicina, permitiendo integrar de manera transversal los conceptos como nichos ecológicos, análisis filogenéticos, epidemiología molecular, teoría de la coalescencia, etc.

Los enfoques de salud ecosistémica, salud compartida o un mundo una salud convergen de una manera perfecta si se habla de la rabia, para su prevención y control obliga a trabajar con una perspectiva integral y multidisciplinaria. Analizar los determinantes sociales que permiten la emergencia de esta enfermedad de importancia para la salud pública, es prioritario.

La rabia como enfermedad infecciosa es compleja en el medio natural, y se ve impulsada hasta cierto punto por cambios ecosistémicos que se asocian con el crecimiento de la población humana en las zonas de riesgo, el aumento de la demanda de proteína animal y por ende el aumento de la crianza de animales domésticos, el consumo insostenible de los recursos naturales, la pérdida de biodiversidad y la fragmentación del hábitat son factores que se traducen en una disminución de servicios ecosistémicos, de esta manera, la rabia, como enfermedad emergente aumenta los riesgos para la salud de todas las especies de un ecosistema, los seres humanos, los animales domésticos y la fauna silvestres. Además, del cambio climático y la pérdida de resiliencia ecosistémica que son factores que preparan el terreno para la irrupción de nuevas amenazas como la rabia transmitida por murciélagos, se suma la sinantropía de los murciélagos hematófagos y los factores antropogénicos que favorecen su desplazamiento, contribuyen directamente en la emergencia, incremento e incidencia de la rabia en el Perú.

El objetivo principal de este estudio ha sido el desarrollo de un análisis epidemiológico minucioso y detallado de la rabia silvestre, los resultados y discusiones que planteamos son inéditos, reveladores, pero sobre todo valioso en la prevención y control de la rabia silvestre transmitida por murciélagos hematófagos.

Abstract

Rabies is probably one of the most neglected diseases by health services in those countries where it is categorized as endemic; however, studies conducted for many years and which we present in this document, show that wild rabies transmitted by vampire bats is more of a slow emerging disease than an endemic disease per se.

The importance of rabies lies not only in the fact that it is a deadly disease for humans, domestic and wild animals (free-living), but for those of us who have had the opportunity to study it, its importance lies in the opportunity that rabies provides to be able to study epidemiology comprehensively. Rabies is a zoonotic disease that affects several species including humans, many of the reservoirs of rabies are wild animals therefore incorporates into its study many disciplines such as biology, ecology, natural history, genetics, veterinary medicine, allowing to integrate into cross-sectional manner concepts such as ecological niches, phylogenetic analysis, molecular epidemiology, the theory of coalescence, etc.

The approaches of ecosystem health, shared health or one world one health converge in a perfect way if we talk about rabies, for its prevention and control requires working with a comprehensive and multidisciplinary perspective. Analyzing the social determinants that allow the emergence of this disease of public health importance is a priority.

Rabies as an infectious disease is complex in the natural environment, and is driven to some extent by ecosystem changes associated with human population growth in risk areas, increased demand for animal protein and thus increased breeding of domestic animals, and unsustainable consumption of natural resources, biodiversity loss, and habitat fragmentation are factors that result in a decline in ecosystem services, thus rabies as an emerging disease increases the health risks for all species in an ecosystem, humans, domestic animals, and wildlife. Besides, climate change and the loss of ecosystem resilience, which are factors that pave the way for the emergence of new threats such as bat-borne rabies, are compounded by the synanthropy of hematophagous bats and the anthropogenic factors that favor their displacement, directly contributing to the emergence, increase, and incidence of rabies in Peru.

INDICE DE TABLAS

I. Factores ecológicos y antropogénicos de exposición a la rabia en los murciélagos hematófagos: implicaciones para la transmisión y el control.

Tabla 1. Modelo generalizado mixto de análisis lineal de los factores individuales y a nivel de población que influyen en la exposición de la rabia en los murciélagos hematófagos.

IV. Cuantificar la carga de la rabia de los murciélagos hematófagos en el ganado peruano.

Tabla 1. Predictores del reporte de mortalidad en animales domésticos debido a la sospecha de enfermedades infecciosas en sur de los Andes peruanos.

Tabla 2. Predictores de la vacunación bovina contra la rabia en distritos endémicos.

Tabla 3. Número de casos y carga económica de pérdidas de animales debido a la rabia en el sur del Perú, estimación por varios métodos para el 2014.

Tabla 4. Número de casos y carga económica de la mortalidad animales debido a la rabia en el sur del Perú en el 2014.

*VII. Modelo de nicho ecológico de murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) y de la rabia bovina como herramienta de vigilancia de la rabia silvestre.*

Table 1. Umbral (p-value) y ratios por defecto.

Table 2. Porcentaje de contribución de las variables climáticas en el modelo.

INDICE DE GRAFICOS y FIGURAS

I. Factores ecológicos y antropogénicos de exposición a la rabia en los murciélagos hematófagos: implicaciones para la transmisión y el control.

Figura 1. Efectos de la edad (a) y la historia de sacrificio (b) en la exposición a RABV en murciélagos hematófagos.

Figura 2. Relación entre el tamaño de la colonia de murciélagos hematófagos y la seroprevalencia.

II. Características evolutivas de los patógenos hospedantes revelan la dinámica y las futuras invasiones de la rabia de los murciélagos hematófagos

Figura 1. Estructura genética y geográfica de los marcadores del reservorio y del virus con distintos mecanismos de herencia.

Fig. 2. Dinámica de la dispersión viral histórica dentro del Perú.

Figura 3. Pronosticando la invasión del RABV a la costa del Pacífico de Sudamérica.

III. Expansiones espaciales y ondas de expansión de la rabia en murciélagos hematófagos

Figura 1. Patrones espaciales y temporales de los brotes del RABV en Perú.

Figura 2. Expansión espacial nacional del RABV.

Figura 3. Cambios en la elevación geográfica de los brotes de rabia en cada región.

Figura 4. Expansiones espaciales y aumento de la carga del RABV en los valles andinos de Apurímac, Ayacucho y Cusco (AAC).

Figura 5. Propagación en forma de ola y previsión de brotes en dos valles del Perú.

IV. Cuantificar la carga de la rabia de los murciélagos hematófagos en el ganado peruano.

Figura 1. Tasas de notificación y vacunación por comunidad en toda el área de estudio.

Figura. 2. Cálculo de los factores de multiplicación a partir del cuestionario y de los datos de vigilancia epidemiológica del SENASA.

Figura 3. El efecto del aislamiento geográfico en la probabilidad de notificar la muerte de ganado debido a presuntas enfermedades infecciosas.

Fig. 4. Distribución espacial de los casos de rabia en animales domésticos en los distritos del sur del Perú después de corregir el efecto del aislamiento geográfico o la notificación.

V. Los biomarcadores fluorescentes demuestran las perspectivas de las vacunas untables para controlar la transmisión de enfermedades en los murciélagos silvestres.

Figura 1. Transferencia e ingestión de un biomarcador en gel esparcido orotópicamente en tres colonias de murciélagos hematófagos.

Figura 2. Heterogeneidad de los contactos de los murciélagos revelada por las transferencias de polvo ultravioleta.

Figura 3. Modelos dinámicos de transmisión de la rabia y de vacunación tópica.

Figura 4. Simulación de brotes de rabia con vacunación.

Figura 5. Comparación de los efectos del sacrificio y la vacunación en la transmisión de la rabia.

VI. Modelo de nicho ecológico de murciélagos hematófagos (Desmodus rotundus) y de la rabia bovina como herramienta de vigilancia de la rabia silvestre.

Figura 1. Análisis de las características operativas del receptor (ROC) de la precisión del modelo realizado con datos de prueba (AUC = 0.957).

Figure 2. La prueba "Jackknife" de entrenamiento estandarizado para la presencia del murciélago hematófago.

Figura 3. Curvas de respuesta. Las gráficas reflejan la idoneidad prevista a lo largo del rango de cada variable seleccionada después de tener en cuenta las dependencias inducidas por las correlaciones entre la variable seleccionada.

Figura 4. Área geográfica máxima prevista para la transmisión de la rabia de los murciélagos hematófagos a los animales domésticos en el Perú

ACRÓNIMOS, ABREVIATURAS, SIGLAS Y ALGUNAS DEFINICIONES

ACMR	Antepasado Común Más Cercano
AgV	Variantes antigénicas
AMA	Amazonas
ANV	Anticuerpos Neutralizantes
API	Apurímac
ArcGis	Software de cartografía digital
BRL1-3	Cepas de rabia de diferentes áreas geográficas en Brasil.
CAJ	Cajamarca
CENAGRO	Censo Nacional Agrario
cytB	Citocromo Mitocondrial B
DAPC	Análisis Discriminantes de Componentes Principales
ENM	Ecological Niche Modeling
F _{IS}	Inbreeding coefficient of an individual relative to the subpopulation
GLMM	Análisis Mixto Lineal Generalizado
GPS	Sistema de Geoposicionamiento Global
HPD	Highest Posterior Density
LMA	Lima
MaxEnt	Software de modelado de nichos ecológicos por Máxima Entropía.
MG1-3	Grupo de Microsatélites 1-3
ML	Máxima Probabilidad
mtADN	ADN mitocondrial
OMS	Organización Mundial de Salud
OR	Odds Ratio
PP	Probabilidad Posterior
R ₀	Número Reproductivo Básico
RABV	Virus de la Rabia
RB	Rodamina B
SatScan	Software estadístico epidemiológico
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad Agraria
UCA	Ucayali
UFP	Unidad Formadora de Placas
un ADN	ADN nuclear
VEV	Virus de la Estomatitis Vesicular

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción
2. Antecedentes Teóricos de la Rabia silvestre transmitida por murciélagos
 - 2.1. Nociones generales
 1. Clasificación del virus rábico
 2. Estructura
 3. Propiedades
 4. El genoma
 5. Infección
 6. Ciclo viral
 7. Caracterización antigénica
3. Justificación
 - 3.1. Planteamiento del Problema
 - a. Rabia asociada con murciélagos
 - b. Cambio de hospedante de RABV de murciélagos a carnívoros y sus implicaciones para la salud pública.
 - c. RABV asociado con carnívoros silvestres e implicaciones para la reintroducción potencial de la rabia enzoótica canina
 - 3.2. Formulación del problema
4. Objetivo
 - 4.1 General
 - 4.2 Específicos
5. Metodología
 - 5.1. Diseño de la investigación
 - 5.2. Población y muestra
 - I. Muestra de selva y zonas rurales
 - 5.3. Aspectos administrativos
 - Recursos humanos
 - Recursos financieros
6. Resultados
 - I. *Factores ecológicos y antropogénicos de exposición a la rabia en los murciélagos hematófagos: implicaciones para la transmisión y el control.*
 1. Tamaño de las colonias y la dinámica de población de murciélagos hematófagos.
 2. Los patrones espaciales y temporales de la exposición al virus de la rabia en los murciélagos hematófagos.
 3. Predictores individuales y a nivel de población de la exposición al virus de la rabia en los murciélagos hematófagos.
 - II. *Características evolutivas de los patógenos hospedantes revelan la dinámica y las futuras invasiones de la rabia de los murciélagos hematófagos.*
 1. Estructura genética viral

2. Contrastando la estructura de la población de los genomas de los murciélagos hematófagos con el virus de la rabia.
3. Confirmación por microsatélite de la dispersión masculina
4. Expansiones estacionales de la rabia a través de la geografía.
5. Reconstrucción y previsión de la dinámica de la invasión viral.

III. Expansiones espaciales y ondas de expansión de la rabia en murciélagos hematófagos

1. Las expansiones espaciales son la causa de la reciente duplicación de la propagación de la rabia en el ganado.
2. Velocidades de las ondas de expansión de la rabia transmitida por murciélagos hematófagos en áreas geográficas heterogéneas.
3. Previsiones espaciales de la transmisión entre especies a los animales domésticos

IV. Cuantificar la carga de la rabia de los murciélagos hematófagos en el ganado peruano

1. Factores socio-ecológicos asociados a la notificación de enfermedades.
2. Factores socio-ecológicos asociados a la vacunación de animales domésticos contra la rabia.
3. Factores de multiplicación de sub-notificaciones de rabia.
4. La carga de la rabia transmitida por murciélagos hematófagos asociada a la muerte de animales domésticos durante el año 2014.
5. Análisis costo-beneficio de la vacunación de animales

V. Los biomarcadores fluorescentes demuestran las perspectivas de las vacunas untables para controlar la transmisión de enfermedades en los murciélagos silvestres

1. La transferencia e ingestión de biomarcadores muestra el potencial de una alta cobertura de vacunas en murciélagos hematófagos silvestres.
2. Heterogeneidades de contacto entre los grupos demográficos de murciélagos hematófagos.
3. Los modelos epidemiológicos muestran que las vacunas diseminadas superan el sacrificio para el control de la rabia.

VI. Definición de nuevas vías para gestionar la actual aparición de la rabia de los murciélagos en América Latina.

1. Distribución de los reservorios de la rabia
 - 1.1. *Conocimientos actuales*
 - 1.2. *Prácticas de gestión actuales*
 - 1.3. *Mejora de la gestión*
2. Dinámica de la transmisión dentro del reservorio
 - 2.1. *Conocimientos actuales*
 - 2.2. *Prácticas de gestión actuales*
 - 2.3. *Mejora de la gestión*
3. Exposición entre especies
 - 3.1. *Conocimientos actuales*
 - 3.2. *Prácticas de gestión actuales*
 - 3.3. *Mejora de la gestión*
4. Susceptibilidad de los huéspedes reservorios
 - 4.1. *Conocimientos actuales*
 - 4.2. *Prácticas de gestión actuales*
 - 4.3. *Mejora de la gestión*
5. Conclusión y medidas futuras

*VII. Modelo de nicho ecológico de murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) y de la rabia bovina como herramienta de vigilancia de la rabia silvestre*

7. Discusión

La discusión de los VII estudios está contenida en el capítulo de resultados.

8. Conclusiones

9. Bibliografía

10. Publicaciones científicas durante el doctorado y como parte de la presente tesis

1. Introducción

La rabia en el Perú es considerada por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria – SENASA (Organismo Público Desconcentrado del Ministerio de Agricultura) como una enfermedad infecciosa con presentación de dos ciclos enzoóticos, un ciclo de presentación urbana la cual es transmitida por perros, los programas de prevención y control de la rabia en caninos están a cargo del Ministerio de Salud (la rabia urbana no forma parte del presente estudio de investigación), y un ciclo silvestre transmitida por murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) en zonas de selva y valles interandinos, los programas de control están a cargo del SENASA.

El Perú en los últimos años ha tenido un desarrollo económico pronunciado en el sector minero y agrícola y este crecimiento ha generado alteraciones del medio ambiente por la actividad humana y los movimientos migratorios que contribuyen al riesgo de aparición o reaparición de la rabia. Una mejor comprensión de las relaciones entre los factores ecológicos y humanos con enfermedades zoonóticas es vital para identificar riesgos espaciales para la población humana y animal. El objetivo de este estudio es llevar a cabo una revisión sistemática la epidemiología molecular de la rabia silvestre en el Perú y evaluar los modelos de distribución geográfica del virus rábico a partir de los datos recogidos por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica del Servicio Nacional de Sanidad Agraria – SENASA.

La investigación se basó en el análisis filogenético del virus de la rabia; la distribución geográfica del huésped (animales domésticos) y el reservorio (murciélagos hematófagos); y los casos confirmados de rabia en diferentes especies animales en el periodo comprendido del año de 1997 al 2015.

El criterio de elegibilidad de este estudio obedece al hecho de que no existen investigaciones que se hayan realizado previamente mediante el uso de técnicas de análisis filogenético en las muestras colectadas por SENASA, tampoco hay estudios sobre evaluaciones espacio temporal de casos de rabia en el Perú. Esta investigación incluye el análisis filogenético, el análisis de la dinámica de uso del suelo, y el complejo patógeno-ecológico, es decir la evaluación del riesgo epidemiológico de presentación de la rabia en diferentes ecosistemas del Perú, las regiones de Amazonas, Cajamarca, Huánuco, Junín, Ayacucho, Apurímac, Cusco y Madre de Dios serán las áreas de intervención y evaluación, de acuerdo con el SENASA estas regiones son consideradas como de alto endemismo para la rabia silvestre.

En el Perú la presentación de la rabia silvestre en animales domésticos se da en diferentes pisos altitudinales, por tal motivo este estudio incorpora evaluaciones espacio-temporal bajo el esquema de conglomerados. La altura máxima encontrada para casos de rabia silvestre en el Perú fue 3856 metros, revelando rangos superiores del movimiento de hematófagos que actualmente son aceptados. El trabajo de investigación destaca el papel de la eco-epidemiología para el estudio de la estructura y funcionamiento de los focos naturales de infección. El estudio incorpora la epidemiología molecular, el análisis filogenético y geográfico para modelar la dinámica espacial y temporal de la rabia, contribuyendo de esta manera a predecir y controlar la rabia silvestre en el Perú.

El análisis filogenético ha estado a cargo del personal del Institute of Biodiversity, Animal Health and Comparative Medicine, Centre for Virus Research de la Universidad de Glasgow en Escocia, las muestras y las bases de datos asociadas a ellas son proporcionadas por

SENASA, el estudio está patrocinado por Programa de Doctorado de Metodología de la Investigación Biomédica y Salud Pública del Departamento de Pediatría, Ginecología, Obstetricia y Medicina Preventiva de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona.

2. Antecedentes Teóricos de la Rabia silvestre transmitida por murciélagos

2.1. Nociones generales

El virus de rabia es un virus de ARN del género *Lyssavirus*, familia *Rhabdoviridae* y es uno de los virus zoonóticos más importante del mundo, responsable de más de 59,000 muertes humanas cada año (1). La rabia transmitida por murciélagos hematófagos es una amenaza importante para la salud pública en toda la distribución de su vector, el murciélago hematófago común (*Desmodus rotundus*), desde el norte de México hasta el norte de Argentina (2). El virus se transmite entre los murciélagos y otros mamíferos por la mordedura de un animal infectado. Transmisión a otras especies, incluidos los humanos se produce cuando los murciélagos infectados muerden para tomar sangre, su fuente de alimentación principal.

Los primeros estudios sobre la epizootiología de la rabia en poblaciones de *D. rotundus* describieron la infección como una ola de migración – la persistencia del virus dependió del movimiento entre poblaciones con individuos susceptibles (3–5). Por eso, la mayoría de las poblaciones estaban libres de infección en cualquier momento. Sin embargo, observaciones de años recientes introducen la posibilidad de un cambio fundamental en la epizootiología de la rabia. En zonas con mucho ganado casos de rabia en bovinos ocurren cada año y parece que la rabia es endémica, no epizootica en estos lugares.

Sabemos por la teoría de la epidemiología de enfermedades humanas, que los brotes tienen una menor probabilidad de terminar en poblaciones grandes, un fenómeno denominado “tamaño crítico de la comunidad” (6,7). Por lo tanto, las poblaciones más grandes pueden soportar persistencia endémica o permanente, pero las poblaciones pequeñas no apoyan a la existencia de una persistencia permanente y tienen brotes esporádicos o con una frecuencia regular (7). En el sistema de la rabia silvestre en el Perú, se sabe que poblaciones de *D. rotundus* son más grandes en zonas de alta densidad de población animal que en zonas naturales del (8). Una hipótesis es que la rabia tiene persistencia enzoótica en poblaciones grandes de murciélagos asociados con grandes poblaciones de ganado, pero persistencia epizootica en zonas con poco ganado.

Un método poderoso para comprender las dinámicas de enfermedades infecciosas, especialmente virus de ARN con altas frecuencias de mutación, es el análisis genético mediante la teoría de la coalescencia. Esta teoría de genética poblacional demuestra que hay una relación positiva entre la diversidad genética y el tamaño de la población. Estudios recientes han demostrado que, mediante la combinación de información genética con información temporal y espacial, es posible estimar las dinámicas de brotes, su tamaño y sus movimientos (9,10). En este proyecto, usaremos métodos similares para explorar diferencias fundamentales en la epizootiología de la rabia en poblaciones de *D. rotundus* entre zonas selváticas y zonas rurales consideradas áreas ganaderas. Predecimos que, en poblaciones con mucho ganado en la sierra, la rabia tiene un tamaño de población constante sin evidencia de transmisión entre poblaciones, pero en poblaciones selváticas con poco ganado, la rabia tiene dinámicas esporádicas con evidencia de movimientos y transmisión entre poblaciones.

La rabia en el Perú es una enfermedad de declaración obligatoria, dispuesto en la Resolución Jefatural N° 271-2008-AG-SENASA. Para la evaluación de los datos epidemiológicos se ha tomado como referencia los criterios técnicos establecidos en el Capítulo 8.10.1 del Código Sanitario para los Animales Terrestres (11).

La rabia es una enfermedad vírica que afecta al sistema nervioso central de los animales de sangre caliente, incluidos los humanos. El período de incubación de la enfermedad es largo (seis meses – Art. 8.10.1.), y los síntomas pueden tardar varias semanas en aparecer tras la infección, pero una vez que aparecen, la rabia es siempre fatal en los animales y humanos.

El virus de la rabia es un lyssavirus, grupo de virus causante de encefalitis que comprende también varios lyssavirus del murciélago identificados recientemente. Los lyssavirus pertenecen a la familia Rhabdoviridae (12).

El nombre Rhabdo viene del griego e identifica la forma característica de bala o de bastoncillo de los virus. Existen varias cepas del virus clásico de la rabia que por lo general están asociadas a una especie principal como reservorio.

La rabia ha sido reconocida desde hace siglos, pero no es sino en 1880 cuando el trabajo realizado por Louis Pasteur identifica un virus como la causa de la enfermedad.

La rabia es una enfermedad inscrita en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres, 2009, (Capítulo 1.2; Artículo 1.2.3), de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y debe ser declarada a la OIE (capítulo 1.1– “Notificación de enfermedades y datos epidemiológicos”).

El virus de la rabia está presente en todos los continentes, excepto en la Antártica. Algunos países han establecido medidas de control y vigilancia y han conseguido erradicar la enfermedad para satisfacer los requisitos de la OIE sobre el estatus sanitario libre de rabia. En el Perú y en otros países, la enfermedad sigue siendo endémica y los principales reservorios son los animales salvajes como es el *D. rotundus*.

Informes epidemiológicos publicados por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria – SENASA del Perú (2015), indican que existe una asimetría en la presentación y distribución de casos (asimétricamente positiva), según el informe en el Perú se presentan años epidémicos asociados a cambios climáticos y al incremento de las poblaciones de murciélagos hematófagos. SENASA considera que esta asimetría se debe a la falta de sensibilidad del sistema de vigilancia y a la información heterogénea de notificaciones que se reciben a nivel de campo (sub notificación). El valor predictivo positivo de los casos no es preciso, algunas de las sospechas no han sido confirmadas ya sea por muestras mal remitidas, inapropiadas, inadecuadas o por que las notificaciones son tardías, no permitiendo la toma de muestras para un diagnóstico adecuado.

La base de datos del SENASA asociada a rabia, contiene información epidemiológica detallada, al realizar un análisis de estos datos se observa que existe una marcada presentación de casos de rabia silvestre por especie animal (animales domésticos), el 91% de los casos diagnosticados es en bovinos, en equinos 23%, en caprinos 9% y otras especies con menor presentación de casos (años evaluados 2007-2013).

Si bien la rabia no ha sido de las mayores epidemias que ha sufrido el género humano (13), si es una de las enfermedades más antiguas y recurrentes que se recuerdan, ya que su conocimiento se remonta aproximadamente al siglo 23 A.C. (14,15). Desde 1885, cuando Pasteur introdujo la vacunación contra la rabia, se han seguido presentando infinidad de casos de este padecimiento tanto en humanos como en otras especies domésticas y silvestres (13). Se trata de una enfermedad infecciosa, transmisible, de curso agudo y mortal, única por su capacidad para afectar a todos los mamíferos, ampliamente distribuida en el mundo, con una letalidad de 100%, clasificada como zoonosis y en cuya transmisión interviene casi siempre la agresión de un animal enfermo (16). La enfermedad se inicia a partir del momento en el que el vector del virus rábico inocular por mordida al hospedero susceptible y los mecanismos de defensa inespecíficos no son capaces de interceptar y anular al virus, continuando de esta manera su evolución hasta producir la muerte.

Una vez infectado el tejido subyacente, el virus rábico sufre una primera replicación en el sitio de la herida, durante las primeras horas, posteriormente avanza por los nervios periféricos hasta alcanzar el Sistema Nervioso Central y de ahí se disemina por vía nerviosa a los demás órganos, llegando a las glándulas salivales (17).

Desde el punto de vista epidemiológico hay dos formas de presentación de rabia, la urbana que se propaga sobre todo entre los perros, y la silvestre que se asienta en diferentes especies vectoras de la enfermedad dependiendo de la zona geográfica involucrada. De esta manera encontramos a los zorros rojos como únicos vectores en Europa Occidental; a los zorros plateados, zorrillos, mapaches y coyotes en América del Norte; las mangostas en algunas islas del Caribe; los chacales en África del Norte etc. (17,18).

En los países industrializados la rabia de tipo urbano transmitida al humano por perros está prácticamente eliminada, predominando la rabia de tipo silvestre (18). Por otro lado, en las regiones tropicales de América Latina el vector silvestre es el murciélago hematófago que plantea problemas importantes. Los murciélagos mueren a consecuencia de la rabia, aunque la pueden transmitir por períodos largos de tiempo sin que se observen manifestaciones clínicas (17). Como estos quirópteros se alimentan exclusivamente de sangre se han multiplicado en las regiones tropicales donde hay cría de ganado vacuno, en quienes encuentran su alimento con facilidad, causando graves pérdidas económicas (17).

Para una mejor comprensión del virus, conviene hacer una explicación detallada de su estructura y epidemiología la cual se describe seguidamente.

1. Clasificación del virus rábico

El virus de la rabia ha sido Clasificado recientemente dentro del nuevo género de los Lyssavirus. Este género junto con el de los Vesiculovirus y otros virus todavía no asignados a ningún género y para los cuajes no se aprobó nombre, constituyen la familia Rhabdoviridae (16).

El género Lyssavirus contiene el virus de la rabia y a otros de reciente descubrimiento que están serológicamente relacionados con él. Estos Son el virus lagos Bat, el virus Mokola, el virus Obodhiang y el virus Kotonkan. Una de las bases para separar al antiguo género de los Rhabdovirus en los actuales géneros Vesiculovirus y Lyssavirus, fue el que los .vesiculovirus se multiplican tanto en vertebrados como en artrópodos, estando en este género los virus de la Estomatitis Vesicular, Cocal, Flanders-Hart Park, etcétera; en tanto que los Lyssavirus se multiplican en vertebrados solamente. La naturaleza tentativa de algunas asignaciones a determinados géneros se evidencia en el hecho de que los virus Obodhiang y Kotonkan se colocan en los Lyssavirus por su relación antigénica con el virus de la rabia; sin embargo, se multiplican en artrópodos (14). La relación antigénica de los dos virus mencionados con el virus de la rabia es bastante lejana en el mejor de los casos, pero considero que el criterio inmunológico no es suficiente motivo para la asignación del virus a uno u otro género. Una línea independiente de investigación parece sugerir que la relación del virus de la rabia y el de la Estomatitis Vesicular es más estrecha de lo que se había pensado hasta ahora (19). Aparentemente la ARN transcriptasa del virus de Estomatitis Vesicular inactivado con luz ultravioleta, es utilizado por el virus de la rabia acortando su periodo de latencia (19)

En caso de ser así, la parte del ARN viral del virus de la rabia en la que se inicia la replicación del ácido nucleico sería lo suficientemente parecida a la sección de inicio de replicación del virus de la Estomatitis Vesicular como para activar a la enzima. Este efecto parecería indicar que de manera semejante a lo estudiado con otros virus de la familia Rhabdoviridae (19), los complejos de iniciación de transcripción del ARN son semejantes, ya que la ARN transcriptasa dependiente de ARN que forma parte del virión de la Estomatitis Vesicular, es lo suficientemente específica para replicar ARN viral y no los múltiples ARN presentes en el citoplasma de la célula infectada (19).

Independientemente del género a que sea finalmente asignado el virus de la rabia; el hecho es que ésta, continúa siendo una enfermedad importante en el mundo; tanto desde el punto de vista de las pérdidas que ocasiona en algunos países de Ibero América (19) como desde el punto de vista de la salud pública en casi todo el mundo.

CLASIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA RABIA

ORDEN: Mononegavirales

FAMILIA: Rhabdoviridae

GENERO: Lyssavirus

Desde un punto de vista sistemático, los Rhabdovirus pertenecen al orden Mononegavirales, que se distribuye en tres familias: Rhabdoviridae, Paramyxoviridae (virus Sendai, de la enfermedad de Newcastle, del sarampión, virus sincitial respiratorio y rubulavirus porcino) y Filoviridae (virus de Marburg). Los rhabdovirus que infectan a los animales pertenecen a tres géneros (20): los Vesiculovirus (cuyo prototipo es el virus de la estomatitis vesicular -VSV-),

los Lyssavirus (cuyo modelo es el virus de la rabia) y los Ephemerovirus (representados por el virus de la fiebre efímera bovina).

2. Estructura

Los Rhabdovirus son virus de ARN de cadena negativa; esto es que tienen una única hebra de ARN que está en sentido contrario al del ARNm necesario para codificar proteínas virales. Esto significa que el ARN no puede codificar directamente la síntesis proteica y ha de ser copiado a una cadena de ARNm de sentido positivo. Como resultado, el virus debe de portar su propia ARN polimerasa dependiente de ARN(21).

Como lo sugiere su nombre estos virus tienen forma bacilar. Tienen un lado que termina en una forma redondeada y por ello se dice que tiene forma de bala. Cada partícula vírica es de casi 100nm de diámetro y 400 nm de largo, pero esto puede variar. Tienen una envoltura derivada de la membrana plasmática de la célula huésped. El virus sólo tiene cinco proteínas(21).

Proteína G (de superficie). Esta es la glicoproteína que forma una espina en la superficie saliendo de la misma como trímeros. Hay cerca de 1200 proteínas G (400 trímeros) por partícula viral. Es una proteína transmembrana con una secuencia de señal N-terminal. La proteína G se fija a los receptores celulares y es el blanco de anticuerpos neutralizantes. Hay tres cadenas sacaras unidas por enlaces N-glicosídicos. La penetración del virus al citoplasma toma lugar por una vía endocítica y no por la membrana plasmática. Esto es porque el trímero de proteína G sufre un cambio de conformación a un pH de 6.1 que lo hace más estable y probablemente permite que una región hidrofóbica de la molécula sea expuesta y se embeba en la membrana de la célula a ser infectada(21).

- **Proteína M (matriz).** Esta es una proteína periférica de membrana (originalmente la M era por membrana) que parece bordear la superficie interna de la membrana viral, aunque esto sigue en controversia. Puede actuar como un puente entre la membrana o la proteína G y la nucleocápside(21).
- **Nucleocápside.** Esta es el núcleo de ribonucleoproteína infeccioso. Tiene una estructura helicoidal que descansa sobre la membrana. En micrografías de electrones con tinción negativa, la nucleocápside tiene una apariencia estriada.
- **Proteína N (Nucleoproteína).** Esta es la principal proteína estructural y cubre el genoma de ARN. Protege al genoma de las nucleasas y mantiene su conformación de forma tal que permite la transcripción.
- **Proteína L (Larga) y NS (no estructural, también conocida como P (fosfo))** Juntas forman la ARN polimerasa ARN dependiente o transcriptasa. La proteína L tiene un peso molecular de 240 kiloDaltons y su gen ocupa casi el 60% del genoma.

3. Propiedades

Los Rhabdovirus son virus frágiles, inactivados por el calor, los rayos ultravioletas, la desecación, los solventes orgánicos y la tripsina, y son bastante estables entre pH 5 y 10. Los rhabdovirus se conservan varios días a 4°C y durante mucho tiempo a -70°C y liofilizados.

El virus de la estomatitis vesicular – VSV, ha sido el más estudiado y sirve de virus de referencia de los rhabdovirus. A pesar del gran parecido, la analogía antigénica entre los

diferentes géneros de rhabdovirus es poca; por ejemplo, las proteínas G del virus de la rabia y de VSV solamente tienen 20% de homología en frecuencia de aminoácidos (22).

El virus de la rabia tiene una forma ojival truncada y mide 180 nm de largo por 75 nm de ancho. Posee proyecciones de superficie y presenta estrías características en microscopía electrónica. El virus de la rabia tiene un coeficiente de sedimentación de 600 unidades S₂₀w y está constituido por 5 proteínas (23), codificadas por el ARN viral, distribuidas en 2 componentes principales: la nucleocápside (NC) y envoltura.

La Nucleo Cápside (NC) interna es un complejo ribonucleoproteínico con simetría helicoidal, constituida por una cadena de ARN asociada a 3 proteínas: la Nucleo proteína (N) asociada fuertemente, la proteína No Estructural (NS) y la proteína Larga (L) asociadas menos fuertemente(21).

Las partículas están cubiertas por una envoltura que obtienen por la gemación del virus a través de la membrana plasmática de la célula hospedera. Las 2 proteínas de la envoltura son la Glicoproteína (G) y la proteína M. La proteína G está glicosilada y contiene aproximadamente 3% de carbohidratos y la envoltura contiene fosfolípidos que forman el 15 a 25%, según la célula hospedera, ambos de la masa del virión (24). La proteína M, descrita tradicionalmente como una proteína de la envoltura que recubre internamente la membrana lipídica, aparentemente forma parte de la NC (24).

4. El genoma

Cada una de las 5 proteínas que constituyen el virus rábico es codificada por un gen en el ácido nucleico. La secuencia de los 11932 nucleótidos del genoma de la cepa PV del virus de la rabia (25) ha permitido estudiar los elementos reguladores de la transcripción y de la replicación. La secuencia completa de aminoácidos fue deducida de la secuencia de los genes que codifican respectivamente las 5 proteínas: N, NS, M, G y L. Por otro lado, el análisis de las secuencias parciales de diferentes Lyssavirus ha permitido su estudio comparativo y "evolutivo" (26) (27–29).

Una peculiaridad del genoma del virus de la rabia es la existencia de un gran intergen entre los cistrones G y L que comprende 423 nucleótidos. Esta región que no codifica e hipervariable fue denominada pseudogen II (25). Esta región posee una señal de parada de la transcripción; el complejo de transcripción puede ignorar la señal de parada del gen G y reconocer aquélla de II para producir un ARNm largo G-, de la proteína G. La transcripción del gen G y de II en un solo ARNm largo es sistemática para ciertas cepas como Flury HEP (30), 0 alternativa para otras como PV, donde las 2 formas de transcripción del gen G (ARNm G y ARNm G-,) coexisten (28). Se desconoce el significado biológico de estas 2 formas de transcripción de la proteína G, pero aparentemente este fenómeno tiene un papel regulador sobre la tasa de transcripción del gen distal L y en consecuencia sobre la expresión del genoma (28).

5. Infección

A. Especies susceptibles

Aunque en principio todos los animales homeotermos pueden ser infectados por el virus de la rabia, la sensibilidad de las aves es muy atenuada. El virus provoca en ellas una enfermedad pasajera de evolución muy lenta después de la inoculación intracerebral y la enfermedad no

existe en la naturaleza (14). En los mamíferos, una vez declarada, la enfermedad siempre tiene una salida fatal, pero existen importantes variaciones de sensibilidad o de virulencia.

Ciertos animales, como el perro, el zorro, el murciélago y otros, son extremadamente sensibles a la rabia y constituyen los reservorios del virus, lo que plantea problemas epizooticos y epidemiológicos. Otros mamíferos como los roedores no representan peligro para la fauna silvestre porque normalmente no desarrollan rabia furiosa, sino al contrario, una forma paralítica. Si los roedores son los modelos de experimentación animal para la infección rábica, es porque las cepas rábicas han sido adaptadas en ellos y que puede practicárseles la vía de infección intracerebral, aunque no sea la vía de infección natural (14).

B. Bases moleculares de la virulencia

La adaptación de las cepas de virus rábico a su sustrato celular favorece la virulencia. Desde el inicio de sus investigaciones, Louis Pasteur clasificó los virus de la rabia en 2 categorías: a) los virus de la calle, aislados en campo y que causan la enfermedad después de una inoculación periférica en animales de laboratorio y b) los virus fijos, manipulados en el laboratorio, que en general no causan enfermedad sino después de una inoculación intracerebral. El nombre virus de la calle se refiere a las cepas aisladas en medio urbano, mientras que el de virus fijos se refiere a la fijación de tiempo de incubación en una especie determinada (31).

La estructura de la proteína G también tiene gran influencia sobre la virulencia de las cepas. Los mutantes con una sustitución de aminoácidos en las posiciones 1980333 son menos virulentos en ciertas condiciones que varían según la especie, la edad y el estado inmunitario del hospedero (31).

Aunque el virus rábico haya sido adaptado *in vitro* a varias líneas fibroblásticas de mamíferos, su blanco principal *in vivo* es la neurona. Sin embargo, un estudio realizado en 1965 en el conejo ha señalado la presencia de partículas infecciosas del virus rábico en células sanguíneas periféricas durante la enfermedad (32).

Aparentemente porque la viremia no es un evento importante de esta enfermedad, la infección de los linfocitos por el virus de la rabia no fue publicada más hasta 1994 (33), cuando se describió que esta infección induce la apoptosis (34). Este mecanismo tal vez explique el estado de inmunosupresión observado en los casos de rabia.

C. Bases moleculares de la susceptibilidad

Experiencias *in vitro* realizadas con fibroblastos y neuroblastomas sugieren la existencia de receptores saturables y específicos para el Virus rábico (35). Sin embargo, su identificación incontestable no ha sido obtenida todavía. Parece ser que el receptor del virus de la rabia depende de la naturaleza de la célula hospedera. De esta manera, si se ha demostrado que los gangliósidos juegan un papel en la adsorción del virus rábico a los fibroblastos (36) y que el receptor nicotínico de la acetilcolina está implicado en su fijación a las células musculares, el receptor específico del virus sobre las neuronas no ha sido identificado todavía.

D. Acción de los anticuerpos neutralizantes

La conformación de la proteína G se modifica bajo efecto del pH ácido y se revelan regiones hidrófobas que permiten su unión a la membrana lisosomal (24,37). Probablemente algunos anticuerpos anti-G neutralizan el virus rábico al inhibir la etapa de fusión (38), mientras que

otros anticuerpos aparentemente neutralizan el virus por una vía más clásica, que es aquella de inhibir la adsorción de la proteína G a sus receptores sobre la célula hospedera.

6. Ciclo viral

Como resultado de un estudio comparativo de la morfogénesis de diferentes cepas de virus rábico en cultivos celulares, (39) estudió intensivamente en cortes ultrafinos con microscopía electrónica, el comportamiento de varias cepas de virus rábico, usando especialmente células BHK-21 Y 13S CI ambas de origen de riñón de hámster. Si bien no se observaron grandes diferencias en la morfogénesis de las diferentes cepas de virus rábico estudiadas, el ciclo de infección del virus rábico en cultivos celulares fue estudiado con un grado de detalle que lo hace accesible de interpretación.

El ciclo de multiplicación de los virus ARN en general está constituido por once pasos diferentes que fluyen uno en el otro sin detenerse y en ocasiones se mezclan entre sí.

- a) El primer paso del ciclo de todo virus es la adsorción o adherencia, es decir la unión del virus con una célula susceptible. Esta adsorción puede ser con o sin mediación de sitios receptores.
- b) El segundo paso es la penetración, que también tiene variaciones según la familia de virus de que se trate. Puede ser penetración por captación celular en vesículas pinocitóticas, como en el caso de los Poxviridae (familia de virus ADN), por penetración a través de la membrana celular como en algunos Picornaviridae o bien por viriopenesis, es decir la unión de la envoltura viral a la célula y el subsecuente vaciado de la nucleocápside al citoplasma celular como en los Herpetoviridae (familia de virus ADN).
- c) Una vez dentro de la célula, ocurre la denudación, es decir la liberación de un ácido nucleico funcional. En algunos virus los procesos de penetración y de denudación ocurren simultáneamente.
- d) Una vez liberado el ácido nucleico en el citoplasma pueden ocurrir varias cosas según el tipo de ácido nucleico contenido en el virus. Existen varias terminologías para denominar los ácidos nucleicos (40), dependiendo de si el ARN viral es al mismo tiempo el ARN mensajero, es decir que puede ser traducido directamente en proteína o bien si requiere de una síntesis de ARN antes de ser traducible en proteína. Siguiendo convenciones internacionales, se llamará cadena positiva a la contenida en el virión y negativa o Complementaria a la que se sintetiza en la célula infectada. Si el ARN viral es al mismo tiempo mensajero se le denominará "mensaje", que será opuesto al ARN "antimensaje" que no tiene sentido para la célula. Si el ARN positivo es mensaje, el siguiente paso que sigue a la denudación, es la formación de polirribosomas e inicio de la síntesis de proteínas tempranas. Si el ARN positivo es antimensaje, lo primero que ocurre después de la denudación es la síntesis de un ARN complementario que sea mensaje antes de proceder a la síntesis de proteínas. En este caso el virus casi siempre lleva su propia enzima, la ARN replicasa, como parte integral del virión ya que el ácido nucleico deberá replicarse en ausencia de síntesis de proteína. Una vez que el ARN complementario o mensaje ha sido producido se inicia la síntesis de proteínas tempranas. Por último, en el caso de la familia Retroviridae, a continuación de la denudación ocurre la síntesis de un ADN complementario al ARN viral, para esto, el virión lleva la llamada transcriptasa reversa o inversa, que da el nombre a la familia y que se encarga del paso de ARN a ADN(39).
- e) El siguiente paso es la síntesis de proteínas tempranas que por definición son aquellas que se sintetizan directamente en el ARN progenitor o bien en el ARN complementario del progenitor. Estas proteínas tempranas sintetizadas como es natural en pequeña cantidad

sirven para establecer la infección viral en la célula. Algunos virus producen potentes inhibidores de macromoléculas celulares en esta fase (inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas celulares) así como las polimerasas necesarias para el siguiente paso(41).

- f) A continuación, se inicia la síntesis de ARN de progenie por medio de la formación de un intermediario de replicación que está formado por una molécula de ARN que es recorrido simultáneamente por varias moléculas de polimerasa y, sobre una sola molécula de ácido nucleico (positiva o negativa) se sintetizan simultáneamente varias moléculas complementarias en varios grados de maduración. Una vez que se han acumulado suficientes ARN virales se inicia el siguiente paso(41).
- g) Por definición las proteínas tardías son aquellas que se sintetizan en el ARN de progenie y en este caso ocurre una síntesis masiva de proteínas. Estas son generalmente proteínas precursoras, es decir que van a formar parte del virión, de ahí que se requieran en gran cantidad. La mayoría de las cápsides virales están formadas de unidades repetitivas independientemente de la familia de virus de que trate. Una vez que se han sintetizado suficientes proteínas precursoras, ocurre una especialización en la función de los ácidos nucleicos al iniciarse el siguiente paso.
- h) Ensamble de nucleocápsides. Este es esencialmente el proceso de agregado de las cápsides junto con el ácido nucleico. En este caso también el proceso es diferente según el virus de que se trate.
- i) La maduración viral consiste en una gemación a través de la membrana celular en el caso de los virus envueltos y en la simple concreción de las nucleocápsides en el caso de los virus desnudos.
- j) La citólisis ocurre casi exclusivamente en los virus que maduran en el citoplasma, como el único medio de liberarse; y en el caso de virus envueltos, de maduración en la membrana plasmática, generalmente la citólisis no ocurre o por lo menos es muy lenta dando lugar a la máxima liberación de viriones maduros, que es el último paso del ciclo de virus.
- k) Liberación viral, como se explicó antes. El llamado periodo de latencia de los virus abarca desde el paso a (adsorción) hasta el k (liberación viral), en tanto que el llamado periodo o fase de eclipse, es un término puramente microscópico y abarca el periodo en que el virus es invisible hasta que los viriones de la progenie empiezan a ser reconocibles (desde el paso y hasta el paso h según se ha descrito). El periodo de Latencia del virus rábico dura un promedio de 16 horas desde el momento en que se adhiere a la célula susceptible hasta que los primeros viriones son liberados al medio ambiente y son detectables (42).

Independientemente del sistema celular, de la cepa de virus y de la multiplicidad empleados, la infección celular progresa en forma asincrónica. Nunca se logra infectar en forma sincronizada a la totalidad de las células a pesar de que se empleen altas mutiplicidades para infectar a los monoestratos (33). Esto se ha tomado como evidencia indirecta de que sólo cierta parte del ciclo celular es susceptible al virus rábico y que por lo tanto sólo las células que están en esa fase son infectadas, en tanto que las otras células se muestran refractarias. Una vez establecido el virus en el cultivo, la infección subsecuente de las células ocurriría tan pronto como fueran llegando al punto del ciclo celular que es susceptible y así llegaría a infectarse todo el monoestrato (33). Otra posibilidad que ha surgido deriva de la determinación del número de partículas físicas que constituyen una unidad formadora de placa. Esta, es una indicación del número de partículas defectuosas que constituyen un determinado cosechado de virus. La discrepancia observada entre autores, con respecto a una característica del virus rábico, deriva de la falta de homogeneidad de una cosecha a otra (vide infra, III-2, 3). Hernández (39) determinó que el número de partículas físicas que constituyen una unidad formadora de placas es de 10 000. Esto no necesariamente significa que hay una partícula vírica

completa por cada 10 000 partículas defectuosas. Más bien significa que esa es la eficiencia de detección con que se cuenta en los diferentes sistemas de ensayo del virus rábico. Si suponemos que la prueba de placas detecta una partícula completa por cada diez presentes (lo que constituye un margen más que generoso), entonces la proporción de partículas completas a partículas defectuosas sería de 1: 1000. Aun así, la cantidad de partículas incompletas es muy elevada. Esto condicionaría a un marcado fenómeno de Von Magnus (1958), algunos autores lo han observado (39) en tanto que otros consideran que el virus rábico es insensible a él (33). Las partículas incompletas mezcladas con partículas completas condicionan tres tipos de interacción con las células, con tres resultados diferentes: a) Infección de una célula susceptible por una partícula completa solamente. Este tipo de interacción conduce a una infección productiva en la que se producirá la consabida proporción de 1000 partículas T por cada partícula B, b) Infección de una célula susceptible por una partícula completa y una partícula incompleta. Este tipo de interacción conduce al acumulo de material teñible por inmunofluorescencia en el citoplasma, pero no a una -infección productiva, y e) Infección de una célula susceptible solamente por una partícula incompleta. Este tipo de interacción no produce cambios en las células, pero produce una pérdida temporal de la susceptibilidad. Las tres posibilidades arriba anotadas hacen caso omiso del ciclo celular como factor de susceptibilidad y consideran a la célula susceptible todo el tiempo. Por otra parte, también hace caso omiso de la infección de la misma célula por vanas partículas virales de un mismo tipo; esto último por considerarlo irrelevante en cuanto al resultado de la interacción. La susceptibilidad celular, desde luego, juega un papel que pudiera ser importante (no se ha investigado este aspecto) pero en este caso solamente produciría confusión. Dado el alto número de partículas virales incompletas por cada partícula completa (mil a uno, según se ha indicado), la posibilidad de una interacción del primer tipo y que conduce a infección productiva es prácticamente nula en altas multiplicidades de infección desde 1 UFP / célula como se han empleado (38), en tanto que a medida que se emplean menores multiplicidades 0.1 UFP/célula o inferiores, las probabilidades aumentan. Si el criterio de evaluación referente al porcentaje de células infectadas es la inmunofluorescencia, la prueba detectará el primer y segundo eventos, a y b. Si el criterio es producción de virus infectante, la prueba es una medida indirecta del primer evento, a, solamente.

Es obvio que en ningún caso se logrará el 100% de infección. En altas multiplicidades, porque hay demasiadas partículas incompletas y a bajas multiplicidades, por la sencilla razón de que no hay suficientes partículas completas para ello. La explicación es razonable dado que se ajusta a las observaciones actuales en tanto que predice que aun cuando se empleen células sincronizadas, nunca se logrará una primera infección involucrando al 100% de las células. El tercer tipo de interacción, e, implica una resistencia temporal por parte de la célula, debido a que la célula infectada se haya ocupada sintetizando ARN más corto que el viral y que es el que contienen las partículas T. Eventualmente toda esta actividad metabólica inútil, cesa dentro del citoplasma celular y la célula destruye estas estructuras anómalas y recupera su susceptibilidad, justo a tiempo para ser infectada por la segunda generación de virus. Según evidencia de microscopía de fluorescencia, la adherencia y penetración del virus a la célula susceptible ocurre bastante rápido después de ponerse en contacto (38). Existe una diferencia importante entre cepas. La adsorción tarda de dos a tres horas en virus no adaptados a cultivos celulares, pero tarda unos pocos segundos en virus adaptados (33). Después de la penetración ocurre la denudación. Esta fase del ciclo del virus rábico no ha sido examinada en detalle. En el caso del virus de la Estomatitis Vesicular (VEV), el ARN purificado no es infeccioso. Baltimore concluyó de estas observaciones, que el ácido nucleico del VEV es "antimensaje" y que requiere de una ARN replicasa (ARN ~polimerasadependiente del ARN) para la replicación del ácido nucleico (40).

El virus de la rabia también contiene ARN no infeccioso, pero en él no se ha encontrado una ARN replicasa similar (23). Hernández (39) conjeturó que la replicasa de VEV inactivado con luz ultravioleta podría ser utilizada intracelularmente por el virus rábico para acortar el periodo de infección. En el sistema de trabajo empleado por estos autores (39) el periodo de latencia del virus rábico fue de 22 horas y del VEV inactivado, fue de 20.5 horas. El efecto observado en un trabajo preliminar como éste, puede explicarse de muchas formas, pero el hecho de que haya habido efecto reproducible es interesante de por sí. El problema no resuelto en el caso del virus rábico es como ocurre la primera síntesis de proteínas. Con el "antimensaje" viral esta síntesis es imposible; y así, 1) O bien el virus tiene por lo menos una parte de su genoma como "mensaje" para codificar su ARN replicasa; o 2) Tiene una ARN replicasa que sólo se activa intracitoplásmicamente y los infructuosos esfuerzos que se han hecho para revelar su presencia han sido inadecuados o, por último 3) El virus de alguna forma logra extraer una ARN replicasa del nucleoplasma, llevaría hasta el citoplasma y ahí hace interactuar su ARN con ella(43). Independientemente del procedimiento de replicación del ácido nucleico que el virus rábico siga y en la actualidad no se cuenta con evidencia que apunte hacia ninguna de las posibilidades-, el hecho es que ocurre. Una vez que se encuentra el ARN complementario, mensaje, en el citoplasma, se inicia la síntesis de proteínas tempranas. Generalmente las proteínas tempranas de los virus incluyen inhibidores de macromoléculas celulares y polimerasas de ácidos nucleicos. En el caso del virus rábico no ocurre la inhibición de síntesis de proteínas. Quizá la única proteína temprana que produce el virus es la ARN replicasa que necesita para empezar a acunar unas copias tanto del ARN viral como del complementario. Tan pronto como se encuentran suficientes mensajes disponibles, se inicia la síntesis de proteínas tardías que son principalmente proteínas precursoras y la enzima ensambladora de que se ha hablado antes. Cabe preguntarse cómo es que los ribosomas celulares logran distinguir ARNm viral si no ha desaparecido el ARNm celular. Le bastaría al virus producir suficientes copias de ARNm viral para impedir casi por completo la síntesis de proteínas celulares. En realidad, así ocurre. En presencia de la infección, la célula continúa sintetizando proteínas celulares al punto de que es capaz de dividirse aun estando infectada, dando lugar a infecciones crónicas y a cultivos "portadores" del virus (33). La síntesis de proteínas precursoras acumuladas en el interior del retículo endoplásmico granular es el primer cambio visible en las células infectadas, esto ocurre entre las ocho y catorce horas después de la infección. A las 16 horas después de la infección, aparecen en el citoplasma las llamadas matrices virales que son los corpúsculos de inclusión detectables por inmunofluorescencia. Como ya se ha indicado antes estas matrices virales consisten en nucleocápsides ya ensambladas, o sea que ya ha ocurrido el proceso de formación de estas. Simultáneamente a la aparición de las primeras matrices virales empieza a ocurrir la gemación viral en la membrana plasmática de la célula. Los viriones se observan primero en cantidades discretas y más tarde en cantidades verdaderamente extraordinarias, esto ocurre entre las 16 y las 24 horas. Si bien éste es el fin del periodo de latencia, no es el fin del ciclo de infección, ya que después de esto ocurren numerosos cambios morfológicos en las células infectadas que ayudarían a explicar observaciones disímiles de otros autores (33,44). El punto medio de la infección, que va de las 24 a las 72 horas, es cuando la célula infectada produce la mayor cantidad de virus rábico. Este virus está representado en su mayoría por virus defectuosos (39) encontrándose rara vez entre ellos a una partícula de longitud adecuada para constituir una partícula B. Después de las 72 horas, la célula puede seguir el camino de dividirse, con lo cual diluye con citoplasma nuevo y en dos células, todos los componentes virales que contiene. Con esto se establece el cultivo crónicamente infectado en el que las células continúan dividiéndose y produciendo virus esporádica o continuamente (39). En caso de que la célula no se divida, por falta de medios nutritivos en el cultivo, etcétera (las células infectadas continúan alimentándose como lo evidencia las vacuolas pinocitóticas que aún entre los virus, se forman), ocurre el último paso, que es la degeneración celular. La degeneración

celular va precedida de una serie de cambios. El sitio de ensamble cambia de la membrana plasmática a estructuras membranosas intracitoplásmicas como son el retículo endoplásmico en vacuolas y por último en sitios libres de membranas, como los bordes de las matrices virales. Todos estos sitios anómalos de multiplicación viral producen virus de características poco estudiadas. No se sabe si es virus viable o no. Wagner considera que los virus intracelulares contienen una mayor capacidad hemoaglutinante (23). Probablemente sean virus incompletos, como lo evidencia el alto porcentaje de formas anómalas; formas de L, y formas tubulares con ambos extremos abiertos, así como virus más gruesos de lo normal. Finalmente, el virus deja de madurar en la membrana citoplásmica, la maduración en este sitio cesa, y se transforma en un ciclo de maduración intracitoplásmica exclusivamente. Aparentemente este cambio del sitio de maduración viral es asimismo una señal para la destrucción celular. De esta manera, la citólisis sería un proceso muy tardío del ciclo de infección viral que ocurre después de las 120 horas de infectada la célula.

7. Caracterización Antigénica

Estudios realizados en cincuenta muestras de virus de la rabia en Brasil, recolectadas de muchas especies de animales y varias regiones del país, se caracteriza por la secuenciación parcial de la región central, la variable del gen *P*, un lugar útil para estudios epidemiológicos moleculares sensibles. El análisis filogenético de las secuencias, que incluyó la comparación con otras cepas de rabia recuperadas de las Américas, se identificaron tres grupos principales de virus de Brasil, arbitrariamente designados como BRL-1 a BRL -3. BRL-1 se encuentra en los carnívoros terrestres y clúster con otras cepas de América del linaje cosmopolita. BRL-2 compuesto por dos cepas diferentes, se recuperó de dos especies de murciélagos no hematófagos, que tenía vínculos evolutivos para murciélagos insectívoros, derivados de cepas de América del Norte. BRL-3 consiste en aislados de murciélagos y de las especies animales probablemente infectados por el contacto con los murciélagos. El grupo terrestre fue subdividido en tres subtipos: BRL-1a que se asocian exclusivamente a perros y gatos, mientras que BRL-1b y BRL-1c se encuentran exclusivamente en los zorros canosos. Estas observaciones apoyan fuertemente el papel del zorro canoso brasileño como un reservorio de la rabia. La selección de los virus representativos de la rabia en Brasil en contra de una colección de anticuerpos monoclonales contra la rabia (Acm) identificados con un pequeño panel de AcMo, podrían ser utilizados para discriminar entre todos los subgrupos de Brasil según la definición de la clasificación genética en este estudio (45).

La nucleoproteína (N) y la glicoproteína (G), de 11 virus de la rabia de Corea (RABV) de los aislamientos obtenidos de animales diagnosticados con la rabia entre 2008 y 2009 se sometieron a análisis molecular y filogenética. Seis aislamientos proceden de animales domésticos (ganado vacuno y perros) y cinco fueron obtenidos de perros mapaches salvajes en libertad. *NG* Las similitudes en las secuencias de nucleótidos del gen *N*, entre todos los aislamientos de Corea varió desde 98,1 hasta 99,8%, mientras que las de los genes *G* variaron desde 97,9 hasta 99,3%. *NGLyssavirus* Basándose en el análisis de nucleótidos de los genes *N* y *G*, el RABV coreano aislado se confirmaron como el genotipo I del *Lyssavirus* y se divide en cuatro subgrupos distintos con una gran similitud. El análisis filogenético demostró que los aislamientos de Corea fueron los más estrechamente relacionados con la NeiMeng1025B no coreanos y cepas 857r, que fueron aisladas de perros mapaches rabiosos en el este de China y Rusia, respectivamente. Estos hallazgos sugieren que los aislamientos de origen coreano (RABV) provienen de un perro mapache rabioso en el noreste de Asia. El análisis genético de los aislamientos en Corea no reveló sustituciones en varios sitios antigénicos, lo que indica que las cepas que circulan en Corea pueden ser patógenas en diferentes hospederos. (46).

Los estudios moleculares de los virus de la rabia clásica europea (RABV) han revelado una serie de linajes geográficamente agrupados. Para el estudio de la diversidad de Balcanes RABV, se seleccionaron varias secuencias de genes que fueron analizados por un panel único de los aislamientos (n5210) nucleoproteína parcial (N), obtenidos de diversos hospederos entre 1972 y 2006. Todos los aislamientos de Balcanes agrupados en linajes de la Unión Europea/Medio este, en la mayoría más estrechamente relacionados con las cepas de Europa del Este. Una serie de RABV de Bosnia y Herzegovina y Montenegro, recogidos entre 1986 y 2006, agrupados en las cepas de Europa Occidental, que se cree responsable de la epizootia de rabia que se extendió en toda Europa en la segunda mitad del siglo 20. Por el contrario, no pertenecía este sublinaje a Serbia RABV. Sin embargo, un grupo distinto de zorros de Serbia RABV proporcionan evidencia adicional a la del sur, la vida silvestre mediada por el movimiento de la rabia de Hungría, Rumania y Serbia en Bulgaria. Para determinar la zona óptima para el análisis de la evolución, parcial, total y se concatenan N-gen de la glucoproteína (G) las secuencias de genes se compararon. Mientras tanto los tiempos de divergencia y las tasas de evolución fueron similares independientemente de la región genómica, la probabilidad de un 95% más alto densidad (HPD) se redujeron significativamente los límites para N-gen completo y se concatenan con el NG-gen, las secuencias son comparadas con las secuencias parciales de genes. Un Análisis Bayesiano coalescente estimó que la fecha del antepasado común más reciente de los Balcanes RABV es de 1.885 (95% HPD, 1852-1913), y las parcelas horizontales sugieren una expansión de la población viral en locales 1980-1990, que coincide con la aparición observada de zorro de la rabia en la región (47).

El Rhabdovirus (de la familia Rhabdoviridae) incluyen una diversidad de patógenos importantes de animales y plantas.

Ellos comparten la morfología y la organización del genoma. La comprensión de la filogenia del Rhabdovirus, la ecología y la evolución ha progresado mucho durante los últimos 30 años, debido a la mejora de la vigilancia y mejora de los métodos de caracterización molecular. Junto con otros seis géneros establecidos, varios grupos filogenéticos a diferentes niveles se describen en el Rhabdoviridae. Sin embargo, las relaciones comparativas entre la filogenia y taxonomía viral siguen siendo incompletas, con los representantes de varios a la espera de caracterización genética adicional. Lo mismo es cierto para la evolución del Rhabdovirus. Hasta la fecha, los modelos moleculares más simples, sólo describen parcialmente la dinámica evolutiva de los postulados sobre linajes virales. Hay un Progreso en curso de las investigaciones viral evolutivos y ecológicos será la plataforma para futuros estudios de esta familia diversa. (47)

Ha habido tres grandes epidemias de rabia en China desde la década de 1950. Para obtener más ideas sobre la epidemiología molecular del virus de la rabia (RV) para la tercera la epidemia (la actual), hemos aislado RV de los perros y los seres humanos en las principales zonas endémicas, y se caracterizan estas cepas genéticamente mediante la secuenciación completa de la glicoproteína (G) de genes y el G-L región no codificante. Estas secuencias se compararon también filogenéticamente con RABV aislados en China durante las epidemias anteriores y los de todo el mundo.

La comparación de todos los genes G entre los aislamientos de China reveló hasta el 21,8% de divergencia a nivel de nucleótidos y un 17,8% en el nivel de aminoácidos. Los aislados en China se pueden dividir en dos subtipos distintos, cada uno de los cuales podría ser dividida en seis linajes. Los virus de subtipo que incluyen la mayoría de los virus de la China, así como los virus de los países del sudeste asiático como Indonesia, Malasia, Filipinas, Tailandia y Vietnam. El virus se encontró con poca frecuencia en China, se observó que están estrechamente relacionados con los virus distribuidos en todo el mundo entre los animales

terrestres. Curiosamente, la mayoría de los virus aislados durante los últimos 10 años pertenecen al linaje de los virus dentro de clado I, mientras que la mayoría de los virus aislados antes de 1996 pertenecen a otros linajes dentro de ancestros I y II. Nuestros resultados indican que los linajes de virus A han sido predominantes durante los últimos 10 años y por lo tanto son en gran parte responsable de la tercera y la actual epidemia en China. Nuestros resultados también sugieren que la RV China aísla en linaje que comparte un ancestro común reciente con los que circulan en el sudeste de Asia. (48).

Los Lyssavirus son virus de ARN de una sola hebra, en sentido negativo genomas responsables de la rabia como una de las enfermedades de los mamíferos. Hasta la fecha, los estudios genómicos y evolutivos han utilizado más a menudo secuencias parciales del genoma, en particular de los genes de la nucleoproteína y la glicoproteína, con poca consideración de la evolución del genoma a gran escala. Presentamos la primera genómica y el análisis de la evolución usando secuencias del genoma completo de todos los genotipos lyssavirus reconocidos, entre ellos 14 nuevos genomas completos de cepas de campo de 6 genotipos y un genotipo que es completamente secuenciado por primera vez. Al hacerlo, aumenta significativamente la cantidad de datos disponibles para la secuencia del genoma de estos virus importantes. Nuestro análisis de estos datos la secuencia del genoma revela que todos los lyssavirus tienen la misma organización genómica. El análisis filogenético revela estructuración geográfica fuerte, con la mayor diversidad genética en África, y un origen independiente de los dos genotipos que infectan a los murciélagos de Europa. También sugerimos que los genotipos pueden existir múltiples dentro de la diversidad de los virus actualmente clasificados como "Murciélagos de Lagos(42). En suma, nos muestran que las técnicas de filogenética rigurosa sobre la base de la secuencia completa del genoma de longitud ofrecer el mejor poder discriminatorio para la clasificación de genotipos en el lyssavirus. (49).

Mejoras técnicas en los últimos dos decenios han facilitado enormemente la generación de datos de secuencias de nucleótidos de las colecciones de lyssavirus. Estas bases de datos son susceptibles a los métodos de análisis filogenético, que intentan definir la estructura taxonómica de este género y predecir las relaciones evolutivas de las actuales cepas circulantes. Junto con una serie de herramientas matemáticas para estudiar la idoneidad de los modelos de sustitución de nucleótidos y la prueba de selección positiva, el proceso evolutivo se está estudiando en detalle. A pesar de la posibilidad de que los altos niveles de mutación viral, la operación de la depuración de selección parece limitar con eficacia la evolución de los lyssavirus. El reciente desarrollo de la teoría de coalescencia ha proporcionado enfoques adicionales para el análisis de datos mediante el cual el tiempo de aparición de los linajes virales puede ser más estimado de forma fiable. Estos estudios sugieren que todos los virus de la rabia que circulan actualmente han surgido en los últimos 1500 años. Por otra parte, a través de la capacidad de análisis de la dinámica viral de la población y determinar los patrones de variación de tamaño de la población, enfoques coalescentes pueden proporcionar información sobre la demografía de los brotes virales. Mientras que el hombre ayudado el movimiento de las especies huésped reservorio claramente facilita la transferencia de la rabia entre los continentes, las características topográficas influyen significativamente en la velocidad y el grado de propagación de la enfermedad. Junto con los estudios empíricos sobre la diversidad de virus, la aplicación de enfoques coalescentes ayudará a comprender mejor la emergencia de los lyssavirus, evolución y difusión. En particular, estos métodos son en la actualidad para facilitar la exploración de los factores que operan para limitar la capacidad de establecer nuevos lyssavirus persistente virus-huésped asociaciones y en última instancia, controlar la aparición de nuevas especies de este género. (50).

Los genes de la nucleoproteína de 54 animales contra la rabia humana, domésticos y salvajes aislados obtenidos en la Argentina entre 1995 y 2002 se caracterizaron utilizando anticuerpos monoclonales y análisis parcial de secuencias de genes. La diversidad antigénica y genéticas del virus de la rabia en muestras de casos de murciélagos fueron estudiadas, lo que llevó a la identificación de cinco variantes genéticas distintas. Virus de la rabia aislados de casos relacionados con hematófagos eran muy similares entre sí, mostrando el 98,9% de similitud total. Variantes antigénicas específicas (AgV) se detectaron asociados a las diferentes especies de murciélagos insectívoros, en las muestras de *Tadarida brasiliensis* y *Eumops patagonicus* murciélagos. Por el contrario, los aislamientos de *Myotis sp.* y *Histiotus sp.* Los Murciélagos no podrían coincidir con un tipo antigénico. Además, los casos de rabia en murciélagos también se detectaron en las provincias del sur que antes se consideraban libres de rabia. Por último, dos antigénicos independientes y las variantes genéticas que circulan en el norte de Argentina se encuentran en aislados obtenidos de los perros y los casos relacionados con los perros, lo que sugiere dos ciclos independientes de la transmisión del virus. Este es el primer estudio nacional coordinado de los antígenos, así como la epidemiología molecular de la rabia en la Argentina. La información aquí presentada mejorará el conocimiento sobre la epidemiología de la rabia y, por lo tanto, ayudará a la prevención de casos humanos mortales. (51).

Patrones epidemiológicos de la rabia se describen, con el análisis antigénico y genético de muestras obtenidas de infectados mamíferos domésticos y silvestres en 20 estados de México durante 1976-2002. Dos orígenes independientes se proponen para la rabia en los carnívoros de México. Un grupo comparte ascendencia con la rabia canina, mientras que el otro parece que comparten un origen común con la rabia de los murciélagos de América del Norte. Más de 12 sublinajes fueron encontrados en las poblaciones de perros rabiosos, lo que sugiere al menos seis grandes focos espacio-temporal. La rabia en Coyotes se encontró como focos independientes enzoóticos que probablemente surgió a través de efectos colaterales de la rabia canina, trasladadas desde los focos principales en las regiones centro-sur y el oeste de México. Uno de los objetivos del zorro gris contra la rabia se distribuyó ampliamente en el noroeste de México, se superponen con un enfoque en la misma especie en el suroeste de Estados Unidos. Un foco de rabia en mapaches distribuido en el centro-norte del estado de México parece compartir un origen común con el brote de rabia en América del Norte, y es un pariente cercano del centro-sur de la rabia en mofetas y el mapache en los Estados Unidos. Otros dos focos en mapaches comparten un ancestro común con la rabia canina y se distribuyeron en el noroeste de México y Yucatan (52).

3. JUSTIFICACIÓN

3.1. Planteamiento del Problema

a) *Rabia asociada con murciélagos*

La rabia asociada a los murciélagos hematófagos y su transmisión a humanos y animales de importancia económica fue descrita en América Latina a principios del siglo XX. El primer informe científico sobre la rabia bovina en el hemisferio fue realizado por Carini en el año de 1911 en Sao Paulo, Brasil (53). Observó los corpúsculos de Negri en un cerebro de bovino y pudo reproducir la rabia parálitica en conejos con material aislado. En 1931, Pawan aisló RABV de diferentes especies de murciélagos, incluyendo *D. rotundus*. En 1932, Telles Giron en México demostró que el derriengue, una enfermedad parálitica fatal en el ganado, fue causada por el RABV. Posteriormente, varios científicos reportaron la enfermedad en Colombia, Venezuela y Panamá, entre otros. (54–57). Durante el período 2005-2009, se reportaron aproximadamente 20 casos humanos de origen canino en América Latina y el Caribe, frente a 92 casos asociados con murciélagos, y 5 de carnívoros silvestres, principalmente zorrillos y zorros esporádicamente grises en México (43,58). Entre los casos humanos asociados a los murciélagos, 84 fueron transmitidos por murciélagos hematófagos y al menos 8 por murciélagos no hematófagos (principalmente *Tadarida brasiliensis mexicana* (México), *Tadarida brasiliensis brasiliensis* (Chile) y una novela RABV relacionada con *Tadarida brasiliensis* en México (47,59–61). Los casos relacionados con los murciélagos hematófagos ocurrieron en Brasil (n=50 en la región amazónica y n=3 en otras áreas), Perú (n=18), Colombia (n=10), Ecuador (n=2) y Bolivia (n=1) (43,62–64). Chile fue el primer país de América Latina en reportar un caso de rabia humana asociado con murciélagos no hematófagos, sin antecedentes documentados de exposición (60). Después del inicio de los programas de eliminación de la rabia de perros enzoóticos en los Estados Unidos y Canadá a principios de la década de 1950, la rabia asociada a los murciélagos (murciélagos insectívoros) se convirtió en la principal fuente de infección para los humanos en esta porción de Norteamérica. Las especies de murciélagos asociadas con la mayoría de los casos de rabia humana son: el murciélago de tres colores *Perimyotis subflavus* (anteriormente conocido como *Pipistrellus subflavus* o murciélago de pipistrelle oriental), el murciélago de pelo plateado *Lasiurus noctivagans*, y el murciélago de cola libre mexicano, *T. brasiliensis mexicana* (42,65–69).

Se necesitan estudios integrales sobre la ecología de la rabia asociada a los murciélagos vampíricos para comprender mejor cómo diversas variables ambientales (debido al cambio climático) y modificaciones de los hábitats naturales (infligidas por la actividad comercial humana ligada a la agricultura, ganadería y urbanización) pueden afectar la incidencia, prevalencia, distribución y dinámica de diseminación de la enfermedad en estas especies. (70–74).

La circulación de diferentes linajes de RABV y/o variantes antigénicas en varias especies de murciélagos en las Américas sugiere que la enfermedad se mantiene en enzootias independientes. (75–77). En la mayoría de los países donde la tipificación molecular ya está disponible, se ha revelado una gran diversidad de del virus rábico asociado con los murciélagos. Por ejemplo, en México, Colombia, Colombia, Perú, Argentina, Chile y Brasil se han encontrado diferentes RABVs en asociaciones específicas con *T. brasiliensis mexicana*, *T. brasiliensis brasiliensis*, *Histiotus montanous*, *Nyctinomops laticaudatus*, *Molossus molossus*,

Myotis sp, *Eptesicus furinalis*, *Lasiurus cinereus* y otros *Lasiurus sp*. (50,51,59,73,78–81). Además, la transmisión de especies cruzadas de RABV (también conocida como "spillover"), ha sido reportada recurrentemente entre murciélagos (59,78,82,83). Una ocurrencia frecuente es entre los murciélagos de fruta infectados por la variante RABV del murciélago hematófago. Este evento es detectado tan frecuentemente que algunos han sugerido que esta variante de RABV se ha transformado exitosamente en murciélagos de fruta. Sin embargo, esta hipótesis requiere evidencias más sólidas, dado que el mismo linaje genético ha sido encontrado consistentemente en varias especies de murciélagos frutales, incluyendo *Artibeus lituratus*, *A planirostris*, *A fimbriatus*, e incluso en otras especies de murciélagos insectívoros como, *Molossus rufus* y *Eumops auripendulus*. (81,84). En el contexto, estos hallazgos apoyan mejor el concepto de murciélagos hematófagos rabiosos que frecuentemente cruzan la infección de otras especies de murciélagos con RABV.

Además, un gran número de posibles linajes de RABV asociados a murciélagos aún no han sido asignados a un huésped específico del reservorio de murciélagos, debido a la falta de especímenes adecuados para determinar las especies, ya sea sobre la base de rasgos morfométricos o por taxonomía molecular. (59,82,83,85).

Como consecuencia de la transición epidemiológica de la rabia humana (es decir, el cambio del transmisor principal de la enfermedad de los perros a los murciélagos vampíricos) y de los programas mejorados de vigilancia de la rabia, se han detectado variantes nuevas o criptógamas de RABV en carnívoros y murciélagos silvestres. Desde una perspectiva evolutiva, el RABV ha irradiado exitosamente en diferentes murciélagos y especies carnívoras. Por lo tanto, se necesitan reconstrucciones contemporáneas e históricas de la epizootiología de la rabia en la fauna silvestre para comprender mejor los mecanismos potenciales que impulsan el surgimiento de la enfermedad y su establecimiento en nuevas poblaciones.

Estudios más exhaustivos y multidisciplinarios sobre la ecología, la biología, junto con programas mejorados de vigilancia sistemática de la enfermedad y modelos matemáticos constituyen nuevas vías de investigación para comprender mejor la dinámica de diseminación del huésped asociado con la rabia de murciélagos en las Américas.

b) Cambio de hospedante de RABV de murciélagos a carnívoros y sus implicaciones para la salud pública

Según las re-construcciones filogenéticas, sólo hay dos supuestas variantes zoonóticas de rabia autóctona establecidas en carnívoros silvestres en las Américas, que de hecho están más estrechamente relacionadas con los linajes de murciélagos del RABV. Estas son las variantes de la skunk del centro-sur de los EE. UU., y la skunk del centro-norte de México, que se extiende desde el centro-norte de México hasta el centro-sur de los EE. UU., y la variante de la RABV del mapache, distribuida a lo largo de la mayor parte de la costa oriental de América del Norte (61). Recientemente, se han establecido nuevas emergencias potencialmente zoonóticas después de que se hayan producido en América del Norte cambios recurrentes de especies cruzadas de RABV de murciélagos a carnívoros silvestres. (77,86). A modo de ilustración, durante 2008, un trabajador inmigrante mexicano, mordido por un zorro gris rabioso, murió de rabia mientras estaba en los Estados Unidos. Velasco-Villa A, et al. (2008). Durante ese mismo año, un brote de rabia en coatis (*Nasua narica*) afectó a la península de Yucatán en México. Aréchiga-Ceballos N V-VA, et al. (2010). En ambos casos se identificaron dos nuevos linajes, estrechamente relacionados con los RABVs asociados a *T. brasiliensis*

mexicana. Estudios retrospectivos confirmaron la circulación de ambos linajes, en la región, durante más de 3 años en las poblaciones de zorro gris y coati, respectivamente (61,87). Eventos similares han sido reportados en los Estados Unidos, que describió el cambio de hospedante de RABV de *E. fuscus* a las poblaciones de zorros zorro gris y zorrillo despojado en el norte de Arizona (86). Más allá de exposiciones humanas ocasionales, ninguna otra repercusión importante para la salud pública ha sido atribuida a estos aparentemente emergentes casos de rabia enzoótica en los Estados Unidos. Sin embargo, definitivamente pueden representar nuevas fuentes de casos potenciales de rabia humana para la región, como ocurrió en México. Preocupaciones similares existen sobre el surgimiento de nuevos ciclos de RABV, como en el caso de los primates no humanos en Brasil, que es único en América Latina (88).

El mejoramiento de los sistemas de vigilancia de la rabia en la fauna silvestre constituye una necesidad importante en América Latina para prevenir mejor la rabia en los seres humanos, al impedir el posible establecimiento de nuevas enzimas con la interposición de acciones de control apropiadas (72). Por ejemplo, el brote de rabia de Arizona en zorrillos es quizás uno de los mejores ejemplos de intervenciones holísticas que involucran intervenciones multisectoriales, multidisciplinarias de salud pública y veterinarias, incluyendo la vacunación oral de la fauna silvestre (89,90). Este último tema por sí solo también constituye una gran oportunidad y desafío de investigación para varios países de las Américas, donde el problema se está ampliando debido a las posibles implicaciones para la salud pública.

c) RABV asociado con carnívoros silvestres e implicaciones para la reintroducción potencial de la rabia enzoótica canina

Reconstrucciones filogenéticas recientes e históricas de RABV enzoótica circulando en las Américas sugieren que la rabia asociada a perros no ocurrió en las Américas antes de la colonización europea (61). Aparentemente, el cambio de hospedante del RABV parece ser la fuerza operadora responsable del surgimiento de la mayoría de las actuales enzootias de la rabia establecidas en carnívoros silvestres en las Américas. El perro RABV fue establecido exitosamente en zorrillos y zorros grises en México, así como la mangosta en el Caribe y zorros comedores de cangrejo en Brasil. (61,91). Este fenómeno ha sido ampliamente observado en los Estados Unidos, Europa y partes de África, a lo largo de la historia de la colonización humana en estas regiones. El origen claro de todos estos linajes establecidos de RABV en carnívoros silvestres plantea interrogantes sobre su potencial para regresar a las poblaciones caninas y convertirse en enzoótica de nuevo, según lo permitan las condiciones (61). Hasta ahora, el mantenimiento de una vigilancia exhaustiva con caracterización RABV, junto con la inmunidad ideal del rebaño (más del 70% de la población total) y la disminución de las densidades de población canina libre a través de programas de manejo de poblaciones caninas más integrados, han constituido elementos clave para prevenir el retorno de la RABV relacionada con perros a la población canina en países donde se ha eliminado la rabia enzoótica canina (92–96).

La transmisión y circulación sostenible de la misma variante de RABV relacionada con perros entre dos huéspedes de reservorios altamente susceptibles puede estar ocurriendo en partes de la región del Caribe. Los datos moleculares y filogenéticos sugieren que el RABV está co-circulando entre las poblaciones de perros y mangosta (97–99). Los programas insostenibles e ineficaces de manejo de poblaciones de perros/mangosta en la región resultan en una rápida recuperación de las poblaciones de perros y mangostas, disminuyendo consecuentemente la

inmunidad de la población por debajo del umbral ideal para la interrupción de enfermedades (61,100,101).

En tales circunstancias, es posible que la cobertura efectiva de vacunación antirrábica no alcance nunca la inmunidad necesaria estimada del 70% (61,101,102). Por lo tanto, lograr la eliminación de la rabia canina enzoótica en la región se vuelve más difícil, lo que requiere programas de control de la rabia completamente operativos para ambas especies simultáneamente.

El cambio de hospedante potencial o la co-circulación de RABV en carnívoros domésticos y silvestres, impone nuevos desafíos para la eliminación de la rabia en las regiones rurales de los países en desarrollo. Para hacer frente a la naturaleza dinámica de estas epizootias de la rabia es necesario mejorar la vigilancia de las enfermedades y disponer de instrumentos innovadores de control. La introspección detallada de estos aspectos requerirá la creación de nuevas vías de colaboración multidisciplinaria entre los sectores gubernamentales, académicos y la industria privada.

3.2. Formulación del Problema

En el Perú la rabia es endémica con presentación de dos ciclos enzoóticos claramente definidos, un ciclo urbano transmitido por perros (en proceso de erradicación), y un ciclo selvático gestionado por murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) en áreas de selva y valles interandinos. Una mejor comprensión de las relaciones entre los factores ecológicos y humanos con las enfermedades zoonóticas es vital para identificar el riesgo espacial de las poblaciones humanas y animales.

El propósito de este estudio es describir y caracterizar la epidemiología molecular de la rabia silvestre en el Perú usando datos colectados por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria desde 1997 al 2002 con datos sin georreferenciación y datos desde el 2003 hasta 2015 con datos georreferenciados.

Esta investigación incluye el análisis de la caracterización antigénica de virus rábicos aislados de murciélagos hematófagos en el Perú. El estudio también incluye el análisis de la dinámica del uso de la tierra y complejos eco-patogénicos: Riesgos eco-epidemiológicos en los distintos ecosistemas. Se evalúa la gama de la variabilidad altitudinal de casos de rabia en animales domésticos y evaluaciones para el agrupamiento espacio-temporal. La altura máxima encontrada para casos de rabia silvestre en el Perú es de 3,856 metros (datos SENASA), revelando rangos altos de movimientos de hematófagos que actualmente son aceptados por evidencias científicas previas.

La investigación permitirá determinar el papel de la eco-epidemiología para el estudio de la estructura y función de los focos naturales de infección. Nuestro estudio incorpora el modelo de análisis geográfico mediante la dinámica espacial y temporal de la rabia que puede ayudar a predecir y controlar la rabia silvestre en el Perú.

El desconocimiento de la caracterización antigénica del virus rábico en el Perú, y la falta de conocimiento para poder llevar a cabo una epidemiología molecular de la enfermedad de la rabia, hace imprescindible, con mayor detalle, la realización de estudios epidemiológicos para determinar la distribución geográfica de cepas virales y su asociación con determinadas especies animales, identificar el origen de la exposición de personas y/o animales al virus

rábico, y estudiar, eventualmente, la influencia potencial que las características antigénicas de los virus rábicos que podrían tener en el control de la enfermedad.

La información presentada en el planteamiento del problema sugiere la conveniencia de intensificar el aislamiento y la caracterización de los virus rábicos de origen murciélagos (hematófagos y no hematófagos) del Perú, donde cada vez son más frecuentes los casos de exposición a rabia por mordedura de estas especies, específicamente del *D. rotundus*; el análisis espacial y temporal es fundamental para complementar la caracterización de la enfermedad en el Perú, mediante la epidemiología molecular.

La incorporación de técnicas de caracterización de virus por AcM-N o Genotipificación a los sistemas de vigilancia epidemiológica, facilitarán el conocimiento del origen y la distribución de biotipos de virus rábicos, así mismo el análisis de la transmisión y distribución espacio temporal de casos de rabia silvestre en el Perú, el análisis de los movimientos espaciales (casos de rabia) del virus rábico entre poblaciones, y el análisis predictivo de la dispersión de la rabia silvestre en el Perú, contribuirán a la solución del problema identificado en el presente estudio.

El no conocer a fondo el origen y distribución de los biotipos de virus rábico, genera la posibilidad de que en el Perú estén apareciendo cepas con variaciones antigénicas autóctonas, lo cual podría explicar algunos de los fracasos que se puedan observar con ciertas vacunas.

4. Objetivo

4.1. General:

- a) Desarrollar el análisis epidemiológico de la rabia silvestre (murciélagos hematófagos), mediante la genotipificación molecular del virus rábico aislado en el Perú entre los años 1997 al 2015.

4.2. Específicos:

- a) Estudiar la transmisión y distribución espacio temporal de casos de rabia silvestre en el Perú.
- b) Identificar geográficamente las variantes antigénicas virales circulantes en el Perú, y sus reservorios.
- c) Identificar las especies silvestres que mantienen los ciclos endémicos de transmisión de la rabia, mediante la genotipificación del virus rábico.
- d) Establecer las bases de la evaluación epidemiológica molecular de la rabia en el Perú.

5. Metodología

5.1. Diseño de la investigación

El presente manuscrito contempla la recopilación y análisis de artículos científicos desarrollados a lo largo de muchos años de trabajo en el área de la salud pública y en específico en la investigación molecular y epidemiológica de la rabia silvestre transmitida por murciélagos hematófagos en el Perú.

Todos los artículos que se describen en el presente estudio, se han basado en el análisis de bases de datos mediante el uso de un scan estadístico (SatScan), uso de un programa de modelamiento

de nichos ecológicos (Maxent), que permita estudiar y determinar la distribución espacio temporal de casos de rabia silvestre en el Perú, los modelos han sido incorporados a un programa de cartografía digital que para nuestro caso ha sido el ArcGis 10.1.

5.2. Población y Muestra

Los datos analizados corresponden a la data de casos clínicos de rabia silvestre en animales domésticos, con resultados positivos emitidos por la Unidad del Centro de Diagnóstico de Sanidad Animal del SENASA. El presente estudio no incluye ningún análisis relacionado a rabia urbana transmitida por canes.

Este estudio corresponde al análisis de datos estadísticos; por lo tanto, no fue necesario completar ninguna evaluación ética antes de realizar la investigación.

En esta investigación se utilizaron datos históricos de la vigilancia pasiva y de los registros de los registros de datos murciélagos son de acceso libre. Como tal, no se requirió ninguna autorización formal.

I. Muestras de zonas de selva y zonas rurales

La información de cada una de las muestras positivas analizadas corresponderán a muestras de diferentes especies animales (domésticos, excepto perros) colectados a nivel nacional durante el periodo de estudio 1997-2015, de los departamentos de Apurímac, Amazonas, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Loreto, Madre de Dios, Cerro de Pasco, Puno, San Martín y Ucayali, por ser departamento con alta endemismo, muestras colectadas por Servicio Nacional de Sanidad Agraria – SENASA, del Ministerio de Agricultura del Perú.

5.3. Aspectos Administrativos

Recursos Humanos:

Investigador principal:

Dr. William Valderrama Bazán

ILLARIY

Lima, Perú

wvalderrama@illariy.org

www.illariy.org

Colaboradores:

Daniel Streicker, PhD

Sir Henry Dale Fellow

Institute of Biodiversity, Animal Health and Comparative Medicine

MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research

University of Glasgow

+44 (0) 141 330 6632

Director: Prof. Josep Vaqué Rafart

Universidad Autónoma de Barcelona

Recursos financieros:

El financiamiento del proyecto de investigación ha estado a cargo del doctorando.

6. Resultados

Sobre la base de diversos estudios de investigación realizados sobre rabia silvestre, en este capítulo llevaremos a cabo una consolidación de resultados encontrados, con el objetivo de sistematizar los aspectos más relevantes en la prevención, control y la epidemiología de la rabia en el Perú.

I. Factores ecológicos y antropogénicos de exposición a la rabia en los murciélagos hematófagos: implicaciones para la transmisión y el control.

A. Introducción

A pesar del extenso sacrificio de *Desmodus rotundus* en América Latina, letales brotes de rabia humana transmitida por esta especie se reconocen cada vez, y la rabia en animales domésticos se produce con una frecuencia sorprendente. Para identificar los factores individuales y de nivel de población de conductores de transmisión de virus de la rabia (RABV) en los murciélagos hematófagos, se realizó un estudio de captura-recaptura longitudinal en 20 colonias de murciélagos hematófagos que abarca cuatro regiones del Perú. La serología demostró la circulación de RABV en los murciélagos hematófagos de todas las regiones en todos los años. La seroprevalencia varió de 3 a 28 por ciento y fue mayor en murciélagos juveniles y sub-adultos, la exposición RABV es independiente del tamaño de colonia de murciélagos, en consonancia con la ausencia de umbrales de densidad de población para la invasión viral y la extinción. El sacrificio de las campañas implementadas por el estado peruano durante nuestro estudio, no logró reducir la seroprevalencia y fueron quizás contraproducente para el control de enfermedades debido a la eliminación selectiva de los adultos, siendo de mayor importancia el control en los murciélagos juveniles y sub-adultos por su potencial capacidad de transmisión de la rabia. Estos hallazgos proporcionan nuevos conocimientos sobre los mecanismos de mantenimiento de RABV en los murciélagos hematófagos y ponen de relieve la necesidad de utilizar enfoques ecológicamente detallados para la prevención de la rabia en América Latina.

Nuestros objetivos específicos fueron los siguientes: (i) identificar los factores de población a nivel individual que influyen en la exposición de RABV en los murciélagos hematófagos silvestres, (ii) poner a prueba la relación entre la densidad de murciélago y la transmisión del virus, y (iii) comparar las tasas de exposición en las poblaciones de murciélagos que se ven afectados por las diferentes fuerzas antropogénicas de sacrificio y la suplementación de recursos a través de la crianza de animales domésticos. Predijimos que la seroprevalencia aumentaría con el tamaño de las colonias de reservorios y la densidad del ganado (suponiendo un componente dependiente de la densidad de transmisión de la rabia). Hemos previsto, además, que el sacrificio reduciría la seroprevalencia, debido a la posible eliminación de los murciélagos infectados y la disminución generalizada de la densidad de población de reservorios.

B. Resultados

1. Tamaño de las colonias y la dinámica de población de murciélagos hematófagos.

Durante el período de 40 meses, se capturaron muestras únicas de 1436 murciélagos hematófagos. Recapturas eran relativamente comunes tanto dentro (n=216) y entre años (n=132), con individuos recapturados hasta 3 años después de la captura inicial (la duración máxima permitida por el diseño de nuestro estudio). Los murciélagos hematófagos demostraron fuerte fidelidad regional sin que se observaran cambios de cuevas durante el

período de estudio. Las estimaciones del tamaño de colonias variaron desde 16 a 444 individuos y en general se mantuvieron estables durante años; sin embargo, en tres sitios, el 95% de los intervalos de confianza sobre el tamaño de las colonias, no se superpuso a través de los años. Las disminuciones del tamaño de las colonias en la Región de Apurímac y Madre de Dios, se debieron a la participación humana en la destrucción de cuevas, y el aumento de murciélagos hematófagos o recolonización en la región de Lima el 2010, puede deberse al cese de la actividad minera en los exteriores cercanos a las cuevas.

El análisis mixto lineal generalizado (GLMM por sus siglas en inglés) no encontró ningún efecto de la eliminación selectiva en el tamaño de la colonia de murciélagos ($X^2_2 = 1.91$, $p = 0,38$), pero el tamaño de las colonias difería entre los departamentos ($X^2_3 = 10.8$, $p = 0,01$) y de acuerdo con la densidad de los animales domésticos de la zona ($X^2_1 = 4,75$, $p = 0,03$). En promedio, las colonias eran más pequeñas en la región amazónica de Madre de Dios (tamaño del efecto, $\beta = -12,89$ (95% *HPD = -22.48 a -3,89)) con relación a las regiones andinas de Cajamarca ($\beta = 7,68$ (95% HPD = 1.13 - 14.03)) y Apurímac (línea de base del tamaño del efecto). Tamaños de colonia en el departamento costero de Lima se superponen con las dos regiones andinas y amazónicas ($\beta = -2,47$ (95% HPD = -7,77 a 3,31)). La densidad de la población de animales domésticos varió por región, en el mismo patrón que los tamaños de las colonias (Cajamarca>Apurímac>Lima>Madre de Dios), esto conducen a una relación global positiva entre la densidad poblacional animal y densidad de murciélago hematófagos. Sin embargo, debido a la “región” se explica gran parte de la variación en la densidad poblacional animal, cuando ambos fueron incluidos en el modelo, la carga “población animal” en realidad tenía un efecto negativo significativo sobre el tamaño de las colonias ($\beta = -0,41$ (95% HPD = -0,82 a 0,014)). Este efecto negativo fue impulsado por una sola colonia grande en Lima (LM6) encontrado en un área de densidad relativamente baja de animales (* Highest Posterior Density Interval -HPD).

2. Los patrones espaciales y temporales de la exposición al virus de la rabia en los murciélagos hematófagos.

El análisis de 1086 muestras de suero reveló una seroprevalencia global del 10,2 por ciento en todos los años y áreas de muestreo. La gran mayoría de los individuos (murciélagos) que fueron recapturados en varios años fueron seronegativos en todos los años ($n = 78/86$). La seroconversión, la pérdida de título de anticuerpos detectables y el mantenimiento de los anticuerpos se produjo en dos, cinco y un individuo, respectivamente. A través de los años, los murciélagos hematófagos seropositivos fueron encontrados en todos los sitios donde se muestrearon más de cuatro individuos y la seroprevalencia en estas colonias variaron de 3,3 a 28,6 por ciento. La seroprevalencia fue relativamente estable en el tiempo en la mayoría de las zonas de muestreo, pero se produjeron cambios significativos como supuestas extinciones de la enfermedad y re-colonización en Apurímac y Lima (X^2 test: $p < 0,05$ para cada región). A través de los años, las zonas de muestreo en la Región de Lima en el 2009 tenían significativamente diferentes niveles de exposición a la rabia ($X^2 = 25.63$, $p < 0,001$), y en Apurímac y Cajamarca en 2010 (Apurímac: $\chi^2 = 10,56$, $p = 0,014$; Cajamarca: $\chi^2 = 12,99$, $p = 0,005$), pero no se pudieron diferenciar estadísticamente otras combinaciones de región por año.

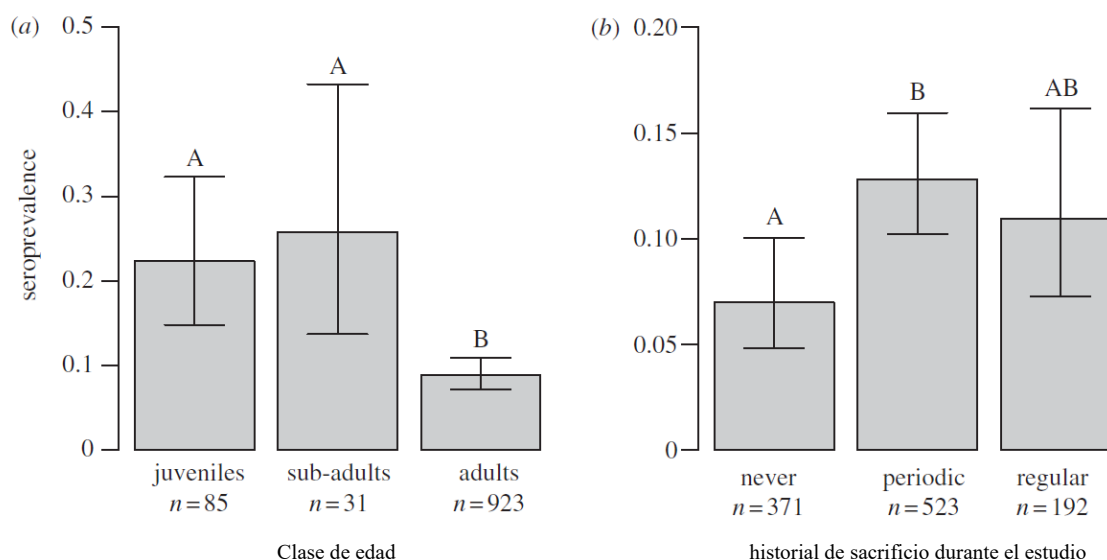


Figura 1. Efectos de la edad (a) y la historia de sacrificio (b) en la exposición a RABV en murciélagos hematófagos. Las barras de error son intervalos de confianza del 95%. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0,05$) en modelos lineales mixtos generalizados. Los tamaños de las muestras de los grupos se indican debajo de las etiquetas de las barras.

Tabla 1. Modelo generalizado mixto de análisis lineal de los factores individuales y a nivel de población que influyen en la exposición de la rabia en los murciélagos hematófagos. (Texto en cursiva indica la inclusión en el modelo mínimo. El nivel de significancia se determinó mediante pruebas de coeficiente de probabilidad que comparan el modelo mínimo a modelos incluyendo cada término (o excluyendo en el caso de la edad y 4 años de sacrificio). Se omitieron dos interacciones bidireccionales no significativas en la tabla. Todos los modelos contenían las zonas de capturas como de efecto aleatorio y un término significativo de y-intercepción)

factor	X^2	d.f	p -valor
<i>Años</i>	16.41	2	0.001
<i>Sacrificio (4 años)</i>	6.72	2	0.035
Sexo	3.39	1	0.066
Reproductivo	2.39	1	0.121
Tamaño de la colonia	2.02	1	0.225
Densidad poblacional	0.26	1	0.607
zona	0.005	1	0.943
Sacrificio (1 año)	0.0005	1	0.982

3. Predictores individuales y a nivel de población de la exposición al virus de la rabia en los murciélagos hematófagos.

El modelo mixto lineal generalizado mínimo (GLMM por sus siglas en inglés) retuvo sólo dos factores: la edad y la historia de sacrificio entre 2007 y 2010, como predictores de la exposición a RABV (tabla 1). Notablemente, la seroprevalencia del RABV no aumentó de manera uniforme con la edad, pero en su lugar se elevó en los juveniles en relación con los adultos (odds ratio (OR) = 3.01), alcanzó su punto máximo en sub-adultos (OR = 3,58) y luego se redujo en los murciélagos adultos (figura 1a). La evaluación del efecto de sacrificio mostró que la seroprevalencia de RABV fue mayor en las colonias de murciélagos que fueron sometidos a

un sacrificio periódico (OR = 2,03) y regular (OR = 1,43) en comparación con aquellos que nunca fueron sacrificados durante el estudio. Sin embargo, la seroprevalencia en colonias sacrificadas regularmente no fue estadísticamente diferente de la de las colonias no perturbadas o sacrificadas periódicamente (figura 1b).

También se probó la robustez del GLMM en diferentes estructuras de modelos. Los resultados se mantuvieron sin cambios cuando los factores año y departamento, que fueron excluidos del componente de efectos aleatorios, se incluyeron como efectos fijos y ninguno de estos fue significativo (departamento: $X^2_3 = 2,71$, $p = 0,44$; año: $X^2_2 = 1,17$, $p = 0,55$). A continuación, se repitió el análisis del GLMM usando una sola muestra de sangre seleccionada al azar por murciélago recapturado para tener en cuenta la posible no dependencia de las muestras del mismo individuo. Finalmente, se repitió el análisis excluyendo seis colonias que contenían otras especies de murciélagos porque exposiciones cruzadas entre especies pueden causar seroconversión en *D. rotundus*. En cada uno de estos últimos análisis, la edad y la selección conservaron el apoyo estadístico. Sin embargo, en el análisis que utiliza únicamente cuevas con *D. rotundus*, las hembras tuvieron una seroprevalencia significativamente mayor que los machos (OR = 1.98, $X^2_1 = 5.0$, $p = 0.025$), un efecto marginalmente significativo en el modelo GLMM original (Tabla 1).

La relación entre el tamaño de la colonia y la seroprevalencia fue fundamental para nuestro estudio, pero no se apoyó en el análisis GLMM, por tanto, se llevó a cabo un análisis de regresión logística separada para confirmar la ausencia de una relación después de eliminar factores potencialmente correlacionados. Este el análisis sugirió una asociación positiva muy débil entre el tamaño de la colonia y la seroprevalencia, pero esta tendencia fue significativa solo cuando se excluyeron dos combinaciones de lugar/año que tenía una seroprevalencia inusualmente alta (figura 2).

Ambos modelos tenían una y-intersección significativamente positiva, lo que sugiere la ausencia de un umbral de población más bajo para invasión viral.

C. Resultados

El sacrificio de los murciélagos hematófagos es una herramienta central de control utilizado por muchos países de América Latina para prevenir la rabia en los seres humanos y animales domésticos. El supuesto básico que subyace al sacrificio para reducir las enfermedades de la fauna silvestre, es que la reducción del tamaño de la población reservorio disminuye la transmisión del patógeno (105).

Pusimos a prueba esta hipótesis estudiando la exposición de RABV en 20 colonias de murciélagos hematófagos en Perú que mostraron una variación natural en el tamaño de la población, y en colonias con y sin historial de sacrificio. Nuestros resultados demostraron que la exposición al RABV era ubicua en las poblaciones de murciélagos hematófagos geográficamente extendidas, estaba en el mejor de los casos sólo débilmente relacionada con el tamaño de la colonia de murciélagos, y tendía a aumentar después de la eliminación esporádica.

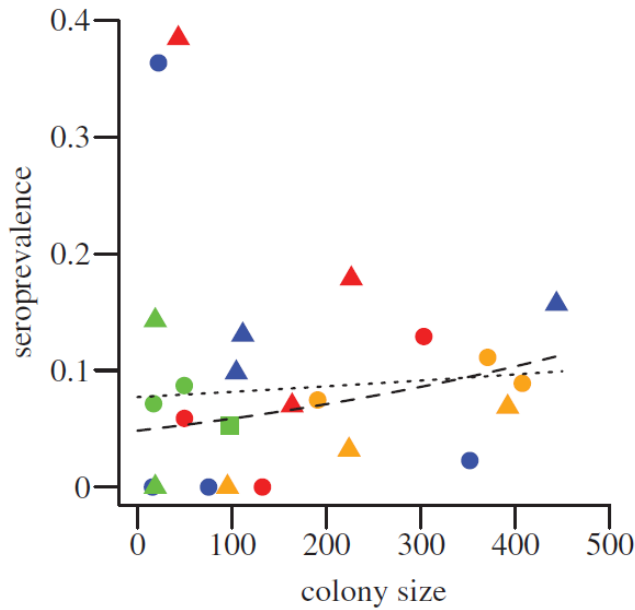


Figura 2. Relación entre el tamaño de la colonia de murciélagos hematófagos y la seroprevalencia. Los colores indican la región (Apurímac=rojo; Cajamarca=anaranjado; Lima=azul; Madre de Dios=verde). Una regresión logística no encontró una asociación significativa entre el tamaño de la colonia y la seroprevalencia ($Z_1 = 0.71$, $p = 0.479$). Cuando se eliminaron los dos sitios con seroprevalencia inusualmente alta (véase la parte superior izquierda de la figura), esta relación se volvió débil pero significativamente positiva ($Z_1 = 2.138$, $p = 0.031$). Sin embargo, la y-intersección siguió siendo significativamente mayor que cero, lo que sugiere la ausencia de un umbral

estricto de población para la invasión viral. Los puntos y las líneas discontinuas muestran las predicciones del modelo de prevalencia para los conjuntos de datos completos y parciales, respectivamente. Cuadrados, 2008; círculos, 2009; triángulos, 2010.

El predictor más poderoso de los anticuerpos del RABV fue la clase de edad del reservorio, con mayor seropositividad en murciélagos juveniles y sub-adultos en relación con los adultos (figura 1a). Es poco probable que esta pauta refleje los anticuerpos derivados de la maternidad porque la seroprevalencia media fue mayor en los juveniles que en las hembras adultos y no disminuyó durante el primer año de vida (figura 1a). Además, aunque faltan estudios de los títulos de anticuerpos de la madre y la cría en relación con el *D. rotundus*, los anticuerpos derivados de la madre en el murciélago de cola libre mexicano (*Tadarida brasiliensis*) se perdieron a las 10 semanas del nacimiento, y los títulos de anticuerpos en los murciélagos pardos grandes capturados en estado silvestre (*E. fuscus*) que tenían pocos meses de edad disminuyeron rápidamente en cautiverio (106,107). Por lo tanto, el mantenimiento de una seroprevalencia elevada en los murciélagos juveniles y sub-adultos más viejos de nuestro estudio es más consistente con las exposiciones al RABV durante el primer año de vida, como se sugirió previamente en los estudios serológicos de *T. brasiliensis* (108). También se indicó un papel clave de los juveniles en la transmisión de los RABV en una encuesta de murciélagos sometidos a pruebas diagnósticas en Canadá, donde los juveniles constituían entre el 38,5 y el 84,2% de los murciélagos con rabia, según la especie (109). Por lo tanto, la exposición y la infección por RABV pueden ser comunes en murciélagos hematófagos juveniles y sub-adultos y podría contribuir a las altas tasas de mortalidad (más del 50%) observadas durante su primer año de vida (110). La infección frecuente de murciélagos jóvenes también puede contribuir al mantenimiento a largo plazo aprovechando los pulsos estacionales de los individuos susceptibles, como se sugirió en los modelos matemáticos del RABV en las poblaciones de *E. fuscus* en hibernación (111).

Las elevadas tasas de rabia en murciélagos jóvenes y sub-adultos también podrían ayudar a explicar la asociación positiva entre el sacrificio periódico y la seroprevalencia (figura 1b y tabla 1). Concretamente, dado que es probable que los jóvenes tengan menos probabilidades de acicalar a los adultos que los adultos de acicalarse a sí mismos o a los jóvenes, el vampiricida podría matar preferentemente a los adultos. Dado que los adultos tienen una menor

seroprevalencia, pero tal vez una mayor inmunidad debido a exposiciones repetidas, esta eliminación selectiva podría aumentar la seroprevalencia a nivel de la población (112). Los mecanismos demográficos que actúan en escalas de tiempo más largas, como la recolonización de las colonias eliminadas de las poblaciones vecinas (el "efecto vacío") o el aumento de la supervivencia de los jóvenes tras una liberación repentina de las limitaciones dependientes de la densidad, podrían aumentar aún más la transmisión al aumentar la población susceptible de murciélagos. En algunos lugares, es posible que se mataran murciélagos en respuesta a la detección de rabia en animales domésticos cercanos a las cuevas. Esto puede explicar la alta seroprevalencia en la Región Apurímac en septiembre de 2011, donde los pobladores capturaron murciélagos en redes y encendieron fuego en cuevas después de que dos bovinos murieran de rabia en agosto de 2010 (Informes epidemiológicos semanales del SENASA 32-2010 y 37-2010). Sin embargo, si este fuera el caso de manera más general, habríamos esperado que el sacrificio durante los 12 meses anteriores al muestreo, en lugar de la estrategia general de sacrificio durante el período de estudio, hubiera sido el mejor predictor de la exposición al RABV en los murciélagos (Tabla 1).

Independientemente de que el sacrificio aumentará la transmisión del RABV, aumentará numéricamente la seroprevalencia al eliminar desproporcionadamente a los adultos o se produzca una respuesta a brotes de rabia transmitida por murciélagos en animales domésticos, es evidente que el sacrificio de murciélagos hematófagos no logró eliminar la circulación regional del RABV (figura 1b). Se han observado resultados similares en otros sistemas de enfermedades de la fauna silvestre, en particular la tuberculosis bovina en los tejones en el Reino Unido, donde la eliminación selectiva de tejones aumentó realmente la prevalencia en los tejones y tuvo efectos mixtos en la incidencia en animales domésticos; y la rabia del zorro en Europa, donde los modelos predijeron que la necesidad de los altos niveles de sacrificio podrían explicar su limitado éxito (113–115). Habida cuenta de los recientes debates sobre el sacrificio de murciélagos para el control de agentes patógenos (por ejemplo, el virus de Hendra en Australia, el síndrome de la nariz blanca en América del Norte), cabe mencionar los posibles mecanismos que subyacen a la perpetuación del RABV a pesar del sacrificio de murciélagos hematófagos (116,117). En primer lugar, es posible que la eliminación no se haya llevado a cabo a una escala suficiente como para afectar al tamaño general de las colonias de murciélagos. De hecho, las colonias de sacrificio regular no eran significativamente más pequeñas que las colonias no perturbadas, y la perturbación reducía el tamaño de las colonias sólo cuando implicaba perturbaciones importantes de las cuevas. El sacrificio subóptimo podría ser suficiente para cambiar la estructura de edad de las colonias de murciélagos sin tener efectos dramáticos en el tamaño total de la colonia (es decir, los adultos sacrificados son reemplazados por una mayor supervivencia juvenil y sub-adulta). Si bien esto podría tener la desafortunada consecuencia de aumentar la transmisión del RABV a niveles bajos de sacrificio, deja abierta la posibilidad de que un sacrificio más intenso o campañas coordinadas dentro y entre las regiones puedan eliminar el RABV. Una segunda explicación del fracaso de la eliminación para reducir la seroprevalencia del RABV es la falta de una fuerte relación entre la densidad de murciélagos y la transmisión del RABV (tabla 1 y figura 2). Así pues, las tasas de contacto entre murciélagos susceptibles e infectados podrían ser independientes del tamaño de la colonia, de modo que la fuerza de infección per cápita depende más de la prevalencia de la infección que de la densidad de población general (es decir, la transmisión es dependiente de la frecuencia) (105). Aunque no conocemos ningún otro estudio que haya examinado la dependencia de la densidad en la transmisión del virus en los murciélagos, la ausencia de una relación para el RABV tal vez no sea sorprendente, dado que incluso en las grandes colonias, cualquier animal tendrá un número limitado de vecinos a los que puede morder. En el caso de

los murciélagos hematófagos, los contactos infecciosos pueden ser aún menos homogéneos debido a la estructura social dentro de las colonias (118).

Una consecuencia de la desvinculación de la transmisión de la densidad de población es que los umbrales de población de murciélagos para la invasión o la persistencia de los vehículos recreativos pueden no existir (105). Esto supone un reto para la gestión de la enfermedad porque ningún nivel razonable de sacrificio será suficiente para eliminar la rabia o prevenir la reinvasión después de las extinciones virales estocásticas.

De hecho, incluso cuando las poblaciones de murciélagos hematófagos del norte de la Argentina se redujeron en un 95% después de gasear las cuevas con cianuro, se notificaron casos de rabia a tan sólo 1 km de la zona de eliminación (119).

Incluso si fuera ecológicamente defendible, la viabilidad de lograr este grado de reducción de la población de murciélagos en escalas espaciales incluso modestas, es en el mejor de los casos desalentadora en áreas agrícolas planas y probablemente imposible en regiones montañosas o selváticas como las de los Andes y el Amazonas, donde muchas de las cuevas de descanso son desconocidos o inaccesibles. A medida que se disponga de más datos de campo y de laboratorio, los enfoques de modelización matemática serán útiles para descubrir los factores básicos que controlan el mantenimiento viral y la eficacia de los diferentes métodos de control.

Quedan importantes preguntas sobre la biología y la escala espacial del mantenimiento de la rabia de los murciélagos hematófagos. En primer lugar, aunque tradicionalmente se considera que la rabia es una enfermedad letal, la seroprevalencia relativamente alta que observamos y la supervivencia de los individuos seropositivos a lo largo de los años indica que la exposición no siempre mata a los murciélagos hematófagos, y en cambio puede dar lugar a cierto grado de inmunidad.

Dado que estos resultados alternativos de la exposición influirán en la dinámica de la transmisión, la caracterización de la probabilidad de infección letal frente a la inmunidad adquirida naturalmente es fundamental para comprender el mantenimiento a largo plazo (10). En segundo lugar, los estudios anteriores sobre la incidencia de la rabia en animales domésticos sugiere que la rabia transmitida por murciélagos hematófagos se mantiene como una epizootia de migración lenta, en la que el virus se propaga de una colonia a otra y no puede volver a invadir hasta que se recupere algún número umbral de murciélagos susceptibles (119). En apoyo de esta teoría, la mortalidad de animales debido a la rabia en el límite de la distribución geográfica de los murciélagos hematófagos en el norte de la Argentina parece episódica. Sin embargo, dentro del rango enzoótico de la rabia de los murciélagos hematófagos, varias líneas de evidencia ponen en duda que la extinción viral regional se produzca de manera predecible y que existan umbrales de población para la reinvasión. En primer lugar, nuestros datos serológicos indicaron la presencia continua del RABV en la mayoría de las zonas de intervención a lo largo de varios años. Es más probable que esto refleje la circulación regional del RABV que el mantenimiento a largo plazo de los anticuerpos en murciélagos individuales porque observamos varios casos de pérdida de anticuerpos en murciélagos recapturados, y las infecciones controladas de otras especies de murciélagos han demostrado que los títulos de anticuerpos disminuyen a niveles indetectables varios meses después de la infección inicial y no se recuperan sin exposiciones adicionales (112,120). En segundo lugar, en el Perú, así como en otros países de América Latina, la mortalidad por rabia en animales domésticos se repite a lo largo de muchos años en regiones geográficas limitadas, y los estudios filogenéticos han revelado que se trata de linajes virales que circulan independientemente (73).

Además de la variación espacial de la dinámica de transmisión, el aparente conflicto entre las hipótesis de una epizootia migratoria y el mantenimiento regional enzoótico podría explicarse

también por la existencia de dos fases epizooticas fundamentalmente diferentes. Las ondas epizooticas iniciales en las poblaciones de naïve podrían ir seguidas de ciclos enzoóticos locales que persisten indefinidamente, ya sea a niveles constantes o a través de ciclos plurianuales. Esto se ha descrito con mayor claridad en el caso de la rabia del mapache, en que la propagación epizootica del virus a través de las poblaciones de mapaches en el este de los Estados Unidos fue seguida de un mantenimiento enzoótico mediante pequeños brotes recurrentes que no requirieron la inmigración de personas infectadas (10).

Una reevaluación de los datos de mortalidad por rabia en animales domésticos sugiere una dinámica análoga en los murciélagos hematófagos. Cuando Fornes y otros (119) analizaron los patrones de los casos de animales domésticos transmitidos por murciélagos hematófagos de la misma región de la Argentina de 1959 a 1974 y Delpietro y Russo (5) de 1984 a 1993, las firmas espaciales de la propagación que eran evidentes en la primera epizootia habían desaparecido en los años posteriores, lo que era coherente con el mantenimiento enzoótico regional. Los programas de control de la rabia se beneficiarían de la consideración de estos escenarios alternativos porque el mantenimiento enzoótico local implica que la transmisión entre especies se producirá de forma esporádica, lo que hace que sea mucho menos predecible en el escenario de una lenta propagación viral a través de un escenario geográfico específico.

Finalmente, varias áreas de incertidumbre acompañan nuestros resultados. En primer lugar, aunque los murciélagos hematófagos mantienen el virus de la rabia independientemente de otras especies, es probable que algunos murciélagos simpátricos también mantengan ciclos de transmisión distintos (73). Nunca se ha observado la transmisión del virus de la rabia de otros murciélagos a la *D. rotundus*; sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que algunas exposiciones entre especies resulten en una seroconversión. Minimizamos este riesgo centrando nuestras capturas en cuevas que estaban ocupados sólo por *D. rotundus* y confirmando la robustez de nuestros resultados al excluir los sitios donde estaban presentes múltiples especies. También nos enfrentamos a la incertidumbre en la escala de los tamaños de las poblaciones de murciélagos hematófagos (desde un único lugar de descanso hasta el tamaño de la población regional) que sería más relevante para modelar la transmisión del RABV. Intentamos generar una estimación intermedia por: i) trabajando en la mayor colonia conocida de cada Región, ii) colocando redes de niebla en la zona que rodea los lugares de las cuevas para vigilar a los individuos que pasan, y iii) trabajando en cada cueva durante varias noches para capturar a los individuos que llegan de las cuevas cercanas. Aunque no observamos ningún cambio de cueva entre nuestras zonas de estudio (separados por 10 km o más), se ha demostrado la dispersión entre las cuevas en un radio de 2 a 5 km en México y el Brasil (121,122). Por lo tanto, nuestra estrategia de muestreo debería haber sido suficiente para detectar esos individuos y dar una aproximación más cercana al tamaño de la metapoblación regional. Los estudios futuros deberían utilizar estimaciones genéticas de los tamaños efectivos de las poblaciones regionales para confirmar la ausencia de dependencia de la densidad en la transmisión del RABV que hemos observado. En conclusión, proporcionamos pruebas de que el RABV se mantiene regionalmente en las poblaciones de murciélagos hematófagos durante varios años en el Perú, y esto está mediado quizás por la transmisión dependiente de la frecuencia con un papel clave para los murciélagos juveniles y sub-adultos. La ausencia de umbrales de población para la invasión y el mantenimiento de del RABV es coherente con la ineficacia observada del sacrificio para eliminar la circulación viral en los murciélagos y la transmisión a los seres humanos y los animales domésticos. Es evidente que la eliminación selectiva de murciélagos hematófagos bien gestionada beneficia a la agricultura al aliviar las mordeduras de murciélagos en animales domésticos y posiblemente al reducir el número total de murciélagos infectados. Sin embargo, el aparente efecto positivo del sacrificio en la seroprevalencia, junto con las respuestas demográficas y de comportamiento que podrían

aumentar la proporción de murciélagos susceptibles, podría tener consecuencias contraproducentes para la transmisión del RABV.

En futuros experimentos sobre el terreno se debería identificar la base mecánica de la relación entre el sacrificio y la seroprevalencia y utilizar esa información para informar a los modelos epidemiológicos de control óptimo de la rabia en América Latina. Mientras tanto, los programas integrados de “One Health” destinados a prevenir las exposiciones virales, la educación ambiental para minimizar las alteraciones ecológicas y la vacunación de las poblaciones susceptibles son la mejor estrategia combinada para reducir al mínimo la carga de la rabia de los murciélagos hematófagos.

II. Características evolutivas de los patógenos hospedantes revelan la dinámica y las futuras invasiones de la rabia de los murciélagos hematófagos.

A. Introducción

Anticipar cómo se propagarán las epidemias a través de las áreas geográficas requiere comprender los eventos de dispersión de los huéspedes que son notoriamente difíciles de medir. Aquí contrastamos las firmas genéticas de los huéspedes y del virus para resolver la dinámica espacio-temporal que subyace a las expansiones geográficas del virus de la rabia transmitida por los murciélagos hematófagos (RABV) en Perú. El análisis filogenético reveló una reciente propagación viral entre poblaciones que, de acuerdo con la estructura geográfica extrema en la herencia materna el ADN mitocondrial del huésped, apareció completamente aislado. En contraste, una mayor conectividad de la población en la herencia nuclear biparental los microsatélites explicaron los límites históricos de las invasiones, sugiriendo que los murciélagos machos dispersos esparcen el RABV entre las poblaciones femeninas aisladas. El ADN nuclear del huésped indicó además flujo de genes inesperado a través de las montañas de los Andes, conectando la costa del Pacífico libre del RABV a la selva tropical amazónica endémica de RABV.

Combinando la filogeografía bayesiana con modelos de resistencia geográfica, proyectamos rutas de invasión a través del norte de Perú que fueron validadas por datos en tiempo real de la mortalidad por rabia en animales domésticos. Los primeros brotes de RABV en la costa del Pacífico de América del Sur podrían ocurrir en junio de 2020, lo que tendría serias implicaciones para la agricultura, la conservación de la vida silvestre y la salud humana. Nuestros resultados muestran que la combinación de datos genéticos del huésped y del patógeno puede identificar sesgos sexuales en la propagación espacial del patógeno, que puede ser un fenómeno generalizado, pero poco apreciado, y demuestran que la previsión genética puede ayudar a estar preparados para inminentes invasiones virales.

B. Resultados

1.- Estructura genética viral. Se realizó el secuenciamiento completo del gen nucleoprotéico (N) a partir de 264 aislamientos de rabia colectados de animales domésticos en Perú entre 1997 y 2012 y fueron comparados con secuencias representativas de toda América. Dado que el ganado no se infecta entre sí ni con los murciélagos, cada aislado representa un único evento de transmisión del murciélago a los animales domésticos, lo que proporciona una ventana de conocimiento de los virus de murciélagos que circulan localmente (123,124). Un árbol filogenético de máxima probabilidad (ML) reveló tres linajes virales en el Perú, cada uno de los cuales compartía un antepasado común más reciente (ACMR) con virus de otros países sudamericanos, lo que concuerda con las múltiples introducciones independientes del RABV en los murciélagos peruanos (Fig. 1A). Dos linajes virales, L1 y L2, circulaban exclusivamente

al este de la cordillera de los Andes y se superponían en el sur y el centro de la Amazonia (Fig. 1B). El linaje viral 3 (L3) fue aislado en los valles interandinos del sur del Perú, con la excepción de dos muestras encontradas muy fuera de ese rango (Fig. 1B).

Los virus atípicos eran parafiléticos entre sí (lo que indica introducciones distintas) y se encontraron en especies raramente infectadas (canino y equino), lo que sugiere translocaciones de animales de compañía mediadas por el hombre, en lugar de infecciones adquiridas de murciélagos autóctonos en la localidad de muestreo.

2.- Contrastando la estructura de la población de los genomas de los murciélagos hematófagos con el virus de la rabia. Un análisis filogenético bayesiano de las secuencias del citocromo mitocondrial B (cytB) de 468 murciélagos hematófagos mostró una marcada estructura geográfica. Los murciélagos capturados al oeste de la cordillera de los Andes en el departamento de Lima (sitios LMA) eran muy divergentes de otros murciélagos peruanos y estaban más estrechamente relacionados con los murciélagos del sudoeste del Brasil (Fig. 1C). Los murciélagos del este de los Andes formaron un grupo monofilético separado (con una sola secuencia de Ecuador) que compartió una ACMR con las poblaciones de América Central [probabilidad posterior (PP) = 0,91]. La mayoría de los linajes mitocondriales se encontraron exclusivamente dentro de los departamentos únicos (equivalentes a los estados de EE.UU.) del Perú (Fig. 1C). En algunos casos [por ejemplo, sitios de Amazonas (AMA) y sitios de Cajamarca (CAJ)], las colonias separadas por distancias cortas estaban compuestas exclusivamente por individuos de linajes mitocondriales distintos y parafiléticos, lo que indica una falta de flujo de genes femeninos entre las colonias cercanas, ya que los linajes divergían. Un linaje que se encontraba tanto en el Amazonas central en Ucayali (sitios UCA) como en el Amazonas septentrional (sitios AMA) era una posible excepción; sin embargo, las subclases bien sustentadas dentro de este linaje estaban restringidos a UCA o AMA, pero no a ambos (Fig. 1C y Apéndice SI, Fig. S6). El aislamiento espacial era aún más fuerte a nivel de los haplotipos. De 27 haplotipos, 16 eran exclusivos de colonias de murciélagos aislados y la distancia media ocupada por los haplotipos era sólo de 22 km (rango = 0-258,1 km). La mínima distribución de haplotipos entre colonias distantes implicaba la ausencia de flujo genético mitocondrial contemporáneo entre regiones (Fig. 1D).

A continuación, comparamos la estructura de la población de los marcadores nucleares biparentales heredados con la del mtADN y el ARN viral. Nueve microsatélites nucleares de 480 murciélagos hematófagos indicaron 2-3 genéticos grupos (K), con la mezcla entre todas las colonias al este de los Andes (grupo de microsatélites 1, MG1; Fig. 1 E y F) y el aislamiento genético de las colonias de murciélagos hematófagos que se encuentran en los valles interandinos en el sur de Perú en el departamento de Apurímac (sitios API, microsatélite grupo 2, MG2). En $K > 2$, los murciélagos de la costa del Pacífico (sitios LMA) formaron un grupo distinto (MG3), que también se detectó de una baja frecuencia a frecuencia moderada en los Andes y el Amazonas septentrionales (Fig. 1E).

Estos hallazgos fueron robustos al análisis de sólo seis loci sin alelos nulos, dos métodos alternativos de inferencia estadística [ESTRUCTURA y análisis discriminante de componentes principales (DAPC)], y a la relajación de las prioridades en las ubicaciones espaciales de las poblaciones de murciélagos muestreadas (Apéndice SI, Figs. S2-S4). Los valores más grandes (menos plausibles) de K revelaron cúmulos geográficos adicionales, pero implicaron un flujo genético extenso entre ellos (Fig. 1E), un patrón esperado dado el aislamiento por distancia en nuestros datos de microsatélites (Apéndice SI, Fig. S5). Es importante destacar que, incluso en los niveles más altos de K, los grupos de microsatélites abarcaban zonas al este de los Andes, proporcionando un corredor potencial para la propagación viral a través del Amazonas y las laderas orientales de los Andes.

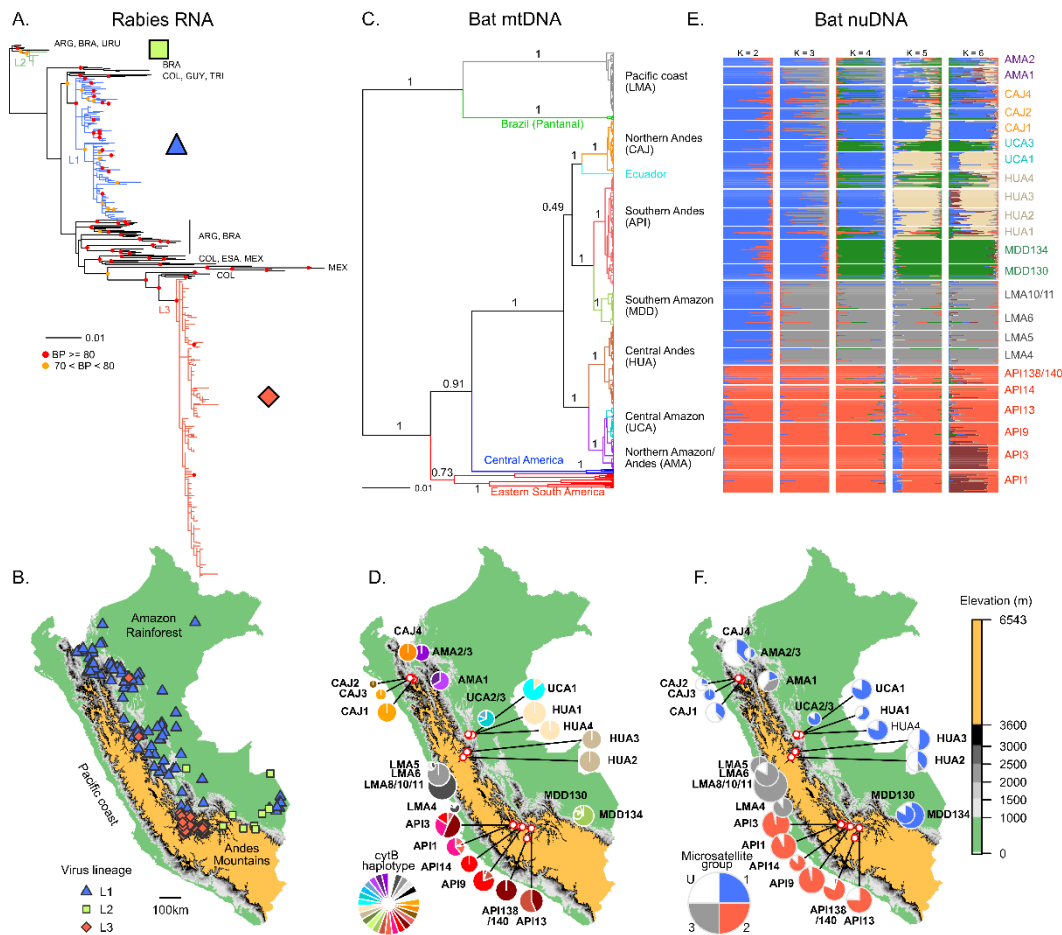
Evaluamos los desajustes genómicos a nivel individual entre el nuADN y el mtADN utilizando 352 murciélagos para los que teníamos datos tanto de microsatélites como de mitocondrias. Los murciélagos del este de los Andes tenían linajes de mtADN muy divergentes, pero pertenecían al mismo grupo de microsatélites ([Apéndice SI, Fig. S6](#)). Por lo tanto, los linajes virales L1 y L2 fueron mantenidos por murciélagos MG1 con diversos y parafiléticos haplotipos mitocondriales, mientras que L3 infectó exclusivamente a murciélagos MG2 con haplotipos mitocondriales API, creando una congruencia genética viral con el nuADN, pero no con el mtADN. Los murciélagos atípicos MG3 que se encuentran en los Andes y el Amazonas tenían haplotipos de mtADN localmente prevalentes, lo que sugiere que los machos inmigrantes de la costa se reproducen con las hembras residentes a pesar de la larga rama que separa a estas poblaciones en la filogenia de la CitB (Fig. 1C).

3.- Confirmación por microsatélite de la dispersión masculina. La mayor estructura de los marcadores heredados por la madre en relación con los marcadores nucleares señalaba el patrón esperado de la filopatía femenina y la dispersión sesgada hacia el macho (125,126). En pruebas adicionales realizadas con microsatélites se encontró un aumento de casi 14 veces en el FIS (el coeficiente de consanguinidad de un individuo en relación con la subpoblación) de los murciélagos hematófagos machos en relación con las hembras (F_{IS} femenino = -0,0003, F_{IS} masculino = 0,1363, $P < 0,0004$), lo que concuerda con la expectativa de que el sexo de dispersión tenga una deficiencia de heterocigotos porque las muestras representan una mezcla de poblaciones (es decir, el efecto Wahlund) (127). Otras comparaciones genéticas de machos y hembras no fueron estadísticamente significativas ([Apéndice SI, Tabla S7](#)), pero la detección por cualquiera de los métodos anteriores implica una intensa dispersión por sexo (127). De manera similar, usando las probabilidades de asignación de nuestro análisis de ESTRUCTURA, encontramos que los posibles migrantes recientes ($PP < 0.2$ por pertenecer al grupo de genotipo localmente abundante) tendían a ser machos (59.3% para todo el Perú, 65.2% para los murciélagos dentro del rango de MG1).

4.- Expansiones estacionales de la rabia a través de la geografía. Hemos estimado la superficie mensual del Perú infectada por el RABV desde 2003 hasta 2014 utilizando una base de datos de 1.146 brotes de rabia en animales domésticos confirmados en laboratorio (128). La descomposición de las series temporales reveló una estacionalidad significativa en el área infectada (modelo aditivo generalizado: desviación explicada = 27,7%, $P < 0,001$) con expansiones espaciales máximas en noviembre y diciembre ([Apéndice SI, Fig. S10](#)).

5.- Reconstrucción y previsión de la dinámica de la invasión viral. Tras identificar la congruencia entre el nuADN de los murciélagos y las distribuciones geográficas virales como un posible subproducto de la dispersión con sesgo masculino, tratamos de reconstruir y pronosticar la dinámica de la propagación viral en toda el área geográfica. Aplicamos la estimación filogenética continua del estado ancestral bayesiano a los virus L1 y L3 con fechas de recolección conocidas con precisión y ubicaciones del Sistema de Posicionamiento Global (GPS) (NL1 = 81, NL3 = 179). Para mejorar la resolución filogenética, añadimos datos de secuencias de la región hipervariable y no codificante entre la glicoproteína y los genes de la polimerasa (G-L, 510 pb) a las secuencias completas del gen N. Se excluyeron análisis similares del linaje L2 por el bajo tamaño de la muestra y la desaparición de este virus después de 2009 ([Apéndice SI, Tabla S8](#)).

Figura 1. Estructura genética y geográfica de los marcadores del reservorio y del virus con distintos mecanismos de herencia. A) El árbol ML del RABV, utilizando 434 secuencias N completas del Perú (ramas de color) y otros países representativos de las Américas (ramas negras; ARG, Argentina; BRA, Brasil; COL, Colombia; ESA, El Salvador; GUY, Guayana Francesa; MEX, México; TRI, Trinidad; URU, Uruguay). Los símbolos de colores muestran el apoyo de 1.000 búsquedas de ML replicadas. Se excluyeron para su visualización dos secuencias de grupos externos de una variante de la rabia que circulaba en perros peruanos. (B) Distribuciones geográficas de linajes virales en el Perú. Las áreas por encima de los 3.600 m (el límite superior de los murciélagos hematófagos en Perú) son de color oro. (C) Árbol filogenético bayesiano de secuencias de *cytB* de murciélagos hematófagos del Perú ($n = 442$) y de otros países de América ($n = 26$). Las ramas están coloreadas por región geográfica. Los valores de los nodos son probabilidades posteriores. (D) Distribución de haplotipos de *CytB* en colonias de murciélagos hematófagos de Perú. Los sitios con <8 individuos secuenciados se agruparon con otras colonias inspeccionadas en un radio de 10 km. Los gráficos circulares son proporcionales al tamaño de la muestra (rango = 8-30). (E) Estimaciones de los análisis de *STRUCTURA* asumiendo $K = 2-6$ poblaciones usando 9 microsatélites ($n = 480$ murciélagos). Cada barra representa la probabilidad de asignación de la membresía a cada uno de los grupos K . (F) Los gráficos circulares muestran la distribución de los grupos de microsatélites [$K = 3$, umbral de probabilidad de pertenencia al grupo = 0,85, individuos no asignados (U) en blanco].



Sin embargo, la falta de aislamiento genético por distancia geográfica en los datos disponibles sugiere una dispersión relativamente libre de ese virus durante su permanencia en el Perú (Apéndice SI, Fig. S7). Los modelos filogeográficos mostraron que las invasiones virales ocurrieron dentro de los últimos 40 años [L1: 95% de la mayor densidad posterior (HPD) en $ACMR = 20.65-35.02$; L3: 95% de HPD = $16.27-28.0$]. Aunque en ambos casos se observó cierta agrupación geográfica. Aunque se observó cierta agrupación geográfica en ambos linajes virales, los saltos entre las regiones peruanas dentro del rango de cada linaje eran comunes

(Fig. 2 A y B). Ambos virus sufrieron invasiones desaceleradas, con un aumento inicial rápido de la extensión geográfica seguido de expansiones graduales en los últimos 10-15 años (Fig. 2D). La mayor escala espacial de las expansiones históricas de L1 produjo una mayor velocidad media en L1 en comparación con L3 [61,5 (95% HPD = 26,2-194,5) frente a 25,4 (95% HPD = 14,9-50,1) km/año]. Sin embargo, las velocidades contemporáneas calculadas a partir de las ramas de la punta (1997-2012) fueron similares entre los linajes (L1: 33,9 vs. L3: 28,4 km/año, Fig. 2E).

El inesperado flujo de genes de MG3 desde la costa del Pacífico libre de RABV hasta los Andes y el Amazonas endémicos del RABV nos impulsó a explorar corredores para la invasión viral a la costa del Pacífico de Sudamérica (Fig. 1F y [Apéndice SI](#), Fig. S6). Un modelo de resistencia del área geográfica que describe el conocido patrón de propagación del RABV a lo largo de los valles (128,129) mostró que las rutas de menor esfuerzo desde las colonias de murciélagos andinos y amazónicos con individuos MG3 hasta la costa pasaban a través de un corredor en el norte del Perú que forma el paso más bajo a lo largo de los Andes (la Depresión de Huancabamba; Fig. 3A). Proyectamos la invasión del RABV combinando estimaciones filogeográficas de las velocidades de dispersión viral con distancias de menor esfuerzo a la costa del Pacífico. Asumiendo las velocidades inferidas de las puntas de las filogenias L1 y L3, respectivamente, pronosticamos la llegada del RABV a Chiclayo (una importante ciudad de la costa) para julio de 2019 (95% HPD: 2016.85-2023.25) o junio de 2020 (95% HPD: 2017.12-2024.93). Los datos de mortalidad por rabia en animales domésticos durante los 3 años posteriores a la recopilación de nuestros datos de secuencia viral (2013-2015) confirmaron la invasión viral en curso a lo largo de las rutas proyectadas por los modelos de resistencia del área geográfica (Fig. 3B). Estos datos no genéticos muestran que el RABV viajó 50,1 km al suroeste desde junio de 2012 hasta abril de 2015 a 16,1 km/año (95% CI = 14,6-17,6, Fig. 2E y [Apéndice SI](#), Fig. S9), dejando menos de 145 km a la costa del Pacífico de Sudamérica.

C. *Discusión*

Combinando grandes conjuntos de datos genéticos de virus y reservorios, mostramos que la filopatía femenina y la dispersión de los machos en los murciélagos hematófagos probablemente crea un papel desproporcionado para los murciélagos machos en la propagación espacial del RABV. Usando estos conocimientos sobre la dispersión del reservorio y del virus, pronosticamos las rutas y tasas de una invasión viral en curso que predecimos que causará una histórica y dañina primera invasión del RABV en la costa del Pacífico de Sudamérica. Independiente los datos epidemiológicos apoyan nuestras predicciones genéticas.

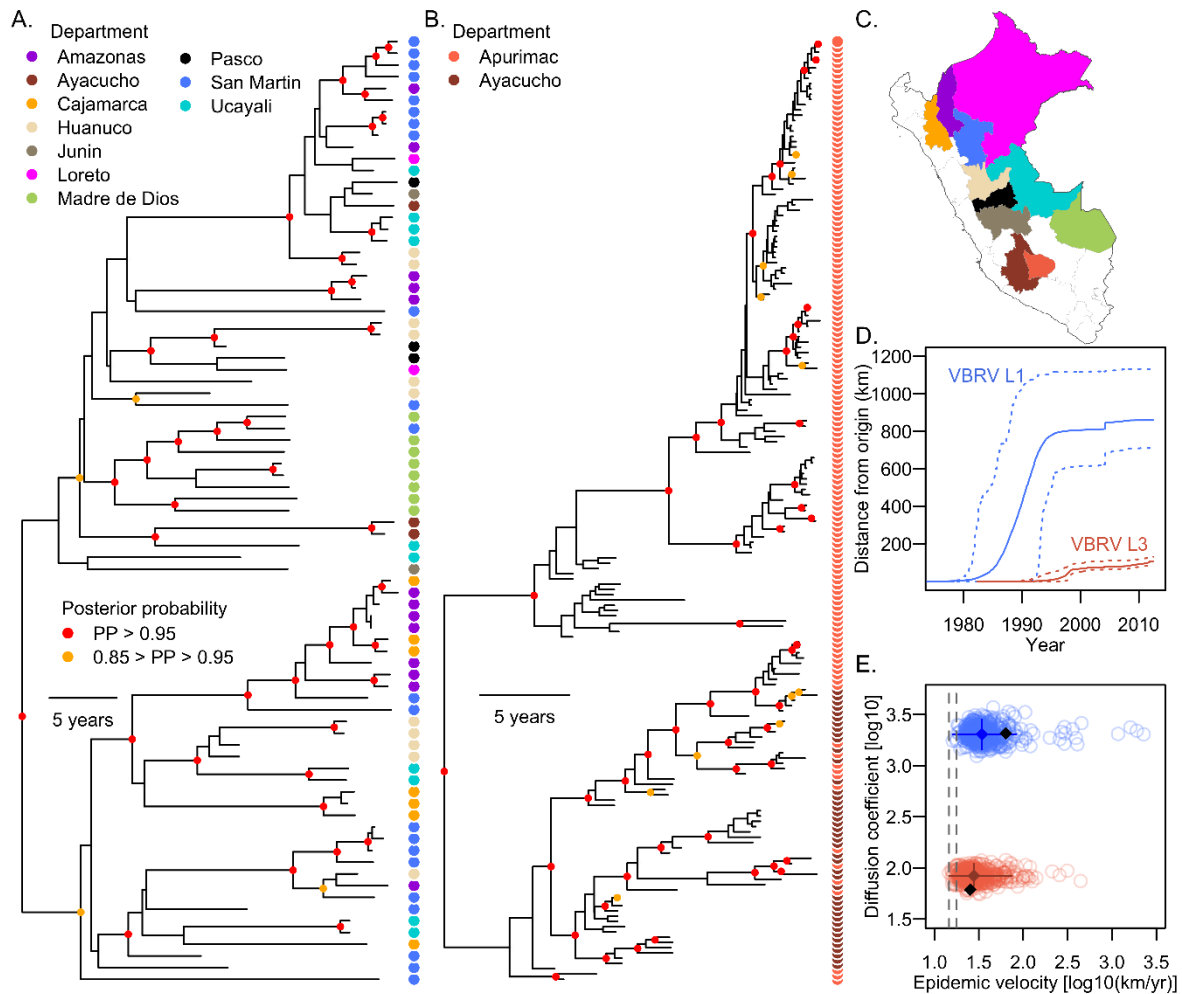


Fig. 2. Dinámica de la dispersión viral histórica dentro del Perú. Árboles filogenéticos bayesianos de RABV L1 (A) y L3 (B), con símbolos de punta coloreados según el departamento del Perú (C). Los símbolos de los nodos interiores son PP de los clados. (D) Expansiones espaciales de cada linaje viral, representadas como la distancia geográfica acumulada desde el origen del brote inferido a través del tiempo. (E) Distribuciones posteriores de la velocidad de la epidemia y el coeficiente de difusión de cada linaje viral. Los puntos son estimaciones de parámetros de las puntas de un árbol muestreado al azar de la distribución posterior de cada análisis filogeográfico bayesiano. Los diamantes sólidos y las líneas son la mediana y el 95% de los HPD en las estimaciones de los parámetros, respectivamente. Los diamantes negros son estadísticas medianas calculadas a través de todas las ramas. Las líneas punteadas verticales son los límites del 95% de la velocidad del frente de onda estimada a partir de los datos de las series temporales en el norte Perú (Fig. 3 y [Apéndice SI](#), Fig. S9).

La reducción de la estructura de la población de reservorios en el núcleo en relación con los marcadores mitocondriales y la deficiencia de heterocigotos en los machos son coherentes con la dispersión masculina y la filopatía femenina en los murciélagos hematófagos, como se conoce en los estudios de campo y es la expectativa general para los mamíferos (125,130). Sugerimos que un subproducto de la dispersión basada en el sexo es que la dispersión espacial y la distribución geográfica del RABV también será impulsada por los machos. Biológicamente, el largo período de incubación (2-4 semanas) y el corto período infeccioso de la rabia (2-3 d) significa que la mayor parte de la dispersión viral ocurrirá antes de la aparición de la enfermedad (131). Además, los signos clínicos debilitantes de la rabia (ataxia, letargo y muerte) durante la mayor parte del período infeccioso hacen poco probable que la infección pueda inducir una dispersión a distancia inusualmente larga en las hembras infectadas, propagando así el RABV sin dejar una firma de mtADN de dispersión a través de la

reproducción. Por lo tanto, el sexo que más se dispersa durante la incubación de la rabia (los machos) dominará naturalmente la propagación viral, y las barreras a la dispersión de los machos delimitarán los límites de las distribuciones virales, como hemos observado. La estacionalidad en el área geográfica infectada por el RABV también fue consistente con la dispersión espacial masculina.

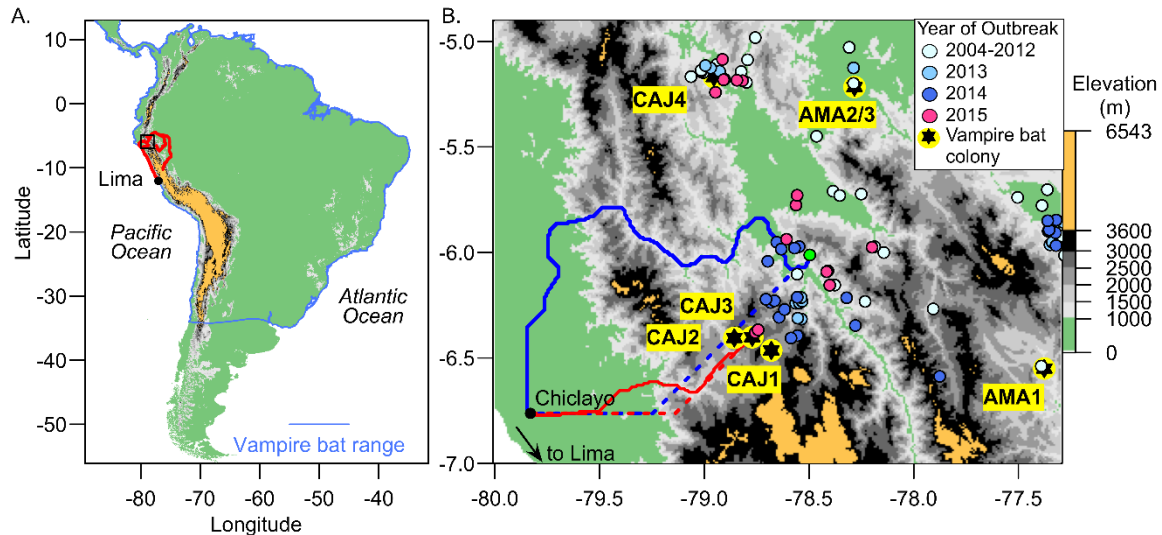


Figura 3. Pronosticando la invasión del RABV a la costa del Pacífico de Sudamérica. (A) La gama de murciélagos hematófagos de Sudamérica, de color como en la Fig. 1. Las líneas rojas son los caminos accesibles desde las colonias de murciélagos en los Andes y el Amazonas con individuos MG3 (típicos de la costa) hasta Lima, utilizando el modelo de resistencia de "valle". El cuadro negro indica la región en B. (B) Las líneas azules son las rutas de menor complejidad desde el brote más occidental del RABV en 2012 (punto verde) hasta Chiclayo (un punto de referencia para la costa del Pacífico) de acuerdo con los modelos de resistencia del valle (sólido) y del umbral (punteado). Las líneas rojas son las rutas desde el frente occidental de la epidemia en 2015. Los puntos azules claros (2004-2012) son brotes que se incluyeron en los análisis filogenéticos.

Las expansiones virales alcanzaron su punto máximo al comienzo de la estación húmeda ([Apéndice SI](#), Fig. S10), cuando se espera que una nueva cohorte de nacimientos inicie la dispersión de los machos del año anterior (3,125). Esta concurrencia proporciona pruebas indirectas de los pulsos de expansión del RABV impulsados por la dispersión estacional de los murciélagos machos, aunque otros factores estacionales y no estacionales también podrían influir en las expansiones espaciales.

En principio, la incongruencia entre los genomas del reservorio podría surgir de las limitaciones de los datos genéticos examinados aquí; sin embargo, varias líneas de pruebas se oponen a esta interpretación. En primer lugar, las tasas de clasificación y mutación de linajes difieren entre el nuADN y el ADN mitocondrial e implican escalas de tiempo diferentes de la estructura de la población (132). Dado que las invasiones virales se produjeron en los últimos 40 años, lo que más nos preocupa es la estructura de la población de murciélagos contemporánea, tal como lo revelan los microsatélites (que coinciden con la distribución viral) y la distribución geográfica de los haplotipos de mtADN. Si la dispersión contemporánea fuera igual entre los sexos y las pautas que observamos surgieran de escalas de tiempo genéticas diferentes, habríamos esperado que los haplotipos de ADNmt abarcaran regiones epidemiológicamente conectadas, en lugar de limitarse más a menudo a colonias únicas de murciélagos. El número o la potencia de los microsatélites tampoco puede explicar su estructura poblacional más débil en relación con el mtADN. Tanto seis como nueve

microsatélites diferenciaron los murciélagos API de los capturados en la región de Madre de Dios (MDD), a pesar de su estrecha relación en la filogenia del mtADN (Fig. 1C), y las simulaciones mostraron un 98-100% de potencia para detectar la estructura de la población ([Apéndice del SI](#), Fig. S8).

La ubicuidad de la dispersión por sexos en la naturaleza [típicamente sesgada hacia las hembras en las aves y hacia los machos en los mamíferos (130)] podría hacer que la dispersión de patógenos por sexos fuera un determinante generalizado de la propagación de la epidemia a nivel geográfico. La dispersión de patógenos con sesgo sexual es difícil de detectar utilizando los métodos tradicionales para estudiar el movimiento de los animales, como la radiotelemetría o las marcas de GPS, porque los raros eventos de dispersión que pueden ser críticos para la propagación de la enfermedad no se detectarán en los estudios realizados a pequeñas escalas espacio-temporales. Este estudio muestra que el contraste de los marcadores genéticos del reservorio y del patógeno con diferentes modos de herencia proporciona un marco para comenzar a evaluar la dispersión de los patógenos en función del sexo. Otros enfoques, como el modelado teórico de la transmisión de patógenos dentro de las redes de contacto con el reservorio, incorporan conceptos similares, pero normalmente carecen de los datos correspondientes de los patógenos para verificar cómo la heterogeneidad de la dispersión del huésped afecta a la propagación de la enfermedad, y requieren extensos conjuntos de datos de campo sobre los contactos con los reservorios, y ofrecen una orientación limitada para el manejo de los patógenos emergiendo a nivel de las áreas geográficas (133,134). La identificación del sexo responsable de la propagación del patógeno tiene implicaciones prácticas para la prevención y el control del RABV porque se predice que el bloqueo del movimiento viral entre las colonias causa la extirpación viral (135). En la labor futura se deberían cuantificar las escalas en que los machos y las hembras contribuyen a la propagación viral intercolonia para evaluar la eficacia de la selección de los machos dispersos en las campañas de control de la rabia. También demostramos que la combinación de la genética de la población huésped, la filogeografía de los patógenos y la ecología del medio geográfico puede predecir tasas y rutas de invasión de patógenos a zonas libres de enfermedades. Un enfoque similar podría ser útil para pronosticar otras invasiones de patógenos emergentes en las que la falta de datos de infección a largo plazo impide análisis epidemiológicos tradicionales. Lo más importante es que pronosticamos una invasión viral en la costa del Pacífico de Sudamérica, históricamente libre del RABV (136), a través de un corredor no detectado de flujo genético de murciélagos hematófagos a través de los Andes peruanos. Tres años de datos independientes sobre la mortalidad de la rabia en animales domésticos confirmaron la expansión viral a lo largo de rutas y velocidades comparables a los pronósticos de los modelos (Figs. 2E y 3).

Advertimos que las invasiones podrían acelerarse o desacelerarse más cerca de la costa, donde la geografía es menos compleja que los de los Andes o el Amazonas y que no se han excluido rutas alternativas.

Sin embargo, en la actualidad, no prevemos ninguna barrera significativa para la continuación de la invasión. También es poco probable que la divergencia evolutiva de las subpoblaciones costeras con respecto a las andinas detenga el RABV porque los desplazamientos de los reservorios de la rabia son comunes en los géneros de murciélagos (137), mientras que las subpoblaciones en cuestión se están cruzando ([Apéndice SI](#), Fig. S6). Es necesario seguir trabajando para determinar si la invasión actual fue desencadenada por cambios recientes en la estructura de la población de murciélagos, por una invasión viral gradual en los límites de la distribución de los murciélagos hematófagos o por una combinación de ambos. Independientemente del mecanismo de iniciación, la llegada del RABV a las regiones costeras

de Perú y su posterior posible propagación a Ecuador y el norte de Chile sería profundamente perjudicial para la agricultura. La presencia del RABV también crearía nuevos riesgos para los seres humanos que interactúan con murciélagos o animales infectados y para la fauna silvestre, como los leones marinos que constituyen una importante fuente de alimento para los murciélagos hematófagos costeros (138). La eliminación de los murciélagos hematófagos no logró detener el avance de las epidemias de RABV en la Argentina y es concebible que pueda exacerbar la propagación viral si los sacrificios promueven la dispersión de los murciélagos, como se observó en los sacrificios de tejonos destinados a controlar la tuberculosis bovina en el Reino Unido (119,135,139). Por lo tanto, abogamos por una mayor vigilancia, la vacunación preventiva de animales domésticos y las campañas educativas para reducir la carga que supone impedir las epidemias.

En comparaciones anteriores de los datos genéticos del huésped y del patógeno se han explotado los patógenos como un marcador de alta resolución de la demografía y la dispersión del huésped o se ha estudiado la dinámica coevolutiva en escalas temporales más largas (140,141). Nuestro estudio muestra que datos similares pueden verificar los principales grupos demográficos de los huéspedes en cuanto a la propagación espacial de los patógenos y pronosticar invasiones epidémicas en zonas libres de enfermedades. A medida que aumenten la abundancia y la resolución de los datos genómicos del huésped y del patógeno, enfoques similares podrían poner a prueba la generalidad de la dispersión de los patógenos en función del sexo, al tiempo que proporcionarían importantes previsiones sobre la dinámica del de la geografía de las invasiones de patógenos emergentes.

III. Expansiones espaciales y ondas de dispersión de la rabia en murciélagos hematófagos

A. Introducción.

Un obstáculo importante para prever la transmisión de enfermedades zoonóticas entre especies y desarrollar nuevas estrategias para su control es la escasez de datos que informen sobre la forma en que estos patógenos circulan dentro de las poblaciones de los reservorios naturales. Los murciélagos hematófagos son el principal reservorio de la rabia en América Latina, donde la enfermedad sigue siendo una de las zoonosis virales más importantes que afectan a los seres humanos y a los animales domésticos. La impredecible dinámica espacio-temporal de la rabia en las poblaciones de murciélagos ha impedido anticiparse a los brotes y ha socavado los programas generalizados de sacrificio de murciélagos. Al analizar 1146 brotes de rabia transmitida por murciélagos hematófagos en animales domésticos a lo largo de 12 años en el Perú, demostramos que las expansiones virales en zonas históricamente no infectadas han duplicado la carga reciente de la rabia transmitida por murciélagos. Las expansiones virales están geográficamente extendidas, pero están severamente limitadas por los picos de alta elevación de la cordillera de los Andes.

En los valles andinos, las invasiones forman frentes de onda que avanzan hacia grandes poblaciones de animales no vacunado que son intensamente mordidos por murciélagos, lo que en conjunto alimentará una alta transmisión y mortalidad. Utilizando modelos espaciales, pronosticamos las vías de las epizootias de RABV en curso a través de áreas geográficas heterogéneas. Estos resultados informan directamente las estrategias de vacunación para mitigar la inminente aparición del virus, revelan que el RABV es una enfermedad emergente más que una enfermedad enzoótica y crean oportunidades para probar nuevas intervenciones para gestionar los virus en los reservorios de murciélagos.

B. Resultados

1. Las expansiones espaciales son la causa de la reciente duplicación de la propagación de la rabia en el ganado

En total, 1146 (51%) de 2265 brotes reportados entre 2003 y 2014 se confirmaron como positivos para la rabia mediante la prueba de anticuerpos fluorescentes, lo que hace que el RABV sea la enfermedad de declaración obligatoria más común en la ganadería peruana (material electrónico complementario, figura S5a). El ganado vacuno se infectó en el 91% de los brotes confirmados, seguido de los caballos (4%), las cabras (2%), las ovejas (1%) y otras especies variadas (2%, 11 cerdos, cuatro búfalos y un camélido). Los brotes se extendieron por los Andes y el Amazonas, y 14 de las 25 regiones gubernamentales informaron de al menos un brote sospechoso en el ganado, y 12 regiones informaron de 7 a 470 brotes confirmados por laboratorio (figura 1a). El análisis de autocorrelación temporal no reveló ninguna estacionalidad en el desbordamiento del VBR en el ganado, ni a nivel nacional ni regional.

En el ámbito nacional, el número de brotes de RABV comenzó a aumentar de manera constante en 2011, y casi se duplicó en 2014 (figura 1b). Es poco probable que este aumento se deba a cambios en la notificación: las otras 56 enfermedades pecuarias rastreadas por el mismo sistema de vigilancia aumentaron desde el establecimiento del sistema en 2003 hasta 2008, pero permanecieron estables en años posteriores cuando se intensificaron las notificaciones de rabia (material electrónico complementario, figura S5b). Además, en un modelo lineal que incluye los efectos del número de otras enfermedades notificadas y el año en el número anual de brotes de rabia, el año ($F_{1,9} = 11,1$, $p < 0,01$), pero no los brotes de otras enfermedades ($F_{1,9} = 0,64$, $p > 0,1$), fue significativo (modelo completo $R^2 = 0,7$).

El aumento de los brotes del RABV no fue geográficamente ubicuo. Los brotes disminuyeron o se mantuvieron estables en el Amazonas, pero se hicieron más frecuentes en los Andes, particularmente en tres regiones caracterizadas por valles con alta producción agrícola rodeados por picos de alta elevación: Apurímac (470 brotes, 41% del total nacional), Ayacucho (197, 17%) y San Martín (128, 11%) (figura 1a; material electrónico complementario, figura S6).

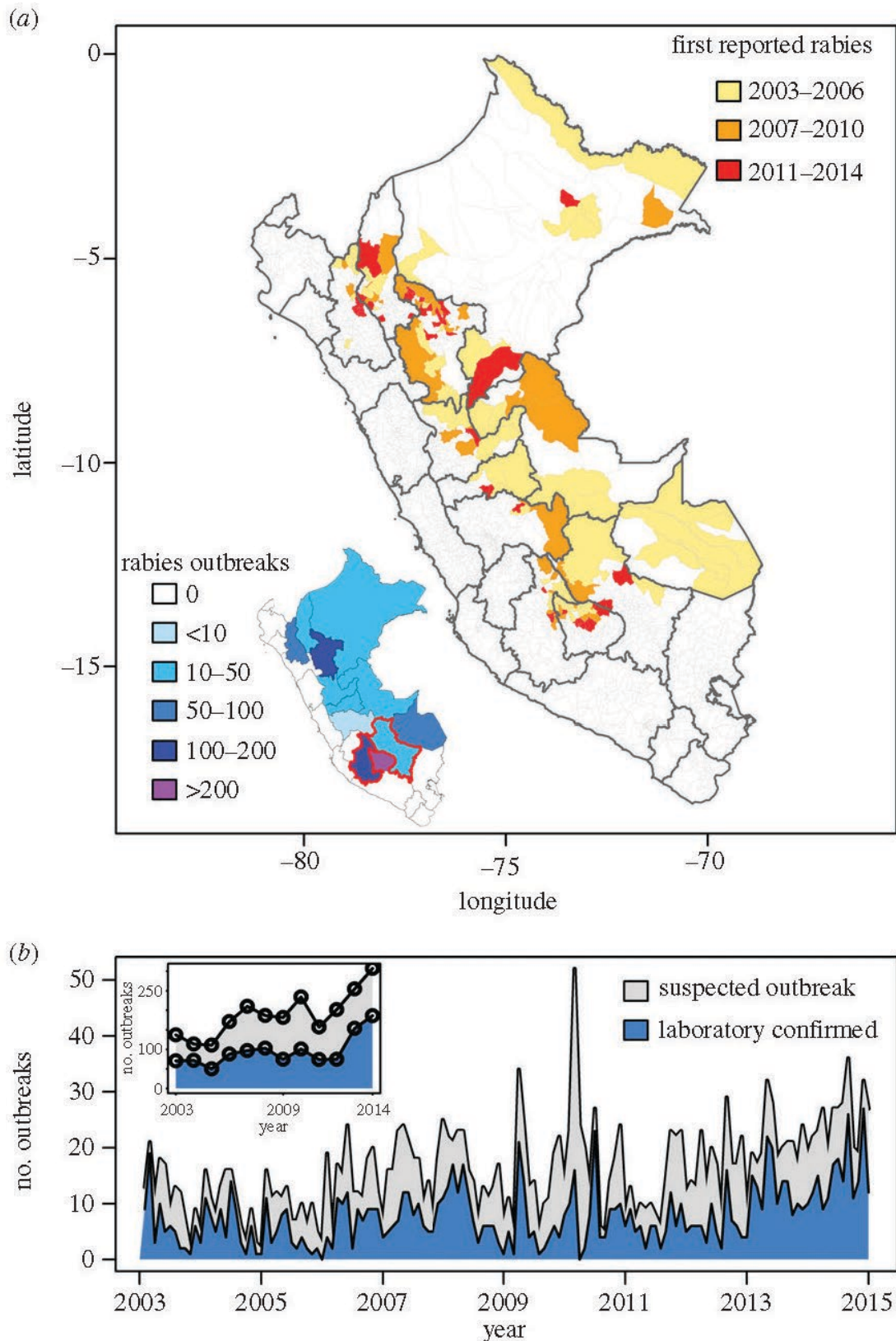


Figura 1. Patrones espaciales y temporales de los brotes del RABV en Perú. a) Tiempos de inicio del RABV a nivel de distrito (mapa principal) y el número neto de brotes confirmados a nivel regional (recuadro). Las líneas rojas muestran el AAC, incluyendo las regiones de Apurímac, Ayacucho y Cusco. b) Patrón de informes de brotes mensuales (figura principal) y anuales (figura insertada) en todo el Perú, excluidas las regiones donde la rabia canina es enzoótica (Puno) y dos regiones de la costa (Lima y Ancash) que informaron de un pequeño número de brotes no confirmados.

El aumento nacional de los brotes de rabia se produjo simultáneamente con la expansión espacial en zonas históricamente no infectadas. El número acumulado de distritos con casos confirmados se triplicó con creces entre 2003 y 2014, de modo que, en promedio, el RABV se propaga anualmente en 12 distritos no infectados anteriormente (desviación estándar, d.s. = 0,319) (figura 2, recuadro), un patrón que también se observa a nivel mensual (1 distrito-mes⁻¹, d.s. = 0,007). El número de distritos infectados también aumentó en los informes anuales (no acumulativos), y las expansiones espaciales más espectaculares coincidieron con el aumento de los brotes a partir de 2011 (figuras 1b,2). Los focos de expansión espacial se produjeron en las regiones de San Martín, Amazonas y Cajamarca en el norte del Perú (5,2 distritos año⁻¹, s.d. = 0,36) y en Apurímac, Ayacucho y Cusco en el sur (4,1 distritos año⁻¹, s.d. = 0,12). En contraste, pocos nuevos distritos fueron infectados en las regiones amazónicas de Loreto, Ucayali y Madre de Dios (1.4 distritos año⁻¹, d.s. = 0.21), donde no hubo nuevos distritos infectados en los últimos 3 años. En consonancia con las expansiones espaciales epizooticas de las zonas enzoóticas, el 85% de los distritos recientemente infectados tenían un distrito vecino infectado en el mismo año o en el anterior.

Para la selección del modelo se utilizó el criterio de información de Akaike (AIC) (se eligió una diferencia de más de dos puntos de AIC), y se probó la importancia de cada factor dentro del modelo seleccionado utilizando una prueba de Wald (142). También se probó el efecto general del año en la elevación del brote utilizando un modelo mixto lineal generalizado (GLMM) con la región como efecto aleatorio utilizando el paquete glmmADMB de R. Los mapas de distrito y elevación se obtuvieron de la base de datos del GADM (gadm.org) y del CGIAR-CSI (<http://www.cgiar-csi.org/>) respectivamente, utilizando el paquete ráster de R.

Los aumentos significativos en el incremento de los brotes del RABV ocurrieron en regiones que contienen transiciones de la selva tropical amazónica a las montañas de los Andes (es decir, Cusco, Cajamarca, San Martín y Ucayali). En cambio, la elevación media de los brotes de rabia no varió en las regiones con sólo elevaciones altas (es decir, Apurímac y Ayacucho en los Andes) y bajas (es decir, Madre de Dios y Loreto en el Amazonas) (figura 3). El modelo con una interacción de región por año recibió un apoyo más firme que el de la región más el año ($\Delta AIC = 91.2$), el del año solo ($\Delta AIC = 1790.33$) y el de la región sola ($\Delta AIC = 96.05$). El criterio de información de Akaike (AIC).

Nuestro Modelo Mixto Lineal Generalizado GLMM mostró que, controlando por región como un efecto aleatorio, la elevación de los brotes generalmente aumentó a través del tiempo (valor- $z = 2.93$, $p < 0.01$). Sin embargo, en varias regiones (por ejemplo, Ayacucho, Cusco), el incremento mínimo de los brotes disminuyó a lo largo del tiempo simultáneamente con el aumento del incremento máximo de los brotes, creando un patrón del tipo embudo que indica que también se produjeron invasiones en zonas más bajas de altura (figura 3).

2. Velocidades de las ondas de expansión de la rabia transmitida por murciélagos hematófagos en áreas geográficas heterogéneas.

En las zonas de Ayacucho, Apurímac y Cusco (área AAC), las estimaciones de la densidad de núcleos mostraron un aumento del 74% en la extensión espacial del RABV entre 2003 y 2014, lo que equivale a una superficie recién infectada de aproximadamente 21.000 km² (figura 4c). Se observaron dos dinámicas espacio-temporales diferentes del RABV. En el norte del área AAC (por ejemplo, los distritos de San Miguel, Huanipaca y Huancarama), la rabia persistió enzoóticamente en brotes esporádicos a lo largo de la duración de la series temporales, coherentes con la dinámica de metapoblación propuesta por Blackwood y otros (135) (figura 4a,b). Por el contrario, el RABV sólo recientemente invadió distritos en el sur o suroeste (por ejemplo, Tintay, Mollepata, Circa).

En los valles de Chalhuanca y del Río Apurímac, las fuertes relaciones lineales entre la distancia temporal y la distancia espacial de menor costo de cada brote a los casos índice

previstos revelaron expansiones ondulatorias del RABV (figura 5). A finales de 2014, esas ondas habían recorrido 39 km en Chalhuanca (94 brotes desde 2009) y 54 km en Río Apurímac (45 brotes desde 2012). Las tasas de dispersión fueron sorprendentemente constantes a lo largo del tiempo, como lo demuestran los altos valores de R^2 en los modelos lineales dentro de cada valle ($R^2 = 0,98$ y $0,93$ para Chalhuanca y Río Apurímac, respectivamente; figura 5b). Curiosamente, el RABV se está extendiendo rápidamente a través de las poblaciones de murciélagos, casi dos veces más en el valle del Río Apurímac que en Chalhuanca ($17,2 \text{ km año}^{-1}$ (intervalo de confianza (IC) del 95%: $15,3-19,7$) frente a $9,1 \text{ km año}^{-1}$ (IC del 95%: $8,6-9,7$); figura 5a). La incertidumbre en los lugares de origen influyó poco en las velocidades de la onda de expansión viral. Las estimaciones de Bootstrap revelaron velocidades similares en todos los lugares de origen plausibles, con estimaciones que oscilaban entre $14,3$ y $20,4 \text{ km año}^{-1}$ (R^2 : $0,87-0,98$) en el Río Apurímac y entre $6,7$ y $11,2$ (R^2 : $0,96-0,99$) en Chalhuanca (material electrónico complementario, figura S1). Asimismo, las estimaciones de las velocidades de la onda de propagación fueron insensibles a los umbrales de elevación en los modelos de resistencia de la geografía, con valores a través de los umbrales en el rango de $16,5-17,9 \text{ km año}^{-1}$ (R^2 : $0,92-0,93$) en el Río Apurímac y de $7,8-9,2$ (R^2 : $0,97-0,98$) en Chalhuanca (material electrónico suplementario, figura S2).

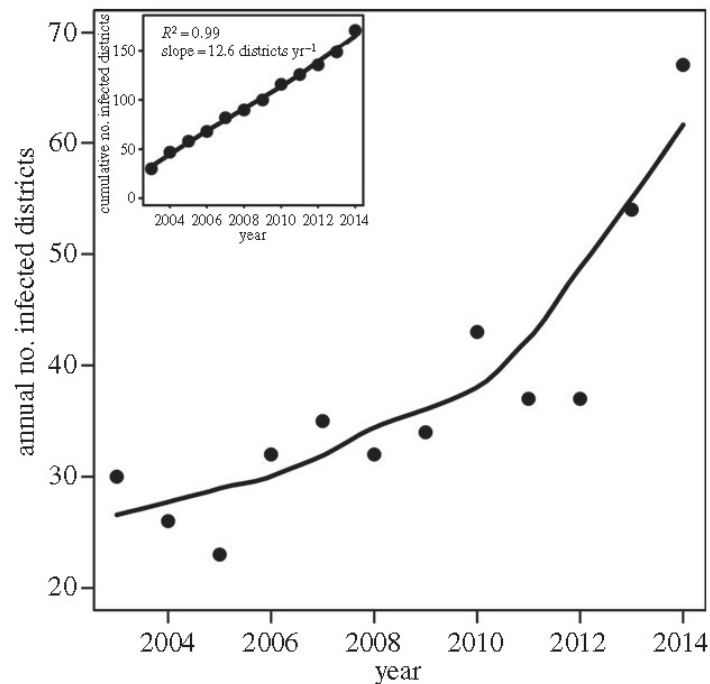


Figura 2. Expansión espacial nacional del RABV. Número anual (cifra principal) y acumulativo (cifra insertada) de distritos gubernamentales que han informado de brotes de rabia desde 2003 hasta 2014. Las líneas muestran los valores predichos por la función loess en R.

La consistencia de las velocidades de la onda de expansión dentro de cada valle sugiere que el RABV se propaga predominantemente por la dispersión a corta distancia a través de una geografía continuamente ocupada, más que por la dispersión puntual impulsada por vuelos de larga distancia de murciélagos infectados. Los datos del censo no mostraron diferencias significativas entre los valles en el número de pueblos por cada cuadrícula de 5 km (Chalhuanca: media \pm d.s.: $12,9 \pm 11,5$; Río Apurímac: $12,5 \pm 12,2$; prueba de Wilcoxon, $W = 838$, $p = 0,6$) tampoco en el porcentaje de comunidades encuestadas que informaron de animales mordidos por murciélagos (Chalhuanca: 71% (36/51 comunidades) y Río Apurímac:

78% (92/118); material electrónico complementario, figura S4). Los dos valles tuvieron una prevalencia equivalente de mordeduras de murciélagos ($W = 267$, $p = 0,8$) y la presencia/ausencia de mordeduras (modelo lineal con distribución binomial de errores que controla el número de pueblos y el número de inspecciones por celda: efecto valle, t -valor_{1,44} = 0,74, $p = 0,4$). En conjunto, estos datos sugieren una presencia generalizada de murciélagos en cada valle con distribuciones similares de comunidades y esfuerzo de inspección.

3. Previsiones espaciales de la transmisión entre especies a los animales domésticos

Nuestros cuestionarios confirmaron la presencia de murciélagos hematófagos (como incidencia de mordeduras de murciélagos) antes del avance de las ondas de expansión, lo que permitirá la propagación del RABV en las partes actualmente libres de rabia de cada valle (figura 5a). Además, sólo el 25% (Chalhuanca) y el 3% (Río Apurímac) de los encuestados sabían que los murciélagos podían transmitir la rabia y menos de la mitad (47%: Chalhuanca y 40%: Río Apurímac) conocían el organismo gubernamental adecuado para informar sobre la rabia. Sólo 1 de cada 90 granjeros había vacunado a algún animal contra la rabia. Dada la presencia de murciélagos hematófagos y la baja preparación para los brotes antes de las ondas de expansión, utilizamos nuestros modelos espaciales para pronosticar las fechas de llegada de la rabia a las zonas actualmente no infectadas. El poder de predicción de nuestros modelos fue apoyado por nuestra validación de datos internos. La llegada real de la rabia se situó dentro de los CI previstos en todos los brotes (material electrónico complementario, figura S3), con una diferencia media de 6,4 y 3,3 meses entre las fechas de llegada previstas y reales en Chalhuanca y el Río Apurímac, respectivamente ($n = 5$ y 7 celdas hexagonales para predecir, respectivamente).

Proyectando hacia adelante nuestros modelos completos, predecimos la llegada del RABV a las poblaciones de murciélagos hematófagos en seis distritos actualmente no infectados para finales de 2015, 13 para 2016 y 22 para 2017 en los dos valles combinados (figura 5a; electrónica material suplementario, cuadro S1).

C. Discusión

Utilizando un conjunto de datos espacio-temporales de alta resolución de los brotes de rabia, ilustramos el poder de combinar los datos de los animales centinelas de los sistemas nacionales de vigilancia con modelos estadísticos para predecir el tiempo y el lugar de futuras transmisiones entre especies de virus transmitidos por murciélagos. En Perú, observamos una reciente duplicación de los brotes de rabia en animales domésticos, lo que se asocia con expansiones espaciales del virus en poblaciones de murciélagos no infectadas anteriormente. En la región del país donde se producen la mayoría de los brotes, la expansión forma múltiples olas independientes de infección que se desplazan a ritmos y trayectorias constantes hacia las comunidades donde documentamos altas tasas de contacto entre murciélagos y animales domésticos no vacunados y un escaso conocimiento de la rabia por parte de los productores. Las invasiones generalizadas en nuevas zonas y el aumento de la carga para la salud humana y animal revelan que el RABV es una zoonosis emergente más que una zoonosis enzoótica y obligan a adoptar nuevas estrategias para el control de la rabia en América Latina.

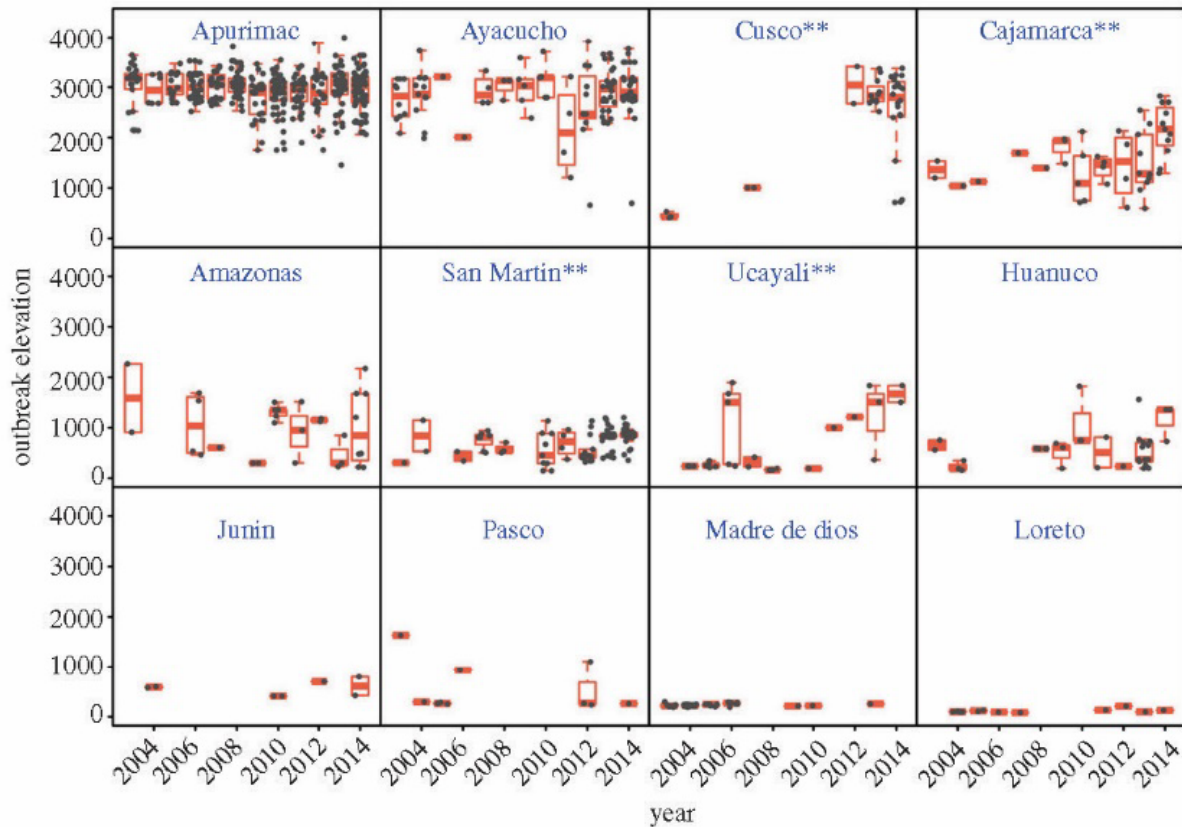


Figura 3. Cambios en la elevación geográfica de los brotes de rabia en cada región. Cada panel muestra la distribución anual de la elevación de los brotes observados en cada región entre 2003 y 2014. Las regiones están clasificadas por orden decreciente de elevación media. Los boletines muestran la mediana, el segundo y el tercer cuartil, mientras que los puntos grises presentan los datos en bruto. Los asteriscos resaltan las regiones donde los aumentos en la elevación de los brotes fueron significativos en nuestro GLM ($p < 0.05$). (Versión online en color.)

La detección sistemática de la rabia por mes en un distrito no infectado anteriormente durante los últimos 12 años, es una señal alarmante de la creciente amenaza para la salud humana y animal que representa la rabia. Los desencadenantes de estas expansiones son inciertos, pero están ocurriendo en todo el país en zonas de transición entre el Amazonas y los Andes y en los valles interandinos (cejas de selva) (figura 3). Una posibilidad es que el incremento de la crianza de animales domésticos podría haber aumentado el tamaño o la conectividad de las poblaciones de murciélagos hematófagos, facilitando de esta manera la introducción viral (129).

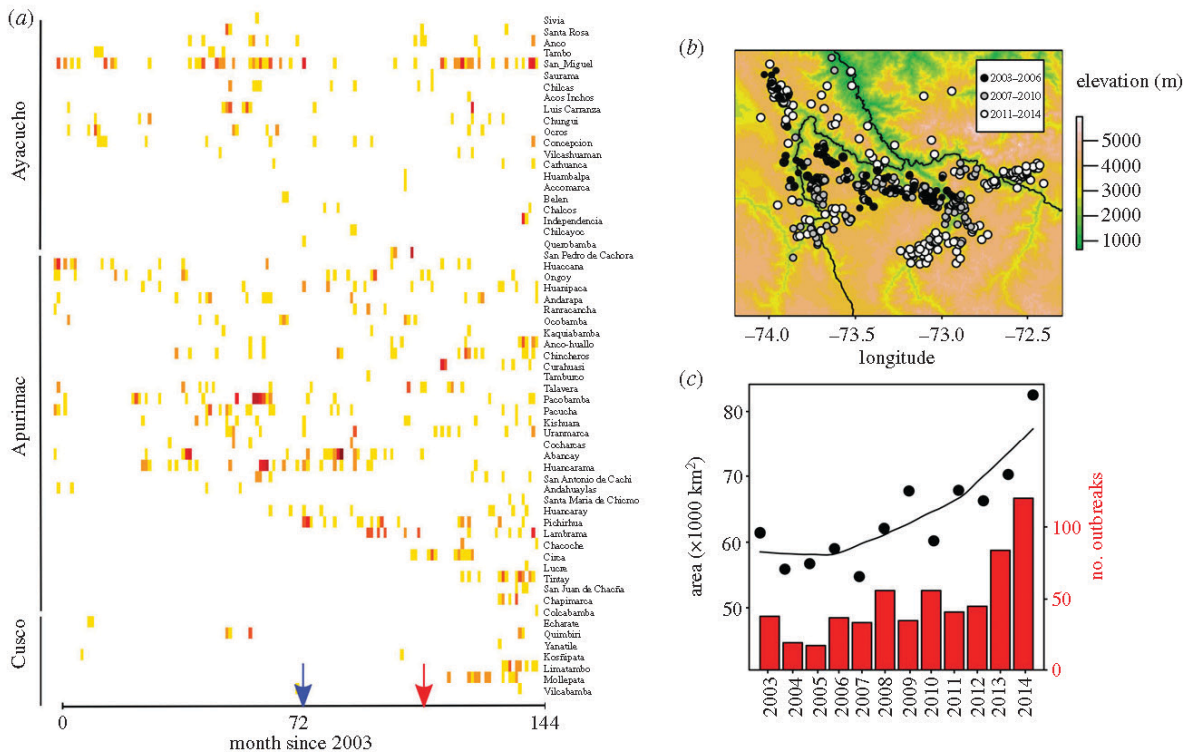


Figura 4. Expansiones espaciales y aumento de la carga del RABV en los valles andinos de Apurímac, Ayacucho y Cusco (AAC). a) Brotes mensuales de rabia desde 2003 hasta 2014 en 61 distritos infectados en las regiones AAC. Cada fila representa el número de brotes en un distrito individual a través del tiempo. Los distritos se clasificaron de acuerdo con la latitud de su centroide (con el distrito más septentrional en la parte superior del panel) dentro de cada región. Los rojos más oscuros indican un mayor número de casos (máximo = 8), el blanco indica la ausencia de detecciones de rabia. Las flechas ilustran el comienzo de la propagación ondulatoria para los valles de Chahuanca (azul) y del Río Apurímac (rojo) que se muestra en la figura 5. b) Ubicación espacial detallada de los brotes desde 2003 hasta 2014. c) El número de brotes por año y la superficie estimada cubierta según las estimaciones de la densidad de Kernel.

Sin embargo, los datos del censo agropecuario de 1994 y 2012 indican que no hay cambios en la densidad del ganado en los distritos recientemente infectados (Censo Nacional Ganadero del Perú, CENAGRO). Otra hipótesis es que el aumento de las temperaturas debido al cambio climático podría estar incrementando las poblaciones de murciélagos y, por lo tanto, incrementándose la presión de infección de la rabia en zonas de mayor altura (143). De hecho, nuestro GLMM muestra que el RABV se está extendiendo en promedio a mayores elevaciones. Sin embargo, es importante destacar que las expansiones ocurrieron en áreas muy por debajo de la máxima elevación del RABV en otras partes del Perú (3600 m.s.n.m), y la elevación de los brotes no aumentó en las regiones de alta elevación donde el RABV fue enzoótico a lo largo de la serie de tiempo (i.e. Apurímac y Ayacucho; figura 3). Por lo tanto, sostenemos que la aparición del RABV en esas regiones no se debe a cambios impulsados por el clima en la distribución de los murciélagos hematófagos, sino a un proceso epidemiológico de invasión viral prolongada de un virus relativamente nuevo en las poblaciones de murciélagos hematófagos, hipótesis que está respaldada por las estimaciones de los relojes moleculares del antepasado común más reciente de la rabia de los murciélagos hematófagos (144). Para apoyar aún más la hipótesis de la invasión lenta, las ondas de expansión viral en los dos valles focales de las regiones de Apurímac, Ayacucho y Cusco, se iniciaron sólo en los últimos años a pesar de las pruebas moleculares de que el RABV estaba presente en las partes noroccidentales de la región desde principios de los años setenta y la evidencia de nuestro estudio es que los murciélagos hematófagos ya están presentes en cada valle considerados como libres o sin presencia del RABV (123) (figura 5a).

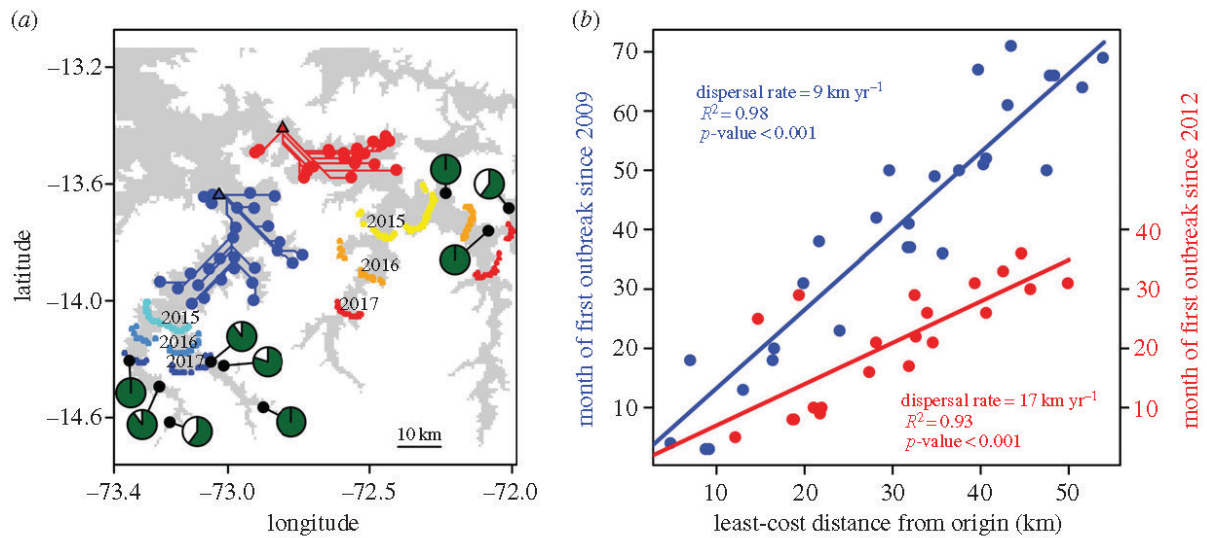


Figura 5. Propagación en forma de ola y previsión de brotes en dos valles del Perú. a) Mapas de los valles de Chalhuanca (izquierda) y Río Apurímac (derecha) que muestran las trayectorias de menor esfuerzo (líneas azules y rojas) desde el centro de cada celda donde se produjo un brote hasta el origen previsto de cada onda (triángulos) y los límites previstos de los brotes para finales de 2015, 2016 y 2017, respectivamente. Las ubicaciones previstas (paletas de color azul y rojo) se dibujaron simulando coordenadas aleatorias que coincidían con la distancia de menor esfuerzo prevista en los modelos lineales. El sombreado en gris indica altitudes inferiores a 3600 m, donde se encuentran murciélagos hematófagos. Los gráficos circulares muestran el porcentaje (verde) de granjas donde se produjeron mordeduras de murciélagos hematófagos en animales domésticos de cada una de las nueve comunidades (10 cuestionarios por comunidad). b) Regresión lineal entre el mes del primer brote de rabia confirmado en cada celda y la distancia de menor costo del brote inferido, que se origina en los valles de Chalhuanca (izquierda, puntos azules) y Río Apurímac (derecha, puntos rojos).

Las velocidades de frente de onda lenta que observamos en los murciélagos hematófagos en relación con otros reservorios de rabia (por ejemplo, 30-100 km año⁻¹ en mapaches) y su baja variabilidad es más consistente con la dispersión de distancia corta de los murciélagos infectados que la invasión impulsada por raros vuelos de larga distancia (145). De hecho, aunque los experimentos de translocación muestran que los murciélagos hematófagos son fisiológicamente capaz de movimientos de larga distancia, los tamaños de rango de hogar son típicamente, <10 km² (121,146,147). Una pregunta restante es por qué las olas expansivas viajan a diferentes ratios en diferentes valles.

Diferentes patrones de movimientos de murciélagos entre colonias en cada valle impulsados por diferencias subyacentes en la distribución de colonias de murciélagos podrían influir en la velocidad de las ondas expansivas. Sin embargo, los valles tenían distribuciones similares de granjas e intensidades de mordeduras (material suplementario electrónico, figura S5), lo que sugiere que es poco probable que la dispersión de larga distancia del RABV sea un factor limitante en cualquiera de los valles. Las alteraciones antropogénicas, particularmente la intensidad de los sacrificios de murciélagos, también podrían influir concebiblemente en la propagación viral. Por un lado, los sacrificios podrían reducir la probabilidad de dispersión por un murciélago infectado al reducir la prevalencia de infecciones o la dispersión de la competencia. Por otro lado, la dispersión por parte de los sobrevivientes de sacrificios podría facilitar la invasión viral en zonas no infectadas. Un ejemplo similar de propagación de patógenos impulsado por perturbaciones se observó en el Reino Unido, donde la interrupción de los límites territoriales del tejón por el sacrificio, facilitó la propagación espacial de la tuberculosis bovina (139). Finalmente, las diferencias en las velocidades de la onda expansiva podrían surgir si las cepas virales con diferentes fenotipos de infección circulan en cada valle.

Sin embargo, trabajos anteriores mostraron que sólo un linaje viral geográficamente aislado ha circulado en las Regiones de AAC desde principios de la década de 1970 (123). Por lo tanto, sospechamos que las ondas descritas aquí tienen un origen evolutivo común, y es poco probable que la evolución reciente explique la variación observada en las velocidades del frente de onda. En ausencia de intervención, la llegada del RABV a las zonas actualmente no infectadas causará una considerable mortalidad animal, importantes pérdidas económicas y una nueva amenaza para la salud pública de los agricultores que manipulan murciélagos o animales infectados. Es difícil cuantificar el impacto real de estas invasiones virales en la agricultura, porque se cree que la sub-notificación de la rabia es significativa, pero sigue sin cuantificarse en la mayoría de las zonas de América Latina, excluyendo la estimación de la verdadera carga de la enfermedad sobre los animales domésticos (1). Sólo en los dos valles de AAC, pronosticamos que más de 11 600 granjas a pequeña escala, que contienen al menos 339 000 animales (93 715 bovinos, 215 707 ovinos, 15 690 caprinos y 13 774 suínos) volverán a correr el riesgo de tener nuevos casos de rabia en los próximos 3 años. La vacunación de estos animales costaría al menos 373.000 dólares EE.UU por año (1,1 dólares EE.UU por vacuna); una carga financiera significativa para los pequeños agricultores que dependen de las ventas de sus animales para pagar el mantenimiento de la casa y la educación infantil, y para los gobiernos locales que no se han visto afectados anteriormente por la rabia. El alto costo de las vacunas, junto con el bajo conocimiento local de la rabia indicado por nuestros cuestionarios, presenta un gran desafío a superar con la invasión epizootica inminente.

Para facilitar la planificación de las intervenciones, proporcionamos una previsión de fechas de llegada de la rabia a las zonas actualmente no infectadas. Como todos los modelos predictivos, nuestra incertidumbre de proyección aumenta aún más en el futuro; por lo tanto, será útil actualizar los modelos a medida que se disponga de datos adicionales. Sin embargo, la consistencia de las velocidades del frente de onda, incluso después de considerar la incertidumbre en las ubicaciones de origen, y la capacidad de nuestro modelo para predecir con éxito las fechas conocidas de llegada de la rabia proporcionan confianza en nuestras previsiones. Aunque nuestros modelos fenomenológicos de propagación de la rabia explican la heterogeneidad del hábitat utilizando un algoritmo de distancia de menor esfuerzo, existen otros métodos para estimar la velocidad del frente de onda. Los métodos estadísticos, como el análisis de superficies de tendencia, se utilizan en escalas espaciales y de tiempo más grandes que nuestros datos, donde los brotes se distribuyen a lo largo de valles relativamente cortos.

Los modelos mecánicos espacialmente explícitos también se han utilizado ampliamente para modelar la propagación de la rabia en carnívoros en áreas geográficas heterogéneas (por ejemplo, (145,148)). Desafortunadamente, las distancias de dispersión de los murciélagos infectados y los tamaños de las colonias son desconocidas, por lo que la parametrización de tal modelo para la rabia no sería sencilla. Además, sin datos adicionales, no se esperaría que estos modelos alterarían nuestras predicciones medias.

Por lo tanto, argumentamos que nuestro enfoque es ideal para informar las respuestas rápidas en una emergencia veterinaria y de salud pública.

Se han identificado olas itinerantes en varias otras zoonosis silvestres (por ejemplo, el virus del Ebola (9), la rabia en los mapaches (10) y la peste en roedores (149)). Las ondas de rabia que identificamos son importantes, porque se están produciendo en tiempo real y son predecibles en velocidad y trayectoria, creando una poderosa oportunidad para dirigir la distribución de vacunas y campañas educativas a áreas donde la infección es inminente (material complementario electrónico, cuadro S1). Nuestros resultados abren aún más nuevas posibilidades para el control de una zoonosis transmitida por murciélagos en sus reservorios. Si bien intervenciones como el sacrificio se han centrado históricamente en las áreas

enzoóticas, nuestros hallazgos permiten apuntar a poblaciones de murciélagos sanos antes de la invasión viral.

Dicha estrategia se intentó en Argentina en la década de 1970, pero incluso con una drástica reducción del 95% de las poblaciones de murciélagos hematófagos (envenenamiento por cianuro), la epizootia continuó avanzando (119).

Este fallo podría reflejar la ausencia de barreras geográficas naturales que permitan al virus circunnavegar la zona de intervención o los desafíos de utilizar la reducción de la población para controlar un patógeno con transmisión dependiente de la frecuencia (105,135,146).

Una alternativa atractiva sería aumentar la proporción de murciélagos inmunizados manteniendo la estructura de edad y el comportamiento disperso relativamente sedentario de los murciélagos hematófagos.

Una vacuna transmisble contra la rabia basada en gel y de aplicación topical, fue eficaz en murciélagos hematófagos en cautiverio, pero nunca se ha liberado en poblaciones silvestres (150). La vacunación antes del frente epizootico podría ser particularmente eficaz cuando se combina con barreras geográficas naturales como los picos andinos altos que se encuentran en las Regiones de AAC.

Este estudio demuestra el poder de los sistemas de vigilancia de la salud animal para generar información de alta resolución sobre la dinámica espacio temporal de los virus zoonóticos que probablemente sería imposible detectar la confianza en estudios dentro de un reservorio de vida silvestre. Las ondas de expansión que detectamos en Perú informan directamente la gestión de la dispersión viral de los murciélagos proporcionando recomendaciones sobre dónde y cuándo se debe vacunar el ganado y el desarrollo de las campañas educativas, al tiempo que se crea una oportunidad única para rastrear intervenciones experimentales en las poblaciones de murciélagos para bloquear los brotes epizooticos de avance replicados espacialmente.

IV. Cuantificar la carga de la rabia de los murciélagos hematófagos en el ganado peruano

A. Introducción

El número de casos y el costo monetario de una enfermedad orientan la forma en que se asignan los recursos para la prevención y el control. En América Latina, la rabia transmitida por murciélagos hematófagos es una de las zoonosis más reconocidas que afectan a los seres humanos y a los animales domésticos, pero su carga sobre las vidas y los medios de subsistencia ha sido difícil de calcular porque se desconoce el porcentaje de brotes que no se notifican a los sistemas de vigilancia. En este caso, utilizando encuestas para calcular la tendencia de los agricultores a notificar las muertes de ganado, estimamos que más de 500 reses murieron de rabia en el sur del Perú en 2014, una pérdida de aproximadamente 170.000 dólares de los EE.UU. o más de 700 meses de ingresos locales. Nuestros resultados también muestran que el riesgo percibido de la rabia afectó fuertemente a la notificación de la mortalidad del ganado y a la cobertura de la vacunación, lo que sugiere que las campañas de sensibilización podrían reducir la carga de la rabia.

B. Resultados

1. Factores socio-ecológicos asociados a la notificación de enfermedades.

Durante el estudio se entrevistó a 400 agricultores entre mayo y octubre de 2015 en 40 comunidades (10 agricultores por comunidad) de 31 distritos de 12 provincias de las regiones de Apurímac, Ayacucho y Cusco (Fig. 1). El promedio de animales por explotación fue de 10,6 (SD: 11,7, rango: 1±151). En promedio, el 38% de los ganaderos declararon que informarían

al SENASA de la muerte de un animal sospechoso a causa de una enfermedad infecciosa. Sin embargo, la notificación varió de 0 a 100% entre las comunidades, con una menor tendencia a informar en los distritos que no habían informado sobre el RABV desde 2003 hasta el momento del estudio (6% vs. 51% en los distritos con casos confirmados, Fig 1C). La notificación se auto-correlacionó espacialmente (prueba I de Moran, $p < 0,001$) hasta unos 50 km, lo que significa que las explotaciones situadas a menos de 50 km de distancia entre sí tenían pautas de notificación similares. La presentación de informes disminuyó con las mayores distancias de las oficinas de recepción del SENASA (Odds Ratio (OR) = 0,94, $p < 0,01$, Tabla 1, Fig 3). Los índices de notificación fueron más de veinte veces más bajos en la región de Cusco, donde el RABV llegó más recientemente, en comparación con Apurímac, que tiene una larga historia con la rabia (128). La percepción general del riesgo de tres enfermedades (rabia, Clostridiosis y fiebre aftosa) aumentó la probabilidad de reportar la muerte de un animal en al menos un 80%, con el efecto de la percepción del riesgo de rabia casi el doble del efecto de la percepción del riesgo de Clostridiosis o fiebre aftosa (Tabla 1). Las granjas con poblaciones de animales más grandes eran ligeramente menos propensas a reportar. Los reportes no estaban relacionados con el nivel o estatus del predio, variables de socioeconómicas, la edad o el sexo del encuestado, el conocimiento de la presencia de un veterinario en la zona, o la confianza en que el SENASA respondiera a un brote reportado, influyeron en la notificación de nuevos casos.

Tabla 1. Predictores del reporte de mortalidad en animales domésticos debido a la sospecha de enfermedades infecciosas en sur de los Andes peruanos.

Predictores	Odds ratio (OR)	Value	Standard Error	t-value	p-value
(Intercepto)	-	0.634221	3.505103	0.18094	0.856
Distancia a la oficina de reporte del SENASA	0.94	-0.05952	0.015373	-3.8718	<0.001
Percepción de la presencia de la rabia en la comunidad	3.11	1.133764	0.347386	3.2637	<0.01
Percepción de la presencia de la clostridiosis en la comunidad	1.84	0.60929	0.307971	1.9784	0.048
Percepción de la presencia de la Aftosa en la comunidad	1.83	0.604164	0.305754	1.97598	0.049
Región Cusco	0.04	-3.11401	1.131002	-2.7533	<0.01
Región Ayacucho	0.69	-0.37782	0.856963	-0.4409	0.66
Número de bovinos	0.95	-0.0553	0.020709	-2.6703	<0.01
Atenciones del SENASA	1.76	0.56484	0.299631	1.88512	0.06
Genero (femenino)	0.59	-0.53441	0.295151	-1.8106	0.071
Estatus socio económico 1	0.88	-0.12475	0.106699	-1.1692	0.243
Estatus socio económico 2	1.09	0.086301	0.131578	0.65589	0.512
Edad	1	-0.00485	0.011717	-0.4137	0.679
Conocimiento de la presencia de un veterinario	0.62	-0.47994	0.319714	-1.5012	0.134
Altura	1.00049	0.000492	0.001154	0.4264	0.67

2. Factores socio-ecológicos asociados a la vacunación de animales domésticos contra la rabia.

En toda el área de estudio, el 59% de los granjeros reportaron haber vacunado a su ganado contra la rabia. Al igual que en el caso de la notificación, las tasas de vacunación variaron desde el 0±100% en todas las comunidades (Fig. 1D), y la vacunación se auto-correlacionó espacialmente hasta unos 50 km. La vacunación fue realizada generalmente por el SENASA (78% de los ganaderos que vacunaron), pero el 16% de los ganaderos informaron haber utilizado un veterinario privado o del municipio, y el 5% de los ganaderos vacunaron a sus animales por sí mismos después de comprar las vacunas al SENASA o a los veterinarios privados. La gran mayoría (98%) de los ganaderos pagaron el costo total de la vacuna y la aplicación (US\$1.2 [DS: 0.3, rango: 0.8±2.1]) con fondos personales y el 98% de los que vacunaron declararon que vacunaron a todos sus animales (bovinos). Los costos de la

vacunación variaron según el precio establecido por los veterinarios privados y los costos de la entrega y administración de las vacunas. El principal factor asociado a la vacunación era si el predio estaba ubicado en un distrito en el que el SENASA había confirmado un caso de rabia antes de nuestras encuestas. Las tasas de vacunación fueron del 83% en las explotaciones situadas en distritos con casos confirmados y del 2% en las situadas en distritos sin casos confirmados (Fig. 1D).

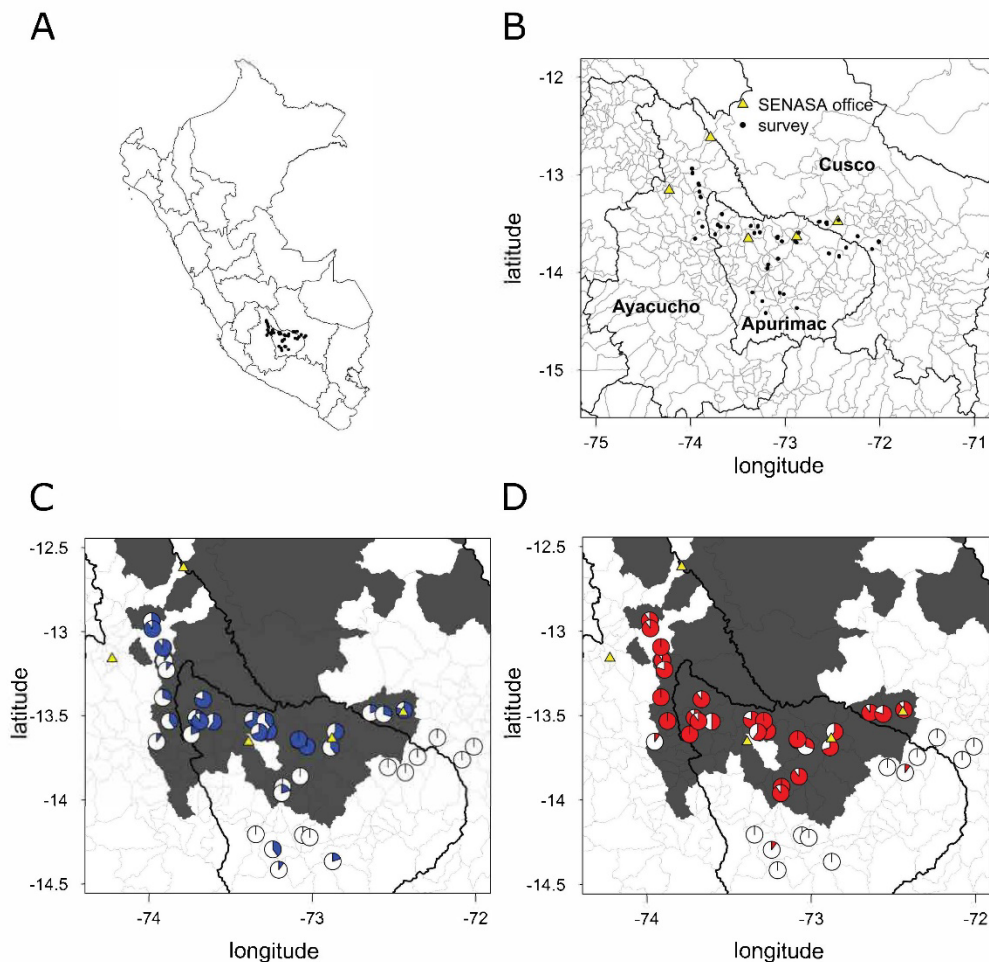
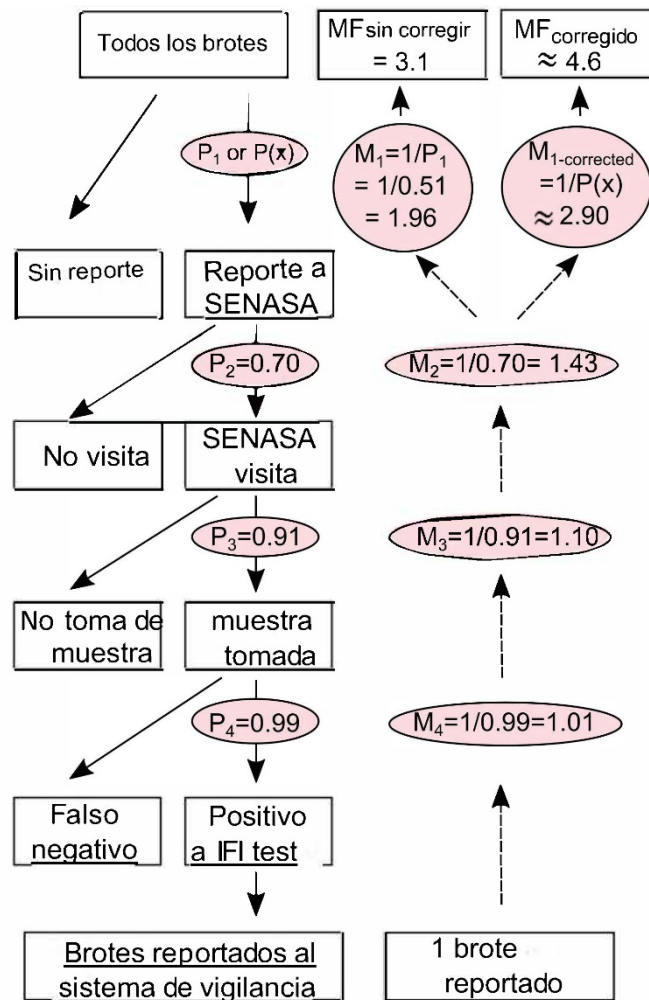


Figura 1. Tasas de notificación y vacunación por comunidad en toda el área de estudio. A) Mapa del Perú con la ubicación de los estudios B) Mapa ampliado que muestra los estudios en las regiones de Ayacucho, Apurímac y Cusco. Los triángulos amarillos muestran la ubicación de las oficinas del SENASA donde se notifican los casos (C) Los gráficos circulares azules muestran el porcentaje de agricultores que notifican la mortalidad del ganado por una presunta enfermedad infecciosa en cada comunidad (N = 10 por comunidad). Los distritos que previamente reportaron uno o más casos de rabia confirmados por laboratorio son de color gris. Los gráficos circulares rojos muestran el porcentaje de ganaderos que vacunan a su ganado contra la rabia. Los mapas de países, regiones y distritos se obtuvieron de la base de datos GADM (<http://www.gadm.org/>) utilizando la función `getData` del paquete `raster` de R.

Por lo tanto, probamos los factores asociados a la vacunación utilizando un `glmmPQL` que incluía sólo los datos de las explotaciones de los distritos con brotes confirmados (N = 280). Los análisis utilizaron una combinación lineal del modelo de cuasi-verosimilitud generalizada (`glmmPQL`) (151) para incluir tanto la autocorrelación espacial como la identidad de la comunidad como efectos aleatorios. La importancia de la autocorrelación espacial para los datos brutos y los residuos de cada modelo fue probado usando la prueba I de Moran (152) en el paquete `APE` de R (Analysis of Phylogenetics and Evolution (APE) es un paquete escrito en el lenguaje R para su uso en la evolución molecular y la filogenética (153).

Figura. 2. Cálculo de los factores de multiplicación a partir del cuestionario y de los datos de vigilancia epidemiológica del SENASA. Diagrama que ilustra la estimación de los factores de multiplicación no corregidos (MFno corregidos) y corregidos espacialmente (MFcorregidos) de subnotificación. (Izquierda) Eventos que ocurren entre un brote en un predio y su reporte y confirmación a través del sistema nacional de vigilancia del Perú. La probabilidad de cada evento se muestra entre paréntesis, basada en los resultados de nuestras encuestas, los registros nacionales de vigilancia y la literatura (para la prueba IFI). (Derecha) Los factores de multiplicación derivados se calculan a partir de estas probabilidades. En el caso de MFcorregido, la corrección espacial se aplica a cada brote mediante el cálculo de la probabilidad $p(x)$ de que un agricultor informe de un caso, que es una función de su distancia a la oficina del SENASA más cercana. Mostramos el valor del promedio MFcorregido en base a los brotes confirmados en 2014, con $MF_{\text{corregido}} = \sum_i^N \frac{1}{p(x_i)}$, donde N = número total de brotes y $p(x_i)$ = probabilidad prevista de notificación del brote i en función de su distancia x_i a la oficina del SENASA.



La vacunación contra la RABV fue 13 veces mayor en los encuestados que también vacunaron contra la Clostridiosis, 3 veces mayor en los ganaderos que declararon conocer el SENASA como autoridad en salud animal, y 7 veces mayor en los ganaderos que vivían en la región del Cusco (Cuadro 2). La vacunación disminuyó ligeramente a mayores alturas (OR = 0.9960, $p < 0.01$). Ni la distancia a la oficina del SENASA, ni la percepción del riesgo de rabia en la comunidad, ni los factores socioeconómicos, ni la eficacia percibida de la vacuna, ni el hecho de conocer a un veterinario se asociaron con la vacunación (Tabla 2). La reimplantación del modelo que reemplaza la percepción del riesgo de rabia del último año en que los agricultores percibieron la rabia en su comunidad (modelada como un factor) mostró que la vacunación

continuó durante los primeros 3 años después de los brotes, pero disminuyó cuando se percibió que la rabia estuvo ausente durante 4 años o más (OR = 0,09, p = 0,02).

Tabla 2. Predictores de la vacunación bovina contra la rabia en distritos endémicos.

Predictores	Odds ratio (OR)	Value	Standard Error	t-value	p-value
(Intercepto)	-	10.2577	3.61658	2.81497	<0.01
Vacunación contra Clostridiosis	13.45	2.59922	0.47153	5.32815	<0.001
Conocimiento del SENASA	3.37	1.21503	0.588875	2.09879	0.04
Altitud	1	-0.0039	0.001182	-3.4786	<0.01
Región Cusco	7.47	2.01074	1.033985	2.28448	0.063
Región Ayacucho	0.37	-0.9955	0.775415	-1.721	0.211
Percepción de la presencia de la rabia en la comunidad	2.26	0.81446	0.45876	1.77196	0.077
Distancia a la oficina de reporte del SENASA	1.02	0.01761	0.018297	1.76727	0.336
Estatus socio económico 1	1.02	0.01596	0.150919	0.16983	0.915
Estatus socio económico 2	0.87	-0.1378	0.187185	-0.6172	0.462
Edad	0.99	-0.0063	0.018737	-0.329	0.736
Género (femenino)	1.73	0.5499	0.442495	1.24783	0.215
Número de bovinos	1.03	0.02828	0.035162	0.70303	0.422
Conocimiento de la presencia de un veterinario	0.51	-0.679	0.531072	-1.324	0.202
Percepción de la eficacia de la vacuna (medio)	1.16	0.14921	0.422253	0.30089	0.724

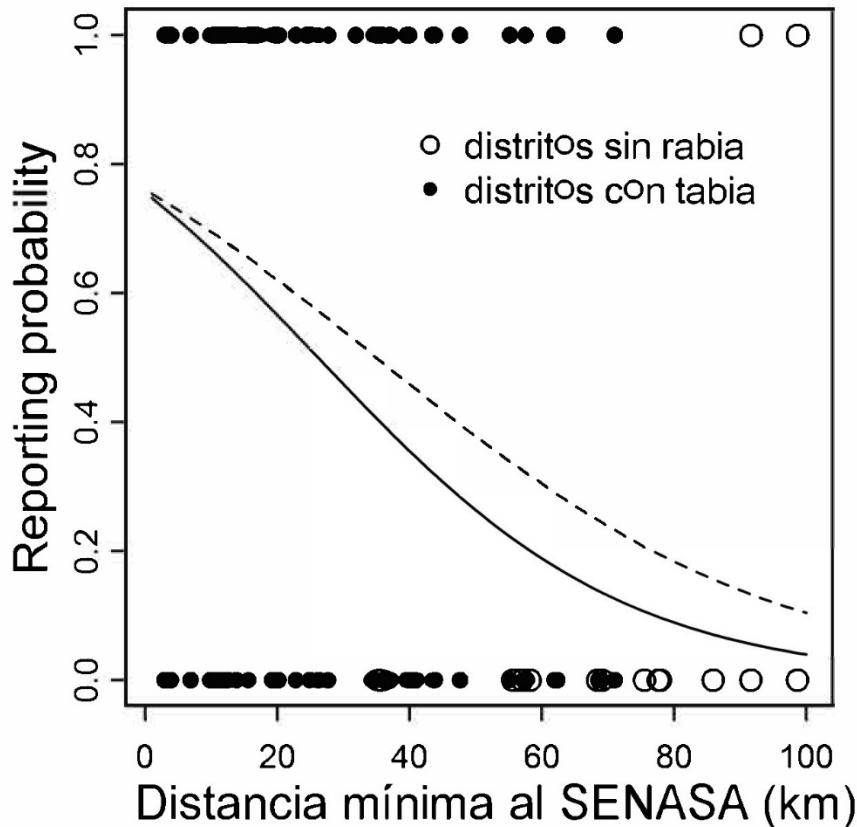


Figura 3. El efecto del aislamiento geográfico en la probabilidad de notificar la muerte de ganado debido a presuntas enfermedades infecciosas. Los puntos muestran las respuestas de los ganaderos en relación con la notificación de la mortalidad de un animal enfermo (1 = notificación, 0 = no notificación) en función de su distancia mínima a la oficina del SENASA (estimada con la función de menor costo, véanse los métodos). Las granjas estaban ubicadas en distritos con brotes confirmados de rabia desde 2013 (puntos negros) o en distritos sin brotes confirmados (puntos blancos). Sólo un distrito (Chalhuana) tenía casos sospechosos de rabia, pero no confirmados. Las líneas muestran la predicción del modelo glmmPQL que predice la probabilidad de notificación por la distancia a la oficina del SENASA utilizando todos los distritos (línea continua) o sólo los distritos

endémicos (línea discontinua). La última predicción se utilizó para calcular una tasa de subregistro corregida espacialmente.

3. Factores de multiplicación de sub-notificaciones de rabia.

Dado que la notificación de la enfermedad por parte de los agricultores estaba influida por la presencia local de rabia, calculamos el MF utilizando únicamente datos de distritos con al menos un brote de rabia confirmado por laboratorio, y asumimos que reflejaba la presencia real de la rabia en ese distrito. Esto llevó a la exclusión de un único distrito (Chalhuanca) que tenía casos sospechosos, pero ningún laboratorio confirmó los casos de rabia. Sin tener en cuenta el efecto del aislamiento espacial en la notificación, estimamos un promedio MFsin coregir de 3,1 (95% CI: 2,7±3,7) brotes por cada brote notificado (Fig. 2).

Al incorporar el efecto de la distancia a la oficina del SENASA (OR = 0,970, p = 0,04, Figura 3) se aumentó el MF corregido a 4,6 (IC 95%: 4,4±8,2). También exploramos cómo esta corrección espacial de la sub-notificación afectaba a la distribución percibida de los brotes en toda la región, ya sea para la carga global de rabia de 2003±2014 (suponiendo que el efecto de la distancia a la oficina del SENASA es constante a lo largo de los años), o sólo para 2014 (Figura 4). Este análisis puso de relieve los distritos de Ayacucho y Cusco que parecían tener relativamente pocos brotes según los registros nacionales de vigilancia, pero que probablemente sufrieron un número desproporcionado de brotes después de ajustar los efectos espaciales en la sub-notificación. En cambio, los distritos cercanos a las oficinas de notificación de Apurímac tuvieron menos brotes de los que implicaban los datos globales (Fig. 4C y 4F).

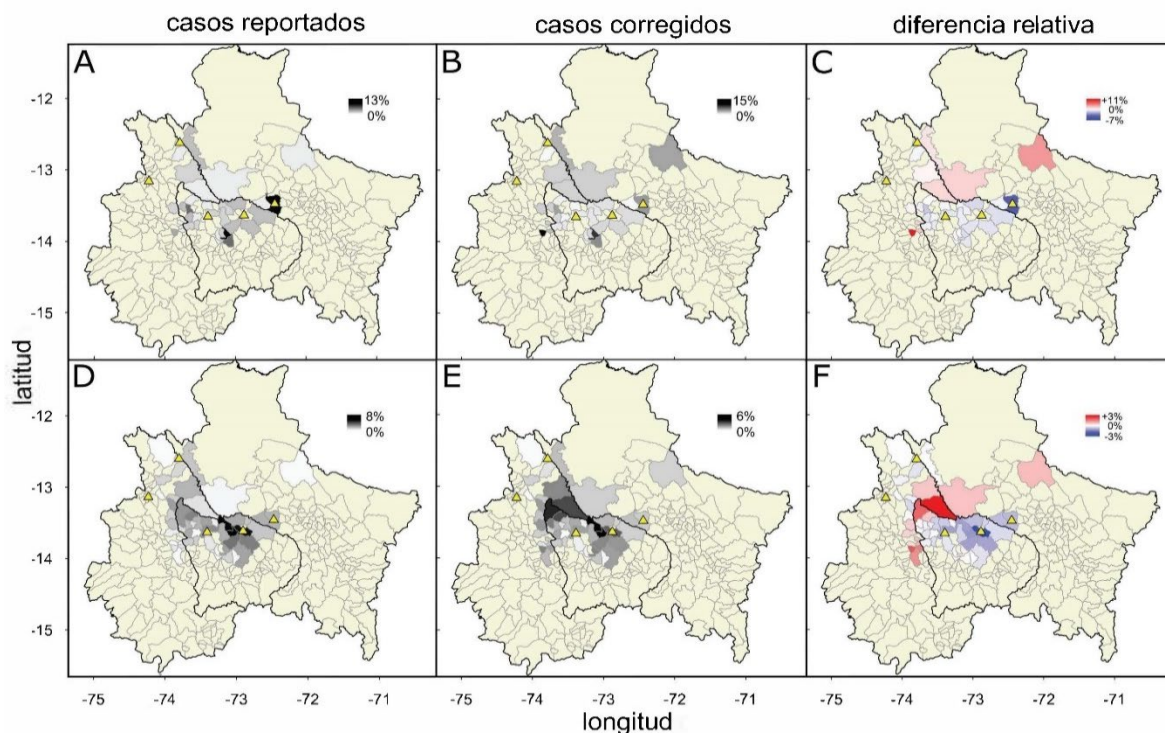


Fig. 4. Distribución espacial de los casos de rabia en animales domésticos en los distritos del sur del Perú después de corregir el efecto del aislamiento geográfico o la notificación. (A) Porcentaje relativo de casos por distrito en las regiones de Ayacucho, Apurímac y Cusco que se notificaron al SENASA en 2014 (B) Porcentaje relativo de casos por distrito en 2014 estimado después de corregir por el efecto de la distancia a la oficina del SENASA en las tasas de notificación. (C) Diferencia relativa entre el número de casos oficiales y corregidos en cada distrito. (D) (E) y (F) son equivalentes a (A) (B), (C) respectivamente para el período de 2003± 2014. En los distritos de

color beige no se ha notificado ni confirmado ningún caso de rabia. Se excluyeron del análisis de 2003±2014 dos casos del distrito de 'Echarate' en Cusco, dada su gran distancia a la oficina del SENASA, lo que generó un número muy elevado de casos corregidos y desorientó la proporción relativa estimada de casos de todos los demás distritos. Los mapas de las regiones y distritos se obtuvieron de la base de datos del GADM (<http://www.gadm.org/>) utilizando la función `getData` del paquete rasterizado de R.

4. La carga de la rabia transmitida por murciélagos hematófagos asociada a la muerte de animales domésticos durante el año 2014.

En 2014 se notificaron al SENASA 157 brotes sospechosos de RABV en animales domésticos, asociados a 169 muertes, en las regiones de Ayacucho, Apurímac y Cusco, con 104 brotes (113 casos) confirmados en laboratorio. El promedio de muertes de animales por brote fue de 1.06 (DS = 0.28, rango 1±3), y el precio promedio por animal (bovinos) estimado a partir de nuestras encuestas fue la media ± DS: US \$241 ± 134. Para una población bovina total de 160.939 y 120.011 animales en distritos con casos sospechosos y confirmados, esto representa una incidencia oficial notificada de 105 muertes por cada 100.000 bovinos con sospecha y 94 muertes confirmadas por virus de la brucelosis. A través de los métodos utilizados para contabilizar la sub-notificación, el número verdadero estimado de brotes de rabia durante este período varió de 341 (284 muertes/100.000 cabezas de ganado) a 714 (444 muertes/100.000 cabezas de ganado), lo que representa pérdidas económicas de UD\$81,524±171,992 (Tabla 3).

En el ámbito nacional en 2014, hubo 254 sospechas de brotes, con 166 confirmados por la prueba de IFI y 1,2 casos por brote (DS: 0,74, rango: 1±10). Asumiendo una MFno corregida nacional similar a la estimada por nuestra CBS, las pérdidas económicas se estimaron en UD\$148, 841±206,840 (Tabla 4). Suponiendo el mismo nivel de sub-notificación desde 2003 hasta 2014, la carga económica de la rabia tuvo una pérdida media de 150.876 US\$ (casos sospechosos) y 93.554 US\$ (casos confirmados) por año.

Tabla 3. Número de casos y carga económica de pérdidas de animales debido a la rabia en el sur del Perú, estimación por varios métodos para el 2014.

Método	Basado en casos confirmados		Basado en casos sospechosos	
	Numero de casos (95%IC)	Pérdidas económicas US\$	Numero de casos (95%IC)	Pérdidas económicas US\$
Reportes oficiales	113	26,974	169	26,974
MF sin corregir	341 (275–632)	81,524 (25,532–214,137)	468 (382–876)	112,934 (36,147–298,471)
MF corregidos	505 (459–1165)	121,797 (47,009–408,013)	714 (680–1,629)	171,992 (66,973–573,879)
V	-	-	596 (354–1,042)	143,691 (40,742–371,897)
V corregido	-	-	522 (340–966)	125,813 (37,896–343,573)

5. Análisis costo-beneficio de la vacunación de animales

La vacunación de todos los animales para eliminar la carga de la enfermedad de la rabia en los distritos con casos sospechosos habría costado 194.496 dólares en 2014, un costo medio de 12 dólares por productor. La cobertura de vacunación según nuestras encuestas implica que los productores gastaron en realidad ~US\$161,403 en la vacunación de animales en 2014. Así pues, el costo total de la rabia (vacunación y mortalidad por rabia corregida por MF) en 2014 fue de 333.395 dólares. En el escenario hipotético en el que no se vacunara a los animales, nuestros modelos proyectan que 4.196 bovinos morirían de VBR anualmente (2.607 muertes/100.000 bovinos), lo que equivale a un costo económico de 1.010.560 dólares. Por lo tanto, la tasa de vacunación actual evita aproximadamente 3482 muertes de animales, lo que supone un ahorro de unos 838.601 dólares. Con estos supuestos, la relación beneficio/costo de vacunar a todos los animales susceptibles (bovinos) en lugar de no vacunarlos sería de 5,2, y de 1,71 en comparación con la situación actual.

C. *Discusión*

Identificamos los factores asociados con la notificación de enfermedades de animales domésticos y la vacunación contra el RABV, que utilizamos para estimar la carga de la rabia en el sur del Perú. Después de tener en cuenta la falta de notificación, la mortalidad de animales por rabia fue más de 4 veces mayor que el costo implicado por los informes oficiales. A los niveles actuales de vacunación, los granjeros de nuestra área de estudio gastan aproximadamente 161.000 dólares anuales y todavía experimentan pérdidas de animales debido al RABV del orden de 444 muertes por cada 100.000 reses. En conjunto, la mortalidad animal y los costos de vacunación superan los 300.000 dólares anuales, lo que representa una gran pérdida para las comunidades agrícolas empobrecidas que dependen de los animales para su subsistencia. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la mejora de los programas de vacunación podría reducir drásticamente estas pérdidas financieras.

Tabla 4. Número de casos y carga económica de la mortalidad animales debido a la rabia en el sur del Perú en el 2014.

Método	Based on confirmed outbreaks		Based on suspected outbreaks	
	Number of cases (95% IC)	Economic loss in US\$ (95% IC)	Number of cases (95% IC)	Economic loss in US\$ (95% IC)
Reportes oficiales	188	45,308	305	73,505
MF <small>sin corregir</small>	618 (443–1551)	148,841(41,927–440,717)	859 (619–2151)	206,840 (58,712–608,596)

Nuestras estimaciones de los costos económicos de la mortalidad de animales debido a la rabia en el sur del Perú en 2014 oscilaban entre 81.524 y 171.992 US\$, dependiendo del método y de si sólo se consideraban los casos confirmados por el laboratorio o todos los casos sospechosos. Dada la menor sensibilidad de la prueba IFI en muestras degradadas (154) y la significativa reducción de los reportes de las granjas ubicadas lejos de las oficinas del SENASA, esperamos que la verdadera carga se acerque más a nuestra estimación superior. Los costos hacia esta estimación superior también fueron apoyados por nuestro cálculo independiente basado en las observaciones personales de los productores sobre los signos clínicos de la rabia en sus animales (Tabla 3). El ingreso mensual promedio en Ayacucho, Apurímac y Cusco para el año 2014 fue de US\$243, y Ayacucho y Apurímac se encuentran entre las regiones más pobres del país (155). Por lo tanto, la pérdida de un solo animal debido a la rabia (~US\$241) equivale aproximadamente a un mes de ingresos. Nuestras encuestas muestran que el 61% de los agricultores utilizaron los ingresos de la venta de bovinos (sobre todo) para el mantenimiento del hogar, y el 30% para la educación de los niños. Por lo tanto, estas pérdidas, aunque aparentemente modestas, pueden reforzar la pobreza entre los pequeños agricultores de la región andina que dependen del ganado para su subsistencia, y consideran el ganado como "cuentas de ahorro" (156,157).

En el plano nacional, las muertes de animales debidas a rabia costaron 148.742 US\$ ± 206.840 US\$ en 2014. Sin embargo, dada la amplia variación en las tendencias de reporte que observamos en nuestra región de estudio, se necesitan estudios similares en otras áreas para refinar aún más la carga total del RABV en el Perú. Por ejemplo, la notificación podría disminuir más bruscamente con la distancia en áreas donde el transporte es más limitado, como las regiones amazónicas. Además, las diferencias regionales en la notificación y la vacunación podrían ocurrir independientemente de la distancia a la oficina del SENASA más cercana, como observamos en el caso de Cuzco. No obstante, nuestra estimación puede utilizarse como punto de partida al establecer las prioridades de los esfuerzos de control de enfermedades. Por ejemplo, la carga de la enfermedad de la rabia a nivel nacional es mucho menor que las pérdidas

económicas estimadas en el Perú por parásitos en las llamas (~US\$1.5 millones (158) pero equivalente a la carga de *Echinococcus* (~US\$196,000 sólo por pérdidas directas (159)).

Es importante reconocer los costos adicionales provocados por la rabia que no pudimos incluir en el presente estudio. En primer lugar, no cuantificamos directamente las pérdidas asociadas a la producción lechera, que fue practicada por el 60% de los productores en nuestro estudio. Sin embargo, esperamos que el precio de una vaca represente parte de este costo. En segundo lugar, aunque casi el 90% de los brotes de rabia notificados en animales domésticos en el Perú involucran al ganado vacuno (128), es probable que haya un subregistro aún mayor de especies ganaderas menos valoradas (por ejemplo, ovinos, caprinos y suinos) (160). Tercero, el número promedio de muertes por brote fue reportado en el sistema de vigilancia como el número de animales muertos o enfermos durante la visita del SENASA, pero los animales adicionales que murieron después de la visita no habrían sido incluidos en nuestras estimaciones. También excluimos los datos de los distritos sin informes oficiales de la rabia, lo que haría que nuestras estimaciones fueran demasiado conservadoras si la rabia estuviera realmente presente. Sin embargo, los cuestionarios confirmaron la ausencia de animales con signos clínicos de rabia en distritos supuestamente libres de rabia (en comparación con 14% en distritos endémicos), y nuestros anteriores análisis epidemiológicos de las ondas de expansión del RABV implicó que estas áreas están verdaderamente libres de rabia (128). Por lo tanto, aunque esperamos que el sesgo introducido en este supuesto es mínimo, podría seguir habiendo retrasos en la notificación de los nuevos infectados lo que aumentaría el número estimado de brotes a un nivel superior al que se informa aquí (161).

Por último, no se disponía de datos para estimar los costos financieros de las pruebas de muestreo y diagnóstico de los casos sospechosos de rabia. En conjunto, estos factores probablemente aumenten el costo neto del RABV más allá de las estimaciones presentadas en este estudio.

También demostramos un marco estadístico para incorporar la heterogeneidad espacial en las prácticas de presentación de informes en las estimaciones de la carga de morbilidad. Aunque corregimos la carga estimada utilizando únicamente la distancia a las oficinas de notificación del SENASA, en principio nuestro enfoque puede generalizarse para incluir otros factores que afectan a la sensibilidad de la notificación o el diagnóstico cuando éstos están disponibles. En nuestro conjunto de datos, la corrección de la sub-notificación espacialmente heterogénea reveló áreas geográficas que tenían una carga de rabia desproporcionadamente más alta que la implícita en los registros oficiales (Fig. 4).

Esta conclusión pone de relieve la posibilidad de que los recursos destinados a la prevención y el control se dirijan a las zonas que tienen una elevada tasa de notificación, pero no necesariamente la mayor carga, lo que podría amplificar disparidades en la carga del RABV. Además, dado que el RABV persiste en los murciélagos a través de la dinámica espacial, las zonas de alta carga y baja notificación descuidadas podrían crear puntos de transmisión que faciliten persistencia viral a largo plazo (135). Nuestros resultados apoyan los hallazgos de estudios previos de que la vacunación del ganado es la intervención más efectiva para reducir la carga del RABV (56,162). En nuestro estudio, la cobertura de la vacunación contra la rabia fue alta (83%) en distritos con brotes confirmados, pero casi inexistente (es decir, el 2% de los productores) en distritos vecinos, supuestamente libres de rabia (128). Esto demuestra que la vacunación se produce de forma reactiva a los brotes de rabia y proporciona un mecanismo

(tasas de vacunación más bajas y reducción de la inmunidad del rebaño) por el cual los brotes en las zonas recientemente invadidas podrían ser mayores que en las zonas históricamente endémicas. Dentro de las zonas endémicas de rabia, la distancia a la oficina de notificación del SENASA no se correlacionó con la vacunación, lo que sugiere que la presencia de rabia supera los desafíos logísticos para adquirir las vacunas. Dado el alto costo de esta vacuna para los agricultores (alrededor de 1,2 dólares por dosis), fue sorprendente que los factores socioeconómicos no estuvieran relacionados con la vacunación, lo que sugiere que la percepción del riesgo de rabia es más importante que la asequibilidad para impulsar la adopción de la vacuna para el RABV.

Estimamos que la actual cobertura de vacunación del 83% evitó la muerte de alrededor de 3842 bovinos en 2014, lo que ahorró a los ganaderos ~US\$ 800.000. Estos ahorros deben ser tratados con precaución ya que los ganaderos pueden haber exagerado las tasas de vacunación y no se disponía de una confirmación independiente (por ejemplo, certificados de vacunación). Además, nuestra estimación supone una relación lineal entre la cobertura de la vacunación y la incidencia del RABV, que, aunque intuitiva, no ha sido demostrada empíricamente, y la vacunación reactiva en respuesta a los brotes puede complicar aún más esta relación. No obstante, nuestros resultados implican que la vacunación de todo el ganado sería 1,7 veces más beneficiosa que la cobertura de vacunación actual, y 5 veces más beneficiosa que no vacunar al ganado debido al aumento previsto de la mortalidad del mismo. Esta última relación es similar a la relación beneficio-costos de un valor de 6 estimada en México (162). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que nuevas inversiones en la vacunación del ganado, tal vez mediante subvenciones gubernamentales, serían económicamente beneficiosas para mitigar la carga del RABV. Sin embargo, vacunar a la población bovina restante podría ser más difícil y costoso que lograr la cobertura actual, especialmente si la población bovina restante es propiedad de ganaderos que son reacios a vacunar porque no perciben al RABV como una amenaza.

Hasta donde sabemos, nuestro estudio es la primera estimación de la carga de la enfermedad de la rabia en América Latina para incorporar las tasas estimadas de sub-notificación o la heterogeneidad espacial en la notificación y la aparición de la enfermedad. Esta estimación, por lo menos cuatro veces superior a la de los informes oficiales, es esencial para planificar y aplicar medidas eficaces en función de los costos para prevenir y controlar la enfermedad, que afecta principalmente a los agricultores de bajos ingresos y en pequeña escala. Nuestros resultados sugieren además que el aumento de la percepción de riesgo de las comunidades que están lejos de las oficinas de notificación podría aumentar la notificación y reducir las pérdidas de ganado al fomentar la vacunación preventiva en las zonas de alto riesgo. Esto podría lograrse mediante el desarrollo de campañas de sensibilización utilizando herramientas relativamente baratas como las radios comunitarias. En términos más generales, esta labor pone de relieve cómo la variación en la notificación de enfermedades puede influir en las estimaciones de la carga de morbilidad, lo que será importante tener en cuenta al extrapolar estimaciones de la carga de los estudios de base comunitaria en escalas espaciales mayores.

V. Los biomarcadores fluorescentes demuestran las perspectivas de las vacunas untables para controlar la transmisión de enfermedades en los murciélagos silvestres

A. Introducción.

Las vacunas que se transfieren de forma autónoma entre individuos, se han propuesto como una estrategia para controlar las enfermedades infecciosas dentro de las poblaciones silvestres inaccesibles. Sin embargo, las tasas de propagación de las vacunas y la eficacia epidemiológica en los sistemas del mundo real siguen siendo difíciles de alcanzar. Aquí investigamos si las vacunas tópicas que se transfieren entre individuos a través de contactos sociales pueden controlar la rabia de los murciélagos hematófagos, una zoonosis importante desde el punto de vista médico y económico en América Latina. Experimentos de campo en tres colonias de murciélagos peruanos, en los que se utilizaron biomarcadores fluorescentes como sustituto de la transferencia de murciélago a murciélago y la ingestión de una vacuna oral, revelaron que la transferencia de la vacuna aumentaría la inmunidad a nivel de la población hasta 2,6 veces más allá del mismo esfuerzo utilizando vacunas convencionales no diseminadas. Los modelos matemáticos mostraron que los niveles observados de transferencia de vacunas reducirían la probabilidad, el tamaño y la duración de los brotes de rabia, incluso a niveles bajos pero realistas de aplicación de la vacuna. Los modelos predijeron además que las vacunas existentes ofrecían ventajas sustanciales con respecto a la eliminación de murciélagos, política que se aplica actualmente en América del Norte, Central y del Sur. La vinculación de los estudios sobre el terreno con los biomarcadores a modelos matemáticos puede informar sobre la forma en que las vacunas untables pueden combatir los patógenos de interés para la salud y la conservación antes de que se realicen inversiones costosas en el diseño y el ensayo de las vacunas.

B. Resultados

1. La transferencia e ingestión de biomarcadores muestra el potencial de una alta cobertura de vacunas en murciélagos hematófagos silvestres.

Hemos estimado el potencial de una vacuna untable para su transferencia entre murciélagos utilizando la rodamina b (RB), un biomarcador que, cuando se ingiere, produce una fluorescencia duradera en los folículos pilosos de diversas especies de mamíferos (163,164). Después de aplicar una formulación de gel de RB tópica a los murciélagos de tres colonias del Perú (tamaño de las colonias: 207-257 individuos; proporción de sexos: 43,1-50,6% de los machos), la transferencia e ingestión orotópica se vigiló mediante un análisis microscópico fluorescente de muestras de pelo recogidas en sesiones de captura posteriores, y la fluorescencia indicó el consumo de RB (Cuadro suplementario 1). En dos sitios (LMA5 y LMA6), se estima que el 84 y el 92% de los murciélagos, respectivamente, ingirieron RB, ya sea después de la aplicación tópica o de la transferencia de los murciélagos tratados (Fig. 1). La tercera colonia (LMA12) se reubicó en una cueva no documentada poco después del tratamiento de la RB, lo que disminuyó las capturas durante el período de vigilancia en relación con el tamaño estimado de la colonia (Cuadro suplementario 1). En consecuencia, la cobertura total estimada se redujo al 28,8% (Fig. 1). No obstante, el porcentaje de murciélagos LMA12 muestreados al final del período de vigilancia de un mes que dieron positivo al RB (48,3%; agregando los días 24 y 25) no fue estadísticamente diferente de los porcentajes en las fechas finales de captura en las otras dos colonias (58,3 y 70,0%; prueba de chi-cuadrado, $\chi^2 = 3,2$; g.l = 2; P = 0,21). Caracterizamos además los patrones de captación de RB entre los grupos

demográficos de murciélagos. Las proporciones de sexo de los murciélagos con transferencia positiva se volvieron ligeramente más sesgadas hacia los machos (aumentos del 3-11%, dependiendo de la colonia) en relación con las proporciones de sexo de los murciélagos que fueron tratados con RB, sugiriendo una elevada transferencia a los machos; sin embargo, estos aumentos no fueron estadísticamente significativos (prueba de χ^2 ; todos $P > 0,05$; Fig. Suplementaria 1). Observamos la transferencia de RB a los murciélagos no tratados en las tres clases de edad. En todas las colonias, el 73,4% de los adultos muestreados ($\bar{n} = 351$, promediado a través de lecturas de microscopía de observadores independientes), el 57,5% de los juveniles muestreados ($\bar{n} = 30,5$) y el 89,9% de los sub-adultos muestreados ($\bar{n} = 34,5$) se convirtieron en RB positivos por transferencia durante el período de monitoreo. Por consiguiente, estos resultados implicaban que las vacunas desplegadas en sólo 2 días de capturas (17-50% del tamaño total de la colonia) producirían altos niveles de inmunidad poblacional en todas las clases de edad debido a la transferencia orotópica.

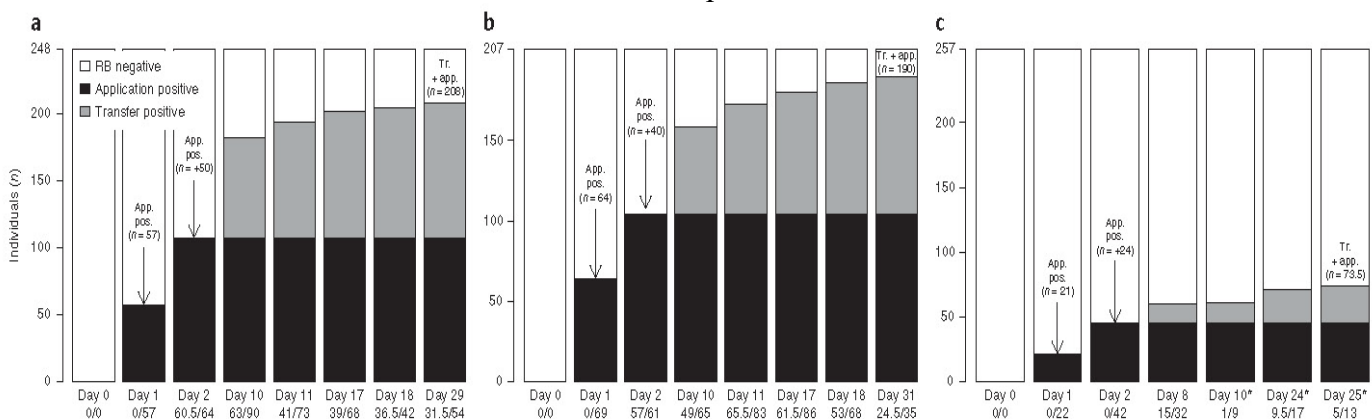


Figura 1. Transferencia e ingestión de un biomarcador en gel esparcido orotópicamente en tres colonias de murciélagos hematófagos. a-c. Los datos de transferencia e ingestión del biomarcador en gel se muestran para el LMA5 (a), LMA6 (b) y LMA12 (c). Los días en los ejes x muestran el tiempo transcurrido desde la aplicación del RB, con el número de murciélagos positivos a la transferencia sobre el total de capturas. Los ejes y muestran el número de murciélagos de cada colonia dentro de tres categorías: RB negativo (blanco); aplicación positiva (negro); y transferencia positiva (gris). Los asteriscos durante y después del día 10 en c indican las capturas de la cueva reubicada. Los datos son los medios de lectura al microscopio de dos observadores, salvo que se indique lo contrario. Los murciélagos con transferencia positiva a partir del día 2 se les aplicó RB y se incluyeron en la barra negra para visualizar la fuerza total de aplicación, pero se incluyeron como transferencias en los análisis estadísticos.

2. Heterogeneidades de contacto entre los grupos demográficos de murciélagos hematófagos.

A continuación, se examinó si las heterogeneidades de contacto podrían hacer que ciertos grupos demográficos de murciélagos fueran especialmente eficaces o ineficaces como diseminadores de vacunas mediante la utilización de marcas de polvo ultravioleta, en las que los diferentes grupos de edad y sexo de los murciélagos se trataron con diferentes colores de polvo ultravioleta, y la transferencia a los murciélagos no tratados se vigiló durante dos noches de captura posteriores (165,166). En tres repeticiones de tratamientos con rayos ultravioleta por colonia, se documentaron 78 casos de transferencia de polvo ultravioleta, lo que dio lugar a tasas de contacto estimadas que oscilaban entre 0,23 y 1,25 por murciélago tratado (Fig. 2). Los murciélagos machos tuvieron tasas de contacto significativamente más altas que las de las hembras (prueba de suma de rango de Wilcoxon, $W = 91$; $P = 0,025$; media = 1,14 frente a

0,67) y tuvieron tasas similares de contactos macho con macho y macho con hembra (prueba de suma de rango de Wilcoxon, $W = 42$; $P = 0,93$).

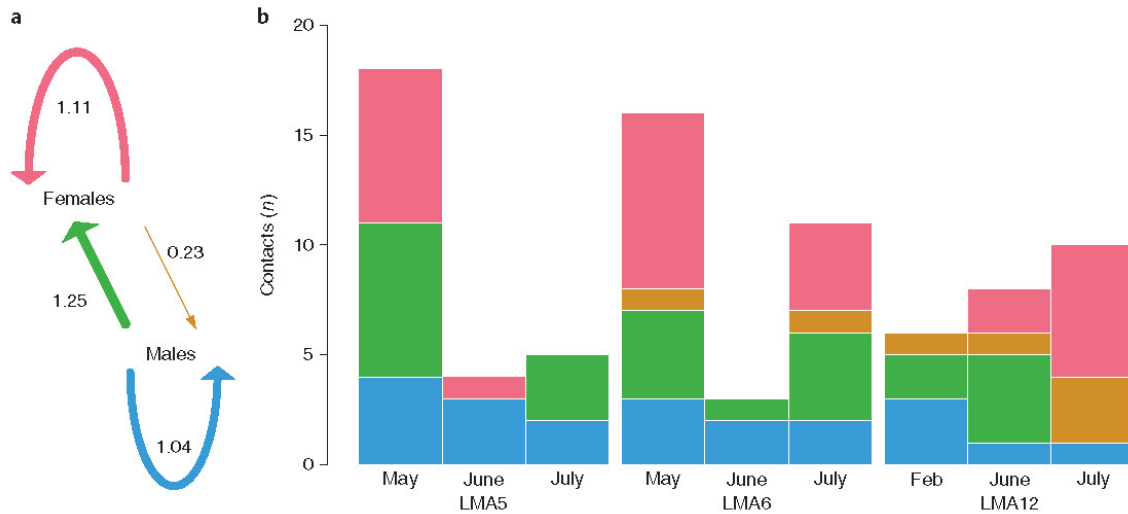


Figura 2. **Heterogeneidad de los contactos de los murciélagos revelada por las transferencias de polvo ultravioleta.** **a.** Nuevos contactos por murciélago marcado, por sexo. El grosor de las flechas es proporcional a las tasas de contacto. **b.** Número y direccionalidad de los contactos por sexo, ubicación y fecha de muestreo. Los contactos con juveniles no se muestran ya que los juveniles de las colonias estudiadas eran demasiado jóvenes para alimentarse de forma independiente y habrían sido subestimados por nuestro método de captura durante la vigilancia.

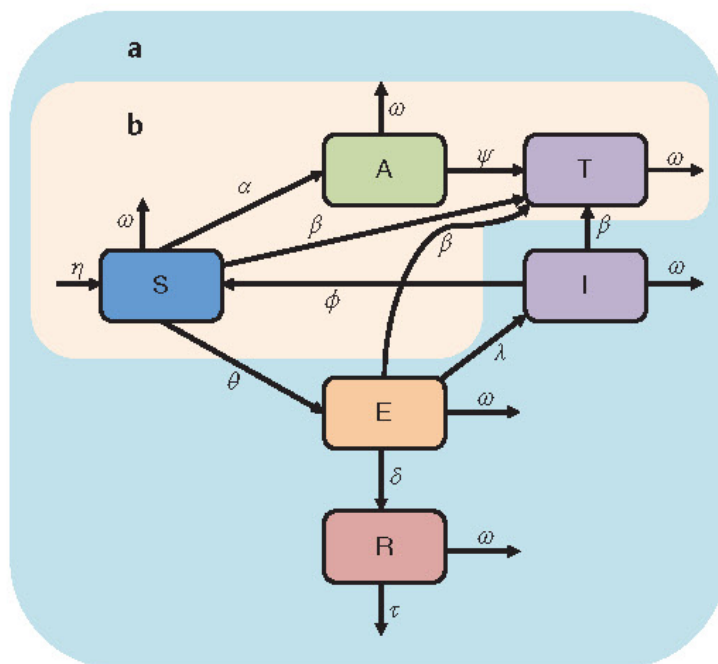


Figura 3. **Modelos dinámicos de transmisión de la rabia y de vacunación tópica.** **a.** El modelo completo utilizado para los análisis de los brotes incluyó la transferencia orotópica y la transmisión de la rabia. Las clases comprendían las susceptibles (S), las de aplicación positiva (A), las de transferencia positiva (T), las inmunes (I), las expuestas a la rabia (E) y las de murciélagos rabiosos (R). **b.** Estructura de los modelos de transferencia de biomarcadores para la adaptación β . En el modelo de vacunación, las clases I y T proporcionan inmunidad contra la rabia, pero la clase T tiene una inmunidad permanente. Los parámetros del modelo describen las tasas de: nacimientos naturales (η) y muertes (ω); aplicación de gel orotópico (α), persistencia (ψ) y transferencia (β); transmisión de la rabia

(θ); disminución de la inmunidad (ϕ); mortalidad inducida por la rabia (τ); y las probabilidades de sucumbir a la rabia (δ) o sobrevivir (λ) después de la exposición. En el cuadro suplementario 3 se ofrecen más detalles y referencias sobre los valores de los parámetros.

Por el contrario, las hembras contactaron preferentemente con otras hembras (Fig. 2a). La transferencia a los juveniles no pudo cuantificarse de manera fiable porque estos murciélagos eran en su mayoría demasiado jóvenes para alimentarse de manera independiente, y nuestro método de captura durante el período de vigilancia requería que los murciélagos salieran

volando de sus cuevas. No obstante, un solo murciélago juvenil capturado tuvo una transferencia ultravioleta de una hembra. En cambio, la transferencia de los juveniles a los adultos debería haber sido detectable si se producía debido a la mayor facilidad de captura de los adultos. Sin embargo, ninguno de los 27 juveniles marcados transfirió polvo ultravioleta a los adultos. Junto con las altas tasas observadas de exposición de los jóvenes a la RB, estos hallazgos sugieren que los despliegues de vacunas deberían dirigirse a los adultos en lugar de a los jóvenes. Apuntar a los adultos sería logísticamente ventajoso, ya que minimizaría la perturbación social de las colonias que resulta de entrar en las cuevas para capturar a los juveniles.

3. Los modelos epidemiológicos muestran que las vacunas diseminadas superan el sacrificio para el control de la rabia.

Adaptamos un modelo compartimentado determinista de persistencia del RABV (135) para incorporar una vacuna diseminada orotópicamente, y utilizamos los mínimos cuadrados (Fig. 3b) para estimar las tasas de transferencia de vacunas per cápita esperadas a partir de las series temporales de transferencias de RB observadas en nuestros estudios de campo, asumiendo que la transferencia de RB equivale a una protección de por vida. Este análisis reveló que cada murciélago tratado transfirió RB a 1,45-2,11 individuos no tratados -hasta un aumento de 2,6 veces en la cobertura a nivel de la población en relación con la cobertura que se esperaría utilizando la cobertura convencional con vacunas no untables (Fig. 4b, Fig. 2 suplementaria y Tabla 2 suplementaria).

Hemos simulado la capacidad de las vacunas untables para controlar la rabia a través del rango de R_0 (el número previsto de infecciones secundarias que surge de una única introducción viral en una zona completamente susceptible de la población) sugeridos en la literatura sobre la rabia (135,167,168). Aplicando vacunas a aproximadamente el 20% de los murciélagos, se vacunó el 40% de la población y se redujo el tamaño del brote de rabia en un 45-75%, dependiendo del supuesto R_0 de la rabia (Fig. 4a-c). Sin embargo, aplicando las vacunas a una mayor proporción de murciélagos tuvieron rendimientos decrecientes tanto para la proporción de la colonia que fue finalmente protegida y para el control de la rabia. Si las vacunas se aplicaran a más del 30% de los murciélagos, las reducciones adicionales en los brotes de rabia fueron <5%, lo que significa que un aumento del 5% en la aplicación inicial condujo a una reducción <5% en tamaños de los brotes (Fig. 4d). El mayor beneficio (reducción del brote tamaño en relación con el esfuerzo) se produjo a niveles de vacunación <15%.

A continuación, comparamos la eficacia relativa de la vacunación y el sacrificio a través de tres escenarios epidemiológicos que representan diferentes estrategias de manejo: 1) un enfoque preventivo, en el que se aplicó la vacuna/vampiricida para prevenir la invasión de la BRV en poblaciones de murciélagos históricamente libres de rabia (128,169) 2) un enfoque proactivo, que representó una intervención en un área endémica de rabia, pero en una colonia que no estaba actualmente infectada; y 3) un enfoque reactivo, en el que la intervención siguió 60 días después de que se introdujera en la colonia un solo murciélago infectado con rabia (Fig. 4 suplementaria). Aunque simulamos los resultados en toda la gama posible de esfuerzos de aplicación (es decir, el 0-100% de los murciélagos tratados), nos centramos en niveles de aplicación más bajos, ya que la captura de grandes proporciones de murciélagos en grandes zonas geográficas sería poco práctica para las campañas de control de la rabia. De hecho, los estudios de recaptura de marcas en múltiples colonias de murciélagos hematófagos en Perú

sugirieron que, en promedio, <10% de las colonias fueron capturadas en una sola noche (146). A niveles realistas de aplicación, la vacunación redujo sistemáticamente la probabilidad de invasión viral, el tamaño del brote y la duración del mismo con mayor eficacia que la eliminación, independientemente de que las medidas de control fueran preventivas, proactivas o reactivas (Fig. 5). El sacrificio sólo se favoreció cuando se trató al menos el 25% de la colonia, y sólo en escenarios reactivos. Sin embargo, la ventaja del sacrificio en función del tamaño del brote fue relativamente pequeña (un máximo de una reducción mayor del 20%) en relación con las mayores ventajas observadas cuando se favoreció la vacunación (hasta un 45% de reducción mayor), y las diferencias en la duración del brote fueron insignificantes hasta que se sacrificaron proporciones mucho mayores de murciélagos (Fig. 5). En los escenarios preventivo y proactivo, el sacrificio requería la captura y el tratamiento de proporciones mucho mayores de poblaciones de murciélagos hematófagos (por ejemplo, >60%) para igualar la reducción del tamaño y la duración del brote lograda por la vacunación (Fig. 5). De hecho, la única diferencia discernible a niveles de aplicación más altos fue una mayor reducción de la duración de los brotes por medio de la eliminación selectiva; sin embargo, esto se debió a la extinción casi completa de las colonias de murciélagos. Incluso si este grado de eliminación de murciélagos fuera alcanzable y éticamente aceptable, tal vez no sea una estrategia favorable a largo plazo, ya que las poblaciones que se recuperaron de las eliminaciones serían totalmente susceptibles a la rabia, causando potencialmente mayores brotes en el futuro (170).

Nuestras tasas de transferencia per cápita probablemente representan límites más bajos de propagación de vacunas y vampiricidas, ya que el porcentaje relativamente alto de murciélagos tratados inicialmente con RB dejó otros pocos disponibles para ser expuestos mediante transferencia en dos de nuestras colonias, y la reubicación de la tercera colonia redujo las tasas de captura durante el período de vigilancia.

De hecho, algunos estudios han sugerido tasas de transferencia más altas del vampiricida (171,172). Por lo tanto, realizamos un análisis de sensibilidad en el que tanto las vacunas como el vampiricida se propagaron hasta diez veces más eficientemente que en nuestras estimaciones de RB (valores que superaban las mayores tasas de transferencia sugeridas de las aplicaciones de vampiricida). Además, consideramos que las tasas de transferencia eran hasta un 75% menos eficientes que nuestras estimaciones de RB. Este análisis demostró que la vacunación de bajo nivel seguía siendo favorecida en los enfoques preventivos y proactivos, incluso si tanto la vacuna como el vampiricida se propagaban hasta tres veces más que lo observado en nuestros estudios de campo (Figuras suplementarias 6-8). Si ambas intervenciones se propagaban con menos eficacia que la RB, la vacunación era superior o equivalente al sacrificio, excepto cuando grandes proporciones de las colonias de murciélagos eran sacrificadas de forma reactiva (Fig. 6 suplementaria). Bajo niveles realistas de aplicación (aplicación $\leq 25\%$), incluso si el vampiricida se propagó tres veces mejor que una vacuna, no fue capaz de superar la vacunación bajo enfoques preventivos o proactivos cuando el R_0 era <2. En los escenarios reactivos, se favorecía el sacrificio si el vampiricida se propagaba dos o tres veces mejor que una vacuna o si el R_0 de la rabia era 2 (Fig. 9 suplementaria). Dado que las vacunas orales contra la rabia existentes utilizan vectores virales competentes para la replicación con el potencial de dosis efectivas más bajas que las de los venenos químicos (150,173), es menos probable que se produzca una mayor transferencia del vampiricida que a la inversa, donde las vacunas se propagan mejor (174). Los escenarios de alto R_0 en los que se favorece el sacrificio también son poco probables, ya que el R_0 de rabia estimado es considerablemente inferior a 2

(135). Por lo tanto, nuestros resultados apoyan las sugerencias anteriores de que el sacrificio puede requerir la casi eliminación de los murciélagos para beneficiar localmente la prevención de la rabia (119), y revelan que las vacunas untadas son herramientas eficaces para reducir el tamaño, la duración y la probabilidad de que se produzcan brotes de rabia en América Latina.

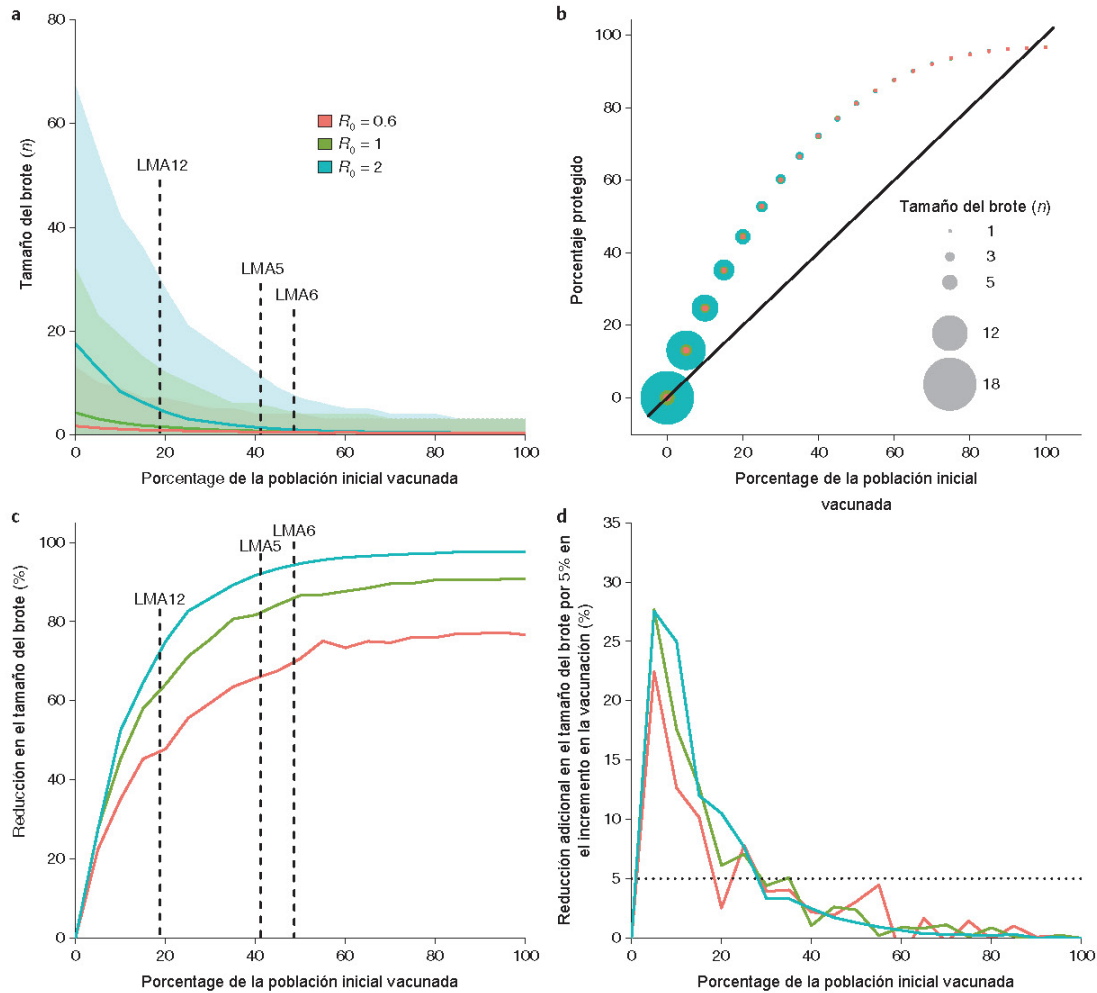


Figura 4. Simulación de brotes de rabia con vacunación. **a**, Tamaño medio de los brotes de rabia después de la introducción de un solo murciélago rabioso en la colonia 1 semana después de la aplicación de una vacuna untada. Los colores representan diversos grados de R_0 rabia, con intervalos de confianza del 95% (sombreado) calculados a partir de 5.000 simulaciones. Las líneas discontinuas indican el porcentaje de murciélagos a los que se aplicó la RB en nuestros lugares de estudio. La figura suplementaria 5 muestra los resultados calculados sólo a partir de simulaciones en las que se produjeron brotes. **b**, Porcentaje de murciélagos finalmente protegidos por la aplicación inicial de la vacuna. Los tamaños de los círculos indican los tamaños de los brotes para los tres valores del R_0 de la rabia. La línea sólida representa $x = y$. Los puntos sobre la línea representan el beneficio añadido de la transferencia de la vacuna. **c**, Reducción del tamaño del brote de rabia (% de menos casos) por la variación de los niveles de vacunación inicial y los valores del R_0 de la rabia. **d**, Porcentaje de casos adicionales de rabia prevenidos mediante el aumento del esfuerzo de aplicación inicial de la vacuna en un 5% (es decir, la tasa de cambio en la reducción de la rabia a partir de c).

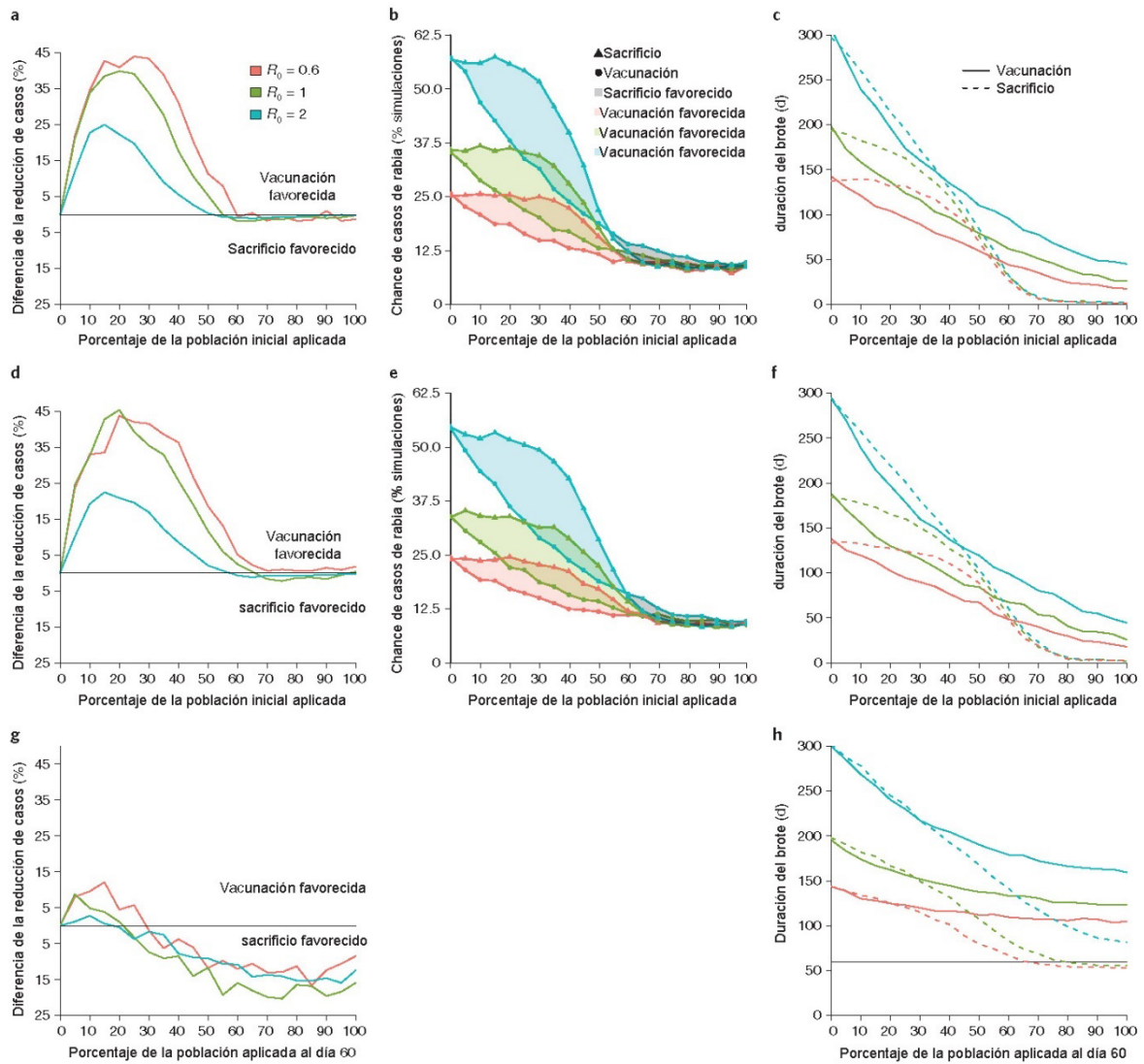


Figura 5. Comparación de los efectos del sacrificio y la vacunación en la transmisión de la rabia. a-h, Diferencia en la reducción de los casos de rabia entre niveles iguales de esfuerzo en la vacunación frente al sacrificio (**a, d y g**), probabilidad de un brote de rabia (**b y e**) y duración de los brotes de rabia tras la vacunación y el sacrificio (**c, f y h**) para las estrategias preventivas (**a-c**), proactivas (**d-f**) y reactivas (**g y h**). En **a, d y g**, los valores superiores e inferiores a 0 favorecen la vacunación y el sacrificio, respectivamente. En **b y e**, la probabilidad de un brote de rabia se define como el porcentaje de simulaciones ($n = 5.000$) en las que la introducción del virus de la rabia dio lugar a una transmisión posterior, y las regiones sombreadas representan la diferencia entre la vacunación (círculos) y el sacrificio (triángulos); el sacrificio se favorece en las regiones grises y la vacunación en las regiones azules, verdes y rojas. La probabilidad de que se produzcan brotes no se modeló para el control reactivo ya que, por definición, los brotes ya se habían producido. La línea horizontal en **h** indica el día 60, cuando se aplicaron las medidas de control reactivo. En todos los paneles, los colores corresponden a diferentes valores del R_0 asumidos para la rabia.

C. Discusión

Este estudio proporciona una prueba de principio de que a niveles de despliegue operacionalmente alcanzables y tasas cuantificadas empíricamente de propagación de murciélago a murciélago, las vacunas orotópicas deberían reducir la transmisión de la rabia de manera más eficaz que la eliminación selectiva (la política actual empleada en toda América Latina). Dado que la persistencia de la rabia requiere la propagación entre colonias para la dispersión viral, incluso las reducciones modestas del tamaño del brote probablemente tengan

repercusiones epidemiológicas importantes en las escalas geográficas más amplias en las que se llevan a cabo las campañas de control de la enfermedad. En particular, al reducir el número de murciélagos infectados y la probabilidad de invasión viral, la vacunación de un número limitado de colonias beneficiaría desproporcionadamente la eliminación regional de la rabia al favorecer las extinciones virales estocásticas. Dado que la dispersión de los machos propaga la rabia entre las colonias, la vacunación podría beneficiarse aún más si se dirigiera a los murciélagos machos (137). Aunque se esperaba que las tasas más elevadas de aseo social entre las hembras socavarán esta estrategia (172,175), encontramos que los machos tienen iguales o mayores tasas de contacto inter e intra-sexo, una posible consecuencia de los intentos de apareamiento con las hembras o de las peleas entre los machos. Es importante, porque el autotrecimiento es común, cualquier vacuna transferida a través de estas interacciones sería finalmente ingerida.

El diseño de campañas a gran escala para desplegar vacunas contra la rabia que se puedan propagar requiere una investigación adicional en varias áreas. En primer lugar, para optimizar el número de dosis de vacunas que se deben aplicar a cada murciélago, los estudios de campo y en cautiverio deben cuantificar la heterogeneidad individual en las tasas de transferencia utilizando vacunas reales además de biomarcadores. En segundo lugar, los costos de la vacunación deben estimarse en términos económicos, además de la evaluación epidemiológica que aquí se ofrece. Lamentablemente, en la actualidad las vacunas se producen sólo para la investigación, y no se dispone de los costos de la producción en gran escala. En tercer lugar, la vacunación de murciélagos hematófagos sin reducción de la población será inaceptable para algunos interesados, ya que la depredación incontrolada de los murciélagos mantiene la exposición a patógenos no relacionados con la rabia (176), y la anemia por mordeduras puede reducir la productividad del ganado independientemente de la rabia(177). Dado que el sacrificio desplaza las poblaciones de murciélagos hacia individuos más jóvenes y más susceptibles a la rabia, lo que podría aumentar la transmisión de la rabia (146)(178), las investigaciones futuras deberían desarrollar herramientas para la supresión reproductiva como alternativa al sacrificio (178).

Por último, el mantenimiento de la metapoblación de la rabia ofrece oportunidades para una vacunación más eficiente y con información epidemiológica (179).

Por ejemplo, las vacunas podrían aplicarse con el conocimiento previo de la presencia de la rabia de los sistemas de vigilancia de animales domésticos (por ejemplo, la vacunación en anillo) o de forma preventiva en zonas en las que la ubicación y el momento de los brotes son previsibles (128). Los modelos de transmisión de la rabia espacialmente explícitos serán un paso importante en el diseño de estas intervenciones, pero requerirán una comprensión más cuantitativa de la dispersión de los murciélagos de la que se dispone actualmente. Resulta emocionante que, una vez elaboradas las estrategias, la capacidad operativa para su aplicación ya está disponible en la mayoría de los países de América Latina como resultado de décadas de experiencia en campañas de sacrificio.

Estos resultados proporcionan pruebas de que las vacunas untables pueden contribuir a la gestión de los patógenos en los murciélagos salvajes. El RABV proporcionó un estudio de caso ideal porque se comprenden los mecanismos epidemiológicos que subyacen al mantenimiento viral y se dispone de vacunas candidatas (128,135,150,180). Si bien las estimaciones de los parámetros exactos y los modelos desarrollados aquí no deberían aplicarse directamente a otros

patógenos de murciélagos, el marco que vincula los biomarcadores con los modelos matemáticos puede orientar las investigaciones futuras. En el caso de varios patógenos de murciélagos de interés para la salud pública o la conservación, como el síndrome de la nariz blanca, el virus de Hendra y el virus de Marburgo, se han propuesto modelos epidemiológicos (181,182), y existen vacunas para murciélagos o existen precedentes que fomentan su desarrollo (183,184). En estos casos, nuestro enfoque podría aplicarse en plazos relativamente cortos para evaluar las perspectivas de las vacunas para ayudar a la gestión y las características inmunológicas y epidemiológicas que se requerirían para el éxito antes de invertir recursos en el desarrollo de las vacunas.

Para otros patógenos de murciélagos con mayor incertidumbre en cuanto a los huéspedes del reservorio y la biología de la transmisión, como los ebolavirus (185), la aplicación requerirá un mayor conocimiento fundamental de los ciclos de transmisión viral. Alentamos a que se siga desarrollando la tecnología de las vacunas virales vectoriales para murciélagos, y destacamos la necesidad de cuantificar su propagación y la eficacia en la naturaleza.

VI. Definición de nuevas vías para gestionar la actual aparición de la rabia de los murciélagos en América Latina.

A. Introducción.

La rabia transmitida por los murciélagos hematófagos comunes (*Desmodus rotundus*) se conoce desde principios del siglo XX, pero sigue expandiéndose geográficamente y en una amplia gama de especies y entornos afectados. En este examen, presentamos los conocimientos actuales sobre la epidemiología y la gestión de la rabia transmitida por *D. rotundus* y sostenemos que puede considerarse razonablemente una amenaza emergente para la salud pública. Identificamos los vacíos de conocimiento relacionados con los determinantes del medio geográfico del reservorio de la rabia, el murciélago, la reducción de las mordeduras en los seres humanos y el ganado, y los obstáculos sociales a la prevención. Discutimos cómo las nuevas tecnologías, incluidas las vacunas de dispersión autónoma y los supresores de la reproducción dirigidos a los murciélagos, podrían gestionar tanto la rabia como el crecimiento indeseable de las poblaciones de *D. rotundus*. Por último, destacamos el subregistro generalizado de la mortalidad humana y animal y la escasez de estudios que cuantifiquen la eficacia de las medidas de control, como la eliminación de murciélagos. La colaboración entre los investigadores y los gestores será crucial para implementar la próxima generación de gestión de la rabia en América Latina.

B. Resultados

1. Distribución de los reservorios de la rabia

1.1. Conocimientos actuales

Tres especies existentes de murciélagos son hematófagos, el murciélago hematófago común (*Desmodus rotundus*), el murciélago hematófago de patas peludas (*Diphylla ecaudata*) y el murciélago hematófago de alas blancas (*Diaemus youngi*). Mientras que las otras dos especies se alimentan principalmente de aves y fauna silvestre (186), *D. rotundus* se alimenta regularmente de ganado y ocasionalmente de humanos, y es el único reservorio de RABV

(186–188). Entender qué es lo que impulsa la distribución geográfica de *D. rotundus* es esencial para comprender el riesgo de la rabia.

D. rotundus está presente en toda la América Latina tropical y subtropical, desde el norte de México hasta el norte de Argentina y Chile (189), y ocupa diferentes ecosistemas, incluyendo selvas tropicales, desiertos costeros, matorrales xéricos y regiones montañosas de hasta 3600 m.s.n.m. (189). Entre los factores que influyen en la presencia de murciélagos y en el riesgo de contraer la rabia a grandes escalas espaciales figuran la temperatura, la altitud y las precipitaciones, mientras que, a escala local, la densidad de ganado, la fragmentación de los bosques inducida por el hombre y la densidad/proximidad de las carreteras y los ríos parecen ser importantes (62,189,190). El crecimiento de la población de *D. rotundus* en el último siglo se relaciona con un aumento del acceso al ganado como fuente de alimentos y la disponibilidad de estructuras hechas por el hombre que podrían utilizarse como cuevas, incluyendo minas, túneles, pozos, alcantarillas y casas abandonadas (62,129). Por el contrario, la deforestación a gran escala de los árboles utilizados por *D. rotundus* para el descanso puede reducir su abundancia relativa (129,191). La eliminación de las zonas abiertas como rutas de vuelo también puede explicar la estrecha asociación de la presencia de *D. rotundus* con bosques fragmentados, ríos y líneas de árboles (192).

1.2. Prácticas de gestión actuales

Las medidas de control para reducir la distribución geográfica y el tamaño de la población de *D. rotundus* se han aplicado durante medio siglo (193). En las campañas nacionales se utilizan venenos anticoagulantes ingeridos por vía oral ("vampiricida") que se aplican de forma tópica y se distribuyen entre los murciélagos mediante la alineación, o se aplican al ganado y se ingieren cuando los murciélagos se alimentan (129). Aunque existe la posibilidad de que otras especies de murciélagos ingieran venenos anticoagulantes o de que se contaminen las cuevas compartidos (193), se ha observado que *D. rotundus* ocupa lugares específicos dentro de las cuevas, lo que puede reducir los efectos en otras especies. Los métodos no autorizados para el control de la población de murciélagos incluyen la captura y el sacrificio de murciélagos mediante redes o trampas improvisadas en las cuevas, así como la destrucción, el daño, el sellado o la quema de las misma (194). Esas actividades han causado una mortalidad generalizada entre los murciélagos hematófagos y otras especies de murciélagos, lo que ha suscitado preocupaciones éticas entre los conservacionistas y ha reducido los servicios de los ecosistemas que prestan los murciélagos (194,195).

Los gobiernos deberían desalentarlos activamente. Independientemente de los métodos utilizados, el sacrificio reduce temporalmente las poblaciones de *D. rotundus* y alivia las mordeduras de personas y/o ganado a escala local (119,196), pero es poco probable que altere la distribución geográfica de *D. rotundus* a escalas mayores, a menos que se aumente la frecuencia e intensidad de las campañas a niveles sin precedentes o se desarrollen nuevas tecnologías para el control de las poblaciones de murciélagos.

1.3. Mejora de la gestión

La gestión actual se centra exclusivamente en el aumento de la mortalidad de los murciélagos. Las intervenciones a nivel geográfico podrían dirigirse a otros determinantes de la presencia y abundancia de *D. rotundus*, como la disponibilidad de alimentos y refugio proporcionados por el hombre. Se han propuesto intervenciones ecológicas que aumentan la presencia de depredadores (por ejemplo, los gatos domésticos) (197), pero deben considerarse con cautela dados los posibles efectos de los gatos en la vida silvestre nativa y su capacidad de transmitir

la rabia a las personas. La reducción de la disponibilidad de alimento (animales) es otra opción, pero se corre el riesgo de fomentar la dispersión de los murciélagos, lo que podría aumentar la propagación de la rabia o incrementar la depredación de los murciélagos sobre presas alternativas como los humanos. Una perspectiva emocionante implica el desarrollo de tecnologías de control de la reproducción hormonal como las que se utilizan en los mamíferos terrestres salvajes (198,199). En relación con el sacrificio, la supresión reproductiva podría reducir más gradualmente el tamaño de las poblaciones de *D. rotundus* (minimizando la perturbación social que se ha supuesto que aumenta la propagación de la rabia (135)), al tiempo que se inclina la estructura de edad hacia los adultos que pueden tener inmunidad contra la rabia por exposiciones anteriores. Los modelos ecológicos también pueden brindar nuevas oportunidades de aumentar la eficacia de las intervenciones mediante la identificación de zonas en que las poblaciones de murciélagos pueden ser particularmente sensibles o robustas a la intervención. Encontrar el equilibrio óptimo entre las nuevas opciones también puede plantear limitaciones específicas de la ubicación en lo que respecta a lo que es factible y eficaz en la práctica (200).

2. Dinámica de la transmisión dentro del reservorio

2.1. Conocimientos actuales

Se cree que el virus de la rabia se transmite principalmente entre los murciélagos a través de las mordeduras. Como es típico de un virus de la rabia, todas las especies de mamíferos son susceptibles y las infecciones exitosas invariablemente resultan en una encefalitis aguda y letal. El mantenimiento a largo plazo se produce a través de un ciclo de transmisión específico de la especie dentro de los murciélagos (169,201). En los murciélagos, las infecciones no letales, en las que el individuo se infecta claramente antes de convertirse en infeccioso, se observan regularmente en el medio silvestre y en estudios de infección en cautiverio mediante la presencia de anticuerpos neutralizadores del virus (ANV) (112,135,146). La naturaleza protectora de los ANV adquiridos de forma natural sigue sin estar clara. La prevalencia de la infección activa en murciélagos de vida libre es generalmente baja (~1%) (131). Sin embargo, las observaciones de murciélagos salvajes llevados en cautiverio han mostrado mayores proporciones de murciélagos infectados que derraman el virus en su saliva, aunque el estrés relacionado con el cautiverio podría haber aumentado su susceptibilidad al virus (202). Aunque no se puede descartar la toma de muestras de infecciones activas, una explicación probable de esta aparente discrepancia es que el virus sufre epizootias localizadas, durante las cuales la prevalencia es sustancialmente elevada, seguidas de extinciones locales. De hecho, esa dinámica de invasión-extinción se observa fácilmente en los complejos patrones espacio-temporales de propagación al ganado, incluidas las ondas epizoóticas, en las que el virus se propaga por áreas geográficas mediante la transmisión entre colonias de murciélagos vecinas a una velocidad relativamente constante (128) y la persistencia de la metapoblación, en la que la presencia asincrónica del virus en las colonias de murciélagos impide la extinción a una escala espacial mayor, y las sustituciones localizadas de linaje (135,203,204). Pueden darse períodos de incubación prolongados, pero son una explicación menos plausible de las desapariciones localizadas de cepas del virus durante varios años, como sugiere la vigilancia pasiva del ganado (203). La confirmación de la desaparición del virus en los propios murciélagos se ha visto obstaculizada hasta ahora por el corto período de tiempo de la mayoría de los estudios longitudinales y su dependencia de los diagnósticos basados en anticuerpos (que siguen siendo detectables durante meses después de la eliminación del virus) en lugar de la evidencia directa de la circulación viral mediante la RT-PCR (146,205). Suponiendo que se confirme la dinámica de extinción-recolonización, el movimiento de murciélagos infectados

entre las colonias es, por lo tanto, crucial para el mantenimiento viral a largo plazo (135). Los mecanismos de dispersión viral están comenzando a entenderse. Aunque *D. rotundus* no es migratorio y suele tener un radio de acción reducido, con dispersiones comunes en distancias relativamente cortas (1 a 3 km), se han documentado dispersiones de mayor distancia (hasta 54 km) (121,206). Estudios moleculares recientes sugieren que la dispersión de los murciélagos machos permite la propagación del virus entre las colonias (203,206), lo que pone de relieve que los machos son un objetivo potencialmente importante para la gestión.

2.2. Prácticas de gestión actuales

La única práctica empleada actualmente para reducir la transmisión de del virus de la rabia dentro de los reservorios es la reducción de la densidad de murciélagos mediante la eliminación. En teoría, la eliminación de los reservorios para el control de enfermedades es más eficaz cuando las tasas de transmisión del patógeno dependen de la densidad del huésped, con un umbral de densidad crítica por debajo del cual el patógeno no puede ser mantenido por la población (105). En la práctica, la relación entre la reducción de las poblaciones de murciélagos y el riesgo de rabia es compleja (119,146). La perturbación social de los murciélagos de sacrificio podría facilitar la propagación de la rabia al aumentar la dispersión de los murciélagos (135). Podrían surgir más complicaciones si los sacrificios reducen la inmunidad de la población matando preferentemente a los individuos inmunes adultos o si el espacio de nicho desocupado aumenta la supervivencia de los jóvenes o la inmigración de los individuos nativos (170). Aunque los datos empíricos siguen siendo limitados, una comparación de la seroprevalencia entre las colonias de *D. rotundus* con diferentes historias de sacrificio sugirió que el sacrificio se asociaba con una mayor y no menor seroprevalencia en los murciélagos (146) A pesar de los programas nacionales de sacrificio de murciélagos que se han llevado a cabo durante varias décadas, hay pocas pruebas publicadas de que el sacrificio reduce la transmisión del RABV a los humanos o al ganado. En particular, no está claro si los programas de sacrificio son infecciosos debido a un sacrificio reactivo (es decir, después de que se detecta un brote en humanos o animales) o a la falta de recursos para mantener los esfuerzos de sacrificio a lo largo del tiempo, en parte debido a la falta de una base evidente que identifique qué niveles de sacrificio podrían ser eficaces. En la Argentina, el gaseado experimental de las cuevas con cianuro redujo las poblaciones de *D. rotundus* en un 95% y limitó la rabia del ganado en una zona de control. Sin embargo, los efectos fueron muy localizados, y los brotes continuaron a varios kilómetros de la zona de sacrificio (119). Esto sugiere que los sacrificios podrían requerir poblaciones muy pequeñas de murciélagos para reducir el riesgo de contraer la rabia, un objetivo que no podría alcanzarse prácticamente en la mayoría de las zonas. De acuerdo con esta idea, los efectos indirectos en el ganado persisten o han aumentado en algunas zonas con sacrificios regulares, aunque no se han probado los efectos específicos de los sacrificios y es concebible que los aumentos puedan reflejar reducciones en la cantidad de sacrificios (190,207) Se necesitan urgentemente estudios detallados que cuantifiquen directamente los impactos del sacrificio en el comportamiento de los murciélagos, la demografía y la transmisión de la rabia en diferentes contextos ambientales.

2.3. Mejora de la gestión

Para todos los reservorios de rabia que no sean murciélagos, la vacunación de los reservorios es la piedra angular de la prevención de la rabia humana, habiendo sido aplicada con éxito tanto en perros como en carnívoros salvajes. (208,209). Los murciélagos tienen una esperanza de vida similar o más larga (por ejemplo, hasta 15 años en el caso de los murciélagos hematófagos comunes salvajes (210)) que los carnívoros actualmente vacunados (por ejemplo, hasta 12 años en el caso de los zorros rojos salvajes (211)), pero su reproducción es de 3 a 6 veces más lenta,

lo que ampliaría la inmunidad de la población inducida por la vacuna hasta el punto de que una inmunidad de rebaño eficaz podría prevenir definitivamente la transmisión (212,213). Además, los ANV adquiridos de forma natural a partir de exposiciones subletales crean potencialmente una importante inmunidad de base no observada en los carnívoros reservorios, lo que también puede ayudar a alcanzar una inmunidad de rebaño eficaz con mayor rapidez (214). Las vacunas virales recombinantes existentes que utilizan los vectores de la vaccinia (virus de la viruela) (215,216) y la viruela del mapache (173,180) son inmunogénicas y protectoras en los murciélagos. Como ambos vectores ya se utilizan en campañas a gran escala dirigidas a la fauna silvestre, se han sometido a pruebas exhaustivas de seguridad y de falta de reversión a la virulencia en las especies no objetivo (208,217). Además, se están desarrollando herramientas para la difusión masiva en geles tópicos que mejoran la transferencia entre los murciélagos mediante la alineación (173). La aplicación de este enfoque en muchas colonias sigue siendo un desafío, pero la liberación de vacunas podría optimizarse utilizando el conocimiento del comportamiento social, de dispersión y reproductivo de *D. rotundus* (218). Otra posibilidad sería desarrollar vacunas con mayor potencial de propagación (es decir, "vacunas transmisibles"), asegurando que se reduzcan al mínimo los posibles efectos negativos de la propagación de un microorganismo modificado genéticamente en poblaciones silvestres (219). Los ensayos de campo que examinan la dinámica de la propagación de la vacuna en el medio silvestre son un paso siguiente crucial. Sin embargo, aunque la vacunación de los murciélagos redujera al mínimo la circulación de la rabia, las consecuencias negativas de las mordeduras de murciélagos en los seres humanos y el ganado seguirían exigiendo mejores estrategias de gestión de las poblaciones de murciélagos.

3. Exposiciones entre especies

3.1. Conocimientos actuales

El *D. rotundus* requiere sangre cada 2-3 días para evitar la inanición (110,220), y los murciélagos infecciosos pueden alimentarse durante días antes de sucumbir a la rabia. Como tal, las mordeduras de murciélagos son frecuentes y los comportamientos de búsqueda de alimento definen los riesgos de transmisión entre especies. Cuando están presentes, el ganado doméstico se alimenta con mayor frecuencia, pero algunos individuos se alimentan predominantemente de la fauna silvestre, incluso cuando el ganado está presente (169,221). Entre todos los animales domésticos, el ganado vacuno es la presa más atacada, pero otras especies (por ejemplo, caballos, pollos, cabras y cerdos) pueden ser la presa más común en lugares específicos dependiendo de la diversidad local de los alimentos/presas (187,222). Los murciélagos se alimentan en zonas relativamente pequeñas (normalmente <5 km) y la frecuencia de mordedura disminuye a medida que se alejan de las cuevas (223), lo que significa que la disponibilidad local de alimento/presa en las zonas rurales influye directamente en el riesgo de contraer la rabia para los seres humanos.

3.2. Prácticas de gestión actuales

Al reducir las poblaciones de murciélagos, los sacrificios también reducen las tasas de mordedura (véase la sección anterior). Las mordeduras en los seres humanos podrían reducirse aún más si las casas fueran "a prueba de murciélagos" para evitar su entrada y si se utilizaran mosquiteros para protegerse de los murciélagos dentro de las casas (224). Aunque la aplicación generalizada de esos métodos puede ser financieramente prohibitiva en las comunidades de bajos ingresos y su eficacia no se ha puesto a prueba, el uso de redes podría ser beneficioso para varias enfermedades transmitidas por mosquitos y algunos costos para los habitantes en situación de riesgo podrían ser absorbidos por los programas nacionales destinados a reducir

esas enfermedades (por ejemplo, la lucha contra el paludismo en el Brasil (225)). El uso en las selvas tropicales, donde las picaduras son más frecuentes, puede verse limitado aún más por la incomodidad de las casas de paredes cerradas y los mosquiteros en entornos cálidos y húmedos(224,226). Los brotes de rabia en los seres humanos han seguido a la eliminación del ganado o al agotamiento de las presas de la fauna silvestre (188,226), lo que sugiere que la introducción de animales domésticos podría tener un efecto "zooprofiláctico" de desviación de las mordeduras de los seres humanos. Sin embargo, esta posible intervención debe considerarse con cautela, ya que la suplementación de los recursos alimentarios puede aumentar las poblaciones de *D. rotundus* a largo plazo. Además, es posible que no sea deseable la cría de ganado en zonas protegidas (es decir, parques nacionales o bosques protegidos) por razones ambientales como la deforestación para introducir cultivos para el pastoreo. La prevención de los ataques al ganado podría lograrse con barreras físicas, incluidos corrales cercados análogos a los mosquiteros, pero los elevados costos limitan la aplicación generalizada. Iluminar los corrales puede reducir los ataques, ya que los murciélagos evitan la luz, pero conllevan un alto costo de energía eléctrica (227), lo que requiere encontrar fuentes de electricidad de bajo costo, como las luces de energía solar. Además, la habituación de los murciélagos a los entornos urbanos iluminados sugiere que los beneficios podrían ser de corta duración y potencialmente contraproducentes para el control de la rabia si los elementos disuasorios promueven la dispersión de los murciélagos (228).

3.3. Mejora de la gestión

La reducción de las mordeduras de murciélago es una de las esferas más difíciles de intervenir con éxito, ya que es poco probable que las poblaciones humanas en situación de riesgo adopten nuevas y costosas barreras o aumenten el uso de las existentes que repercuten negativamente en el bienestar diario. La exposición de los seres humanos dentro de las casas podría reducirse identificando y cambiando los factores que limitan el uso de los mosquiteros e identificando las poblaciones de riesgo en las que las casas a prueba de murciélagos pueden ser rentables. La reducción de las picaduras en el ganado es más difícil, ya que el ganado se mantiene en su mayoría en corrales sin protección (187) y los elementos disuasorios como la luz y el ultrasonido (229) pueden tener beneficios de corta duración o consecuencias no deseadas para la dispersión de los murciélagos. Los nuevos enfoques de la gestión del ganado pueden ofrecer oportunidades. Las pruebas anecdóticas indican que el ganado que se cría en libertad en grandes pastos abiertos es menos atacado por *D. rotundus* que el que se mantiene en corrales (230). Esto sugiere que, cuando sea posible, la modificación de las prácticas agrícolas (por ejemplo, la composición del rebaño o la distribución en el espacio y el tiempo) podría reducir el éxito de la búsqueda de los murciélagos. Sin embargo, el ganado en libertad requiere considerar otros factores, como la necesidad de concentrar el ganado para la vacunación de rutina y una menor protección contra los ataques de carnívoros salvajes (por ejemplo, jaguares o leones de montaña). Aunque es posible que con el tiempo se desarrollen nuevas barreras físicas contra las mordeduras de murciélagos, el sacrificio selectivo o la supresión de la reproducción son actualmente las únicas opciones previsibles para reducir la exposición entre especies.

4. Susceptibilidad de los huéspedes reservorios

4.1. Conocimientos actuales

La rabia tiene la tasa de letalidad más alta de todas las enfermedades infecciosas, que se acerca al 100% en los huéspedes no tratados, pero por razones que aún no están claras, la probabilidad de desarrollar una infección productiva que pueda transmitirse después de la exposición parece

variar según la especie (231). En estudios recientes se ha demostrado la seroconversión en seres humanos aparentemente sanos (224), en el ganado (232) y en la fauna silvestre (233). Una amplia gama de vacunas confiere inmunidad protectora.

4.2. *Prácticas de gestión actuales*

En los seres humanos, se dispone de vacunas de preexposición, pero sólo implican un programa reducido de profilaxis después de las exposiciones. La vacunación previa a la exposición rara vez se proporciona a las comunidades en riesgo porque es costosa y difícil de implementar en áreas remotas donde la circulación del virus de la rabia es más problemática (224,234). La resistencia de la comunidad a la vacunación (por ejemplo, las creencias religiosas locales) es un impedimento aparte (235). Una consecuencia trágica e inaceptable es que las campañas de vacunación reaccionan en gran medida a los informes de mortalidad humana y se basan principalmente en la profilaxis posterior a la exposición de los individuos previamente mordidos. En el caso del ganado, no se practica la vacunación post exposición deliberada, aunque es probable que algunos animales que están incubando la rabia sean vacunados incidentalmente cuando la vacunación se produce en respuesta a un brote (234). Las vacunas preventivas en el ganado son eficaces, pero requieren refuerzos anuales que inflan los costos y reducen el uso. A pesar de ello, los beneficios de la vacunación preventiva del ganado son más de seis veces superiores a los costos asociados a la mortalidad asociada por la enfermedad de la rabia (162,234).

4.3. *Mejora de la gestión*

La investigación socioeconómica y antropológica que identifique y aborde los obstáculos a la vacunación generalizada debería ser una prioridad para la salud humana y animal. La investigación transdisciplinaria desempeña un papel fundamental para pasar de las estrategias de vacunación reactivas a las preventivas. Por ejemplo, en los mapas de riesgo espacio-temporales de la distribución del RABV se podría dar prioridad a las zonas de vacunación preventiva en gran escala de los seres humanos, mientras que las campañas educativas deberían tener por objeto convencer a las poblaciones locales de los beneficios y la seguridad de las vacunas. Deberían realizarse estudios adicionales que caractericen la verdadera carga de la rabia en los seres humanos y el ganado para fundamentar las decisiones sobre la distribución de las vacunas (234,236). Las vacunas también podrían mejorarse reduciendo los costos y asegurando que las vacunas tengan un nivel de protección estándar en todos los fabricantes. Los recientes progresos en la vía de administración (es decir, la intradérmica favorecida sobre la intramuscular) han reducido el volumen y el número de dosis para la profilaxis de la rabia antes y después de la exposición recomendada por la OMS (237). Además, el desarrollo de vacunas que requieren menos dosis y que no requieren una cadena de frío estricta beneficiaría a las comunidades remotas (234). Esto debería seguir los recientes progresos realizados en la vacunación contra la rabia de los perros y el desarrollo de vacunas termoestables de una sola dosis (238).

5. **Conclusiones y medidas futuras**

Ha pasado un siglo desde que la rabia transmitida por *D. rotundus* fue reportada por primera vez en humanos y ganado (129). A pesar de décadas de inversiones en el sacrificio de murciélagos, la vacunación humana y la vacunación animal, los resultados en toda América Latina muestran que el problema está aumentando simultáneamente por lo menos de tres maneras potencialmente interrelacionadas: expansiones geográficas en áreas históricamente libres de rabia, aumento de la incidencia en áreas endémicas y cambios en la ecología del

comportamiento del huésped del reservorio que ponen en riesgo nuevas especies y localidades. Como tal, a pesar de ser la primera descubierta y estar entre las zoonosis transmitidas por murciélagos mejor comprendidas, la rabia causada por el RABV todavía puede considerarse razonablemente como una amenaza emergente para la salud pública. Sostenemos que esta revelación exige una nueva generación de intervenciones que aprovechen los avances de campos que abarcan la ecología, la sociología, la geografía, la biología computacional, la inmunología y la inmunización para potenciar el cambio del control de daños a la prevención. Entre las investigaciones cruciales que deben abordarse ahora figuran los análisis del escenario geográfico de la distribución de los murciélagos, la cuantificación de los efectos a nivel de la población de las vacunas actuales y futuras dirigidas a los murciélagos, así como los estudios de ciencias sociales que determinan las condiciones en que las intervenciones existentes y nuevas serán aceptadas por las poblaciones de alto riesgo. Los avances tecnológicos, incluidas las vacunas y los supresores de la reproducción para los murciélagos y las vacunas mejoradas para el ganado y los seres humanos, están a la vista y podrían ser transformadores. Por último, existen importantes incertidumbres en cuanto a la escala del problema y la eficacia de las intervenciones. Es difícil consolidar los datos de vigilancia, salvo en las escalas espacio-temporales más generales. Es probable que la sub-notificación de la mortalidad esté muy extendida, pero, con pocas excepciones, no está cuantificada. Las medidas de control tradicionales contra el virus de la rabia, como el sacrificio, se han aplicado durante decenios, pero su eficacia rara vez se cuantifica o, si se cuantifica, no se notifica públicamente. Alentamos la integración de equipos de investigación internacionales e interdisciplinarios para abordar estas lagunas y consolidar la información para encontrar patrones emergentes que revelen los éxitos dependientes del contexto de las diferentes estrategias. La colaboración entre investigadores y administradores crearía una retroalimentación mutuamente beneficiosa, en la que los éxitos y las deficiencias de las intervenciones guiarían el desarrollo y la aplicación de la próxima generación de estrategias para controlar y, en última instancia, eliminar la rabia transmitida por *D. rotundus*.

VII. Modelo de nicho ecológico de murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) y de la rabia bovina como herramienta de vigilancia de la rabia silvestre

A. Introducción.

La rabia es una grave infección viral causada por los lisavirus de la familia Rhabdoviridae que provoca una encefalitis universalmente mortal. En América Latina, el murciélago hematófago común (*Desmodus rotundus*) es el reservorio más importante del virus de la rabia. Son relativamente pocos los estudios en que se han investigado los factores ecológicos, ambientales y antropogénicos que afectan a la distribución geográfica de este importante reservorio, lo que podría ser útil para establecer prioridades espaciales en los esfuerzos que se están realizando para la gestión de la población de murciélagos y la vigilancia de la rabia. En este caso, utilizamos la modelización de nichos ecológicos para identificar los factores climáticos, ambientales y antropogénicos asociados a la distribución geográfica del *Desmodus rotundus*. Predecimos la posible distribución adecuada de *Desmodus rotundus* mediante el desarrollo de un Modelo de Máxima Entropía utilizando grandes conjuntos de datos sobre la presencia de murciélagos tanto de los registros de los museos sobre la presencia de murciélagos como de los registros de vigilancia de los brotes de rabia en el ganado, que requieren la presencia de murciélagos hematófagos. Los resultados del Modelo de Máxima Entropía mostraron que la presencia de *D. rotundus* se ve favorecida por los ambientes cálidos, con altitudes entre 450 y 2500 metros, una precipitación media anual de 800 mm y una temperatura media anual de 19

°C. Nuestros resultados pueden ayudar a orientar las estrategias de prevención y control de la rabia al poner de relieve las zonas del Perú con alto riesgo de presencia de murciélagos.

B. Resultados

Las predicciones del programa de modelamiento de nichos ecológicos MaxEnt, superaron sistemáticamente al azar. Aplicando el umbral logístico para la presencia mínima de entrenamiento y para la tasa de omisión de la prueba (0,016), la prueba binomial por defecto fue altamente significativa ($p < 0,001$, una cola) para el modelo de *D. rotundus* (Tabla 1). Teniendo en cuenta el resultado obtenido del área bajo la curva (AUC) sobre el análisis de las características de funcionamiento del receptor (ROC), ambas interpolaciones en las curvas de entrenamiento y prueba se situaron lo más cerca posible, lo que significó lograr un ajuste en el modelo utilizando las variables climáticas; por otra parte, con la interpolación de los datos climáticos junto con las variables ambientales se obtuvieron los valores más altos para los datos de entrenamiento (0,972) y prueba (0,957).

Table 1. Umbral (p-value) y ratios por defecto.

Cumulative threshold	Logistic threshold	Description	Fractional predicted area	Training omission rate	Test omission rate	P-value
1	0.01	Fixed cumulative value 1	0.448	0	0	2.31E-18
5	0.043	Fixed cumulative value 5	0.267	0.005	0.033	1.87E-35
10	0.079	Fixed cumulative value 10	0.178	0.022	0.066	4.23E-54
2.866	0.028	Minimum training presence	0.331	0	0.016	1.23E-27
22.756	0.183	10 percentile training presence	0.072	0.098	0.148	0.00E+00
21.063	0.163	Equal training sensitivity and specificity	0.082	0.082	0.148	0.00E+00
18.151	0.139	Maximum training sensitivity plus specificity	0.1	0.054	0.098	0.00E+00
18.366	0.14	Equal test sensitivity and specificity	0.098	0.06	0.098	0.00E+00
18.417	0.141	Maximum test sensitivity plus specificity	0.098	0.065	0.098	0.00E+00
2.866	0.028	Balance training omission, predicted area and threshold value	0.331	0	0.016	1.23E-27
16.601	0.126	Equate entropy of thresholded and original distributions	0.111	0.049	0.098	0.00E+00

El análisis de Jackknife reveló cinco variables climáticas (temperatura máxima y mínima anual, isotermia, rangos de temperatura anual, precipitación del mes más seco y precipitación del trimestre más cálido y rango de temperatura anual) con la mayor contribución al modelo (tabla 2, figura 2). El intervalo altitudinal, el rango de temperatura media diurna, la precipitación del mes más seco y la densidad del ganado fueron importantes determinantes de la presencia de murciélagos. Nuestro modelo muestra que la presencia de *D. rotundus* en el Perú se asocia con ambientes cálidos, altitudes que van desde los 2500 metros sobre el nivel del mar, una precipitación media anual de 800 mm y una temperatura media anual de 19 °C. Estos valores corresponden a los registros de casos positivos de rabia transmitidos por murciélagos en el Perú.

La precipitación del mes más seco (bio7p) tuvo la mayor ganancia en aislamiento, lo que indica que fue la variable ambiental con mayor información útil en cuanto a la presencia de murciélagos (Figura 2). El modelo de disminución de la densidad animal (en particular de las especies bovinas) es el que más gana cuando se omite, lo que sugiere que es la variable que tiene más información en comparación con las demás variables.

Table 2. Porcentaje de contribución de las variables climáticas en el modelo.

Variable	Description	Percent contribution	Permutation importance
bio2p	Altitude	18	0.1
bio14p	Mean Diurnal Range (Mean of monthly (max temp - min temp))	16.6	23.3
dacp	Isothermality (bio2/bio7) (*100)	12.9	1.3
tmax10p	Temperature Annual Range (bio5-bio6)	8.5	1.5
bio7p	Precipitation of Driest Month	7.7	0.5
bio18p	Precipitation of Driest Quarter	7	0.4
daop	Precipitation of Warmest Quarter	6.3	11.3
bio17p	Animal Density Cattle	3.8	0.3
prec6p	Animal Density Goats	3.1	0.3
prec1p	Animal Density Sheep	2.9	2.7
altp2	Animal Density Porcine	1.7	9.3
dabp	Seasonality of precipitation month 1	1.6	2.1
bio3p	Seasonality of precipitation month 6	1	0.3
dapp	Seasonality of precipitation month 10	0.9	0.4

La figura 3 muestra cómo cada variable ambiental afectó la predicción de MaxEnt. Las variables más importantes según el análisis de Jackknife fueron elegidas para predecir la distribución potencial de la rabia transmitida por los murciélagos hematófagos en el Perú (Figura 4). MaxEnt indicó condiciones favorables para la presencia de murciélagos hematófagos en las regiones de Madre de Dios, Ucayali, Loreto, San Martín, Cajamarca, Amazonas, Junín, Ayacucho, Apurímac y Cusco en el Perú.

Figura 1. Análisis de las características operativas del receptor (ROC) de la precisión del modelo realizado con datos de prueba (AUC = 0.957).

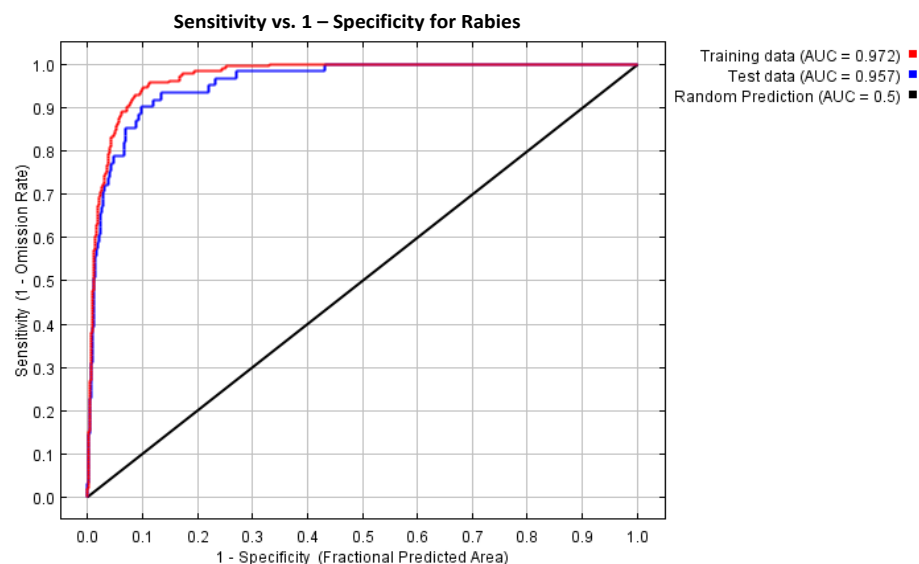
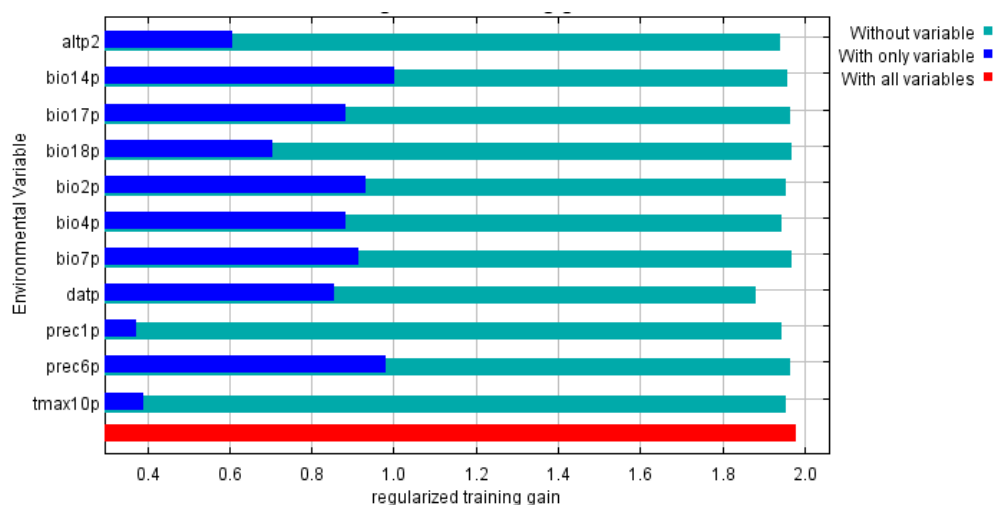


Figure 2. La prueba "Jackknife" de entrenamiento estandarizado para la presencia del murciélago hematófago.



C. Discusión

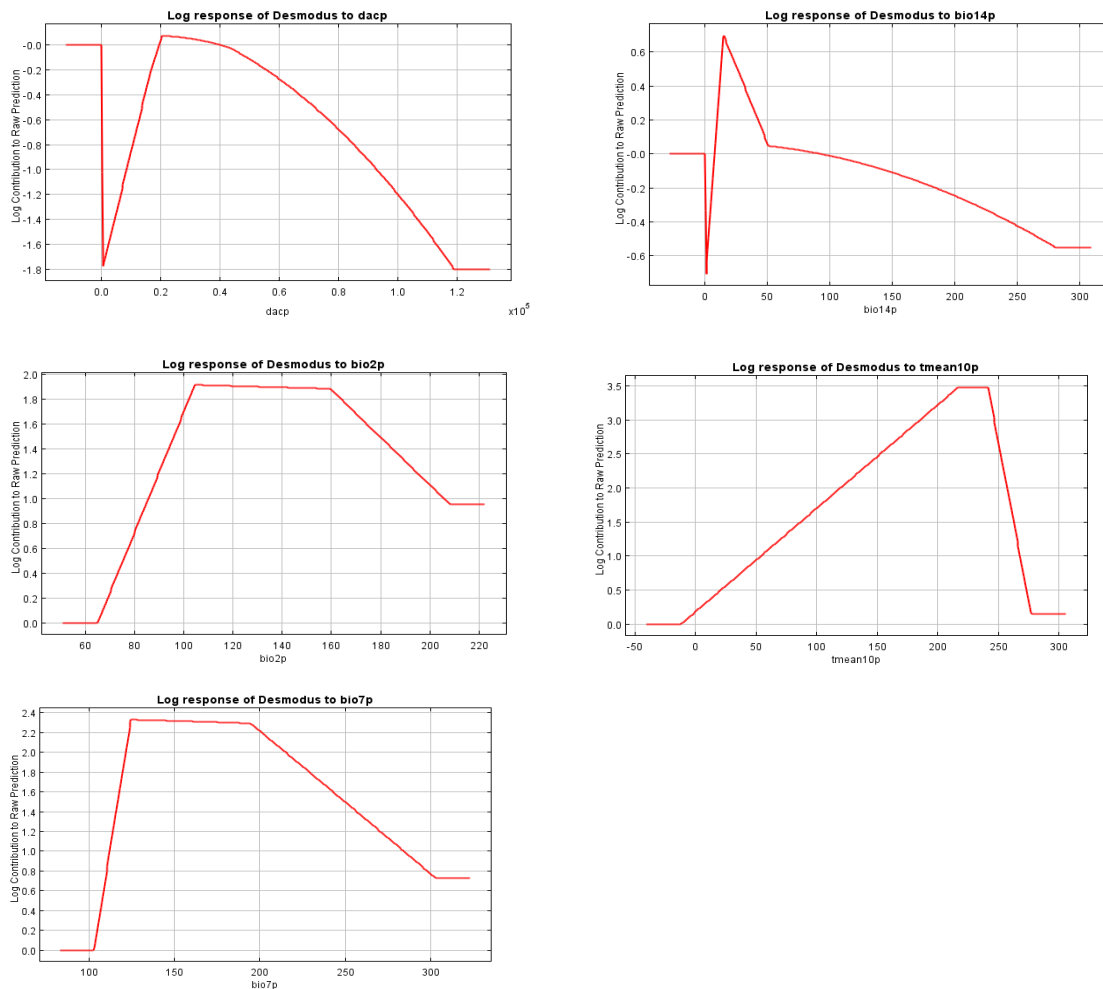
Nuestro mapa de riesgo identificó áreas en Perú que se prevé que sean adecuadas para la presencia de murciélagos hematófagos, y por lo tanto tienen el potencial de transmisión de la rabia de los murciélagos hematófagos al ganado si el virus se propaga a esas poblaciones de murciélagos.

El valor de AUC fue muy cercano a 1 para los datos de prueba (0,957), lo que indica un buen rendimiento general del modelo. De hecho, el modelo MaxEnt predijo con éxito la presencia de murciélagos hematófagos en una amplia zona de la selva tropical y de las montañas andinas donde se han producido casos de rabia bovina. Sin embargo, observamos grandes áreas en los Andes y el Amazonas (Apurímac, Ayacucho, Madre de Dios, Ucayali, San Martín, Cajamarca, Huánuco, Loreto, Amazonas, Pasco, Junín y Cusco) donde se predice y se confirma la presencia de murciélagos hematófagos, pero no se ha informado de brotes de rabia. Aunque los murciélagos hematófagos pueden alimentarse de una amplia variedad de animales silvestres, es posible que cambian de fuente de alimento a raíz de los cambios ambientales(226,239,240), es poco probable que la ausencia de casos de rabia refleje una falta de alimentación del ganado, dado que el ganado es mordido regularmente en estas zonas según (188,222). En cambio, la falta de casos en estas zonas puede reflejar o bien un subregistro de los brotes, una capacidad limitada de los sistemas de vigilancia o una verdadera ausencia de circulación viral durante el período analizado. Esta última explicación se ve favorecida por estudios anteriores que muestran nuevas expansiones del virus de la rabia en poblaciones de murciélagos no infectadas anteriormente en el Perú (128,169). Por lo tanto, la prioridad es identificar actualmente las zonas libres de rabia que corren el mayor riesgo de invasión viral. En nuestro estudio se identificaron las zonas que, según las previsiones, apoyarán a las poblaciones de murciélagos cercanas a los brotes en curso, a las que el servicio veterinario oficial podría dar prioridad para mejorar los esfuerzos de vigilancia de los murciélagos y la vacunación del ganado.

A pesar del alto rendimiento general del modelo, las áreas con registros históricos de *D. rotundus* a lo largo de la costa del Pacífico de Perú y la región norte de Tumbes no se incluyeron en nuestra predicción del modelo (Figura 4). Una posible explicación de esta discrepancia es que los factores ambientales locales que permiten la presencia de *D. rotundus* en las zonas costeras difieren de los que son importantes en los Andes y el Amazonas, que representaron la

gran mayoría de las observaciones en nuestro conjunto de datos. De hecho, *D. rotundus* en la costa del Perú son genéticamente divergentes y tienen hábitos de alimentación diferentes de los de otras partes del país (138,169,188). Se necesitan modelos regionales para evaluar los factores ambientales que permiten la presencia de murciélagos hematófagos en esas zonas y el virus de la rabia podría propagarse eficazmente si se introdujera. Lamentablemente, la escasez de observaciones de la presencia de murciélagos hematófagos en las regiones costeras y la ausencia de casos de rabia en el ganado impide actualmente esos análisis.

Figura 3. Curvas de respuesta. Las gráficas reflejan la idoneidad prevista a lo largo del rango de cada variable seleccionada después de tener en cuenta las dependencias inducidas por las correlaciones entre la variable seleccionada.



Nuestro estudio identificó varias variables ambientales asociadas con la presencia de murciélagos hematófagos, entre ellas la altitud y la media de la franja diurna. Se sabe que los murciélagos son muy sensibles a la temperatura. Los límites latitudinales superiores e inferiores de los murciélagos se dan en el isoterma invernal mínimo de 10°C (241). Este fenómeno se ha explicado por el aumento de los costos energéticos de la termorregulación en los ambientes fríos, donde las comidas de sangre suficientes para mantener la homeostasis serían demasiado grandes para ser transportadas. Los efectos de la altitud que hemos detectado son probablemente similares a los que se producen en los límites de latitud, pero a lo largo del gradiente de elevación de los Andes. La altitud se ha señalado anteriormente como un determinante clave de la presencia de murciélagos hematófagos, aunque la altitud máxima en que se produce el *Desmodus* varía geográficamente (242). En el Perú, se ha informado de

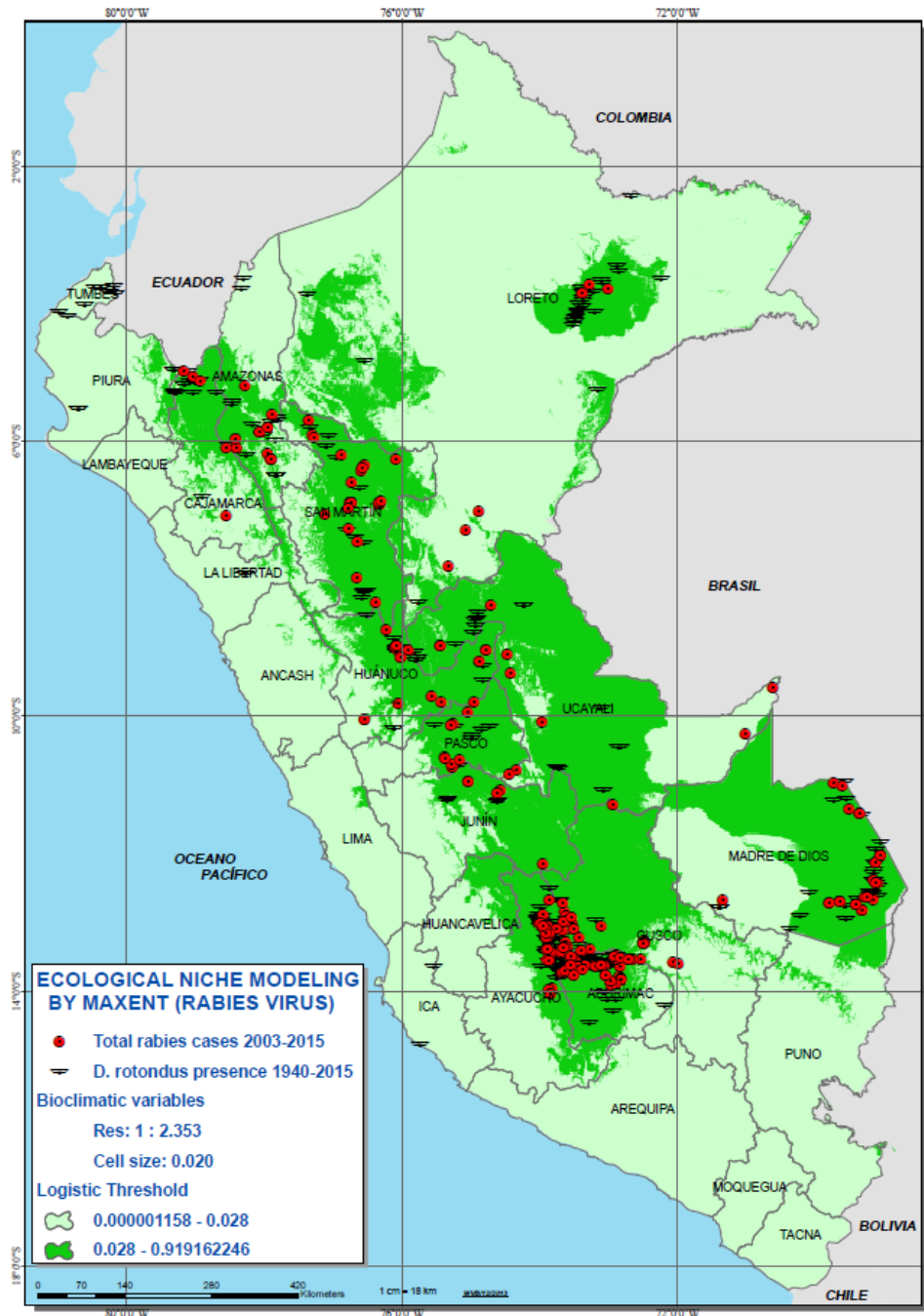
animales domésticos mordido por murciélagos hematófagos a una altura de hasta 3600 metros sobre el nivel del mar (128). El estudio predijo que las elevaciones muy altas y muy bajas tenían bajas probabilidades de que presencias de murciélagos hematófagos. Esto puede reflejar las bajas densidades de murciélagos en las zonas bajas del Amazonas, quizás debido a la falta de cuevas profundas o a la disponibilidad más limitada de alimentos/presas en comparación con las zonas con una cría de ganado más intensiva (243). El efecto de la amplitud térmica diaria en la presencia de murciélagos probablemente refleje la sensibilidad de esta especie a las bajas temperaturas, ya que los altos valores en el Perú reflejan zonas con temperaturas tanto muy cálidas como muy frías, principalmente en los Andes. La ausencia prevista de *Desmodus* a muy bajas temperaturas apoya nuestro hallazgo de que esta especie es rara en las partes más bajas del Amazonas donde la variación de temperatura es menor. Dado que la rabia de los murciélagos requiere metapoblaciones de murciélagos suficientemente conectadas para su persistencia a largo plazo, esta menor abundancia de murciélagos o la presencia de murciélagos más escasamente distribuidos puede tener implicaciones interesantes para el mantenimiento endémico o la previsibilidad de la rabia en estas zonas (135).

En este estudio se utilizó un gran número de puntos georreferenciados de presencia de murciélagos y de casos de rabia bovina para predecir la posible distribución adecuada de los murciélagos hematófagos (SENASA-CENAGRO), sin embargo, se enfrentó a varias limitaciones de datos. Por ejemplo, los datos sobre la presencia de murciélagos no son completos para todo el territorio peruano debido a las complicaciones logísticas del muestreo de murciélagos. Sin embargo, las técnicas de ENM pueden interpolar a partir de la información conocida para llenar los vacíos de distribución de los murciélagos hematófagos y de los casos de rabia. Además, las variables climáticas utilizadas en este modelo tienen algunos inconvenientes en forma de "puntos fríos" que carecen de información y que fueron interpolados (244). En el Perú, la red de estaciones meteorológicas que registran las variables climáticas no está distribuida uniformemente y muchas estaciones no recogen información con regularidad. De hecho, hay algunas zonas que no tienen ninguna estación meteorológica, especialmente en el sur de la región de Loreto, debido a la accesibilidad y a otras razones políticas y de seguridad. Esto se traduce en zonas en las que no es posible determinar la idoneidad ambiental para la distribución de ninguna especie, lo que genera un "punto frío" en los mapas. Otra cuestión que hay que tener en cuenta es que es más probable que se notifiquen brotes de rabia en murciélagos y ganado cerca de asentamientos humanos o a lo largo de carreteras o ríos, lo que puede haber introducido sesgos en la ubicación de los brotes de rabia bovina (234). En particular, esta agregación espacial podría haber inflado las AUC (245). Por último, los resultados de las contribuciones de las variables deben interpretarse con cautela cuando las variables dependientes están correlacionadas, es decir, la presencia de *Desmodus rotundus* y los casos de rabia en animales domésticos.

En resumen, este estudio contribuye a nuestra comprensión de la transmisión de la rabia de los murciélagos hematófagos en el Perú y los determinantes de la distribución de su principal reservorio, el murciélago *Desmodus rotundus*, mediante la identificación de zonas con condiciones bioclimáticas favorables. Nuestra labor pone de relieve la necesidad de comprender mejor los desajustes entre la presencia de murciélagos hematófagos y la aparición de la rabia en el ganado, a fin de predecir las invasiones de rabia y los futuros brotes. Nuestro mapa de riesgos sobre la posible distribución adecuada de los murciélagos hematófagos o la rabia puede ayudar a dirigir la vigilancia y el control a través de zonas de vacunación prioritarias que el servicio veterinario oficial del Perú podría aplicar en el futuro. En particular, insistimos en la necesidad de dirigirnos a las zonas del Perú con alto riesgo de presencia de murciélagos, pero en las que no se han registrado brotes de rabia. Los estudios futuros podrían abordar la forma en que los cambios en las variables climáticas y la densidad de ganado que

afectan a la distribución de los murciélagos modificarán el riesgo futuro de rabia de los murciélagos hematófagos.

Figura 4. Área geográfica máxima prevista para la transmisión de la rabia de los murciélagos hematófagos a los animales domésticos en el Perú. El mapa muestra las áreas con condiciones ambientales adecuadas para la presencia de *D. rotundus*, lo que podría facilitar la transmisión de la rabia al ganado cuando el virus está presente. Las zonas de color verde oscuro muestran las áreas con presencia prevista de murciélagos hematófagos, mientras que las zonas de color verde claro indican una ausencia prevista de murciélagos hematófagos y, por lo tanto, la ausencia de transmisión de la rabia al ganado. Los puntos rojos muestran los brotes de rabia registrados (2003-2015) y las siluetas negras de los murciélagos indican los registros históricos de la presencia de *D. rotundus*.



8. CONCLUSIONES

En el Perú la rabia es endémica con presentación de dos ciclos enzoóticos claramente definidos, un ciclo urbano transmitido por perros (en proceso de erradicación), y un ciclo selvático gestionado por murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) en áreas de selva y valles interandinos. Una mejor comprensión de las relaciones entre los factores ecológicos y humanos con las enfermedades zoonóticas es vital para identificar el riesgo espacial de las poblaciones humanas y animales.

Los primeros estudios sobre la epizootiología de la rabia en poblaciones de *D. rotundus* describieron la infección como una ola de migración – la persistencia del virus dependió del movimiento entre poblaciones con individuos susceptibles (3–5). Por eso, la mayoría de las poblaciones estaban libres de infección en cualquier momento. Sin embargo, observaciones de años recientes introducen la posibilidad de un cambio fundamental en la epizootiología de la rabia. En zonas con mucho ganado casos de rabia en bovinos sobre todo ocurren cada año y parece que la rabia es endémica, no epizootica en estos lugares.

Sabemos por la teoría de la epidemiología de enfermedades humanas, que los brotes tienen una menor probabilidad de terminar en poblaciones grandes, un fenómeno denominado “tamaño crítico de la comunidad” (6,7). Por lo tanto, las poblaciones más grandes pueden soportar persistencia endémica o permanente, pero las poblaciones pequeñas no apoyan a la existencia de una persistencia permanente y tienen brotes esporádicos o con una frecuencia regular (7). En el sistema de la rabia silvestre en el Perú, se sabe que poblaciones de *D. rotundus* son más grandes en zonas de alta densidad de población animal que en zonas naturales del (8). Una hipótesis es que la rabia tiene persistencia enzoótica en poblaciones grandes de murciélagos asociados con grandes poblaciones de ganado, pero persistencia epizootica en zonas con poco ganado.

Como consecuencia de la transición epidemiológica de la rabia humana (es decir, el cambio del transmisor principal de la enfermedad de los perros a los murciélagos hematófagos) y de los programas de vigilancia de la rabia, se han detectado variantes nuevas o criptógamas de RABV en carnívoros y murciélagos silvestres. Desde una perspectiva evolutiva, el RABV ha irradiado exitosamente en diferentes murciélagos y especies carnívoras. Por lo tanto, aún se necesitan llevar a cabo reconstrucciones contemporáneas e históricas de la epizootiología de la rabia en la fauna silvestre para comprender mejor los mecanismos potenciales que impulsan el surgimiento de la enfermedad y su establecimiento en nuevas poblaciones.

Epidemiología de la rabia en relación a los murciélagos hematófagos.

La serología realizada a 1436 muestras de murciélagos hematófagos, demostró la circulación de RABV de todas las regiones de estudio. La seroprevalencia varió de 3 a 28 por ciento y fue mayor en murciélagos juveniles y sub-adultos, la exposición RABV es independiente del tamaño de colonia de murciélagos, en consonancia con la ausencia de umbrales de densidad de población para la invasión viral y la extinción. El sacrificio de las campañas implementadas por el estado peruano, no ha logrado reducir la seroprevalencia y fueron quizás contraproducente para el control de la rabia debido a la eliminación selectiva de los adultos, siendo de mayor importancia el control en los murciélagos juveniles y sub-adultos por su potencial capacidad de transmisión de la rabia. Estos hallazgos proporcionan nuevos conocimientos sobre los mecanismos de mantenimiento de RABV en los murciélagos

hematófagos y ponen de relieve la necesidad de utilizar enfoques ecológicamente detallados para la prevención de la rabia en Perú y en América Latina.

La evaluación del efecto de sacrificio de los murciélagos mostró que la seroprevalencia de RABV fue mayor en las colonias de murciélagos que fueron sometidos a un sacrificio periódico y regular, en comparación con aquellos que nunca fueron sacrificados. Sin embargo, la seroprevalencia en colonias sacrificadas regularmente no fue estadísticamente diferente de la de las colonias no perturbadas o sacrificadas periódicamente. En cada uno de los análisis realizados, la edad y la selección conservaron el apoyo estadístico. Sin embargo, en el análisis que utiliza únicamente cuevas con *D. rotundus*, las hembras tuvieron una seroprevalencia significativamente mayor que los machos.

En Perú, el sacrificio de los murciélagos hematófagos es una herramienta central de control utilizado para prevenir la rabia en los seres humanos y animales domésticos. El supuesto básico que subyace al sacrificio para reducir las enfermedades de la fauna silvestre, es que la reducción del tamaño de la población reservorio disminuye la transmisión de la rabia. Pusimos a prueba esta hipótesis estudiando la exposición de RABV en 20 colonias de murciélagos hematófagos en Perú que mostraron una variación natural en el tamaño de la población, y en colonias con y sin historial de sacrificio. Nuestros resultados demostraron que la exposición al RABV era ubicua en las poblaciones de murciélagos hematófagos geográficamente extendidas, estaba en el mejor de los casos sólo débilmente relacionada con el tamaño de la colonia de murciélagos, y tendía a aumentar después de la eliminación esporádica. El predictor más poderoso de los anticuerpos del RABV fue la clase de edad del reservorio, con mayor seropositividad en murciélagos juveniles y sub-adultos en relación con los adultos. Es poco probable que esta pauta refleje los anticuerpos derivados de la maternidad porque la seroprevalencia media fue mayor en los juveniles que en las hembras adultos y no disminuyó durante el primer año de vida. Las elevadas tasas de rabia en murciélagos jóvenes y sub-adultos también podrían ayudar a explicar la asociación positiva entre el sacrificio periódico y la seroprevalencia. Concretamente, dado que es probable que los jóvenes tengan menos probabilidades de acicalar a los adultos que los adultos de acicalarse a sí mismos o a los jóvenes, el vampiricida podría matar preferentemente a los adultos. Dado que los adultos tienen una menor seroprevalencia, pero tal vez una mayor inmunidad debido a exposiciones repetidas, esta eliminación selectiva podría aumentar la seroprevalencia a nivel de la población. Los mecanismos demográficos que actúan en escalas de tiempo más largas, como la recolonización de las colonias eliminadas de las poblaciones vecinas (el "efecto vacío") o el aumento de la supervivencia de los jóvenes tras una liberación repentina de las limitaciones dependientes de la densidad, podrían aumentar aún más la transmisión al aumentar la población susceptible de murciélagos. Independientemente de que el sacrificio aumentará la transmisión del RABV, aumentará numéricamente la seroprevalencia al eliminar desproporcionadamente a los adultos o se produzca una respuesta a brotes de rabia transmitida por murciélagos en animales domésticos, es evidente que el sacrificio de murciélagos hematófagos no ha logrado eliminar la circulación del RABV en el Perú. Es posible que la eliminación no se haya llevado a cabo a una escala suficiente como para afectar al tamaño general de las colonias de murciélagos. De hecho, las colonias de sacrificio regular no eran significativamente más pequeñas que las colonias no perturbadas, y la perturbación reducía el tamaño de las colonias sólo cuando implicaba perturbaciones importantes de las cuevas. El sacrificio subóptimo podría ser suficiente para cambiar la estructura de edad de las colonias de murciélagos sin tener efectos dramáticos en el tamaño total de la colonia (es decir, los adultos sacrificados son reemplazados por una mayor supervivencia juvenil y sub-adulta). Si bien esto podría tener la desafortunada consecuencia de aumentar la transmisión del RABV a niveles bajos de sacrificio, deja abierta la posibilidad de

que un sacrificio más intenso o campañas coordinadas dentro y entre las regiones puedan eliminar el RABV. Una segunda explicación del fracaso de la eliminación para reducir la seroprevalencia del RABV es la falta de una fuerte relación entre la densidad de murciélagos y la transmisión del RABV. Así pues, las tasas de contacto entre murciélagos susceptibles e infectados podrían ser independientes del tamaño de la colonia, de modo que la fuerza de infección per cápita depende más de la prevalencia de la infección que de la densidad de población general (es decir, la transmisión es dependiente de la frecuencia). Los estudios sobre la incidencia de la rabia en animales domésticos sugieren que la rabia transmitida por murciélagos hematófagos se mantiene como una epizootia de migración lenta, en la que el virus se propaga de una colonia a otra y no puede volver a invadir hasta que se recupere algún número umbral de murciélagos susceptibles. La variación espacial de la dinámica de transmisión, el aparente conflicto entre las hipótesis de una epizootia migratoria y el mantenimiento regional enzoótico podría explicarse también por la existencia de dos fases epizooticas fundamentalmente diferentes. Los programas de control de la rabia se beneficiarían de la consideración de estos escenarios alternativos porque el mantenimiento enzoótico local implica que la transmisión entre especies se producirá de forma esporádica, lo que hace que sea mucho menos predecible en el escenario de una lenta propagación viral a través de un escenario geográfico específico. La ausencia de umbrales de población para la invasión y el mantenimiento de del RABV es coherente con la ineficacia observada del sacrificio para eliminar la circulación viral en los murciélagos y la transmisión a los seres humanos y los animales domésticos. Es evidente que la eliminación selectiva de murciélagos hematófagos bien gestionada beneficia a la agricultura al aliviar las mordeduras de murciélagos en animales domésticos y posiblemente al reducir el número total de murciélagos infectados. Sin embargo, el aparente efecto positivo del sacrificio en la seroprevalencia, junto con las respuestas demográficas y de comportamiento que podrían aumentar la proporción de murciélagos susceptibles, podría tener consecuencias contraproducentes para la transmisión del RABV.

Epidemiología molecular de la rabia

Nuestros estudios moleculares de la rabia han construido un árbol filogenético de máxima probabilidad (ML) el cual reveló tres linajes virales en el Perú, cada uno de los cuales compartía un antepasado común más reciente (ACMR) con virus de otros países sudamericanos, lo que concuerda con las múltiples introducciones independientes del RABV en los murciélagos peruanos. Los virus atípicos identificados eran parafilicos entre sí (lo que indica introducciones distintas) y se encontraron en especies raramente infectadas (canino y equino), lo que sugiere translocaciones de animales de compañía mediadas por el hombre, en lugar de infecciones adquiridas de murciélagos autóctonos en la localidad de muestreo.

Combinando grandes conjuntos de datos genéticos de virus y reservorios, mostramos que la filopatía femenina y la dispersión de los machos en los murciélagos hematófagos probablemente crea un papel desproporcionado para los murciélagos machos en la propagación espacial del RABV. Usando estos conocimientos sobre la dispersión del reservorio y del virus, pronosticamos las rutas y tasas de una invasión viral en curso que predecimos que causará una histórica y dañina primera invasión del RABV en la costa del Pacífico de Sudamérica. Independiente los datos epidemiológicos apoyan nuestras predicciones genéticas.

La reducción de la estructura de la población de reservorios en el núcleo en relación con los marcadores mitocondriales y la deficiencia de heterocigotos en los machos son coherentes con la dispersión masculina y la filopatía femenina en los murciélagos hematófagos, como se conoce en los estudios de campo y es la expectativa general para los mamíferos (125,130). Sugerimos que un subproducto de la dispersión basada en el sexo es que la dispersión espacial y la distribución geográfica del RABV también será impulsada por los machos. Además, los

signos clínicos debilitantes de la rabia (ataxia, letargo y muerte) durante la mayor parte del período infeccioso hacen poco probable que la infección pueda inducir una dispersión a distancia inusualmente larga en las hembras infectadas, propagando así el RABV sin dejar una firma de ADN mitocondrial de dispersión a través de la reproducción. Por lo tanto, el sexo que más se dispersa durante la incubación de la rabia (los machos) dominará naturalmente la propagación viral, y las barreras a la dispersión de los machos delimitarán los límites de las distribuciones virales, como hemos observado. La estacionalidad en el área geográfica infectada por el RABV también fue consistente con la dispersión espacial masculina. Este estudio muestra que el contraste de los marcadores genéticos del reservorio y del patógeno con diferentes modos de herencia proporciona un marco para comenzar a evaluar la dispersión de los patógenos en función del sexo. La identificación del sexo responsable de la propagación del patógeno tiene implicaciones prácticas para la prevención y el control del RABV porque se predice que el bloqueo del movimiento viral entre las colonias causa la extirpación viral (135). En la labor futura se deberían cuantificar las escalas en que los machos y las hembras contribuyen a la propagación viral intercolonia para evaluar la eficacia de la selección de los machos dispersos en las campañas de control de la rabia. También demostramos que la combinación de la genética de la población huésped, la filogeografía de los patógenos y la ecología del medio geográfico puede predecir tasas y rutas de invasión de patógenos a zonas libres de enfermedades. Un enfoque similar podría ser útil para pronosticar otras invasiones de patógenos emergentes en las que la falta de datos de infección a largo plazo impide análisis epidemiológicos tradicionales. En comparaciones anteriores de los datos genéticos del huésped y del patógeno se han explotado los patógenos como un marcador de alta resolución de la demografía y la dispersión del huésped o se ha estudiado la dinámica coevolutiva en escalas temporales más largas. Nuestro estudio muestra que datos similares pueden verificar los principales grupos demográficos de los huéspedes en cuanto a la propagación espacial de los patógenos y pronosticar invasiones epidémicas en zonas libres de enfermedades. A medida que aumenten la abundancia y la resolución de los datos genómicos del huésped y del patógeno, enfoques similares podrían poner a prueba la generalidad de la dispersión de los patógenos en función del sexo, al tiempo que proporcionarían importantes previsiones sobre la dinámica de la geografía de las invasiones de patógenos emergentes.

Epidemiología de la rabia y su dispersión a través de murciélagos hematófagos

Utilizando un conjunto de datos espacio-temporales de alta resolución de los brotes de rabia, ilustramos el poder de combinar los datos de los animales centinelas de los sistemas nacionales de vigilancia con modelos estadísticos para predecir el tiempo y el lugar de futuras transmisiones entre especies de virus transmitidos por murciélagos. En el Perú, en las zonas donde se producen la mayoría de los brotes, la expansión forma múltiples olas independientes de infección que se desplazan a ritmos y trayectorias constantes hacia las comunidades donde documentamos altas tasas de contacto entre murciélagos y animales domésticos no vacunados y un escaso conocimiento de la rabia por parte de los productores. Las invasiones generalizadas en nuevas zonas y el aumento de la carga para la salud humana y animal revelan que el RABV es una zoonosis emergente más que una zoonosis enzoótica y obligan a adoptar nuevas estrategias para el control de la rabia. La detección sistemática de la rabia por mes en un distrito no infectado anteriormente durante los últimos 12 años, es una señal alarmante de la creciente amenaza para la salud humana y animal que representa la rabia. Los desencadenantes de estas expansiones son inciertos, pero están ocurriendo en todo el país en zonas de transición entre el Amazonas y los Andes y en los valles interandinos (cejas de selva). Una posibilidad es que el incremento de la crianza de animales domésticos podría haber aumentado el tamaño o la conectividad de las poblaciones de murciélagos hematófagos, facilitando de esta manera la

introducción viral. es importante destacar que las expansiones ocurrieron en áreas muy por debajo de la máxima elevación del RABV en otras partes del Perú (3600 m.s.n.m), y la elevación de los brotes no aumentó en las regiones de alta elevación donde el RABV fue enzoótico a lo largo de la serie de tiempo (i.e. Apurímac y Ayacucho). Por lo tanto, sostenemos que la aparición del RABV en esas regiones no se debe a cambios impulsados por el clima en la distribución de los murciélagos hematófagos, sino a un proceso epidemiológico de invasión viral prolongada de un virus relativamente nuevo en las poblaciones de murciélagos hematófagos, hipótesis que está respaldada por las estimaciones de los relojes moleculares del antepasado común más reciente de la rabia de los murciélagos hematófagos. Para apoyar aún más la hipótesis de la invasión lenta, las ondas de expansión viral en los dos valles focales de las regiones de Apurímac, Ayacucho y Cusco, se iniciaron sólo en los últimos años a pesar de las pruebas moleculares de que el RABV estaba presente en las partes noroccidentales de la región desde principios de los años setenta y la evidencia de nuestro estudio es que los murciélagos hematófagos ya están presentes en cada valle considerados como libres o sin presencia del RABV. Diferentes patrones de movimientos de murciélagos entre colonias en cada valle impulsados por diferencias subyacentes en la distribución de colonias de murciélagos podrían influir en la velocidad de las ondas expansivas. Sin embargo, los valles tenían distribuciones similares de granjas e intensidades de mordeduras, lo que sugiere que es poco probable que la dispersión de larga distancia del RABV sea un factor limitante en cualquiera de los valles. Las alteraciones antropogénicas, particularmente la intensidad de los sacrificios de murciélagos, también podrían influir concebiblemente en la propagación viral. Por un lado, los sacrificios podrían reducir la probabilidad de dispersión por un murciélago infectado al reducir la prevalencia de infecciones o la dispersión de la competencia. Por otro lado, la dispersión por parte de los sobrevivientes de sacrificios podría facilitar la invasión viral en zonas no infectadas.

Este estudio demuestra el poder de los sistemas de vigilancia de la salud animal para generar información de alta resolución sobre la dinámica espacio temporal de los virus zoonóticos que probablemente sería imposible detectar la confianza en estudios dentro de un reservorio de vida silvestre. Las ondas de expansión que detectamos en Perú informan directamente la gestión de la dispersión viral de los murciélagos proporcionando recomendaciones sobre dónde y cuándo se debe vacunar el ganado y el desarrollo de las campañas educativas, al tiempo que se crea una oportunidad única para rastrear intervenciones experimentales en las poblaciones de murciélagos para bloquear los brotes epizooticos de avance replicados espacialmente.

Sistemas de vigilancia oficial de la rabia y su impacto en poblaciones humanas y de animales

En nuestros estudios llevados a cabo sobre la carga de la enfermedad de la rabia, observamos que la corrección de la sub-notificación espacialmente heterogénea reveló áreas geográficas que tenían una carga de rabia desproporcionadamente más alta que la implícita en los registros oficiales.

Esta conclusión pone de relieve la posibilidad de que los recursos destinados a la prevención y el control se dirijan a las zonas que tienen una elevada tasa de notificación, pero no necesariamente la mayor carga, lo que podría amplificar disparidades en la carga del RABV. Además, dado que el RABV persiste en los murciélagos a través de la dinámica espacial, las zonas de alta carga y baja notificación descuidadas podrían crear puntos de transmisión que faciliten persistencia viral a largo plazo. Nuestros resultados apoyan los hallazgos de estudios previos de que la vacunación del ganado es la intervención más efectiva para reducir la carga del RABV. En nuestro estudio, la cobertura de la vacunación contra la rabia fue alta (83%) en distritos con brotes confirmados, pero casi inexistente (es decir, el 2% de los productores) en

distritos vecinos, supuestamente libres de rabia. Esto demuestra que la vacunación se produce de forma reactiva a los brotes de rabia y proporciona un mecanismo (tasas de vacunación más bajas y reducción de la inmunidad del rebaño) por el cual los brotes en las zonas recientemente invadidas podrían ser mayores que en las zonas históricamente endémicas. Dentro de las zonas endémicas de rabia, la distancia a la oficina de notificación del SENASA no se correlacionó con la vacunación, lo que sugiere que la presencia de rabia supera los desafíos logísticos para adquirir las vacunas. Dado el alto costo de esta vacuna para los agricultores (alrededor de 1,2 dólares por dosis), fue sorprendente que los factores socioeconómicos no estuvieran relacionados con la vacunación, lo que sugiere que la percepción del riesgo de rabia es más importante que la asequibilidad para impulsar la adopción de la vacuna para el RABV. Nuestros resultados sugieren además que el aumento de la percepción de riesgo de las comunidades que están lejos de las oficinas de notificación podría aumentar la notificación y reducir las pérdidas de ganado al fomentar la vacunación preventiva en las zonas de alto riesgo. Esto podría lograrse mediante el desarrollo de campañas de sensibilización utilizando herramientas relativamente baratas como las radios comunitarias. En términos más generales, esta labor pone de relieve cómo la variación en la notificación de enfermedades puede influir en las estimaciones de la carga de morbilidad, lo que será importante tener en cuenta al extrapolar estimaciones de la carga de los estudios de base comunitaria en escalas espaciales mayores.

Futuros controles de la rabia a través de inmunizaciones en murciélagos

Nuestros estudios proporcionan una prueba de principio de que a niveles de despliegue operacionalmente alcanzables y tasas cuantificadas empíricamente de propagación de murciélago a murciélago, las vacunas orotópicas deberían reducir la transmisión de la rabia de manera más eficaz que la eliminación selectiva (la política actual empleada en toda América Latina). Dado que la persistencia de la rabia requiere la propagación entre colonias para la dispersión viral, incluso las reducciones modestas del tamaño del brote probablemente tengan repercusiones epidemiológicas importantes en las escalas geográficas más amplias en las que se llevan a cabo las campañas de control de la enfermedad. En particular, al reducir el número de murciélagos infectados y la probabilidad de invasión viral, la vacunación de un número limitado de colonias beneficiaría desproporcionadamente la eliminación regional de la rabia al favorecer las extinciones virales estocásticas. Dado que la dispersión de los machos propaga la rabia entre las colonias, la vacunación podría beneficiarse aún más si se dirigiera a los murciélagos machos. Aunque se esperaba que las tasas más elevadas de aseo social entre las hembras socavarán esta estrategia, encontramos que los machos tienen iguales o mayores tasas de contacto inter e intra-sexo, una posible consecuencia de los intentos de apareamiento con las hembras o de las peleas entre los machos. Es importante, porque el autocrecimiento es común, cualquier vacuna transferida a través de estas interacciones sería finalmente ingerida. El diseño de campañas a gran escala para desplegar vacunas contra la rabia que se puedan propagar requiere una investigación adicional en varias áreas. En primer lugar, para optimizar el número de dosis de vacunas que se deben aplicar a cada murciélago, los estudios de campo y en cautiverio deben cuantificar la heterogeneidad individual en las tasas de transferencia utilizando vacunas reales además de biomarcadores. En segundo lugar, los costos de la vacunación deben estimarse en términos económicos, además de la evaluación epidemiológica que aquí se ofrece. Lamentablemente, en la actualidad las vacunas se producen sólo para la investigación, y no se dispone de los costos de la producción en gran escala. En tercer lugar, la vacunación de murciélagos hematófagos sin reducción de la población será inaceptable para

algunos interesados, ya que la depredación incontrolada de los murciélagos mantiene la exposición a patógenos no relacionados con la rabia, y la anemia por mordeduras puede reducir la productividad del ganado independientemente de la rabia. Dado que el sacrificio desplaza las poblaciones de murciélagos hacia individuos más jóvenes y más susceptibles a la rabia, lo que podría aumentar la transmisión de la rabia, las investigaciones futuras deberían desarrollar herramientas para la supresión reproductiva como alternativa al sacrificio. Por último, el mantenimiento de la metapoblación de la rabia ofrece oportunidades para una vacunación más eficiente y con información epidemiológica.

Futuros modelos predictivos de la rabia

Uno de los Sistemas de Información Geográfica es **Maxent**. Mediante este programa hemos analizado estadísticamente diversas variables territoriales (pendiente, temperatura, vegetación, altitud, humedad), junto a la distribución inicial de la del *D. rotundus*. Como resultado hemos obtenido un conjunto de gráficas, tablas y mapas que nos advierten de la distribución potencial de esta especie animal en las zonas ecológica y climáticamente favorables.

Nuestros estudios contribuyen a una mejor comprensión de la transmisión de la rabia de los murciélagos hematófagos en el Perú y los determinantes de la distribución espacio-temporal de su principal reservorio, el murciélago *Desmodus rotundus*, mediante la identificación de zonas con condiciones bioclimáticas favorables. Nuestra labor pone de relieve la necesidad de comprender mejor los desajustes entre la presencia de murciélagos hematófagos y la aparición de la rabia en el ganado, a fin de predecir las invasiones de rabia y los futuros brotes. Nuestro mapa de riesgos sobre la posible distribución adecuada de los murciélagos o la rabia puede ayudar a dirigir la vigilancia y el control a través de zonas de vacunación prioritarias que el servicio veterinario oficial del Perú podría aplicar en el futuro. En particular, insistimos en la necesidad de dirigirnos a las zonas del Perú con alto riesgo de presencia de murciélagos, pero en las que no se han registrado brotes de rabia. Los estudios futuros podrían abordar la forma en que los cambios en las variables climáticas y la densidad de ganado que afectan a la distribución de los murciélagos modificarán el riesgo futuro de rabia de los murciélagos hematófagos.

9. BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. WHO Expert Consultation on Rabies. Second report. World Health Organ Tech Rep Ser. 2013;
2. K. F. Koopman, A. M. Greenhall RKS. Natural History of Vampire Bats. 1°. CRC Press I, editor. Boca Raton, Florida: 9781351074919; 1988. 7–17 p.
3. Lord RD. Seasonal Reproduction of Vampire Bats and Its Relation to Seasonality of Bovine Rabies. *J Wildl Dis.* 2013;
4. Lord RD, Fuenzalida E, Delpietro H, Larghi OP, de Diaz AM, Lazaro L. Observations on the epizootiology of vampire bat rabies. *Bull Pan Am Heal Organ.* 1975;
5. Delpietro HA, Russo RG. Ecological and epidemiological aspects of attacks by vampire bats in relation to paralytic rabies in Argentina, and an analysis of proposals for control. *Rev Sci Tech - Off Int des Epizooties.* 1996;
6. Bartlett MS. Measles Periodicity and Community Size. *J R Stat Soc Ser A.* 2006;
7. Grenfell BT, Bolker BM. Cities and villages: Infection hierarchies in a measles metapopulation. *Ecol Lett.* 1998;
8. Delpietro HA, Marchevsky N, Simonetti E. Relative population densities and predation of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) in natural and cattle-raising areas in north-east Argentina. *Prev Vet Med.* 1992;
9. Walsh PD, Biek R, Real LA. Wave-like spread of Ebola Zaire. *PLoS Biol.* 2005;
10. Biek R, Henderson JC, Waller LA, Rupprecht CE, Real LA. A high-resolution genetic signature of demographic and spatial expansion in epizootic rabies virus. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;
11. OIE. Terrestrial Code. 27th ed. France; 2018. 246 p.
12. OIE. Rabies Portal [Internet]. Francia; 2019. Available from: www.oie.int
13. Wilkinson L. Understanding the Nature of Rabies: An Historical Perspective. Kluwer Ac. Publ. Boston. Boston MA: Springer, Boston, MA; 1988. 1–10 p.
14. Baer GM. The natural history of rabies. 2da ed. Press C, editor. The Natural History of Rabies, 2nd Edition. New York; 2018. 370 p.
15. Rupprecht CE, Kieny M-P. Development of a Vaccinia-Rabies Glycoprotein Recombinant Virus Vaccine. In 2011.
16. Fenner F, Maurin J. The classification and nomenclature of viruses - Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Madrid, September 1975. *Arch Virol.* 1976;
17. Ramirez V. Los mecanismos de exposición e infección rábica en el ciclo silvestre. In 1987.
18. Vargas C, Cárdenas J. Epidemiología de la rabia: Situación actual en México. In 1996.
19. Hernández B. La rabia parestante bovina: definición del problema y metodología de control en Ciencia Veterinaria. México; 1976. 104–131 p.
20. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. *Virus Taxonomy.* 2012.
21. Hunt Richard. Microbiology and Immunology. University of South Carolina School of Medicine, editor. South Carolina : University of South Carolina School of Medicine; 2016.
22. Rose JK, Doolittle RF, Anilionis A, Curtis PJ, Wunner WH. Homology between the glycoproteins of vesicular stomatitis virus and rabies virus. *J Virol.* 1982;
23. Wagner RR, Prevec L, Brown F, Summers DF, Sokol F, MacLeod R. Classification of rhabdovirus proteins: a proposal. *J Virol.* 1972;
24. Barge a, Gaudin Y, Coulon P, Ruigrok RW. Vesicular stomatitis virus M protein may be inside the ribonucleocapsid coil. *J Virol.* 1993;

25. Tordo N, Pocht O, Ermine A, Keith G, Rougeont F. Walking along the rabies genome: Is the large G-L intergenic region a remnant gene? (nucleotide sequence/rabies proteins/transcription signals/unsegmented negative-strand RNA viruses). *Genetics*. 1986;
26. Smith JS, Orciari LA, Yager PA, David Seidel H, Warner CK. Epidemiologic and Historical Relationships among 87 Rabies Virus Isolates as Determined by Limited Sequence Analysis. *J Infect Dis*. 1992;
27. Sacramento D, Bourhy H, Tordo N. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Mol Cell Probes*. 1991;
28. Sacramento D, Badrane TH, Bourhy H, Tordo N. Molecular epidemiology of rabies virus in France: Comparison with vaccine strains. *J Gen Virol*. 1992;
29. Bourhy H, Kissi B, Tordo N. Molecular diversity of the lyssavirus genus. *Virology*. 1993;
30. Morimoto K, Ohkubo A, Kawai A. Structure and transcription of the glycoprotein gene of attenuated HEP-Flury strain of rabies virus. *Virology*. 1989;
31. Blondel D, Ruigrok R, Chelbi-Alix M, Tordo N. La protéine P du virus rabique: Une protéine multifonctionnelle à l'interface entre le virus et son hôte. *Virologie*. 2005.
32. Baratawidjaja RK, Morrissey LP, Labzoffsky NA. Demonstration of vaccinia, lymphocytic choriomeningitis and rabies viruses in the leucocytes of experimentally infected animals. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1965;
33. Wiktor TJ, Koprowski H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;
34. Montaña-Hirose JA, Lafage M, Weber P, Badrane H, Tordo N, Lafon M. Protective activity of a murine monoclonal antibody against European bat lyssavirus 1 (EBL1) infection in mice. *Vaccine*. 1993;
35. Wunner WH, Reagan KJ, Koprowski H. Characterization of saturable binding sites for rabies virus. *J Virol*. 1984;
36. Superti F, Hauttecoeur B, Morelec MJ, Goldoni P, Bizzini B, Tsiang H. Involvement of gangliosides in rabies virus infection. *J Gen Virol*. 1986;
37. Whitt MA, Buonocor L, Prehaud C, Rose JK. Membrane fusion activity, oligomerization, and assembly of the rabies virus glycoprotein. *Virology*. 1991;
38. Dietzschold B, Wunner WH, Wiktor TJ, Lopes AD, Lafon M, Smith CL, et al. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;
39. Hernández Baumgarten E. EL VIRUS RABICO: MORFOLOGÍA, MORFOGÉNESIS y CRECIMIENTO EN CULTIVOS CELULARES. *Cienc Vet*. 1978;
40. Baltimore D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev*. 1971;
41. Mizutani S, Temin HM. An RNA-Dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2012;
42. Jackson AC. Rabies pathogenesis update. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2010;
43. Schneider MC, Romijn PC, Uieda W, Tamayo H, Silva DF da, Belotto A, et al. Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America? *Rev Panam Salud Pública*. 2009;25(3).
44. Diamond L. Two spontaneously transformed cell lines derived from the same hamster embryo culture. *Int J Cancer*. 1967;
45. Schnell MJ, McGettigan JP, Wirblich C, Papaneri A. The cell biology of rabies virus: Using stealth to reach the brain. *Nature Reviews Microbiology*. 2010.
46. Yang DK, Park YN, Hong GS, Kang HK, Oh YI, Cho SD, et al. Molecular characterization of Korean rabies virus isolates. *J Vet Sci*. 2011;
47. Kuzmin I V., Shi M, Orciari LA, Yager PA, Velasco-Villa A, Kuzmina NA, et al.

- Molecular inferences suggest multiple host shifts of rabies viruses from bats to mesocarnivores in Arizona during 2001-2009. *PLoS Pathog.* 2012;
48. Zhang YZ, Xiong CL, Lin XD, Zhou DJ, Jiang RJ, Xiao QY, et al. Genetic diversity of Chinese rabies viruses: Evidence for the presence of two distinct clades in China. *Infect Genet Evol.* 2009;
 49. Delmas O, Holmes EC, Talbi C, Larrous F, Dacheux L, Bouchier C, et al. Genomic diversity and evolution of the lyssaviruses. *PLoS One.* 2008;
 50. Nadin-Davis SA, Real LA. Molecular Phylogenetics of the Lyssaviruses-Insights from a Coalescent Approach. *Advances in Virus Research.* 2011.
 51. Cisterna D, Bonaventura R, Caillou S, Pozo O, Andreau ML, Dalla Fontana L, et al. Antigenic and molecular characterization of rabies virus in Argentina. *Virus Res.* 2005;
 52. Velasco-Villa A, Orciari LA, Souza V, Juárez-Islas V, Gomez-Sierra M, Castillo A, et al. Molecular epizootiology of rabies associated with terrestrial carnivores in Mexico. *Virus Res.* 2005;
 53. PAHO/WHO. Epidemiología de la rabia bovina paralítica transmitida por los quirópteros. *BOLETÍN LA Of Sanit Panam.* 1968;
 54. Gonçalves MAS, Sà-Neto RJ, Brazil TK. Outbreak of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;
 55. Mendes W da S, Silva AAM da, Neiva RF, Costa NM, Assis MS de, Vidigal PMO, et al. An outbreak of bat-transmitted human rabies in a village in the Brazilian Amazon. *Rev Saude Publica.* 2009;
 56. Mayen F. Haematophagous Bats in Brazil, Their Role in Rabies Transmission, Impact on Public Health, Livestock Industry and Alternatives to an Indiscriminate Reduction of Bat Population. *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health.* 2003.
 57. Almeida EO, Moreira EC, Naveda LAB, Herrmann GP. Combate ao *Desmodus rotundus rotundus* (E. Geoffroy, 1810) na região cárstica de Cordisburgo e Curvelo, Minas Gerais. *Arq Bras Med Vet e Zootec.* 2002;
 58. Lucas CH, Pino F V, Baer G, Morales PK, Cedillo VG, Blanco MA, et al. Rabies control in Mexico. *Dev Biol.* 2008;
 59. Velasco-Villa A, Orciari LA, Juárez-Islas V, Gómez-Sierra M, Padilla-Medina I, Flisser A, et al. Molecular diversity of rabies viruses associated with bats in Mexico and other countries of the Americas. *J Clin Microbiol.* 2006;
 60. Favi M, De Mattos CA, Yung V, Chala E, López LR, De Mattos CC. First case of human rabies in Chile caused by an insectivorous bat virus variant. *Emerg Infect Dis.* 2002;
 61. Velasco-Villa A, Reeder SA, Orciari LA, Yager PA, Franka R, Blanton JD, et al. Enzootic rabies elimination from dogs and reemergence in wild terrestrial carnivores, United States. *Emerg Infect Dis.* 2008;
 62. De Andrade FAG, Gomes MN, Uieda W, Begot AL, Ramos ODS, Fernandes MEB. Geographical analysis for detecting high-risk areas for bovine/human rabies transmitted by the common hematophagous bat in the Amazon region, Brazil. *PLoS One.* 2016;
 63. Badillo R, Mantilla JC, Pradilla G. Human rabies encephalitis by a vampire bat bite in an urban area of Colombia. *Biomédica.* 2009;
 64. Castilho JG, Carnieli P, Durymanova EA, Fahl W de O, Oliveira R de N, Macedo CI, et al. Human rabies transmitted by vampire bats: Antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from the Amazon region (Brazil and Ecuador).

- Virus Res. 2010;
65. Gibbons R V. Cryptogenic rabies, bats, and the question of aerosol transmission. *Ann Emerg Med.* 2002;
 66. Messenger SL, Smith JS, Rupprecht CE. Emerging Epidemiology of Bat-Associated Cryptic Cases of Rabies in Humans in the United States. *Clin Infect Dis.* 2002;
 67. Goldrick B. Human Rabies: Unusual cases shine the spotlight on an old disease. *Pub Med [Internet].* 2005; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15867529>
 68. De Serres G, Skowronski DM, Mimault P, Ouakki M, Maranda-Aubut R, Duval B. Bats in the Bedroom, Bats in the Belfry: Reanalysis of the Rationale for Rabies Postexposure Prophylaxis. *Clin Infect Dis.* 2009;
 69. Jackson AC. Bat rabies virus variants causing human rabies [1]. *Pediatric Infectious Disease Journal.* 2006.
 70. Jones ME, Curns AT, Krebs JW, Childs JE. Environmental and Human Demographic Features Associated with Epizootic Raccoon Rabies in Maryland, Pennsylvania, and Virginia. *J Wildl Dis.* 2013;
 71. Jones RD, Kelly L, Fooks AR, Wooldridge M. Quantitative risk assessment of rabies entering Great Britain from North America via cats and dogs. *Risk Analysis.* 2005.
 72. Kuiken T, Leighton FA, Fouchier RAM, LeDuc JW, Peiris JSM, Schudel A, et al. Pathogen surveillance in animals. *Science.* 2005.
 73. Kobayashi Y, Sato G, Mochizuki N, Hirano S, Itou T, Carvalho AAB, et al. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. *BMC Vet Res.* 2008;
 74. Markovchick-Nicholls L, Regan HM, Deutschman DH, Widyanata A, Martin B, Noreke L, et al. Relationships between human disturbance and wildlife land use in urban habitat fragments. *Conserv Biol.* 2008;
 75. Nadin-Davis SA. Molecular Epidemiology. In: *Rabies.* 2013.
 76. Gehrt SD, Chelsvig JE. Species-specific patterns of bat activity in an urban landscape. *Ecol Appl.* 2004;
 77. Gordon ER, Curns AT, Krebs JW, Rupprecht CE, Real LA, Childs JE. Temporal dynamics of rabies in a wildlife host and the risk of cross-species transmission. *Epidemiol Infect.* 2004;
 78. Davis PL, Bourhy H, Holmes EC. The evolutionary history and dynamics of bat rabies virus. *Infect Genet Evol.* 2006;
 79. Páez A, Núñez C, García C, Bóshell J. Molecular epidemiology of rabies epizootics in Colombia: Evidence for human and dog rabies associated with bats. *Journal of General Virology.* 2003.
 80. Nadin-Davis SA, Loza-Rubio E. The molecular epidemiology of rabies associated with chiropteran hosts in Mexico. *Virus Res.* 2006;
 81. Kobayashi Y, Sato G, Kato M, Itou T, Cunha EMS, Silva M V., et al. Genetic diversity of bat rabies viruses in Brazil. *Arch Virol.* 2007;
 82. Oliveira R de N, de Souza SP, Lobo RSV, Castilho JG, Macedo CI, Carnieli P, et al. Rabies virus in insectivorous bats: Implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. *Virology.* 2010;
 83. Carneiro NFDF, Caldeira AP, Antunes LA, Carneiro VF, Carneiro GF. Raiva em morcegos *Artibeus lituratus* em Montes Claros, Estado de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;
 84. Ito M, Arai YT, Itou T, Sakai T, Ito FH, Takasaki T, et al. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: Identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. *Virology.* 2001;

85. Páez A, Velasco-Villa A, Rey G, Rupprecht CE. Molecular epidemiology of rabies in Colombia 1994-2005 based on partial nucleoprotein gene sequences. *Virus Res.* 2007;
86. Leslie MJ, Messenger S, Rohde RE, Smith J, Cheshier R, Hanlon C, et al. Bat-associated rabies virus in skunks. *Emerg Infect Dis.* 2006;
87. Aréchiga-Ceballos N, Velasco-Villa A, Shi M, Flores-Chávez S, Barrón B, Cuevas-Domnguez E, et al. New rabies virus variant found during an epizootic in white-nosed coatis from the Yucatan Peninsula. *Epidemiol Infect.* 2010;
88. Favoretto SR, De Mattos CC, Morais NB, Alves Araújo FA, De Mattos CA. Rabies in marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2001;
89. Engeman RM, Christensen KL, Pipas MJ, Bergman DL. Population Monitoring in Support of a Rabies Vaccination Program for Skunks in Arizona. *J Wildl Dis.* 2013;
90. Slate D, Rupprecht CE, Rooney JA, Donovan D, Lein DH, Chipman RB. Status of oral rabies vaccination in wild carnivores in the United States. Vol. 111, *Virus Research.* 2005. p. 68–76.
91. Carnieli P, Castilho JG, Fahl W de O, Vêras NMC, Carrieri ML, Kotait I. Molecular characterization of Rabies Virus isolates from dogs and crab-eating foxes in Northeastern Brazil. *Virus Res.* 2009;
92. Duke-Sylvester SM, Bolzoni L, Real LA. Strong seasonality produces spatial asynchrony in the outbreak of infectious diseases. *J R Soc Interface.* 2011;
93. Lembo T, Hampson K, Kaare MT, Ernest E, Knobel D, Kazwala RR, et al. The feasibility of canine rabies elimination in Africa: Dispelling doubts with data. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;
94. Pastoret PP, Kappeler A, Aubert M. European rabies control and its history. Historical perspective of rabies in Europe and the Mediterranean Basin: a testament to rabies by Dr Arthur A. King. 2004.
95. Cleaveland S, Kaare M, Knobel D, Laurenson MK. Canine vaccination-Providing broader benefits for disease control. *Vet Microbiol.* 2006;
96. Finnegan CJ, Brookes SM, Johnson L, Fooks AR. Detection and strain differentiation of European bat lyssaviruses using in situ hybridisation. *J Virol Methods.* 2004;
97. Nadin-Davis SA, Torres G, De Los Angeles Ribas M, Guzman M, Cruz de La Paz R, Morales M, et al. A molecular epidemiological study of rabies in Cuba. *Epidemiol Infect.* 2006;
98. Russell CA, Smith DL, Waller LA, Childs JE, Real LA. A priori prediction of disease invasion dynamics in a novel environment. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2004;
99. Nadin-Davis SA, Velez J, Malaga C, Wandeler AI. A molecular epidemiological study of rabies in Puerto Rico. *Virus Res.* 2008;
100. Suzuki K, González ET, Ascarrunz G, Loza A, Pérez M, Ruiz G, et al. Antibody response to an anti-rabies vaccine in a dog population under field conditions in Bolivia. *Zoonoses Public Health.* 2008;
101. Dalla Villa P, Kahn S, Stuardo L, Iannetti L, Di Nardo A, Serpell JA. Free-roaming dog control among OIE-member countries. *Prev Vet Med.* 2010;
102. Blanton JD, Meadows A, Murphy SM, Manangan J, Hanlon CA, Faber M-L, et al. Vaccination of Small Asian Mongoose (*Herpestes javanicus*) Against Rabies. *J Wildl Dis.* 2013;
103. Eisinger D, Thulke HH, Selhorst T, Müller T. Emergency vaccination of rabies under limited resources - Combating or containing? *BMC Infectious Diseases.* 2005.
104. Eisinger D, Thulke HH. Spatial pattern formation facilitates eradication of infectious diseases. *J Appl Ecol.* 2008;
105. Lloyd-Smith JO, Cross PC, Briggs CJ, Daugherty M, Getz WM, Latto J, et al. Should we expect population thresholds for wildlife disease? Vol. 20, *Trends in Ecology and*

- Evolution. 2005.
106. Constantine DG, Tierkel ES, Kleckner MD, Hawkins DM. Rabies in New Mexico carvern bats. Public Health Rep. 1968;83(4).
 107. Shankar V, Bowen RA, Davis AD, Rupprecht CE, O'Shea TJ. Rabies in a captive colony of big brown bats (*Eptesicus fuscus*). J Wildl Dis. 2004;40(3).
 108. Steece R, Altenbach JS. Prevalence of rabies specific antibodies in the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*) at Lava Cave, New Mexico. J Wildl Dis. 1989;25(4).
 109. Dorward WJ, Schowalter DB, Gunson JR. Preliminary studies of bat rabies in Alberta. Can Vet J. 1977;18(12).
 110. Wilkinson GS. Reciprocal food sharing in the vampire bat. Nature. 1984;308(5955).
 111. George DB, Webb CT, Farnsworth ML, O'Shea TJ, Bowen RA, Smith DL, et al. Host and viral ecology determine bat rabies seasonality and maintenance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(25).
 112. Turmelle AS, Jackson FR, Green D, McCracken GF, Rupprecht CE. Host immunity to repeated rabies virus infection in big brown bats. J Gen Virol. 2010;91(9).
 113. Donnelly CA, Woodroffe R, Cox DR, Bourne FJ, Cheeseman CL, Clifton-Hadley RS, et al. Positive and negative effects of widespread badger culling on tuberculosis in cattle. Nature. 2006;439(7078).
 114. Woodroffe R, Donnelly CA, Jenkins HE, Johnston WT, Cox DR, Bourne FJ, et al. Culling and cattle controls influence tuberculosis risk for badgers. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(40).
 115. Anderson RM, Jackson HC, May RM, Smith AM. Population dynamics of fox rabies in Europe. Nature. 1981;289(5800).
 116. HALLAM TG, MCCRACKEN GF. Management of the Panzootic White-Nose Syndrome through Culling of Bats. Conserv Biol. 2011;25(1).
 117. PROMED-mail. Hendra Virus, equine, Australia. ProMED-mail. 2011;
 118. Wilkinson GS. Social organization and behavior. In Natural history of vampire bats . CRC Press. 1988;
 119. Fornes A, Lord RD, Kuns ML, Larghi OP, Fuenzalida E, Lazara L. Control of bovine rabies through vampire bat control. J Wildl Dis. 1974;10(4):310.
 120. Jackson FR, Turmelle AS, Farino DM, Franka R, McCracken GF, Rupprecht CE. Experimental rabies virus infection of big brown bats (*Eptesicus fuscus*). J Wildl Dis. 2008;44(3).
 121. Trajano E. Movements of Cave Bats in Southeastern Brazil, with Emphasis on the Population Ecology of the Common Vampire Bat, *Desmodus rotundus* (Chiroptera). Biotropica. 1996;28(1).
 122. Burns RJ, Crespo RF. Notes on Local Movement and Reproduction of Vampire Bats in Colima, Mexico. Southwest Nat. 1975;19(4).
 123. Condori-Condori RE, Streicker DG, Cabezas-Sanchez C, Velasco-Villa A. Enzootic and epizootic rabies associated with vampire bats, Peru. Emerg Infect Dis. 2013;19(9).
 124. Torres C, Lema C, Gury Dohmen F, Beltran F, Novaro L, Russo S, et al. Phylodynamics of vampire bat-transmitted rabies in Argentina. Mol Ecol. 2014;23(9):2340–52.
 125. Wilkinson GS. The social organization of the common vampire bat: II Mating system, genetic structure and relatedness. Behav Ecol Sociobiol. 1985;17:123–34.
 126. Melnick DJ, Hoelzer GA. Differences in male and female macaque dispersal lead to contrasting distributions of nuclear and mitochondrial DNA variation. Int J Primatol. 1992;13(4):379–93.
 127. Goudet J, Perrin N, Waser P. Tests for sex-biased dispersal using bi-parentally

- inherited genetic markers. *Mol Ecol.* 2002 Jun;11(6):1103–14.
128. Benavides JA, Valderrama W, Streicker DG. Spatial expansions and travelling waves of rabies in vampire bats. *Proc R Soc B Biol Sci* [Internet]. 2016 Jun 15 [cited 2018 Nov 26];283(1832):1–9. Available from: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/lookup/doi/10.1098/rspb.2016.0328>
 129. Johnson N, Aréchiga-Ceballos N, Aguilar-Setien A. Vampire bat rabies: Ecology, epidemiology and control. *Viruses.* 2014.
 130. Greenwood PJ. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Anim Behav.* 1980;28(4):1140–62.
 131. Moreno JA, Baer GM. Experimental rabies in the vampire bat. *Am J Trop Med Hyg.* 1980;29(2):254–9.
 132. Zink RM, Barrowclough GF. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Mol Ecol.* 2008;17(9):2107–21.
 133. Craft ME, Volz E, Packer C, Meyers LA. Disease transmission in territorial populations: the small-world network of Serengeti lions. *J R Soc Interface.* 2011 Jun;8(59):776–86.
 134. Nunn CL, Thrall PH, Stewart K, Harcourt AH. Emerging infectious diseases and animal social systems. *Evol Ecol.* 2008;22(4):519–43.
 135. Blackwood JC, Streicker DG, Altizer S, Rohani P. Resolving the roles of immunity, pathogenesis, and immigration for rabies persistence in vampire bats. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;
 136. Navarro AM, Bustamante J, Sato A. Situación actual y control de la rabia en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2007;24(1):46–50.
 137. Streicker DG, Turmelle AS, Vonhof MJ, Kuzmin I V., McCracken GF, Rupprecht CE. Host phylogeny constrains cross-species emergence and establishment of rabies virus in bats. *Science.* 2010 Aug;329(5992):676–9.
 138. Catenazzi A, Donnelly MA. Sea lion (*Otaria flavescens*) as host of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*). *Mar Ecol Prog Ser.* 2008;360:285–9.
 139. Pope LC, Butlin RK, Wilson GJ, Woodroffe R, Erven K, Conyers CM, et al. Genetic evidence that culling increases badger movement: Implications for the spread of bovine tuberculosis. *Mol Ecol.* 2007;16(23):4919–29.
 140. Biek R, Drummond AJ, Poss M. A virus reveals population structure and recent demographic history of its carnivore host. *Science.* 2006 Jan;311(5760):538–41.
 141. Hafner MS, Sudman PD, Villablanca FX, Spradling TA, Demastes JW, Nadler SA. Disparate rates of molecular evolution in cospeciating host and parasites. *Science (80-).* 1994;265(5175):1087–90.
 142. Wand M, Ripley B. KernSmooth. Functions for Kernel Smoothing Supporting Wand & Jones (1995). R Packag version. 2015;2.
 143. Escobar LE, Peterson AT, Papeş M, Favi M, Yung V, Restif O, et al. Ecological approaches in veterinary epidemiology: mapping the risk of bat-borne rabies using vegetation indices and night-time light satellite imagery. *Vet Res.* 2015;46(1).
 144. Streicker DG, Altizer SM, Velasco-Villa A, Rupprecht CE. Variable evolutionary routes to host establishment across repeated rabies virus host shifts among bats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(48).
 145. Russell CA, Smith DL, Childs JE, Real LA. Predictive spatial dynamics and strategic planning for raccoon rabies emergence in Ohio. In: *PLoS Biology.* 2005.
 146. Streicker DG, Recuenco S, Valderrama W, Benavides JGJG, Vargas I, Pacheco V, et al. Ecological and anthropogenic drivers of rabies exposure in vampire bats: implications for transmission and control. In: *Ecological and anthropogenic drivers of rabies exposure in vampire bats: implications for transmission and control. Proc. R.*

- Soc. B Biol. Sci 279; 2012. p. 3384–92.
147. Ruschi A. Morcegos do estado do Espiritu Santo: introduccion e consideraciones gerais. Museu de Biologia Professor Mello Leitaon. 1951;1–16.
 148. Smith DL, Lucey B, Waller LA, Childs JE, Real LA. Predicting the spatial dynamics of rabies epidemics on heterogeneous landscapes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(6).
 149. Adjemian JZ, Foley P, Gage KL, Foley JE. Initiation and spread of traveling waves of plague, *Yersinia pestis*, in the western United States. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76(2).
 150. Almeida MF, Martorelli LFA, Aires CC, Barros RF, Massad E. Vaccinating the vampire bat *Desmodus rotundus* against rabies. *Virus Res*. 2008;137(2).
 151. F. Dormann C, M. McPherson J, B. Araújo M, Bivand R, Bolliger J, Carl G, et al. Methods to account for spatial autocorrelation in the analysis of species distributional data: A review. *Ecography*. 2007.
 152. Gittleman JL, Kot M. Adaptation: Statistics and a Null Model for Estimating Phylogenetic Effects. *Syst Biol* [Internet]. 1990 Sep 1;39(3):227–41. Available from: <https://doi.org/10.2307/2992183>
 153. Paradis E, Claude J, Strimmer K. APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*. 2004;
 154. David D, Yakobson B, Rotenberg D, Dveres N, Davidson I, Stram Y. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. *Vet Microbiol*. 2002;87(2).
 155. INEI Instituto Nacional de Estadística e Informática. Map of Poverty in Provinces and Districts 2015 Peru. Peru; 2015.
 156. World Health Organization. The control of neglected zoonotic diseases: a route to poverty alleviation. 2006;
 157. Bonds MH, Keenan DC, Rohani P, Sachs JD. Poverty trap formed by the ecology of infectious diseases. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2010;277(1685).
 158. Leguía G. The epidemiology and economic impact of llama parasites. *Parasitol Today*. 1991;7(2).
 159. Moro PL, Budke CM, Schantz PM, Vasquez J, Santivañez SJ, Villavicencio J. Economic impact of cystic echinococcosis in Peru. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(5).
 160. Vos A, Ün H, Hampson K, De Balogh K, Aylan O, Freuling CM, et al. Bovine rabies in Turkey: Patterns of infection and implications for costs and control. *Epidemiol Infect*. 2014;142(9).
 161. Childs JE, Krebs JW, Real LA, Gordon ER. Animal-based national surveillance for zoonotic disease: Quality, limitations, and implications of a model system for monitoring rabies. *Prev Vet Med*. 2007;78(3–4).
 162. Anderson A, Shwiff S, Gebhardt K, Ramírez AJ, Shwiff S, Kohler D, et al. Economic evaluation of vampire bat (*Desmodus rotundus*) rabies prevention in Mexico. *Transbound Emerg Dis*. 2014;
 163. Cagnacci F, Massei G, Coats J, de Leeuw A, Cowan DP. Long-lasting systemic bait markers for Eurasian badgers. *J Wildl Dis*. 2006;42(4).
 164. Fernandez JRR, Rocke TE. Use of rhodamine B as a biomarker for oral plague vaccination of prairie dogs. *J Wildl Dis*. 2011;47(3).
 165. Clay CA, Lehmer EM, Previtali A, St Jeor S, Dearing MD. Contact heterogeneity in deer mice: Implications for Sin Nombre virus transmission. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2009;276(1660).
 166. Hoyt JR, Langwig KE, White JP, Kaarakka HM, Redell JA, Kurta A, et al. Cryptic connections illuminate pathogen transmission within community networks. *Nature*. 2018;563(7733).

167. Hampson K, Dushoff J, Cleaveland S, Haydon DT, Kaare M, Packer C, et al. Transmission dynamics and prospects for the elimination of canine Rabies. *PLoS Biol.* 2009;
168. Amengual B, Bourhy H, López-Roíg M, Serra-Cobo J. Temporal dynamics of European bat lyssavirus type 1 and survival of *Myotis myotis* bats in natural colonies. *PLoS One.* 2007;
169. Streicker DG, Winternitz JCJC, Satterfield DADA, Condori-Condori RERE, Broos A, Tello C, et al. Host–pathogen evolutionary signatures reveal dynamics and future invasions of vampire bat rabies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Sep 27;113(39):10926–31.
170. Choisy M, Rohani P. Harvesting can increase severity of wildlife disease epidemics. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2006;273(1597).
171. Linhart SB, Mitchell GC, Crespo RF. Control of vampire bats by topical application of an anticoagulant (chlorophacinone). *Bol La Of Sanit Panam.* 1972;73(2):31–8.
172. Gomes MN, Uieda W, Do Rosário Dias De Oliveira Latorre M. Influence of sex differences in the same colony for chemical control of vampire *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae) populations in the state of São Paulo, Brazil. *Pesqui Vet Bras.* 2006;
173. Stading B, Ellison JA, Carson WC, Satheshkumar PS, Rocke TE, Osorio JE. Protection of bats (*Eptesicus fuscus*) against rabies following topical or oronasal exposure to a recombinant raccoon poxvirus vaccine. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;
174. Bull JJ, Smithson MW, Nuismer SL. Transmissible Viral Vaccines. *Trends in Microbiology.* 2018.
175. Wilkinson GS. Social grooming in the common vampire bat, *Desmodus rotundus*. *Anim Behav.* 1986;
176. Bergner LM, Orton RJ, da Silva Filipe A, Shaw AE, Becker DJ, Tello C, et al. Using noninvasive metagenomics to characterize viral communities from wildlife. *Mol Ecol Resour.* 2019;
177. Thompson RD, Elias DJ, Mitchell GC. Effects of Vampire Bat Control on Bovine Milk Production. *J Wildl Manage.* 1977;
178. Hardy CM, Hinds LA, Kerr PJ, Lloyd ML, Redwood AJ, Shellam GR, et al. Biological control of vertebrate pests using virally vectored immunocontraception. *Journal of Reproductive Immunology.* 2006.
179. Beyer HL, Hampson K, Lembo T, Cleaveland S, Kaare M, Haydon DT. The implications of metapopulation dynamics on the design of vaccination campaigns. *Vaccine.* 2012;
180. Stading BR, Osorio JE, Velasco-Villa A, Smotherman M, Kingstad-Bakke B, Rocke TE. Infectivity of attenuated poxvirus vaccine vectors and immunogenicity of a raccoonpox vectored rabies vaccine in the Brazilian Free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*). *Vaccine.* 2016;
181. Langwig KE, Hoyt JR, Parise KL, Frick WF, Foster JT, Kilpatrick AM. Resistance in persisting bat populations after white-nose syndrome invasion. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2017;
182. Hayman DTS. Biannual birth pulses allow filoviruses to persist in bat populations. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2015;
183. Rocke TE, Kingstad-Bakke B, Wüthrich M, Stading B, Abbott RC, Isidoro-Ayza M, et al. Virally-vectored vaccine candidates against white-nose syndrome induce anti-fungal immune response in little brown bats (*Myotis lucifugus*). *Sci Rep.* 2019;
184. Pallister J, Middleton D, Wang LF, Klein R, Haining J, Robinson R, et al. A recombinant Hendra virus G glycoprotein-based subunit vaccine protects ferrets from lethal Hendra virus challenge. *Vaccine.* 2011;

185. Olival K, Hayman D. Filoviruses in Bats: Current Knowledge and Future Directions. *Viruses*. 2014 Apr 1;6:1759–88.
186. Wray AK, Olival KJ, Moron D, Lopez MR, Alvarez D, Navarrete-Macias I, et al. Viral diversity, prey preference, and bartonella prevalence in *Desmodus rotundus* in Guatemala. *Ecohealth*. 2016;13:761–74.
187. Bobrowiec PED, Lemes MR, Gribel R. Prey preference of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*, Chiroptera) using molecular analysis. *J Mammal*. 2015;96:54–63.
188. Streicker DG, Allgeier JE. Foraging choices of vampire bats in diverse landscapes: potential implications for land-use change and disease transmission. *J Appl Ecol*. 2016;
189. Lee DN, Papeş M, van Den Bussche RA. Present and potential future distribution of common Vampire bats in the Americas and the associated risk to cattle. *PLoS One*. 2012;
190. Gomes MN, Monteiro AM V. Cattle rabies in the State of Sao Paulo and its spatial distribution from 1992 to 2003. In: *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* 63; 2011. p. 279–86.
191. Gonzalves F, Fischer E, Dirzo R. Forest conversion to cattle ranching differentially affects taxonomic and functional groups of Neotropical bats. *Biol Conserv*. 2017;210:343–8.
192. Avila-Flores R, Bolaina-Badal AL, Gallegos-Ruiz A, Gómez S-, Use WS. Use of linear features by the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) in a tropical cattle-ranching landscape. *Therya*. 2019;10:229–34.
193. Wohlgenant TJ. Roost interactions between the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) and two frugivorous bats (*Phyllostomus discolor* and *Sturnira lilium*) in Guanacaste, Costa Rica. *Biotropica*. 1994;26:344–8.
194. O’Shea TJ, Cryan PM, Hayman DTS, Plowright RK, Streicker DG. Multiple mortality events in bats: A global review. *Mamm Rev*. 2016;46:175–90.
195. Kunz TH, de Torrez EB, Bauer D, Lobova T, Fleming TH. Ecosystem services provided by bats. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1223:1–38.
196. Andrade, Franca S. Spatial and temporal analysis of attacks by common vampire bats (*Desmodus rotundus*) on humans in the rural Brazilian Amazon basin. S; Souza, VP; Barreto, MSOD; Fernandes, MEB Spat temporal Anal attacks by common vampire bats (*Desmodus rotundus*) humans Rural Brazilian Amaz basin. 2015;17:393–400.
197. Delpietro H, Konolsaisen F, Marchevsky N, Russo G. Domestic cat predation on vampire bats (*Desmodus rotundus*) while foraging on goats, pigs, cows and human-beings. *Appl Anim Behav Sci*. 1994;39:141–50.
198. Pérez-Rivero JJ, Pérez-Martínez M, Aguilar-Setién A. Histometric analysis of vampire bat (*Desmodus rotundus*) testicles treated with coumestrol by oral route. *J Appl Anim Res*. 2013;42:208–12.
199. Ransom JI, Powers JG, Hobbs T, Baker N., Ecological DL. Feedbacks can reduce population-level efficacy of wildlife fertility control. *J Appl Ecol*. 2014;51:259–69.
200. Rocha F, Dias RA. The common vampire bat *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae) and the transmission of the rabies virus to livestock: A contact network approach and recommendations for surveillance and control. *Prev*. 2020;174:10480.
201. Fisher CR, Streicker DG, Schnell MJ. The spread and evolution of rabies virus: Conquering new frontiers. *Nature Reviews Microbiology*. 2018.
202. Cárdenas-Canales EM, Gigante CM, Greenberg L, Velasco-Villa A, Ellison JA, Satheshkumar PS, et al. Clinical presentation and serologic response during a rabies epizootic in captive common vampire bats (*Desmodus rotundus*). In: *Trop. 34: Med*.

- Infect. Dis 5; 2020.
203. Streicker DG, González F, Luconi SL., Barrientos G., Leon RG., Phylodynamics B. Phylodynamics reveals extinction-recolonization dynamics underpin apparently endemic vampire bat rabies in Costa Rica. In: Proc R. 20191527: Soc. B Biol. Sci 286; 2019.
 204. de Thoisy B, Bourhy H, Delaval M, Pontier D, Dacheux L, Darcissac E, et al. Bioecological Drivers of Rabies Virus Circulation in a Neotropical Bat Community. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:1–21.
 205. Becker DJ, Broos A, Bergner LM, Meza DK, Simmons NB, Fenton MB, et al. Temporal patterns of vampire bat rabies and host connectivity in Belize. In: Transbound. Emerg. Dis tbed.13754; 2020.
 206. Delpietro HA, Russo RG, Carter GG, Lord RD, Delpietro GLR seasonality. Reproductive seasonality, sex ratio and philopatry in Argentina’s common vampire bats. R Soc Open Sci. 2017;4(16095):9.
 207. Dognani R, Pierre EJ, Silva M. Epidemiologia descritiva da raiva dos herbívoros notificados no estado do Paraná entre 1977 e 2012. P; Patricio, MAC; Costa, SC; Prado, JR; Lisboa, JAN Epidemiol descritiva da raiva dos herbívoros Notif no estado do Paraná entre. 2016;1977:1145–54.
 208. Brochier B, Kieny MP, Costy F, Coppens P, Bauduin B, Lecocq J, et al. Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine. Lett to Nat. 1991;353:737–40.
 209. Hampson K, Coudeville L, Lembo T, Sambo M, Kieffer A, Atflan M, et al. Estimating the Global Burden of Endemic Canine Rabies. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9:1–20.
 210. Tschapka M, Wilkinson GS. Free-ranging vampire bats (*Desmodus rotundus*, Phyllostomidae) survive 15 years in the wild. Int J Mamm Biol. 1999;64:239–40.
 211. Mulder JL. Longevity records in the red fox. Lutra. 2004;47:51–2.
 212. Wilkinson GS, Adams DM. Recurrent evolution of extreme longevity in bats. Biol Lett. 2019;15(20180):860.
 213. Wilkinson GS, South JML history. Life history, ecology and longevity in bats. Aging Cell. 2002;1:124–31.
 214. Gold S, Donnelly CA, Nouvellet P, Woodroffe R. Rabies virus-neutralising antibodies in healthy, unvaccinated individuals: What do they mean for rabies epidemiology? PLoS Negl Trop Dis. 2020;14.
 215. Almeida MF, Martorelli LFA, Aires CC, Sallum PC, Massad E. Indirect oral immunization of captive vampires, *Desmodus rotundus*. Virus Res. 2005;111:77–82.
 216. Aguilar-Setián A, Brochier B, Tordo N, De Paz O, Desmettre P, Peharpre D, et al. Experimental rabies infection and oral vaccination in vampire bats (*Desmodus rotundus*). Vaccine. 1998;16:1122–6.
 217. Rocke TE, Tripp DW, Russell RE, Abbott RC, Richgels KLD, Matchett MR, et al. Sylvatic Plague Vaccine Partially Protects Prairie Dogs (*Cynomys* spp.) in Field Trials. Ecohealth. 2017;14:438–50.
 218. Gomes MN, Uieda W. Influence of sex differences in the same colony for chemical control of vampire *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae) populations in the state of Sao Paulo, Brazil. In: Influ sex Differ same colony Chem Control vampire *Desmodus rotundus* Popul state Sao Paulo, Brazil. 2006;26:38–43.
 219. Nuismer SL, Althouse BM, May R, Bull JJ, Stromberg SP, Antia R. Eradicating infectious disease using weakly transmissible vaccines. In: Proc R. 20161903: Soc. B Biol. Sci 283; 2016.
 220. Freitas MB, Welker AF, Millan SF, Pinheiro EC. Metabolic responses induced by fasting in the common vampire bat *Desmodus rotundus*. J Comp. 2003;173:703–7.

221. Voigt CC, Kelm DH. HOST PREFERENCE OF THE COMMON VAMPIRE BAT (DESMODUS ROTUNDUS; CHIROPTERA) ASSESSED BY STABLE ISOTOPES. *J Mammal.* 2006;
222. Bohmann K, Gopalakrishnan S, Nielsen M, Nielsen L dos SB, Jones G, Streicker DG, et al. Using DNA metabarcoding for simultaneous inference of common vampire bat diet and population structure. *Mol Ecol Resour.* 2018;
223. Moya MI, Pacheco LF, Aguirre LF. Relationships between vampire bat (*Desmodus rotundus*) attacks to goats, livestock management, and some habitat characteristics in the Bolivian prepuna. *Mastozool.* In: *Neotrop.* 22., Gilbert, A.T.; Petersen, B.W.; Recuenco, S.; Niezgodá, M.; Gómez, J.; Laguna-Torres, V.A.; Rupprecht, C. Evidence of rabies virus exposure among humans in the Peruvian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 87, 206-215: 2015; 2012. p. 73–84.
224. Gilbert AT, Petersen BW, Recuenco S, Niezgodá M, Gómez J, Laguna-Torres VA, et al. Evidence of rabies virus exposure among humans in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;
225. Ferreira MU, Silva-Nunes M. Da Evidence-based public health and prospects for malaria control in Brazil. *J Infect.* 2010;4:533–45.
226. Schneider MC, Aron J, Santos-Burgoa C, Uieda W, Ruiz-Velazco S. Common vampire bat attacks on humans in a village of the Amazon region of Brazil. *Cad.* 2001;17:1531–6.
227. McGuire LP, Fenton MBH the W. Light Affects the Obstacle Avoidance Ability of Free-Flying Little Brown Bats (*Myotis lucifugus*). *Acta Chiropterologica.* 2010;12:247–50.
228. Ferraz C, Achkar SM, Kotait I. First report of rabies in vampire bats (*Desmodus rotundus*) in an urban area, Ubatuba, Sao Paulo state, Brazil. In: *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 49; 2007. p. 389–90.
229. Arnett EB, Hein CD, Schirmacher MR, Huso MMP, Szewczak JM. Evaluating the Effectiveness of an Ultrasonic Acoustic Deterrent for Reducing Bat Fatalities at Wind Turbines. *PLoS One.* 2013;8.
230. Delpietro HA. Case reports on defensive behaviour in equine and bovine subjects in response to vocalization of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*). *Appl Anim Behav Sci.* 1989;22:377–80.
231. Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachudha TR re-examined. Rabies re-examined. *Dis.* 2002;2:327–43.
232. Benavides JA, Velasco-Villa A, Godino LC, Satheshkumar PS, Nino R, Rojas-Paniagua E, et al. Abortive vampire bat rabies infections in Peruvian peridomestic livestock. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14.
233. Araujo DB, Martorelli LA, Kataoka APGA, Campos ACA, Rodrigues CS, Sanfilippo LF, et al. Antibodies to rabies virus in terrestrial wild mammals in native rainforest on the North coast of Sao Paulo State, Brazil. *J Wildl Dis.* 2014;50:469–77.
234. Benavides JA, Rojas Paniagua E, Hampson K, Valderrama W, Streicker DG, Paniagua R, et al. Quantifying the burden of vampire bat rabies in Peruvian livestock. Rupprecht CE, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2017 Dec 21 [cited 2018 Nov 26];11(12):e0006105. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006105>
235. Gómez-Benavides J, Laguna-Torres VA, Recuenco S. El real significado de ser mordido por murciélagos hematófagos en las comunidades indígenas Amazónicas del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2010;27(4).
236. Fenton BM, Streicker DG, Racey PA, Tuttle MD, Medellín RA, Daley MJ, et al. Knowledge gaps about rabies transmission from vampire bats to humans. *Nat.* 2020;4:517–8.

237. Organization WH. Rabies Vaccines and Immunoglobulins; WHO Position, Weekly Epidemiological Record; WHO: Geneva, Switzerland, 2018; Volume 16. p. :201–20.
238. Wang C, Dulal P, Zhou X, Xiang Z, Goharriz H, Banyard A, et al. A simian-adenovirus-vectored rabies vaccine suitable for thermostabilisation and clinical development for low-cost single-dose pre-exposure prophylaxis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12.
239. Stoner-Duncan B, Streicker DG, Tedeschi CM. Vampire Bats and Rabies: Toward an Ecological Solution to a Public Health Problem. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;
240. McCarthy TJ. Human depredation by vampire bats (*Desmodus rotundus*) following a hog cholera campaign. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;
241. McNab BK. Energetics and Distribution of Vampires. *J Mammal.* 1973;54(1):131–44.
242. Greenhall AM, Joermann G, Schmidt U. *Desmodus rotundus*. *Mammalian Species.* The American Society of Mammalogists; 1983.
243. Willig MR, Presley SJ, Bloch CP, Hice CL, Yanoviak SP, Díaz MM, et al. Phyllostomid Bats of Lowland Amazonia: Effects of Habitat Alteration on Abundance. *Biotropica.* 2007 Nov;39(6):737–46.
244. Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int J Climatol.* 2005;
245. Phillips SJ, Dudík M. Modeling of species distributions with Maxent: New extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography (Cop).* 2008;

10. Publicaciones científicas durante el doctorado y como parte de la presente tesis doctoral.

1. Fluorescent biomarkers demonstrate prospects or spreadable vaccines to control disease transmission in wild bats. Bakker K, Rocke T, Osorio E, Abbott R, Tello C, Carrera C, Valderrama W, Shiva C, Falcon N, Streicker D. *Nature Ecology and Evolution* (2019) <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1032-x>
2. Defining New Pathways to Manage the Ongoing Emergence of Bat Rabies in Latin America. Julio A. Benavides, William Valderrama *et al.* MDPI (2020). doi:10.3390/v12091002. <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/9/1002>.
3. Ecological Niche Modeling of vampire bats (*Desmodus rotundus*) and livestock rabies as a tool for rabies surveillance. W. Valderrama *et al.* *Royal Society Open Science* (2020). RSOS-201580. <http://datadryad.org/submit?journalID=RSOS&manu=RSOS-201580>.