

Rabia en quirópteros: Circulación de EBLV-1 (*Lyssavirus* de murciélagos europeos tipo 1) en murciélagos de España 169

Estado de las enfermedades de Declaración Obligatoria 173

Resultados de la declaración al Sistema de Información Microbiológica 177

Rabia en quirópteros: Circulación de EBLV-1 (*Lyssavirus* de murciélagos europeos tipo 1) en murciélagos de España

Serra-Cobo, J.¹, Bourhy, H.², López-Roig, M.³, Sánchez, LP.⁴, Abellán, C.⁵, Borràs, M.⁶ y Amengual, B.³

¹ Grup Recerca Consolidat de Biologia Animal, Universitat de Barcelona.

² Unité Dynamique des lyssavirus et adaptation à l'hôte, Institut Pasteur de París.

³ Centre de Recerca en Infeccions Víriques, Illes Balears, Fundació Mateu Orfila, Govern de les Illes Balears.

⁴ Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, CIBERESP.

⁵ Subdirección de Sanidad Exterior y Veterinaria, Ministerio de Sanidad.

⁶ Unitat de Toxicologia Experimental i Ecotoxicologia, Parc Científic de Barcelona.

Introducción

Los quirópteros son los únicos mamíferos capaces de volar. Están ampliamente distribuidos por todo el mundo y agrupan aproximadamente el 20 % de todas las especies de mamíferos conocidas. Los murciélagos son importantes reservorios de virus de ARN capaces de traspasar la barrera específica e infectar tanto a personas como a otras especies de mamíferos terrestres¹. Así pues, los quirópteros realizan una función importante en el mantenimiento y la transmisión de viriasis que conciernen a la salud pública. Sin embargo, la vía como los murciélagos mantienen y transmiten los virus suele ser poco conocida. Gran parte de los virus de los murciélagos producen enfermedades consideradas zoonosis emergentes, siendo una de ellas la rabia, originada por los *Lyssavirus*.

Se han descrito siete genotipos de *Lyssavirus* (ver tabla 1), de los cuales seis han sido aislados en murciélagos. Recientemente se ha publicado la presencia de cuatro nuevos genotipos, todos ellos aislados en quirópteros de Kirgizstan, Tajikistan y Rusia^{2,3,4}. Desde 1977 hasta mediados de 2008 se han publicado más de 860 casos de rabia en quirópteros europeos originados por *Lyssavirus* de los genotipos 5 y 6 (EBLV-1 y EBLV-2, respectivamente) según el Rabies Bulletin Europe de la Organización Mundial de la Salud (<http://www.who-rabies-bulletin.org/>).

El primer murciélago infectado en España por *Lyssavirus* se detectó en el pueblo valenciano del Saler en 1987⁵.

Posteriormente, se han detectado nuevos casos hasta un total de 21 murciélagos infectados, según la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (http://www.isciii.es/htdocs/centros/epidemiologia/boletin_semanal/bes0719.pdf).

La rabia de murciélagos es un problema europeo de salud pública. A pesar de ello, se conoce poco la epidemiología y la patogenia de EBLV en murciélagos⁶⁻⁹. Concretamente, hay pocos datos disponibles de la dinámica espacio-temporal de la infección y de cómo ésta influye en la tasa de mortalidad de las colonias. Para disponer de dicha información son necesarias largas series de datos obtenidos a partir de estudios plurianuales.

El presente trabajo da a conocer algunos de los resultados obtenidos en estudios de este tipo realizados en España y promovidos, desde 1992, por el Ministerio de Sanidad y Consumo, así como por la Consejería de Salud y Consumo del Gobierno de las Islas Baleares^{6,7,10}.

Material y métodos

Captura de murciélagos y obtención de muestras

La selección de las colonias de murciélagos se ha realizado de acuerdo a la diversidad y la conducta de las especies, dando prioridad a las colonias pluriespecíficas y con especies migratorias (figura 1). El muestreo se ha llevado a cabo durante el período 1992 a 2007.

Las colonias en las que se detectaron murciélagos seropositivos han sido objeto de seguimiento. La mayoría de los quirópteros capturados fueron anillados para facilitar el seguimiento individual de la infección y conocer sus desplazamientos estacionales.

El estudio se ha basado, principalmente, en el análisis de muestras sanguíneas de animales vivos. Las muestras sanguíneas se centrifugaron para separar la fracción celular del suero. Las pocas muestras tisulares analizadas durante el estudio corresponden a individuos hallados muertos.

Análisis de laboratorio

La técnica utilizada para la detección, en suero, de anticuerpos rábicos anti EBLV-1 es una adaptación del Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT). Cada análisis serológico fue repetido dos veces para cada muestra, tomando como resultado la media aritmética de ambas repeticiones. Para descartar falsos positivos, originados por reacciones cruzadas, se consideraron sueros positivos aquellos cuya titulación era superior a 27 en ambas repeticiones^{6,11}.

En los murciélagos hallados muertos se realizó la necropsia en un laboratorio de seguridad biológica de

nivel 3, obteniéndose muestras de: cerebro, faringe-esófago, tráquea, pulmón, corazón y lengua.

Las técnicas utilizadas para la detección de material genético vírico en la fracción celular sanguínea, así como en los tejidos, son la retrotranscripción y la reacción en cadena de la polimerasa (nRT-PCR). El gen estudiado ha sido el de la nucleoproteína de EBLV-1^{12,13}. Todos los cerebros de los quirópteros hallados muertos también fueron analizados mediante la técnica de inmunofluorescencia¹⁴.

Las muestras de material genético vírico de EBLV-1 obtenidas fueron secuenciadas y comparadas con otras cepas de EBLV-1, EBLV-2 y DUVV.

Análisis de la dinámica temporal de EBLV-1

Se han realizado a partir del estudio de dos colonias de la especie *Myotis myotis*, murciélago de amplia distribución europea¹⁵. Para analizar la dinámica de EBLV-1 ha sido necesario estimar previamente la tasa de supervivencia de las colonias^{16,17}.

La tasa básica de reproducción es un concepto fundamental en epidemiología y en estudios de dinámica temporal y nos indica la media de infecciones secundarias

Figura 1

Mapa de las localidades en las cuales se han detectado murciélagos positivos

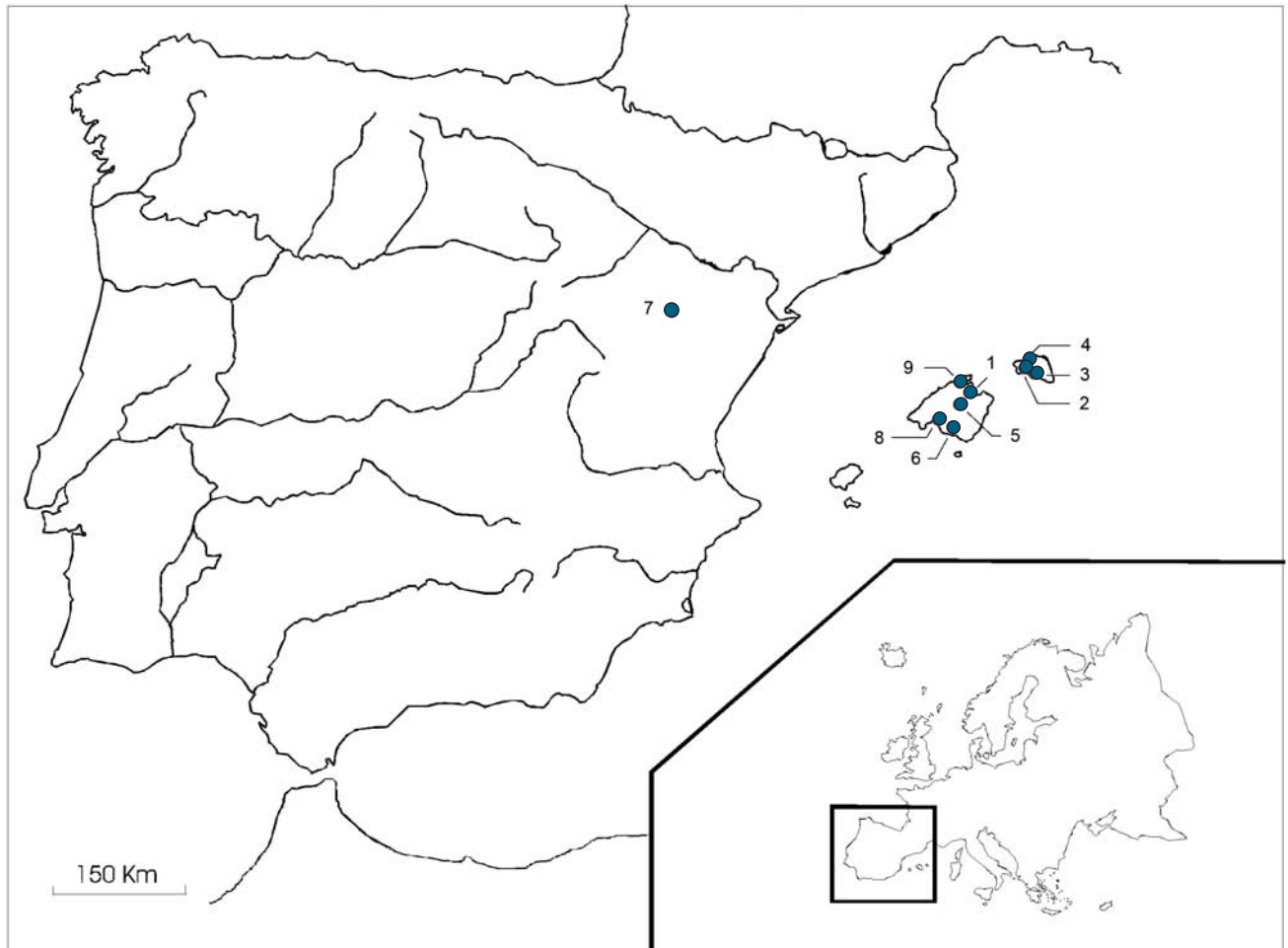


Tabla 1

Diversidad genética de los *Lyssavirus*

| GENOTIPO | | DISTRIBUCIÓN | ESPECIE ANIMAL |
|----------|------------------------------------|--|---|
| 1 | Rabies virus (RABV) | Amplia distribución mundial, excepto Oceanía y Antártico | Humanos Mamíferos terrestres Quirópteros |
| 2 | Lagos bat virus (LBV) | África | Quirópteros frugívoros Quirópteros insectívoros Gato Perro |
| 3 | Mokola virus (MOKV) | África | Humanos Gato Perro Musarañas Roedores |
| 4 | Duvenhage virus (DUVV) | África | Humanos Quirópteros insectívoros |
| 5 | European bat Lyssavirus-1 (EBLV-1) | Europa | Humanos Quirópteros insectívoros Oveja Marta Gatos |
| 6 | European bat Lyssavirus-2 (EBLV-2) | Europa | Humanos Quirópteros insectívoros |
| 7 | Australian bat Lyssavirus (ABLV) | Australia | Humanos Quirópteros insectívoros Quirópteros frugívoros |

que se producen cuando un individuo infectado se introduce en una población de huéspedes susceptibles. Dicha tasa ha sido calculada a partir de los datos obtenidos y el modelo epidemiológico propuesto por Anderson y May^{7,18}.

Resultados

Resultados serológicos

Los primeros resultados del estudio fueron publicados en 2002⁶. Se detectaron por primera vez anticuerpos anti-EBLV-1 en cuatro especies: *Miniopterus schreibersii* (familia *Miniopteridae*), *Myotis myotis* (familia *Vespertilionidae*), *Rhinolophus ferrumequinum* (familia *Rhinolophidae*) y *Tadarida teniotis* (familia *Molossidae*). Posteriormente, nuevos resultados se han obtenido mostrando que la mayor tasa de seroconversión corresponde a la especie *Myotis myotis* (ver tabla 2).

Presencia de material genético (ARN vírico)

El análisis de las fracciones celulares sanguíneas permitió comprobar por primera vez la presencia de ARN de *Lyssavirus* en sangre de mamíferos salvajes. Dicho hallazgo ha permitido ampliar la posibilidad de estudio de las infecciones por *Lyssavirus* en quirópteros.

Tabla 2

Resultados de los análisis sanguíneos de cuatro especies de murciélagos (periodo 1992-2007)

| ESPECIES | TÉCNICA | N | % POSITIVOS |
|----------------------------------|---------|-----|-------------|
| <i>Myotis myotis</i> | RFFIT | 729 | 38.27 % |
| | nRT-PCR | 373 | 5.63 % |
| <i>Miniopterus schreibersii</i> | RFFIT | 321 | 4.67 % |
| | nRT-PCR | 73 | 4.11 % |
| <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> | RFFIT | 282 | 4.26 % |
| | nRT-PCR | 133 | 17.29 % |
| <i>Tadarida teniotis</i> | RFFIT | 227 | 13.66 % |
| | nRT-PCR | 99 | 5.05 % |

Se detectó ARN de EBLV-1 en las fracciones celulares de *Myotis myotis*, *Rhinolophus ferrumequinum*, *Miniopterus schreibersii* y *Tadarida teniotis* (ver tabla 2).

Todos los cerebros analizados por inmunofluorescencia han sido negativos. Por el contrario, resultaron ser positivos por nRT-PCR: dos *Myotis myotis*, uno en cerebro y corazón y el otro en lengua; un *Myotis escalerai*, un *Miniopterus schreibersii* y un *Rhinolophus ferrumequinum* en cerebro; un *Rhinolophus ferrumequinum* en cerebro, corazón, lengua y pulmones; y finalmente, otro *Rhinolophus ferrumequinum* en faringe-esófago y pulmones⁶.

Dinámica temporal de EBLV-1

El modelo obtenido ha mostrado tasa de supervivencia constante en el tiempo, en ambas colonias, a pesar de existir evidencias de haberse producido infecciones víricas, tal como han demostrado las variaciones en la tasa de seroconversión y los análisis de la nRT-PCR. Los resultados obtenidos indican que la tasa de mortalidad no ha sido modificada por las epidemias cíclicas recurrentes y que la mortalidad inducida por la infección por EBLV-1 puede considerarse no significativa.

La tasa básica de reproducción de EBLV-1 en las colonias de *Myotis myotis* estudiadas es de $R_0 = 1,706$. Es la primera vez que se ha estimado el valor de R_0 de EBLV en una colonia de murciélagos⁷.

Discusión

La rabia de los quirópteros europeos ha generado un debate, entre los responsables de salud pública y de medioambiente, sobre el riesgo sanitario que conllevan los murciélagos y la gestión que debe realizarse con las colonias infectadas por *Lyssavirus*¹⁹. Para proporcionar dichas medidas de gestión y evaluar el riesgo sanitario es imprescindible realizar estudios de vigilancia activa y efectuar análisis de dinámica temporal de la infección como los realizados en el presente estudio. Los referidos análisis han de efectuarse a partir de una serie larga de observaciones en animales vivos. Para ello es necesario utilizar técnicas de estudio que no alteren la supervivencia de las colonias y sean lo sufi-

cientemente sensibles para detectar pequeñas concentraciones víricas como las halladas en nuestro trabajo. En dicho sentido, es aconsejable utilizar la técnica de la nRT-PCR en estudios epidemiológicos de EBLV en colonias de quirópteros. La detección de ARN de EBLV-1 en sangre de murciélagos es una nueva aportación de los estudios realizados, siendo una técnica complementaria a los análisis serológicos que aporta valiosa información epidemiológica.

El análisis de la dinámica temporal de EBLV-1 ha puesto de manifiesto la existencia de infecciones cíclicas en las colonias de *Myotis myotis*, en las cuales se producen oscilaciones periódicas en el número de murciélagos susceptibles, infectados e inmunes. Las infecciones cíclicas no modifican significativamente la tasa de supervivencia de las colonias. Cabe añadir que ninguno de los murciélagos capturados durante los 18 años de estudios rábicos presentaba conducta que pudiese ser relacionada con rabia. Así pues, la evaluación del riesgo de transmisión de *Lyssavirus* a humanos no puede efectuarse basándose en la mortalidad en las colonias o en las conductas anormales de los murciélagos. El modelo de dinámica temporal utilizado predice una tasa básica de reproducción de EBLV-1 baja y un corto período de infecciosidad durante el cual un murciélago puede infectar a otro individuo.

Los resultados obtenidos permiten efectuar una primera estimación del riesgo sanitario que suponen las colonias de *Myotis myotis* infectadas por EBLV-1. Teniendo en cuenta la rápida propagación de la infección en la colonia cuando un virus entra en una población susceptible, la existencia de infecciones cíclicas, la prolongada duración de la inmunidad y el corto período de infecciosidad, la probabilidad de transmisión es muy escasa para esta especie. Sin embargo, deben tomarse precauciones y evitar todo contacto con murciélagos, pues el riesgo potencial de transmisión a humanos no es nulo. Por dicha razón, los accesos a los refugios de *Myotis myotis* estudiados en Mallorca están actualmente restringidos gracias a las medidas tomadas por la Consejería de Medio Ambiente del Gobierno de las Islas Baleares.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a la Consejería de Medio Ambiente del Gobierno de las Islas Baleares, al Departamento de Medio Ambiente de la Diputación General de Aragón y a la Asociación Parque Cultural del Río Martín (Teruel) por haber facilitado la logística del estudio.

El estudio ha sido financiado por el Ministerio de Sanidad y Consumo y la Consejería de Salud y Consumo del Gobierno de las Islas Baleares.

Bibliografía

- Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 19 (3): 531-545.
- Arai YT, Kuzmin IV, Kameoka Y, Botvinkin D. New Lyssavirus Genotype from the Lesser Mouse-eared Bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. *Emerg Inf Dis* 2003; 9(3): 333-337.
- Kuzmin IV, Orciari LA, Arai YT, Smith JS, Hanlon CA, Kameoka Y, Rupprecht CE. Bat Lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. *Virus Res* 2003; 97(2): 65-79.
- McElhinney LM, Marston DA, Stankov S, Tu C, Black C, Johnson N, Jiang Y, Tordo N, Müller T, Fooks AR. Molecular epidemiology of lyssaviruses in Eurasia. Dodet B, Fooks AR, Müller T, Tordo N, and the Scientific & Technical Department of the OIE (eds): *Towards the Elimination of Rabies in Eurasia*. Dev Biol (Basel). 2008; 131:125-131.
- Sánchez Serrano LP. Rabia transmitida por murciélagos insectívoros en España. *Bol Epidemiol Semanal* 1999; 7:149-53.
- Serra-Cobo J, Amengual B, Abellán C, Bourhy H. *European bat Lyssavirus infection in Spanish bat populations*. *Emerg Inf Dis* 2002; 4: 413-420.
- Amengual B, Bourhy H, Lopez-Roig M, Serra-Cobo J. Temporal Dynamics of European Bat Lyssavirus Type 1 and Survival of *Myotis myotis* Bats in Natural Colonies. *PLoS ONE*, June 2007; 6 | e566.
- Vázquez-Morón S, Juste J, Ibáñez C, Ruiz-Villamor E, Avellón A, Vera M, Echevarría JE. Endemic Circulation of European Bat Lyssavirus Type 1 in Serotine Bats, Spain. *Emerg Inf Dis* 2008; 14(8): 1263-1266.
- Franka R, Johnson N, Müller T, Vos A, Neubert L, Freuling C, Rupprecht CE, Fooks AR. Susceptibility of North American big brown bats (*Eptesicus fuscus*) to infection with European bat lyssavirus type 1. *J Gen Virol*. 2008; 89(8): 1998-2010.
- Amengual B, Bourhy H, López-Roig M, Serra-Cobo J. Active Monitoring of EBLV Infection in Natural Colonies of the Mouse-eared Bat (*Myotis myotis*). Dodet B, Fooks AR, Müller T, Tordo N, and the Scientific & Technical Department of the OIE (eds): *Towards the Elimination of Rabies in Eurasia*. Dev Biol. (Basel) 2008; 131: 531-537.
- Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. 4th edition. Geneva: World Health Organization; 1996.
- Amengual B, Whitby JE, King A, Serra-Cobo J, Bourhy G. Evolution of *European bat lyssaviruses*. *J Gen Virol* 1997; 78: 2319-2328.
- Davis P, Holmes E, Larrous F, Poel WHM van der, Tjornehoj K, Alonso WJ, Bourhy H. The phylogeography, population dynamics and molecular evolution of *European bat lyssaviruses*. *J Virol* 2005; 79(16): 10487-10497.
- Bourhy H, Kissi B, Lafon M, Sacramento D, Tordo N. Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2419-2426.
- Mitchell-Jones AJ, Amori G, Bogdanowicz W, Krystufek B, Reijnders PJH, et al. *The Atlas of European Mammals*. London: Academic Press; 1999.
- Lebreton JD, Burnham KP, Clobert J, Anderson DR. Modelling survival and testing biological hypotheses using marked animals: a unified approach with case studies. *Ecol Monogr* 1992; 62: 67-118.
- White GC, Burnham KP. Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. *Bird Study* 1999; 46: 120-138.
- Anderson RM, May RM. *Infectious Diseases of Humans*. Oxford University Press 1991.
- Sánchez Serrano LP, Abellán García C. The new face of rabies in Spain: infection through insectivorous bats, 1987-2002. *Euro Surveill* 2003;7(27). <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2250>.