

5
núm.

DOCUMENTS

de recerca en salut



LYSSAVIRUS EN QUIRÒPTERS

Estudi de la ràbia de ratapinyades a les Illes Balears



Govern
de les Illes Balears



DOCUMENTS

de recerca en salut

LYSSAVIRUS EN QUIRÒPTERS: Estudi de la ràbia de ratapinyades a les Illes Balears



Govern de les Illes Balears
Conselleria de Salut i Consum
Direcció General d'Avaluació i Acreditació



**Govern
de les Illes Balears**

Edita:

Conselleria de Salut i Consum.

Direcció General d'Avaluació i Acreditació.

Amb la col·laboració de:

**"SA
NOS
TRA"**

CAIXA DE BALEARS

Autors:

Jordi Serra Cobo¹,

Blanca Amengual Pieras¹,

Marc López Roig¹ i Hervé Bourhy²

¹ Centre de Recerca en Infeccions
Víriques, Illes Balears (CRIVIB).

² Unité Dynamique des Lyssavirus et
Adaptation à l'Hôte, Institut Pasteur,
Paris, França.

Disseny, maquetació i impressió:

amadip.esment

Dip. legal: PM-2236-2008

ISSN: 1696-3415

ISBN: 978-84-606-4740-9

PRESENTACIÓ

És una gran satisfacció reprendre la sèrie de monografies **Documents de recerca en salut**, que crearem l'any 2003 des de la Direcció General d'Avaluació i Acreditació de la Conselleria de Salut i Consum. Poder continuar la col·lecció li dóna més valor en tant que és precisament el poder comptar amb sèries llargues de publicacions el que li imprimeix prestigi.

L'objectiu dels *Documents de recerca en salut* és recollir investigacions fetes al nostre medi, les Illes Balears o d'interès per a la nostra comunitat.

La primera etapa arrencà amb força, publicant dues monografies referides a la malaltia coronària (l'estudi CORSAIB i els resultats de l'Estudi Ibèrica) que omplien un camp on hi havia una gran mancança d'informació acurada: en el cas del CORSAIB ha servit per conèixer les prevalences poblacionals a les Illes Balears dels principals factors de risc cardiovasculars, i l'Estudi IBÈRICA ens donà a conèixer la incidència d'esdeveniments coronaris. Tots dos han tengut una àmplia repercussió en la planificació de serveis. Seguiren altres *Documents* sobre asma infantil i prevalença de càries i necessitat del seu tractament a les Illes Balears.

Volem seguir aquesta tasca, ja que consideram que és de gran utilitat per difondre resultats de recerca, amb major amplitud que el que permeten els articles de les revistes científiques (limitats generalment a 2.500 paraules).

En el *Documents de recerca en salut* s'hi poden trobar a més d'articles originals extensos, revisions bibliogràfiques d'interès, metanàlisis, sense limitar-la a la recerca mèdica, sinó de qualsevol disciplina relacionada amb la salut: biològica, mèdica, d'infermeria o recerca històrica, econòmica, sociològica, etcètera.

Obrim els documents a les iniciatives publicadores de societats científiques, a investigadors, a professionals de la salut i altres autors que creguin que poden fer una aportació de valor per a les nostres Illes.

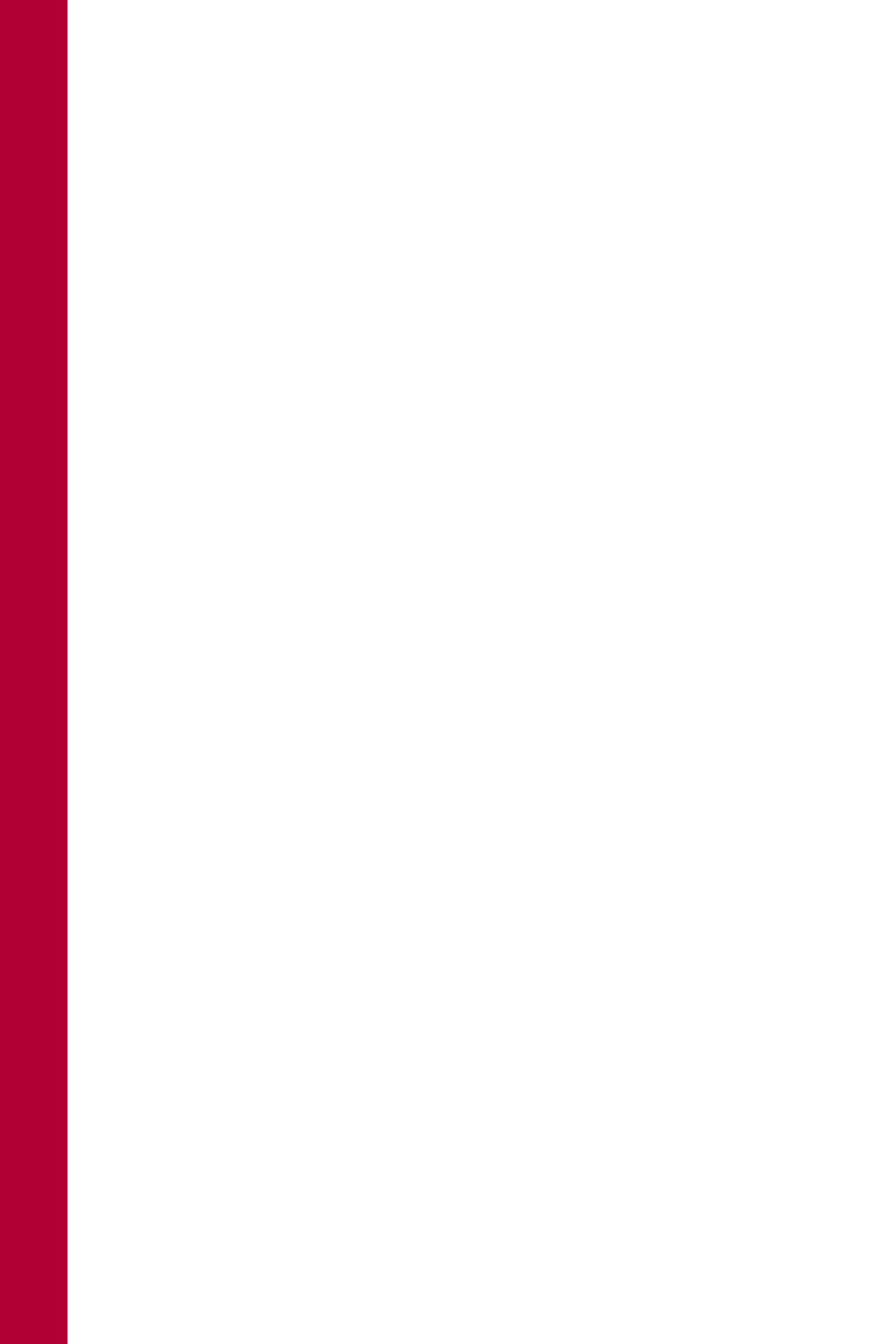
A més de l'edició en paper, ben aviat la col·lecció estarà disponible per poder ser descarregada en pdf en el **repositori institucional** del Sistema Públic de Salut de les Illes Balears, on s'arxivin els treballs, sempre respectant el *copyright*, com una forma d'afegir-nos al moviment *open acces*, que pretén deixar a la xarxa en obert el major nombre dels resultats dels treballs d'investigació.

Per últim afegir que en el *Document* present, els autors, liderats per Jordi Serra-Cobo han pogut resumir els coneixements existents i les principals troballes sobre el virus de la ràbia a les ratapinyades, que són conclusions d'estudis de seguiment de més de dotze anys de durada. La perseverança dels autors, la capacitat d'aconseguir finançament per dur les recerques a terme i el suport institucional que sempre els ha ofert el Govern de les Illes Balears, ens

ha portat a convidar-los a encetar aquesta nova etapa dels *Documents*, coincidint en la inauguració d'uns espais de recerca (Centre de Recerca en Infeccions Viriques de les Illes Balears —CRIVIB—) on poder centralitzar la seva tasca, que ha tengut el reconeixement de la OMS Europa i han despertat gran interès en centres de vigilància epidemiològica, com el Centre per al Control i la Prevenció de Malalties d'Estats Units (CDC).

Per últim agrair a Sa Nostra la seva obra social en favor de la recerca a les Illes Balears donant el seu suport per a la instal·lació del CRIVIB a l'Hospital General i per a l'edició d'aquesta monografia en concret.

Vicenç Thomàs i Mulet
Conseller de Salut i Consum



Agraïments

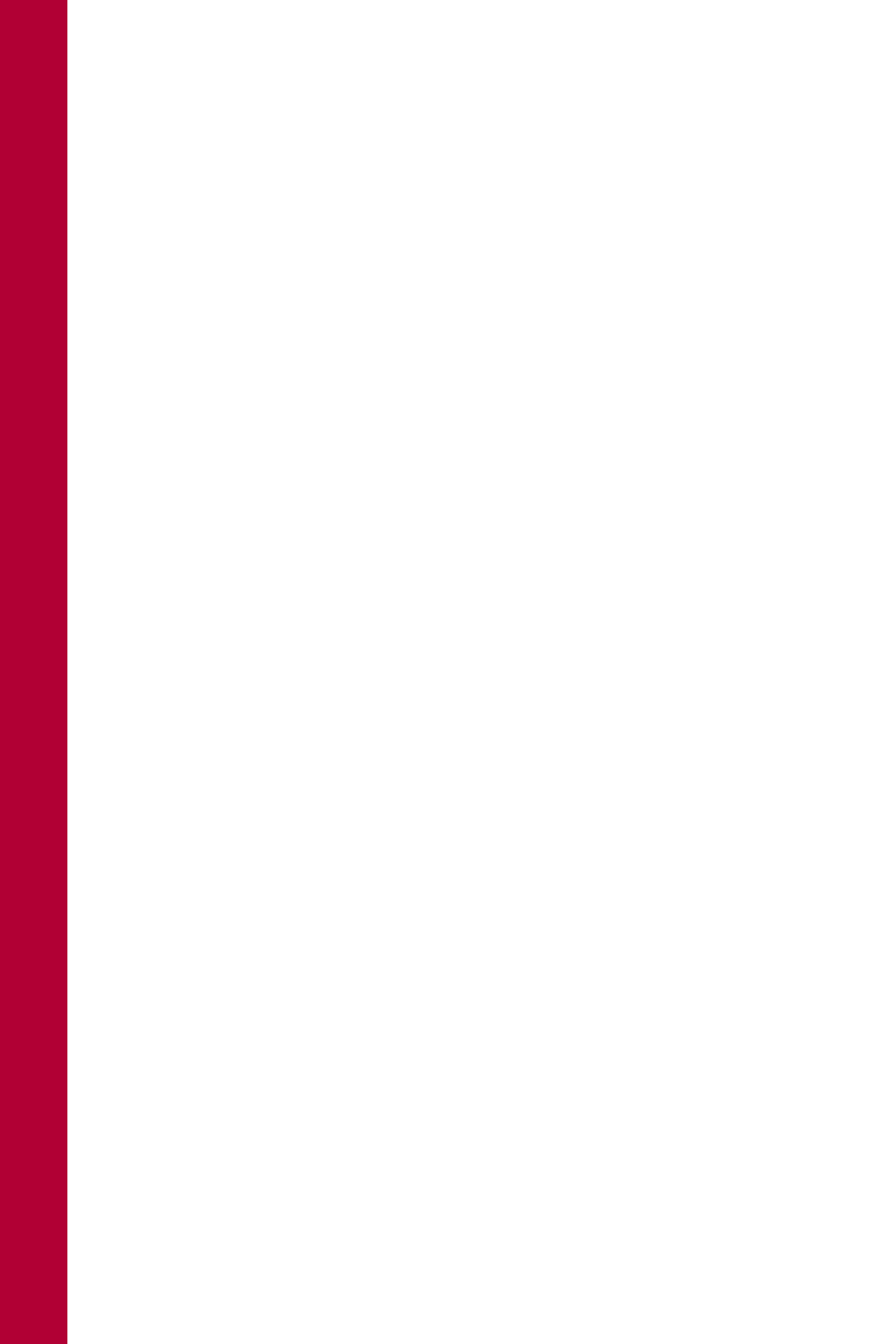
Els autors volen agrair als directors generals, Joan Crespí, Josep Pomar, Margalida Buades, Vicenç Thomàs, Jaume Orfila, Antoni Pallicer i Joan Llobera, la seva col·laboració i el suport logístic proporcionat al projecte. Igualment, volem donar les gràcies a Laurent Audry i Florence Larrous per la seva assistència tècnica i a Josep Márquez, Antònia Sánchez, Xavier Bayer, Cisco Guasch, Aurea Ripoll, Marta Torres i Oliver Mas per la seva col·laboració en els treballs de camp. També volem tenir un record especial per a Eudald Puigferrat pel seu calorós acolliment i la seva col·laboració incondicional.

**LYSSAVIRUS EN QUIRÒPTERS:
ESTUDI DE LA RÀBIA DE LES RATAPINYADES
DE LES ILLES BALEARS**

ÍNDEX

AGRAÏMENTS	7
<hr/>	
1. INTRODUCCIÓ	11
<hr/>	
1.1. Estructura general dels Lyssavirus	12
1.1.1. Morfologia dels Lyssavirus	12
1.1.2. Organització del genoma	12
1.1.3. Les proteïnes d'embolcall	14
1.1.4. La ribonucleoproteïna RNP	14
1.1.5. Els components del complex polimeràsic	15
1.2. Diversitat dels Lyssavirus	15
1.3. Evolució i adaptació dels Lyssavirus	17
1.4. El cicle infecciós	17
1.4.1. Paper de les proteïnes de l'embolcall en el procés de la invasió viral	17
1.4.2. Transcripció, traducció i replicació	18
1.4.3. Paper de les proteïnes en la formació del virió	18
1.4.4. Sortida dels virions infecciosos	19
1.5. Propagació viral dins l'organisme	19
1.6. Patogenicitat viral	20
1.7. Introducció als quiròpters	21
1.8. Taxonomia de l'ordre dels quiròpters	23
1.9. Antecedents de Lyssavirus en quiròpters	25
1.9.1. Lyssavirus en quiròpters d'Àfrica	25
1.9.2. Lyssavirus en quiròpters d'Amèrica	27
1.9.3. Lyssavirus en quiròpters d'Àsia	33
1.9.4. Lyssavirus en quiròpters d'Oceania	35
1.9.5. Lyssavirus en quiròpters d'Europa	35
1.10. Plantejament de l'estudi dels Lyssavirus en quiròpters de les Illes Balears.	40

2. MATERIAL I MÈTODES	41
2.1. Captura de ratapinyades i obtenció de mostres	41
2.2. Breu descripció de <i>Myotis myotis</i> (Borkhausen, 1797)	41
2.3. Recerques de laboratori	42
2.4. Anàlisi de les seqüències	43
2.5. Taxa de supervivència	43
2.6. Dinàmica temporal de la infecció per EBLV-1	43
3. RESULTATS	45
3.1. Ecologia de <i>Myotis myotis</i>	45
3.2. Fluctuació en el percentatge de ratapinyades seropositives	46
3.3. Presència d'ARN d'EBLV-1	48
3.4. Supervivència de <i>Myotis myotis</i>	51
3.5. Dinàmica temporal de la infecció d'EBLV-1	51
3.6. Altres espècies infectades per EBLV-1	51
3.7. Moviments estacionals	52
4. DISCUSSIÓ	56
5. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	60



1. INTRODUCCIÓ

Les ratapinyades són importants hostes reservori de virus d'ARN que poden travessar la barrera d'espècie per infectar humans, animals domèstics o altres mamífers salvatges no voladors (Calisher *et al.*, 2006). Bona part dels virus de les ratapinyades produeixen malalties considerades zoonosis emergents, per exemple la produïda pels *Lyssavirus*. Els nous casos de quiròpters infectats que es van detectant cada any, juntament amb la transmissió de *Lyssavirus* de quiròpters a persones, ha originat un debat en les autoritats sanitàries i els responsables mediambientals europeus sobre la perillositat que comporten les ratapinyades per a la salut pública. Els manipuladors de ratapinyades (quiropteròlegs, treballadors de centres de recuperació de fauna o de zoològics, espeleòlegs, agents de medi ambient, etc.) i els ha-

bitants de cases que allotgen colònies de quiròpters han de saber quines mesures preventives han de prendre per evitar l'exposició als *Lyssavirus* que les ratapinyades poden transmetre. Les esmentades mesures inclouen vacunacions, equipament de protecció personal, mesures higièniques, profilaxis ràbica postexposició o dosis recordatòries en cas d'haver estat prèviament vacunat. Alhora, s'haurien de proporcionar criteris sanitaris a les autoritats mediambientals perquè els tinguin en compte a l'hora de gestionar colònies infectades. Per poder estimar el risc real de transmissió i implementar mesures efectives, però alhora garantir la necessària conservació de les poblacions de ratapinyades, hem realitzat un estudi de 12 anys de durada. L'estudi ha estat promogut per la Conselleria de Salut i Consum i ha rebut el suport de la Conselleria de Medi Ambient del Govern de les Illes Balears.

Taula 1. Classificació de la Família Rhabdoviridae

Família: Rhabdoviridae

Gènere: *Vesiculovirus*

Exemple: virus de l'estomatitis vesiculosa (VSV)

Gènere: *Ephemerovirus*

Exemple: virus de la febre efímera bovina (FEB)

Gènere: *Lyssavirus*

Exemple: virus de la ràbia, soca Pasteur (PV)

Gènere: *Cytorhabdovirus*

Exemple: *Sonchus virus* (SonV)

Gènere: *Nucleorhabdovirus*

Exemple: virus del mosaic del blat de moro (MMV)

La ràbia és una malaltia neurotròpica causada per virus del gènere *Lyssavirus*, els reservoris dels quals són mamífers, principalment carnívors i quiròpters. La ràbia és una zoonosi emergent d'àmplia distribució mundial. Els *Lyssavirus* són virus d'ARN monocatenaris no segmentats, de polaritat negativa que pertanyen a la família dels *Rhabdoviridae* i a l'ordre dels Mononegavirals. Els rhabdovirus poden infectar gran varietat d'hostes, ja siguin espècies de vertebrats o d'invertebrats, així com diverses espècies de vegetals. Aquesta característica els permet tenir una àmplia distribució geogràfica i ser presents en tots els continents habitats (Shope i Tesh, 1987). Aquesta família consta de cinc gèneres (Wunner *et al.*, 1995), tres dels quals infecten animals: *Vesiculovirus*, *Ephemerovirus* i *Lyssavirus*, i dos gèneres que infecten plantes: *Cytorhabdovirus* i *Nucleorhabdovirus* (Taula 1).

1.1. ESTRUCTURA GENERAL DELS LYSSAVIRUS

1.1.1. Morfologia dels *Lyssavirus*

Els *Lyssavirus* són partícules embolcades en forma de bala de fusell, amb un diàmetre comprès entre 78 i 80 nm i una longitud que varia entre 180 i 200 nm (Wunner i Clark, 1980). De l'exterior cap a l'interior, es distingeix un embolcall manllevat de la cèl·lula durant el procés de gemmació, i després una nucleocàpsida (NC) helicoidal, forma-

da per un agrupament de proteïnes d'estructura i el genoma. L'embolcall està format per una membrana constituïda per una doble capa contínua de molècules lipídiques, on són immerses les proteïnes.

1.1.2. Organització del genoma

El genoma dels *Lyssavirus* està constituït per un bri d'ARN monocatenari no segmentat de polaritat negativa d'aproximadament 12.000 nucleòtids de longitud (Tordo *et al.*, 1986; Sokol *et al.*, 1969). A les extremitats del genoma es distingeixen dues regions curtes no codificants 3'leader i 5'trailler que enquadren 5 gens. Aquests codifiquen per a 5 proteïnes: la nucleoproteïna (N), la fosfoproteïna (P), la proteïna de matriu (M), la glicoproteïna (G) i l'ARN polimerasa (L) (Tordo i Poch, 1988). Als extrems de cada gen hi ha senyals d'iniciació i de terminació de la transcripció (Tordo *et al.*, 1986; Bourhy *et al.*, 1989). Els gens N, P, M i G estan separats per curtes seqüències intergèniques (di o pentanucleòtids). Entre els gens G i L hi ha una llarga regió intergènica de mida variable segons les soques (423 – 504 nucleòtids). Les proteïnes de *Lyssavirus* es poden classificar en tres grups funcionals: les proteïnes d'embolcall (G i M), la proteïna de nucleocàpsida (N) i el complex ARN polimerasa (L i P) (figura 1).

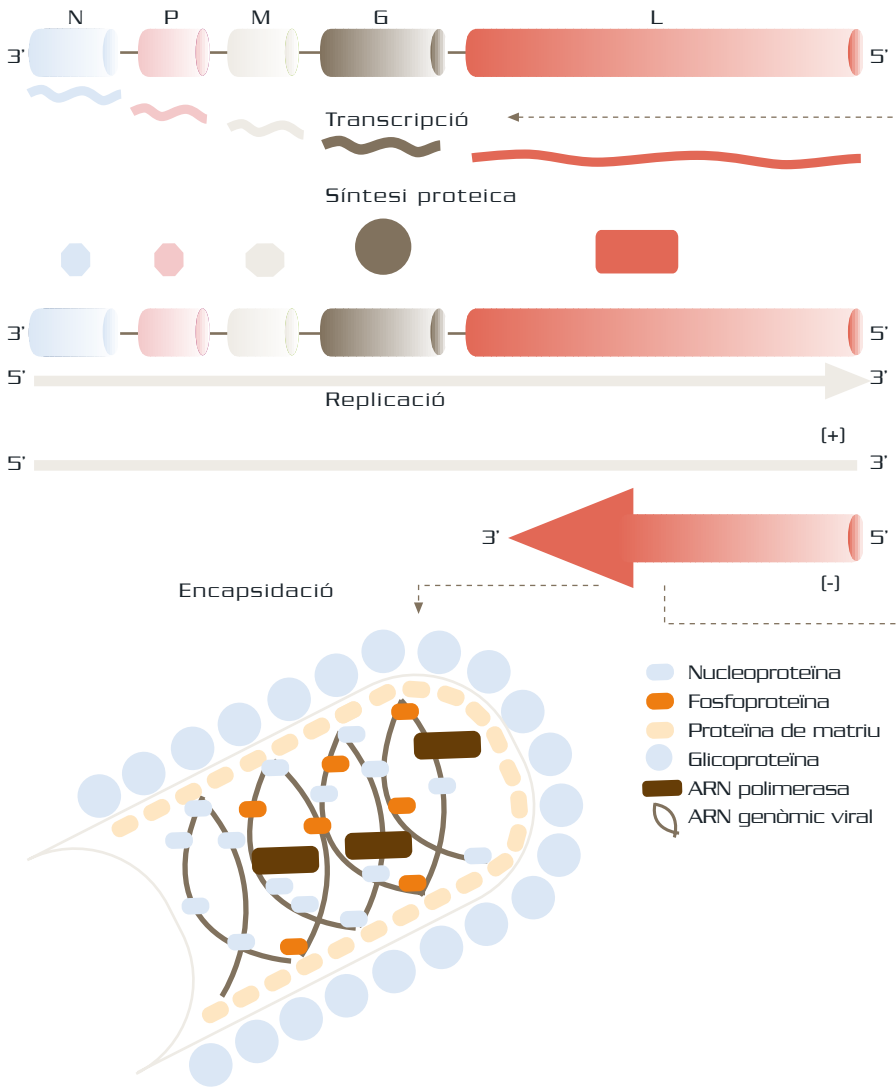


Figura 1. Organització molecular dels *Lyssavirus* (Amengual, 2005).

1.1.3. Les proteïnes d'embolcall

Els *Lyssavirus* posseeixen dues proteïnes d'embolcall, la glicoproteïna membranària de superfície i la proteïna de matriu localitzada sota la bicapa lipídica.

La glicoproteïna de superfície està ancorada dins la membrana externa del virió com a espícules de 6 – 10 nm formades per la projecció d'homotrímers de proteïnes G (unes 400 per partícula viral) (Gaudin *et al.*, 1992) (figura 1). La glicoproteïna G sembla ser un factor essencial en la patogenicitat del virus. La proteïna G és l'única proteïna viral que pot induir la síntesi d'anticossos neutralitzants que confereixen immunitat protectora contra la infecció letal produïda pel virus de la ràbia (Wiktor *et al.*, 1973; Cox *et al.*, 1977; Mac Farlan *et al.*, 1984; Foley *et al.*, 2000).

La proteïna de matriu consta de 202 aminoàcids i forma la membrana interna de la bicapa lipoproteica de l'embolcall viral (Tordo i Poch, 1988) (Figura 1). La proteïna M és multifuncional, està connectada a la bicapa lipídica i a la glicoproteïna per un costat, i a la nucleocàpsida per l'altre, on aquesta regula l'activitat transcripcional de l'ARN viral (Chong i Rose, 1993; Ogden *et al.*, 1986). La proteïna M juga un paper primordial en l'assemblatge i la sortida del virió a la superfície cel·lular (Lyles *et al.*, 1992).

1.1.4. La ribonucleoproteïna RNP

L'estructura interna del virió està constituïda per una ribonucleocàpsida helicoidal de 3,8 – 4,6 µm de longitud i de 30 a 35 ondulacions (Sokol *et al.*, 1969; Tordo i Poch, 1988) formades per l'ARN viral, proteïnes N, P, i L, així com altres proteïnes derivades de la cèl·lula hoste, com les quinases, proteïnes de xoc tèrmic o proteïnes associades al citoesquelet implicades probablement en la replicació i en interaccions virals amb la cèl·lula hoste (Kawai, 1977; Sagara *et al.*, 1995). La proteïna N és la principal component de la ribonucleocàpsida (Sokol i Koprowski, 1975). Es tracta d'una proteïna constituïda per 450 aminoàcids (Sokol i Clark, 1973; Tordo *et al.*, 1986) que es fixa a la molècula d'ARN viral neosintetitzat. L'ARN viral, lligat a la proteïna N, forma un complex ARN-N d'estructura helicoidal, de 9 nucleòtids per monòmer de N, que serveix de matriu al complex polimeràsic (Emerson, 1987; Keene *et al.*, 1981; Iseni *et al.*, 2000). La part C-terminal de la proteïna N està implicada en la fixació de la proteïna P o del complex P-L (Schoehn *et al.*, 2001). La fosforilació sembla jugar un paper important en la regulació i la replicació del virus de la ràbia. La seqüenciació del gen N dels *Lyssavirus* mostra una conservació excepcional de l'estructura primària i un elevat grau de similitud antigènica entre les nucleoproteïnes del virus ràbic clàssic i els altres genotips (Mannen *et al.*, 1991; Bourhy *et al.*, 1993; Kissi *et al.*, 1995). El gen N és el que s'ha utilitzat en els estudis moleculars sobre *Lyssavirus* realitzats a les Illes Balears.

1.1.5. Els components del complex polimeràsic

El complex ARN polimerasa ARN dependent dels *Lyssavirus* està constituït per dues proteïnes L i P, respectivament de 2142 i 297 aminoàcids, components menors de la ribonucleoproteïna (Kawai, 1977; Zaides *et al.*, 1979).

La proteïna P és una fosfoproteïna associada a la proteïna L (Dietzschold *et al.*, 1979; Chenik *et al.*, 1998). Posseeix una funció reguladora de la transcripció de l'ARN viral (Banerjee, 1987). A més, juga un paper important en el procés de replicació de l'ARN viral, i forma un "complex de retenció" amb la proteïna N, que permet desemascarar la funció replicativa i la síntesi d'una molècula d'ARN antigenòmic que servirà de matriu a la síntesi d'un ARN genòmic (Patton *et al.*, 1984).

La proteïna L és una ARN polimerasa ARN dependent. Es tracta d'un enzim multifuncional implicat en la transcripció, que inclou tant la iniciació i l'elongació dels transcrits com les modificacions cotranscripcionals dels ARN, com la metilació o la poliadenilació. L'activitat ARN polimerasa del viriò ràbic és molt feble (Kawai, 1977), però la seva activitat sembla augmentar quan el virus penetra dins la cèl·lula hoste (Bishop *et al.*, 1974).

1.2. DIVERSITAT DELS LYSSAVIRUS

Els estudis moleculars han posat de manifest la diversitat genètica dels *Lyssa-*

virus i han permès classificar-los en set genotips (taula 2) (Badrane *et al.*, 2001; Bourhy *et al.*, 1992; Kissi *et al.*, 1995; Gould *et al.*, 1998; Tordo *et al.*, 1993).

Quatre nous genotips, encara per catalogar, han estat aïllats aquests darrers anys en ratapinyades insectívores. El virus Aravan va ser trobat per primer cop l'any 1991 i aïllat a partir de *Myotis blythii* en la regió d'Osh, al Kirghyzstan, Àsia central (Arai *et al.*, 2003). Estudis filogenètics basats en seqüències del gen de la proteïna N han mostrat que el virus Aravan pertany al gènere *Lyssavirus* i és proper genèticament als genotips 4, 5 i 6, que circulen en els quiròpters d'Àfrica i Europa. L'any 2001 es va aïllar el virus Khujand al Tadjikistan. Estudis preliminars amb anticossos monoclonals anti-nucleocàpsida van mostrar que es tractava d'un nou serotip de *Lyssavirus*. Estudis més recents basats en les seqüències dels gens N, P i G dels virus Aravan i Khujand suggereixen que ambdós poden ser considerats com a nous genotips dins el gènere *Lyssavirus*. Utilitzant diferents mètodes filogenètics i comparant diverses parts dels genomes, s'arriba a la conclusió que el virus Khujand és proper al genotip 6, i el virus Aravan és més similar als genotips 4 i 5 (Kuzmin *et al.*, 2003).

A finals del 2003, es va publicar un article on es descrivien dos nous genotips descoberts a Rússia durant el 2002. El primer correspon al Irkut virus, un *Lyssavirus* aïllat en un

Murina leucogaster de l'est de Sibèria, a prop del llac Baikal. El segon, anomenat West Caucasian bat virus, s'ha aïllat a partir d'un *Miniopterus schreibersii* de l'oest de la serralada Caucàsica, a uns 100 km al sud-est de Krasnodar. Estudis filogenètics basats en seqüències del gen de la proteïna N mostren que el virus Irkut se situa

dins el subgrup dels genotips 4 i 5. El West Caucasian bat virus està més proper als genotips 2 i 3. Els autors reconeixen, però, que es necessiten seqüències més llargues per poder afinar més la situació filogenètica d'aquests dos nous genotips (Botvinkin *et al.*, 2003).

Taula 2. Diversitat genètica dels Lyssavirus.

Genotip	Distribució	Espècies animals	
1	Virus de la ràbia (RABV)	Àmpliament distribuït per tot el món, excepte Oceania i l'Antàrtida	Espècie humana Mamífers terrestres Quiròpters insectívors Quiròpters hematòfags Quiròpters nectarívors
2	Virus Lagos bat (LBV)	Àfrica	Quiròpters frugívors Quiròpters insectívors Moixos Cans
3	Virus Mokola (MOKV)	Àfrica	Espècie humana Moixos Cans Musaranyes Rosegadors
4	Virus Duvenhage (DUVV)	Àfrica	Espècie humana Quiròpters insectívors
5	<i>Lyssavirus</i> europeu de quiròpters tipus 1 (EBLV-1)	Europa	Espècie humana Quiròpters insectívors Ovelles Fagina Moix
6	<i>Lyssavirus</i> europeu de quiròpters tipus 2 (EBLV-2)	Europa	Espècie humana Quiròpters insectívors
7	<i>Lyssavirus</i> australià de quiròpters (ABLV)	Austràlia	Espècie humana Quiròpters insectívors Quiròpters frugívors
?	No identificat	Kyrgyzstan	<i>Myotis blythii</i> (quiròpter insectívor)
?	No identificat	Tadjikistan	<i>Myotis mystacinus</i> (quiròpter insectívor)
?	No identificat	Rússia	<i>Murina leucogaster</i> (quiròpter insectívor)
?	No identificat	Rússia	<i>Miniopterus schreibersii</i> (quiròpter insectívor)

1.3. EVOLUCIÓ I ADAPTACIÓ DELS *LYSSAVIRUS*

Les anàlisis filogenètiques realitzades a partir de seqüències nucleotídiques dels gens de la nucleoproteïna i de la glicoproteïna han mostrat que cada genotip està format per nombroses línies filogenètiques (Kissi *et al.*, 1995; Tordo *et al.*, 1993; Amengual *et al.*, 1997). Les diferents línies difereixen principalment en l'acumulació de substitucions sinònimes, és a dir, que no modifiquen la seqüència peptídica. Determinades línies agrupen soques aïllades en determinades àrees geogràfiques, o corresponen a una determinada espècie d'hoste a la qual estan adaptades (Smith i Orciari, 1995; Nadin-Davis *et al.*, 1994). La replicació dels virus d'ARN es caracteritza per la seva reduïda fidelitat en absència de sistemes de correcció i de reparació (Domingo i Holland, 1997). Els *Lyssavirus* presenten, en els teixits infectats, un conjunt d'estructures genètiques heterogèniques anomenades "quasi-espècies". Aquesta barreja d'ARN dins el mateix individu podria suposar un potencial adaptatiu important i la possibilitat de selecció ràpida de mutants (Mori-moto *et al.*, 1998; Kissi *et al.*, 1999). Malgrat tot, però, els gens de la nucleoproteïna i de la glicoproteïna romanen conservats al llarg de l'evolució. Són pocs els canvis d'aminoàcids que acompanyen els salts entre diferents espècies d'hoste (Bourhy *et al.*, 1999). Estudis recents mostren la baixa taxa de canvis evolutius que pre-

senta EBLV-1, una de les menors taxes de les observades als virus d'ARN (Davis *et al.*, 2005). Es desconeixen els avantatges selectius de la reduïda velocitat d'evolució dels *Lyssavirus*, però probablement podria facilitar el procés de coevolució entre aquests virus i certs hosts.

1.4. EL CICLE INFECCIÓS

Quan un viriò de la família *Rhabdoviridae* troba una cèl·lula hoste susceptible de ser infectada, tenen lloc una sèrie d'etapes que tenen com a resultat una progènie de virions i la mort de la cèl·lula. Les esmentades etapes són: l'adsorció, la penetració, l'obertura de la càpsida, la transcripció, la translació, la replicació, l'acoblament i la sortida.

1.4.1. Paper de les proteïnes de l'embolcall en el procés de la invasió viral

La glicoproteïna, situada en la superfície de la partícula vírica, juga un paper crucial en la fixació al receptor de membrana de la cèl·lula hoste. Existeixen diversos tipus de receptors que poden jugar un paper important en la fixació del virus (Perrin *et al.*, 1982; Wunner *et al.*, 1984; Superti *et al.*, 1986). La proteïna G del virus ràbic posseeix un domini que podria determinar la naturalesa neurotròpica del virus (Lentz *et al.*, 1984).

El virus, fixat a la membrana cel·lular, s'engloba en una vesícula i penetra dins la cèl·lula per endocitosi.

A continuació, la vesícula s'acidifica per la fusió amb lisosomes. Aquesta baixada de pH afavoreix la fusió de l'embolcall viral amb la membrana de la vesícula (Superti *et al.*, 1984; Tsiang i Superti, 1984) i permet l'alliberació de la ribonucleocàpsida directament dins el citoplasma. En aquest moment pot començar la transcripció.

1.4.2. Transcripció, traducció i replicació

Després de l'alliberament de la nucleocàpsida dins del citoplasma, l'ARN genòmic de polaritat negativa és transcrit i posteriorment replicat. La matriu de la transcripció i la replicació està constituïda per l'ARN encapsidat i no l'ARN nu, el genoma només presenta una desencapsidació molt local al pas del complex polimeràsic.

La síntesi de les proteïnes virals té lloc en zones cel·lulars riques en ribosomes. La nucleocàpsida, amb el genoma protegit de l'activitat ARNasa cel·lular per la nucleoproteïna, és transportada cap al soma neuronal, (Gosztonyi, 1986). Dins el pericarió, el genoma d'ARN de polaritat negativa es transcriu en 5 ARN missatgers monocistrònics, amb un cap metilat en les posicions 5' i poliadenilats codificant les 5 proteïnes: N, P, M, G i L (Tordo *et al.*, 1986; Bourhy *et al.*, 1989) (Figura 1). En fase més tardana, una concentració suficient de proteïnes virals assegura el pas de la transcripció cap a la replicació, és a dir, la síntesi de brins d'ARN antigenòmic de polaritat

positiva que serveixen de matriu per a la producció de noves generacions d'ARN genòmic de polaritat negativa.

La replicació comença després de la síntesi de les proteïnes virals (Davis i Wertz, 1982). La quantitat de proteïna N neosintetitzada regula aquest pas de la fase transcripcional a la fase replicativa (Patton *et al.*, 1984).

El pericarió i les parts proximals de les dendrites neuronals són llocs privilegiats per a l'òptima replicació del virus, encara que també s'han trobat zones d'ensamblatge a segments axonals proximals. Això no obstant, les condicions de síntesi de virus als àxons neuronals no són òptimes i la majoria de virus produïts són partícules defectives.

Estudis de microscòpia electrònica i immunohistoquímica han mostrat infeccions de cèl·lules de la glia, astròcits, oligodendròcits i cèl·lules de Schwann (Gosztonyi, 1994). També s'han trobat partícules virals a l'interior de cèl·lules de la microglia i a macròfags després de la fagocitosis.

1.4.3. Paper de les proteïnes en la formació del virió

La síntesi i l'ensamblatge de la nucleocàpsida tenen lloc al compartiment citosòlic, mentre que la formació de l'embolcall es desenvolupa dins orgànuls membranosos, com el reticle endoplasmàtic llis, reticle endoplasmàtic rugós, embolcall nuclear o vacúols citoplasmàtics.

Les glicoproteïnes virals són sintetitzades en el reticle endoplasmàtic rugós. El procés de maduració succeeix a l'aparell de Golgi abans del transport de la glicoproteïna cap a la superfície cel·lular. La formació de l'embolcall viral resulta de la inserció de les proteïnes G i M en la bicapa lipídica.

La incorporació de la nucleocàpsida a l'interior de l'embolcall és una etapa crucial en l'etapa de l'assemblatge del virus. Durant aquest procés, l'interior del futur embolcall viral comunica lliurement amb el citosol, la qual cosa permet la interacció de la glicoproteïna associada a la membrana amb la nucleocàpsida per mitjà de la proteïna de matriu. Aquesta posseeix un doble rol, important durant la maduració. És capaç d'inhibir la transcripció i la replicació al final de la maduració viral (Carrol i Wagner, 1979; De *et al.*, 1982; Ogden *et al.*, 1986; Shipley *et al.*, 1988). La proteïna de matriu també provoca una condensació de la ribonucleoproteïna i de la glicoproteïna a nivell del lloc de gemmació viral a la superfície cel·lular (Odenwald *et al.*, 1986).

La fosfoproteïna estabilitza la interacció entre la seqüència motriu de l'ARN genòmic i la polimerasa. També actua juntament amb la nucleoproteïna durant l'encapsidació (De i Banerjee, 1984).

L'ARN polimerasa ARN depenent posseeix nombroses activitats enzimàtiques, com ara la síntesi d'ARN (Ongradi *et al.*, 1985), la metilació (Hammond i Lesnaw, 1987; Hercyk *et al.*, 1988), la

fosforilació (Chattopadhyay i Banerjee, 1987), la metilació en posició 5' i la poliadenilació (Hunt *et al.*, 1988).

1.4.4. Sortida dels virions infecciosos

Les ribonucleocàpsides s'embolcallen a nivell de la membrana cel·lular i les partícules infeccioses s'alliberen per gemmació.

1.5. PROPAGACIÓ VIRAL DINS L'ORGANISME

La transmissió del virus s'efectua per contaminació de les mucoses o per ferida (esgarrapada, mossegada, llepada d'una nafra, etc.). La transmissió experimental de ràbia per aerosols es coneix en animals de laboratori des de 1938. A la natura també s'ha descrit la transmissió per aerosols a l'interior de coves amb una gran concentració de *Tadarida brasiliensis* infectats per *Lyssavirus* (Constantine, 1967; Constantine, 2001). Després de la replicació local dins les cèl·lules musculars (Fekadu i Shaddock, 1984) o penetració directa dins les cèl·lules nervioses perifèriques (Kucera *et al.*, 1985; Shankar *et al.*, 1991) el virus avança seguint el flux axoplasmàtic centripet (Tsiang *et al.*, 1989) des de les vies sensorials i motrius (Coulon *et al.*, 1989) fins al sistema nerviós central. Aquesta propagació es realitza per transport intraaxonal i transferència transneuronal dendroaxonal. Aquest mecanisme consisteix en una transferència de les nucleocàpsides de les terminacions

dendrítiques d'una neurona cap a la terminació axonal de la neurona adjacent sense replicació prèvia (Tsiang *et al.*, 1989). El transport per flux axoplasmàtic retrògrad condueix les nucleocàpsides de la terminació axonal cap al soma neuronal (pericarió). Diferents estudis sobre l'avanç seqüencial del virus dins les diferents estructures nervioses suggereixen que la implicació de les fibres motrius i/o sensorials en el transport viral està en funció de l'espècie animal, de la via d'inoculació i de la soca viral utilitzada. El líquid cefaloraquídi també ha estat considerat com a vehicle de transport pel virus. En ratolins, les cèl·lules de l'epèndima i les neurones adjacents al canal central de la medulla espinal s'infecten precoçment després de la inoculació intracerebral amb elevades dosis de virus CVS (Jackson i Reimer, 1989).

El virus colonitza les diferents zones cerebrals i, simultàniament, el flux axoplasmàtic comporta un moviment centrífug de la infecció cap als nervis perifèrics. Malgrat que els *Lyssavirus* es caracteritzen per una afinitat molt marcada pels teixits nerviosos, en fase final d'infecció poden, igualment, replicar-se a cèl·lules musculars esquelètiques i a glàndules salivals, i permeten així la transmissió de la infecció a un altre hoste (Charlton i Casey, 1981). La presència de l'antigen ha estat demostrada, a més, a glàndules lacrimals, fol·licles pilosos, mucoses bucal, nasal i intestinal, ronyons, pàncrees, pulmons i teixit adipós bru interescapular (Charlton,

1988). La naturalesa d'aquests teixits no nerviosos varia segons les espècies hostes i la soca inoculada. En tot cas, aquests teixits tenen un paper molt important en el cicle biològic de la infecció, perquè constitueixen els punts externs de producció de partícules infeccioses i condicionen la transmissió de la infecció.

La patogènia originada pels serotips 2, 3, 4, 5, 6 i 7 és similar a la causada pel virus ràbic del serotip 1, tant pel que fa a la transmissió, la utilització dels nervis perifèrics per accedir al sistema nerviós central i la replicació viral dins les neurones, com en el desencadenament d'encefalitis, la disseminació neuronal perifèrica i la infecció dels teixits no nerviosos.

1.6. PATOGENICITAT VIRAL

Diferents estudis revelen que mutacions en la regió III de la glicoproteïna afecten la patogènesi viral (Dietzschold *et al.*, 1983; Seif *et al.*, 1985). La mutació antigènica en la posició 333 de la regió III comporta una pèrdua completa de virulència per substitució de l'arginina 333 per una glicina, glutamina, leucina, isoleucina, metionina, cisteïna, serina o àcid glutàmic (Coulon *et al.*, 1982). La presència d'un aminoàcid carregat positivament (arginina o lisina) en posició 333 és essencial per a la invasió viral de les cèl·lules neuronals (Tuffereau *et al.*, 1989). Anàlisis filogenètiques distingeixen set genotips, que poden ser dividits en dos grans filogrupos. El filogrup I comprèn el genotip 1 (virus de ràbia

clàssica), el genotip 4 (Duvhage virus), el genotip 5 (EBLV-1), el genotip 6 (EBLV-2) i el genotip 7 (ABLV). El filogrup II comprèn el genotip 2 (Lagos bat virus) i el genotip 3 (Mokola virus)

(Badrane *et al.*, 2001). Els virus del filogrup I són patògens per al ratolí per via intracerebral o intramuscular, mentre que els virus del filogrup II només són patògens per via intracerebral. El residu R333 (arginina) de la glicoproteïna, essencial per a la virulència, ha estat naturalment substituït per un D333 (àcid aspàrtic) en els virus del filogrup II, la qual cosa explicaria la seva atenuada patogenicitat. Dins cada filogrup la seqüència d'aminoàcids de l'ectodomini de la glicoproteïna té una similitud de, com a mínim, el 74%. Pel que fa als anticossos antiglicoproteïnes mostren neutralització creuada. Entre filogrups, la similitud és menor del 64,5% i no hi ha neutralització creuada, i és per això que la vacuna de la ràbia clàssica (filogrup I) no protegeix contra els virus del filogrup II (Badrane *et al.*, 2001).

A més de les diferents mutacions, l'espècie, l'edat i l'estat immunològic dels animals poden influir en l'evolució de la infecció vírica (Coulon *et al.*, 1982).

1.7. INTRODUCCIÓ ALS QUIRÒPTERS

Les ratapinyades són mamífers placentaris (euteris) capaços de volar. Totes les espècies de ratapinyades constitueixen l'ordre dels quiròpters, nom d'origen grec que significa mans

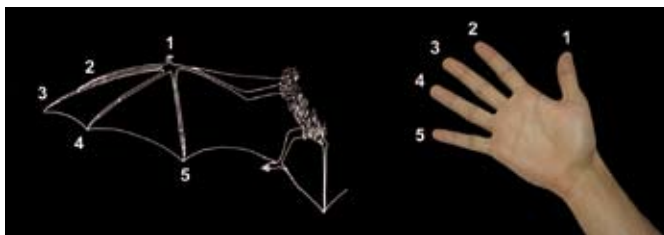


Figura 2. Comparació entre la mà d'un quiròpter i la d'una persona. El dit polze és l'únic que és curt i no està inclòs en l'ala de les ratapinyades.

alades (keir = mà, pteron = ala) (Figura 2). És un grup de mamífers relativament antic que va aparèixer al nostre planeta fa uns 65 milions d'anys quan els continents eren molt més a prop els uns dels altres. Aquest fet hauria facilitat l'expansió dels quiròpters a la major part del planeta a excepció de les regions polars. Trobam ratapinyades als oasis dels deserts, a les selves tropicals i subtropicals, a les planes properes al mar o a les serralades de muntanyes relativament altes, a les illes allunyades dels continents, a les regions temperades o a les regions boreals (Figura 3). El grup dels quiròpters s'ha diversificat molt en el decurs de la seva història evolutiva. Així doncs, no és estrany que trobem un ampli ventall d'espècies adaptades a un variat espectre d'hàbitats i de recursos alimentaris. Actualment, es coneixen més de 1.100 espècies arreu del món i constitueixen aproximadament el 20 % de totes les espècies de mamífers conegudes. Cada any es descriuen noves ratapinyades, que es descobreixen no tant sols a les regions tropicals i subtropicals, sinó també a les regions temperades (Serra-Cobo *et al.*, 2007a i b).



Figura 3. Els quiròpters es distribueixen en tots els continents a excepció de les regions polars i s'han adaptat a un ampli ventall d'hàbitats.

L'acusada variació climàtica estacional de les zones temperades condiona el ritme anual de les ratapinyades. Les espècies que habiten en aquestes regions (com per exemple les ratapinyades de les Illes Balears) presenten un cicle anual que ha d'afrontar un període fred i un període més benigne. Així doncs, els requeriments ecològics dels quiròpters varien en funció de l'època de l'any, fet que comporta la utilització de diferents refugis segons l'estació. Trobam refugis d'hibernació, de primavera, de tardor i d'estiu. Alhora els refugis d'estiu poden ser de cria i allotjar sols femelles adultes amb alguns juvenils i cries o bé refugis de mascles sols. Per sobreviure al període fred, en el qual hi ha pocs recursos alimentaris, els quiròpters hibernen, és a dir, disminueixen el seu metabolisme

per gastar pocs recursos energètics. Els refugis d'hibernació solen tenir humitat elevada i temperatura relativament baixa i força constant. Durant la hibernació, les ratapinyades disminueixen la temperatura corporal, els ritmes cardíac i respiratori per tal de reduir la despesa energètica metabòlica i sobreviure amb les reserves de greix que han acumulat en el decurs de la tardor (Serra-Cobo *et al.*, 2000a). Els refugis d'estiu són càlids i solen ser influenciats per les condicions ambientals exteriors. Les localitats de primavera i de tardor tenen temperatures intermèdies entre les dels refugis d'hibernació i de reproducció.

Les ratapinyades són els únics mamífers adaptats al medi aeri. Realitzen veritables vols batuts, similars als que efec-

tuen les aus. Els vols dels quiròpters no són comparables als efectuats per altres grups de mamífers com els marsupials, els dermòpters i els rosegadors, que tant sols realitzen vols curts i planejats. Les adaptacions al vol que presenten els quiròpters i les aus mostren analogies anatomicofuncionals entre ambdós grups, fruit de processos de convergència evolutiva de quiròpters i aus per l'exploració del medi aeri.

L'aparell circulatori també mostra certes adaptacions, com el fet que les artèries estan proveïdes de vàlvules que impedeixen el reflux de la sang, característica pròpia de les venes. D'altra banda, les venes alars són capaces de realitzar moviments de contracció per tal d'impulsar la sang, gràcies al teixit muscular que les envolta. Les característiques de l'aparell circulatori dificulten molt l'obtenció de mostres sanguínies per a anàlisis. El ritme cardíac és molt variable, i és directament proporcional a la temperatura ambient i a l'estat de l'individu. En fase d'activitat nocturna, el cor dels microquiròpters pot batejar fins a 900 o 1.000 batecs per minut. Durant el torpor diürn disminueix dràsticament fins a 40 o 80 batecs per minut. Aquest ritme és encara menor en el període d'hibernada.

Els sentits millor desenvolupats són l'oïda i l'equilibri. Per això l'oïda interna, l'àrea de l'escorça cerebral responsable de l'audició i el cerebel han adquirit un considerable desenvolupament. La laringe, proveïda de gran musculatura, és la responsable de

l'emissió dels ultrasons, i és un òrgan fonamental en la vida dels quiròpters.

Les singulars adaptacions al vol, el desenvolupament d'un sofisticat sistema de sonar en la majoria d'espècies i el tipus de recursos alimentaris que capturen, fan dels quiròpters un dels grups de vertebrats amb major valor ecològic. La majoria de les ratapinyades europees depreden grans quantitats d'insectes i contribueixen a regular les poblacions d'artròpodes. La importància ecològica dels quiròpters justifica que la Unió Europea hagi inclòs tots els quiròpters en l'annex 1 d'espècies d'interès comunitari que requereixen protecció estricta. També les legislacions ambientals balears i espanyola protegeixen totes les ratapinyades.

1.8. TAXONOMIA DE L'ORDRE DELS QUIRÒPTERS

Tradicionalment, les dades morfològiques indicaven la monofília de l'ordre dels quiròpters i dels dos subordres, Megachiroptera i Microchiroptera, implicant un únic origen del sistema d'ecolocalització i de vol en quiròpters. Recentment, estudis moleculars han confirmat la monofília de l'ordre, però han revelat la sorprenent estreta relació entre la família dels rinolòfids i els megaquiròpters, i suggereixen per tant orígens múltiples de l'ecolocalització dins dels quiròpters o bé un únic origen de l'ecolocalització amb la posterior pèrdua per part dels megaquiròpters (Baker *et al.*, 1997; Teeling *et al.*, 2000, 2002, 2003; Volleth *et al.*,

2002). Estudis filogenètics més aprofundits (Teeling *et al.*, 2005) divideixen el monofilètic ordre dels quiròpters en dos subordres i 5 superfamílies, mostrant els microquiròpters parafilètics (Taula 3). Utilitzant una completa filogènia interfamiliar, s'ha estudiat l'origen dels quiròpters. Els fòssils més antics daten de principis de l'eocè i ja presentaven ecolocalització i capacitat de volar. S'han realitzat reconstruccions geogràfiques d'ancestres a partir d'estudis morfològics de quiròpters extingits i actuals i d'anàlisis moleculars. Els resultats de les reconstruccions suggereixen que els quiròpters s'originaren en terres de Laurasia (Teeling *et al.*, 2005) durant el principi del paleocè fa uns 65 milions d'anys (correspon

al final de la separació de Pangea en dos grans continents, Laurasia i Gondwana, els mamífers comencen a dominar). Sovint s'havia dit que l'origen dels quiròpters actuals podia ser a l'hemisferi sud, però aquestes afirmacions es basaven en la distribució i la màxima diversitat actuals, idees que han quedat desfasades davant dels recents estudis filogenètics. Sembla ser que el subordre Yinpterochiroptera té origen asiàtic i, que des de la seva diversificació a finals del paleocè, ha tingut una distribució exclusivament per l'antic món. En canvi, la història biogeogràfica del subordre Yangochiroptera és més difícil d'interpretar a causa de la seva àmplia distribució mundial (Teeling *et al.*, 2005).

Taula 3. Classificació de l'ordre dels quiròpters, segons Teeling *et al.* (2005).

Ordre Chiroptera

Subordre Yinpterochiroptera

- Superfamília Pteropoidea
 - Família Pteropodidae
- Superfamília Rhinolophoidea
 - Família Rhinolophidae
 - Família Megadermatidae
 - Família Craseonycteridae
 - Família Rhinopomatidae

Subordre Yangochiroptera

- Superfamília Emballonuroidea
 - Família Emballonuridae
 - Família Nycteridae
- Superfamília Noctilionoidea
 - Família Phyllostomidae
 - Família Mormoopidae
 - Família Noctilionidae
 - Família Furipteridae
 - Família Thyropteridae
 - Família Mystacinidae
 - Família Myzopodidae
- Superfamília Vespertilionoidea
 - Família Vespertilionidae
 - Família Molossididae
 - Família Natalidae
 - Família Miniopteridae

1.9. ANTECEDENTS DE *LYSSAVIRUS* EN QUIRÒPTERS

La ràbia en quiròpters representa poc menys del 5% de la ràbia animal diagnosticada en el món (Bourhy, 2003). Les anàlisis filogenètiques distingeixen 7 genotips de *Lyssavirus* que infecten quiròpters (genotips 1, 2, 4, 5, 6, 7 i 8). S'ha descrit el pas de tres d'aquests de ratapinyades cap a mamífers no voladors (genotips 1, 2 i 5). Alhora, el pas de virus dels quiròpters cap a l'home s'ha descrit en 5 dels 7 genotips (genotips 1, 4, 5, 6, 7), la qual cosa representa un risc per a la salut pública. L'escàs nombre d'humans infectats detectats mostra que la probabilitat d'aquest passatge sembla ser reduïda. La situació epidemiològica, però, pot canviar davant noves variants virals que poden aparèixer i presentar una infecciositat superior per a l'home. És el cas que actualment s'està vivint als Estats Units d'Amèrica, on variants virals d'origen recent que circulen en dues espècies de quiròpters (*Lasionycteris noctivagans* i *Pipistrellus subflavus*) són responsables del 70% dels casos humans (Mondul *et al.*, 2003).

Durant anys, els continents en els quals s'havia trobat virus de la ràbia a quiròpters no hematòfags eren Amèrica, Àfrica, Àsia i Europa (Grauballe, *et al.*, 1978; Schneider, 1982; King i Crick, 1988; Lafon i Sureau, 1988; Brass, 1994). Fins al 1996, Austràlia era l'únic continent considerat lliure de ràbia. A partir d'aquest any es va

constatar la presència de quiròpters infectats per *Lyssavirus*, i posteriorment es començaren a diagnosticar mega i microquiròpters infectats. La ràbia en quiròpters hematòfags o vampirs només existeix en la zona intertropical d'Amèrica, compresa entre el nord de Mèxic i el nord d'Argentina (Bourhy, 2003).

El següent apartat comenta sintèticament la situació epidemiològica actual dels *Lyssavirus* en quiròpters en els diferents continents i dona a conèixer alguns dels estudis realitzats. L'objectiu de l'apartat és proporcionar una visió general de la infecció per *Lyssavirus* als quiròpters, zoonosi present als cinc continents que encara causa greus problemes sanitaris a un ampli sector de la població humana. L'aproximació de l'estat actual de la ràbia de ratapinyades al món permet enquadrar i valorar millor els estudis que s'estan realitzant a les Illes Balears.

1.9.1. *Lyssavirus* en quiròpters d'Àfrica

S'han trobat dos genotips de *Lyssavirus* a Àfrica: el genotip 2 (virus Lagos Bat) i el genotip 4 (virus Duvenhage) en quiròpters frugívors i insectívors, respectivament (taula 4).

El virus Lagos Bat va ser aïllat per primera vegada a Nigèria a l'any 1956 (Boulger i Porterfield, 1958) a partir de la guineu voladora *Eidolon helvum*, però no va ser fins a l'any 1970 que va ser identificat com un rbdovirus, anti-

gènicament proper al virus de la ràbia (Shope *et al.*, 1970). El virus Lagos Bat no ha estat mai aïllat en l'home. El seu reservori animal sembla estar constituït per poblacions africanes de quiròpters frugívors de les següents espècies: *Eidolon helvum*, *Epomophorus wahlbergi* i *Micropteropus pusillus*.

L'any 1970, un home del districte de Warmbaths, a 100 km al nord de Pretòria, Sudàfrica, va morir de ràbia cinc setmanes després d'haver estat

mossegat per una ratapinyada insectívora, possiblement un *Miniopterus schreibersii* (Van Der Merwe, 1982). El virus aïllat en l'encèfal de la víctima va resultar ser un nou *Lyssavirus*, anomenat Duvenhage en record de la víctima (Meredith *et al.*, 1971; Tignor *et al.*, 1977). El virus Duvenhage infecta espècies de quiròpters insectívors (*Nycteris thebaica* i *Miniopterus schreibersii*). Malauradament es té poc coneixement de la distribució dels *Lyssavirus* en quiròpters africans.

Taula 4. Casos de ràbia coneguts de virus Lagos bat i virus Duvenhage fins al 1993 (Swanepoel *et al.*, 1993).

Espècies afectades	Nre.	Data	Localitat	Referències bibliogràfiques
Virus Lagos bat				
<i>Eidolon helvum</i> (quiròpter frugívor)	1	1956	Lagos, Nigèria	Boulger i Porterfield, 1958 Shope <i>et al.</i> 1970
<i>Micropteropus pusillus</i> (quiròpter frugívor)	1	1974	Rep.Centre Africana	Sureau <i>et al.</i> , 1977 Sureau <i>et al.</i> , 1980
<i>Epomophorus wahlbergi</i> (quiròpter frugívor)	3	1980	Sudàfrica	Crick <i>et al.</i> , 1982 Meredith i Standing, 1981
Moix	1	1982	Sudàfrica	King i Crick, 1988
<i>Nycteris gambiensis</i> (quiròpter insectívor)	1	1985	Senegal	Anonymous, 1985
<i>Eidolon helvum</i> (quiròpter frugívor)	1	1985	Senegal	Anonymous, 1985
Moix	1	1986	Zimbabwe	King i Crick, 1988 Foggin, 1988
<i>Epomophorus wahlbergi</i> (quiròpter frugívor)	1	1990	Sudàfrica	Swanepoel, 1995
Ca	1	1989	Etiòpia	Mebatsion <i>et al.</i> , 1992
Virus Duvenhage				
Humà	1	1970	Sudàfrica	Meredith <i>et al.</i> , 1971 Tignor <i>et al.</i> , 1977
<i>Miniopterus schreibersii</i> (quiròpter insectívor)	1	1981	Sudàfrica	Schneider <i>et al.</i> , 1985
<i>Nycteris thebaica</i> (quiròpter insectívor)	1	1986	Zimbabwe	Foggin, 1988

Taula 5. Prevalença de ràbia en quiròpters analitzats a l'estat del Colorado des de 1977 fins al 1996 (Pape *et al.*, 1999).

Espècies	Van mossegar humans (% amb ràbia)	No van mossegar humans (% amb ràbia)	Nre. ratapinyades analitzades (% amb ràbia)
<i>Eptesicus fuscus</i>	122 (27%)	2.013 (16%)	2.135 (17%)
<i>Myotis sp.</i>	35 (14%)	722 (6%)	757 (7%)
<i>Lasionycteris noctivagans</i>	28 (14%)	628 (5%)	656 (5%)
<i>Lasiurus cinereus</i>	13 (77%)	452 (39%)	465 (40%)
<i>Myotis evotis</i>	8 (88%)	38 (21%)	46 (33%)
<i>Tadarida brasiliensis</i>	0	41 (12%)	41 (12%)
<i>Lasiurus borealis</i>	1 (100%)	25 (8%)	26 (12%)
<i>Antrozous pallidus</i>	0	21 (5%)	21 (5%)
<i>Nyctinomops macrotis</i>	2 (50%)	19 (11%)	21 (14%)
<i>Plecotus townsendii</i>	1 (0%)	13 (0%)	14 (0%)
No identificats	23 (35%)	265 (9%)	288 (11%)
Total	233 (30%)	4.237 (14%)	4.470 (15%)

Recentment, es va confirmar la infecció per DUVV d'un home de 77 anys, que va ser esgarrapat a la cara per un ratpenat insectívor al febrer de 2006, a North West Province, Sudàfrica, a uns 80 km de la localitat on havia tengut lloc la primera infecció per DUVV, 36 anys enrere. El ratpenat va entrar a l'habitació durant la nit, i es va deixar caure sobre les olleretes de l'home, que se'l va espolsar per fer-lo fora. El ratpenat es va escapar i l'home, sense cap mossegada, no es va curar l'esgarrapada ni va rebre tractament postexposició. Passats 27 dies es va trobar malament i va rebre medicació antigripal, però no va millorar i va ser ingressat amb molta febre, taquicàrdia i rigidesa de coll i extremitats.

El seu estat general va anar empitjorant encara més fins que va necessitar sedació i ventilació mecànica. Va morir 14 dies després de l'inici de la malaltia. Anàlisi de la saliva (recollida durant el procés de la malaltia) i de mostres de cervell (recollides postmortem) varen confirmar la identitat de l'agent patogen com a DUVV.

1.9.2. *Lyssavirus* en quiròpters d'Amèrica

Les infeccions víriques de ràbia clàssica al continent americà són comunes en quiròpters insectívors i hematòfags i, en menor grau, en quiròpters frugívors.

A l'any 1954 es detectà per primera vegada, als Estats Units d'Amèrica, virus del serotip 1 en un quiròpter insectívor. Posteriorment, estudis realitzats a Califòrnia en els anys setanta varen descriure ràbia a quiròpters de les espècies *Myotis thysanodes*, *Lasiurus ega*, *Eumops perotis* i *Euderma maculatum* (Medeiros i Heckmann, 1971; Constantine i Herbenick, 1979).

A finals dels anys 90 es realitzaren estudis per tal d'analitzar la prevalença de ràbia en quiròpters que havien estat en contacte amb humans. Es prengueren dades del període comprès des de 1977 fins a 1996 (Taula 5). L'objectiu era valorar el risc de transmissió de ràbia que suposen els quiròpters a l'estat de Colorado (Estats Units d'Amèrica), així com caracteritzar els contactes entre humans i quiròpters. Es va diagnosticar ràbia en 685 (15%) de les 4.470 ratapinyades analitzades. La prevalença de ràbia en quiròpters que havien mossegat persones fou 2,1 vegades superior que en quiròpters que no havien mos-

segat ningú (Pape *et al.*, 1999). Dels 233 quiròpters que varen mossegar persones, 69 (30%) donaren positiu per ràbia. Dels 4.237 que no havien mossegat ningú, 613 (14%) estaven infectats per *Lyssavirus*. Gràcies al tractament anti-ràbic, cap de les persones mossegades per ratapinyades rabioses va contraure la malaltia. Els quiròpters rabiosos semblen interactuar amb més freqüència i ser més propensos a mossegar que els no rabiosos. Aquest comportament és a causa de les manifestacions clíniques de la ràbia en espècies salvatges, on l'animal exhibeix una conducta anormal, perd la seva por natural cap als humans i sovint actua agressivament (Kaplan *et al.*, 1986). Sorprenentment, els resultats obtinguts en el nostre estudi de les Illes Balears difereixen molt de les dades de Colorado, tal com es podrà comprovar més endavant.

A la taula 6 es mostren els casos humans de ràbia, als Estats Units d'Amèrica, transmesa per ratapinyades des de 1995 fins a 2006 (<http://www.cdc.gov/rabies/>).

Taula 6. Casos humans de ràbia de ratpenats, Estats Units, 1995-2006

Data de la mort	Espècie de ratpenat transmissora de la ràbia
15 març 1995	<i>Myotis</i> sp
21 setembre 1995	<i>Tadarida brasiliensis</i>
3 octubre 1995	<i>Lasionycteris noctivagans</i> o <i>Pipistrellus subflavus</i>
9 novembre 1995	<i>Lasionycteris noctivagans</i> o <i>Pipistrellus subflavus</i>
15 octubre 1996	<i>Lasionycteris noctivagans</i> o <i>Pipistrellus subflavus</i>
19 desembre 1996	<i>Lasionycteris noctivagans</i> o <i>Pipistrellus subflavus</i>

Data de la mort	Espècie de ratpenat transmissora de la ràbia
5 gener 1997	<i>Lasionycteris noctivagans</i> o <i>Pipistrellus subflavus</i>
18 gener 1997	<i>Eptesicus fuscus</i>
17 octubre 1997	<i>Lasionycteris noctivagans</i> o <i>Pipistrellus subflavus</i>
23 octubre 1997	<i>Lasionycteris noctivagans</i> o <i>Pipistrellus subflavus</i>
31 desembre 1998	<i>Lasionycteris noctivagans</i> o <i>Pipistrellus subflavus</i>
20 setembre 2000	<i>Tadarida brasiliensis</i>
10 octubre 2000	<i>Tadarida brasiliensis</i>
25 octubre 2000	<i>Lasionycteris noctivagans</i> o <i>Pipistrellus subflavus</i>
01 novembre 2000	<i>Lasionycteris noctivagans</i> o <i>Pipistrellus subflavus</i>
31 març 2002	<i>Tadarida brasiliensis</i>
31 agost 2002	<i>Lasionycteris noctivagans</i> o <i>Pipistrellus subflavus</i>
28 setembre 2002	<i>Lasionycteris noctivagans</i> o <i>Pipistrellus subflavus</i>
14 setembre 2003	<i>Lasionycteris noctivagans</i> o <i>Pipistrellus subflavus</i>
03 maig 2004	<i>Tadarida brasiliensis</i>
07 juny 2004	<i>Tadarida brasiliensis</i>
09 juny 2004	<i>Tadarida brasiliensis</i>
10 juny 2004	<i>Tadarida brasiliensis</i>
21 juny 2004	<i>Tadarida brasiliensis</i>
Va sobreviure 2004	Ratapinyada, espècie desconeguda
27 setembre 2005	Ratapinyada, espècie desconeguda
12 maig 2006	<i>Tadarida brasiliensis</i>
02 novembre 2006	<i>Lasionycteris noctivagans</i> o <i>Pipistrellus subflavus</i>

Durant 2006 es van detectar, als Estats Units d'Amèrica, 6.940 casos de ràbia en animals i 3 en humans, segons el CDC, la qual cosa representa un increment del 8,2% respecte de l'any 2005, quan s'havien descrit 6.417 casos en animals i un sol cas humà. Respecte a

les espècies animals afectades a l'any 2006, els grups més afectats són, per ordre: 2.615 ós rentador (37,7%), 1.692 ratapinyades (24,4%), 1.494 mofeta (21,5%), 427 guineus (6,2%), 318 moixos (4,6%), 82 caps de bestiar (1,2%) i 79 cans (1,1%).

A l'any 2006 hi varen haver tres casos de ràbia en humans, ocorreguts a Texas, Indiana i Califòrnia. Els casos de Texas i Indiana van ser transmesos per ratapinyades, mentre que el de Califòrnia va ser transmès per un ca provinent de Filipines.

Però, de tots els casos d'infecció ràbica en humans, és especialment interessant des d'un punt de vista mèdic el cas ocorregut l'any 2004, en què una pacient va sobreviure a la infecció ràbica. Es tracta d'una nina de 15 anys d'edat, de la població de Fond du Lac County, Wisconsin, a qui se li va diagnosticar ràbia després d'haver estat mossegada per un ratpenat aproximadament un mes abans. Es tracta del primer cas documentat de recuperació en un pacient que no ha rebut tractament de profilaxi antiràbica pre o postexposició. La nina, que estava a l'interior d'una església, va ser mossegada al dit índex per un ratpenat en intentar espantar-lo perquè sortís. Aquest no va ser capturat i no va mossegar ningú més. La ferida, d'uns 5 mm, va ser curada però la nina no va rebre cap tractament antiràbic de postexposició. Aproximadament un mes més tard, la nina va començar a tenir problemes, com fatiga, inseguretat i visió doble. Després de tres dies de malaltia, varen aparèixer nàusees i vòmits. Al sisè dia els símptomes, com la hipersalivació, dificultat per parlar, entre d'altres, van fer pensar en la possibilitat que es tractàs de ràbia. Efectivament, es van detectar anticossos en sèrum i lí-

quid cefaloraquidi, però no es va poder identificar la variant vírica perquè les proves d'immunofluorescència, així com la PCR sobre mostres biològiques, varen ser negatives. La gestió clínica va consistir en unes mesures neuroprotectores i en un coma induït. Així va estar durant 7 dies, durant els quals el nivell d'anticossos antiràbics va augmentar de 1:32 a 1:2.048, i se li administrà ribavirina intravenosa seguint un protocol d'investigació. La ribavirina és una droga antiviral que inhibeix in vitro el creixement de virus d'ADN i ARN, com flavivirus i influenzavirus, pot, però provocar alteracions neurològiques i gastrointestinals. Posteriorment va sortir del coma, i passats 36 dies des de l'inici de la malaltia, va ser portada a la unitat de rehabilitació. De mica en mica es va anar recuperant, va començar a caminar, a menjar dieta sòlida, a resoldre trencaclosques i a parlar. El com i per què d'aquesta recuperació són desconeguts. Aquest cas representa el sisè cas conegut de recuperació després d'una infecció per ràbia, però és el primer de recuperació sense tractament antiràbic de pre o postexposició. Històricament, la taxa de mortalitat entre els pacients infectats no vacunats era del 100%.

Segons el Centers for Disease Control and Prevention, als Estats Units, durant el període 1980 – 2000, el 74% dels virus de la ràbia aïllats en persones (26 casos) s'han associat a ratpenats insectívors.

A l'Argentina, el principal transmissor de ràbia als herbívors és el vampir (*Desmodus rotundus*). Aquesta malaltia té una estreta relació amb l'elevada densitat poblacional que ha assolit actualment el vampir, principalment per la disponibilitat d'aliment que li proporciona el bestiar, per les construccions humanes, ja estiguin abandonades o no (ponts, pous, mines, etc.) que augmenten les seves possibilitats de trobar refugi diürn i pel progressiu deteriorament dels ecosistemes naturals. Aquest deteriorament ha provocat la disminució i/o desaparició de

nombrosos depredadors que anteriorment controlaven la seva població. Tot això, sumat a la capacitat del vampir per adaptar-se a noves situacions, han possibilitat que aquesta espècie visqui actualment en la majoria dels ecosistemes ramaders del nord d'Argentina. La ràbia paralítica afecta la salut i l'economia d'una àmplia regió que s'estén des dels límits amb Bolívia, Paraguai i Brasil fins aproximadament els 29° de latitud sud i els 66° de longitud oest. Dins aquesta àrea existeix una població de 5.000.000 de bovins i una quantitat indeterminada d'equins, caprins,

Taula 7. Espècies de quiròpters analitzades i resultats obtinguts

Espècie	Nre. cervells	Nre. sèrums	Nre. sèrums amb anticossos antiABLV
<i>Saccolaimus saccolaimus</i>	107	23	0
<i>Taphozous melanopogan</i>	96	30	4
<i>Megaderma spasma</i>	16	4	0
<i>Hipposideros diadema</i>	19	7	0
<i>Rhinolophus sp</i>	9	2	0
<i>Miniopterus schreibersii</i>	14	11	4
<i>Philetor brachypterus</i>	24	13	1
<i>Scotophilus kuhlii</i>	201	63	4
<i>Cynopterus brachyotis</i>	20	1	0
<i>Eonycteris spelaea</i>	10	1	0
<i>Macroglossus minimus</i>	10	4	0
<i>Ptenochirus jagori</i>	46	8	0
<i>Pteropus hypomelanus</i>	27	14	3
<i>Rousettus amplexicaudatus</i>	219	50	6
Total	818	231	22

porcs i ovins que també estan afectats. S'estima que la taxa diària d'atac està entre l'1 i el 3%, la qual cosa significa que cada nit entre 50.000 i 150.000 bovins són mossegats per vampirs.

La ràbia en el bestiar no és més que un reflex del que passa a nivell de vampirs, ja que els herbívors es comporten epidemiològicament com a hostes terminals. La ràbia es propaga ràpidament en una colònia de vampirs a causa de l'increment de l'agressivitat intraespecífica. A més, la transmissió es veu afavorida per l'elevada densitat poblacional i pel caràcter gregari dels vampirs dins els refugis diürns. Els casos ràbics disminueixen quan la fracció de la colònia susceptible de ser infectada és molt petita. La taxa de mortalitat del bestiar és variable, i depèn de factors bioepidemiològics, com la densitat poblacional del vampir dins l'àrea del brot i també de les condicions sanitàries dins cada granja, principalment de la major o menor rapidesa en efectuar la vacunació en els moments de risc. A l'Argentina la vacunació no és obligatòria i va a càrrec dels ramaders. Durant la dècada 1992/2001 la mitja de mortalitat bovina per ràbia paralítica fou de 4.167 caps per any, que és el 0,08% de la població exposada. Si es considera un pes mig de 200 kg per cada boví, es calcula que cada any es perden 833.400 kg. La mortalitat en altres espècies de bestiar no ha estat estimada. A les pèrdues que causa la ràbia se li han d'afegir les que origina l'atac del vampir en ell mateix. Recents observacions han suggerit que aques-

tes pèrdues poden superar les causes per la ràbia paralítica. Si es considera que cada mossegada de vampir produeix una sagnia d'uns 50 ml, 25 ml per la ingesta i 25 ml per l'hemorràgia residual, i tenint en compte una taxa d'atac diària de l'1%, les pèrdues de sang dels bovins en l'Argentina a causa de l'atac dels vampirs assoliria els 912.000 kg per any. D'altra banda, s'ha de tenir present que les ferides provocades pels vampirs són vies d'entrada d'altres infeccions.

La ràbia paralítica també és una amenaça per a l'home. Durant els últims 25 anys, a Argentina, s'han enregistrat 3 casos de ràbia humana transmesa per vampirs. Aquests contactes encara s'observen i generen la necessitat de centenars de tractaments antiràbics de postexposició a l'any. L'atac del vampir en ell mateix també afecta la salut humana, perquè produeix hemorràgies, dolor i infeccions col·laterals. Els atacs a humans no són freqüents a l'Argentina però és molt probable que els casos de mossegada estiguin subestimats, fruit d'una subnotificació, ja que generalment afecten persones de condició molt humil que viuen en àrees allunyades dels nuclis urbans (Delpietro i Russo, 1996).

Al Brasil, a l'estat de Santa Catarina, a principis del segle XX varen observar una severa mortalitat entre els herbívors. Varen poder veure que hi havia gran quantitat de vampirs que en ple dia atacaven i mossegaven els animals, que pocs dies després morien. A l'any

1911 es va formular la hipòtesi que eren les ratapinyades hematòfagues les que transmetien la ràbia a bovins i equins. Posteriorment, es confirmà que efectivament els quiròpters hematòfags eren portadors i transmissors de lyssavirus.

Pel que fa referència als quiròpters no hematòfags, la primera comunicació sobre l'aïllament de ràbia al Brasil fou realitzada l'any 1957. Durant el període de 1990-2001 varen ser confirmats 455 casos de ràbia humana. Es va confirmar el ca com al principal transmissor (74%), seguit dels quiròpters (11%). Durant l'any 2004 es varen confirmar 22 casos de ràbia humana transmesa per quiròpters hematòfags a l'estat de Para, a l'Amazònia (ProMED-mail post, 2004).

Durant el període 1970-1999 s'enregistraren, a Mèxic, 150 casos de ràbia en humans transmesa per quiròpter. D'aquests casos els homes varen ser els més afectats (64%), especialment el grup d'edat comprès entre els 5 i 14 anys (51,3%), seguit del de 15 a 44 anys (29,3%). En el 93% dels casos la transmissió fou per mossegada i en el 36,6% la localització de les ferides va correspondre als membres superiors, seguit dels membres inferiors (32%). Els períodes d'incubació enregistrats foren, en un 48% del total, d'entre 16 i 30 dies. Anàlisis realitzades amb anticossos monoclonals identificaren, en humans, les variants següents: 3-vampir, 5-vampir, 9-*Tadarida brasiliensis mexicana* i 11-vampir. Durant

el període 1993 a 2000 es calcula que varen existir més de 6.000 agressions a humans per part de quiròpters i que durant aquest període la Secretaria de Salut de Mèxic va invertir més de 9 milions de pesos en tractament post-exposició a les persones agredides (Vargas, 2001).

1.9.3. *Lyssavirus* en quiròpters d'Àsia

Es disposa de molt poques dades de la ràbia en quiròpters asiàtics, sobretot a causa de la falta d'un bon sistema de vigilància i és per això que sovint es diu que la ràbia en ratapinyades d'Àsia és un fet poc freqüent. El primer cas de ràbia humana transmesa per ratapinyades va ser descrit a l'any 1954 al sud de l'Índia.

A Tailàndia s'ha descrit la infecció per *Lyssavirus* de la ratapinyada frugívora *Cynopterus brachyotis*. Igualment, a l'Índia també s'ha detectat la presència de *Lyssavirus* en l'espècie frugívora *Pteropus poliocephalus*.

L'any 1998 es va iniciar un estudi a Filipines sobre ràbia en quiròpters (taula 7). Es van capturar 818 quiròpters de 14 espècies diferents, entre insectívors i frugívors, i representen cinc de les sis famílies de quiròpters presents a Filipines. Tots els cervells van ser analitzats per immunofluorescència directa i varen resultar negatius. Dels 818 animals capturats, es recolliren 231 mostres de sèrum amb un volum suficient per poder analit-

zar la presència d'anticossos ràbics. Un total de 22 sèrums (9,5%) varen ser positius per presència d'anticossos antiABLV (genotip 7). D'aquests 22 sèrums positius, 5 també varen ser positius contra CVS (genotip 1). Només 1 dels 209 sèrums que havien estat negatius contra ABLV fou positiu quan s'analitzà contra CVS. Les espècies on s'ha detectat la presència d'anticossos antiABLV són: *Taphozous melanopogan*, *Miniopterus schreibersii*, *Philetor brachypterus*, *Scotophilus kuhlii*, *Pteropus hypomelanus* i *Rousettus amplexicaudatus* (Arguin *et al.*, 2002).

Com s'ha comentat anteriorment, estudis recents efectuats a partir de mostres asiàtiques amplien significativament la diversitat del gènere *Lyssavirus*. Els virus Aravan i Khujand van ser aïllats al sud de Kyrghyzstan l'any 1991 i al nord de Tadjikistan l'any 2001, respectivament. El virus Aravan va ser aïllat de *Myotis blythii* a la regió Osh de Kyrghyzstan, a l'Àsia Central. Estudis genètics compararen la seqüència del gen N del virus Aravan amb 27 soques dels genotips 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7 del gènere *Lyssavirus*, es pot afirmar que es tracta d'un nou genotip, proper als genotips 4 i 5 (Arai, 2003). L'espècie *Myotis blythii*, a partir de la qual s'aïllà el virus Aravan, està àmpliament distribuïda pel Mediterrani, sud-est d'Europa, Caucas, Palestina, sud-oest d'Àsia i zones del centre i est d'Àsia. No es té constància de cap cas humà provocat per aquest genotip, però

els mateixos autors de l'estudi reconeixen que la vigilància ràbica en aquesta zona és molt precària (Arai *et al.*, 2003).

L'any 2002 es van descobrir dos nous *Lyssavirus* a Rússia. Des del 1979 fins al 2002 es van analitzar 339 ratapinyades. Dues d'aquestes varen ser positives: un mascle de *Murina leucogaster* de la ciutat de Irkutsk, a l'est de Sibèria que va entrar dins un edifici i un altre mascle de *Miniopterus schreibersii* capturat en una cova propera a la ciutat de Krasnodar, al Caucas. Els autors acaben reflexionant sobre la importància que aquests resultats tenen per a la salut pública, ja que la regió d'Irkutsk (Sibèria) està considerada lliure de ràbia (feia 35 anys que no s'aïllava cap soca de *Lyssavirus*). En canvi, el Caucas es tracta d'una regió on la ràbia és endèmica, però fins a la data només s'havien identificat cànids com a reservoris de *Lyssavirus*. Els autors es pregunten per l'efectivitat que pot tenir la vacuna ràbica comercial davant aquests nous genotips (Botvinkin *et al.*, 2003).

Recentment s'ha realitzat un estudi a Cambodja, que ha pres com a model el treball efectuat a les Illes Balears, i en el qual 1.303 quiròpters de 35 localitats diferents varen ser analitzats (471 eren *Pteropus lylei* que provenien de restaurants). Els 832 restants pertanyien a 16 espècies diferents originàries de nou províncies. Tal i com succeïa en l'estudi realitzat a Filipines i en el nostre de les Illes Balears, totes les mos-

tres de sistema nerviós van resultar ser negatives per immunofluorescència. Dels 146 sèrums recollits, 30 contenien anticossos contra diferents *Lyssavirus*: RABV, EBLV-1, ABLV i LBV (Reynes *et al.*, 2004).

1.9.4. *Lyssavirus* en quiròpters d'Oceania

Austràlia es considerava un continent lliure de ràbia fins a l'any 1996. Els pocs casos de ràbia que s'havien produït durant el segle XX corresponien a la ràbia clàssica importada d'altres països en els quals aquesta malaltia era endèmica (McColl *et al.*, 1993). Durant 1996 es va descriure el primer reconeixement patològic i immunohistoquímic de ràbia en un quiròpter frugívor natiu: *Pteropus alecto* (Fraser *et al.*, 1996). Un examen amb microscopi electrònic de cervell del *Pteropus* infectat, així com de ratolins infectats amb els virus aïllats, va mostrar partícules de rabdovirus i estructures histològiques típiques de *Lyssavirus*. Anàlisis amb anticossos monoclonals mostraren l'existència de forta relació entre el nou *Lyssavirus* i el serotip 1. Posteriorment, anàlisis genètiques varen demostrar que el virus aïllat era molt més proper al virus de la ràbia clàssica que a qualsevol altre membre del gènere *Lyssavirus*. Estudis filogenètics de seqüències de la proteïna N mostraren que el nou virus pertanyia al gènere *Lyssavirus* i representa un nou genotip: el genotip 7, que s'anomenà Australian Bat *Lyssavirus* (ABLV) (Gould, 1998).

Des del primer aïllament a l'any 1996 fins al 1999 s'han comprovat 42 casos positius més a partir de les quatre espècies de quiròpters frugívors: *Pteropus alecto*, *Pteropus poliocephalus*, *Pteropus scapulatus* i *Pteropus conspicillatus*, així com de l'espècie de microquiròpter insectívor *Saccolaimus flavicentris* (Mackenzie, 1999). Durant aquest període es produïren dues morts humanes causades per ABLV (Field *et al.*, 1999; McCall *et al.*, 2000).

1.9.5. *Lyssavirus* en quiròpters d'Europa

L'evolució del nombre de quiròpters infectats diagnosticats a Europa comprèn dos períodes ben diferenciats: el corresponent a 1954 – 1984 en el qual sols es varen diagnosticar 14 casos (Kappeler, 1989) i el posterior a 1984, en el qual es detectaren la majoria dels casos ràbics coneguts actualment en quiròpters d'Europa. El fort increment de diagnòstics ràbics enregistrat a partir de 1985 és conseqüència de l'aïllament de *Lyssavirus* en *Eptesicus serotinus* de Dinamarca (Mollgard, 1985) i de la mort d'un zòleg finlandès mossegat per una ratapinyada (Lumio *et al.*, 1986), que va desencadenar estudis epidemiològics a Holanda i Dinamarca. Com a resultat, es van passar dels 15 casos diagnosticats a l'any 1985 als 122 de l'any 1986 i als 142 de l'any 1987. Des de 1988, el nombre de casos anuals enregistrats s'ha estabilitzat entorn als 40 (figura 4).

Figura 4 . Nombre de ratapinyades infectades

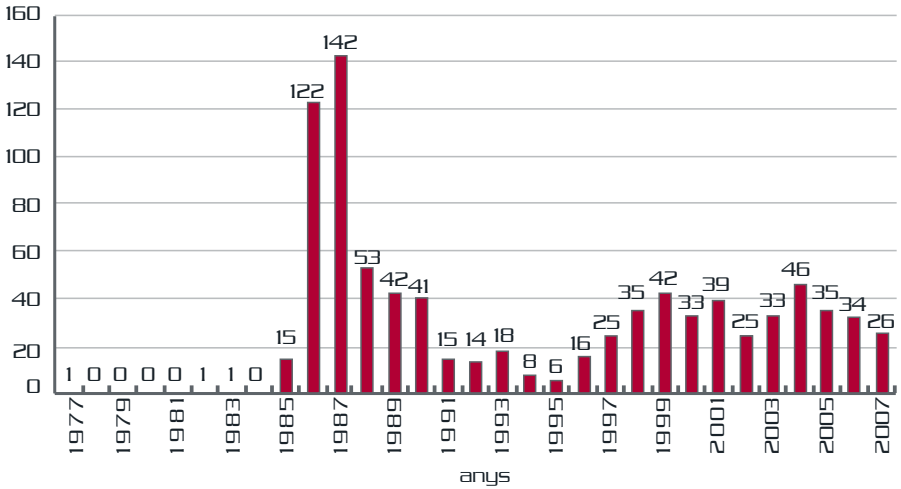


Figura 4. Evolució del nombre de casos de ràbia en quiròpters europeus. Període 1977 – 2006, segons el *Rabies Bulletin Europe*, de l'Organització Mundial de la Salut.

A Europa, fins al 1984 només s'havia descrit ràbia de quiròpters al nord-est europeu: nord d'Alemanya, Polònia, antiga Unió Soviètica, Turquia i antiga Iugoslàvia (Kappeler, 1989). Des de 1985, progressivament es varen anar notificant casos en diverses localitats d'Europa: Dinamarca, Holanda, Alemanya, Espanya, França i posteriorment Suïssa i Regne Unit.

A la taula 8 es resumeixen els primers aïllaments de ràbia en quiròpters europeus (King i Crick, 1988; Kuzmin et al., 2003).

Posteriorment a aquests primers aïllaments se n'han efectuat molts més, tal i com il·lustra la taula 9. Des de 1977 fins a 2007 s'han publicat 868 casos de ràbia en quiròpters europeus provocada per *Lyssavirus* dels genotips 5 i 6,



Figura 5. Exempler d'*Eptesicus serotinus*. Es tracta d'una espècie amb conducta antropòfila i relativament agressiva.

és a dir, els European Bat *Lyssavirus* 1 (EBLV-1) i 2 (EBLV-2), respectivament.

La majoria dels casos publicats en el Butlletí Europeu de Ràbia corresponen a l'espècie *Eptesicus serotinus* (Figura 5), quiròpter adaptat a viure en fissures de roques i també en construccions humanes, de manera que pot tenir contacte amb la població humana més

fàcilment que altres espècies més forestals o troglòfiles (Echevarría *et al.*, 2001). Abans dels estudis realitzats pel nostre equip, eren 8 les espècies de ratapinyades europees en les quals s'havia comprovat infecció per *Lyssavirus*: *Eptesicus serotinus*, *Pipistrellus pipistrellus*, *Pipistrellus nathusii*, *Myotis dasycneme*, *Myotis daubentonii*,

Myotis myotis, *Nyctalus noctula* i *Rhinolophus ferrumequinum*. En algunes d'aquestes espècies no s'havia analitzat el genotip del *Lyssavirus* que havia produït la infecció.

A més dels diagnòstics en quiròpters, fins ara s'han confirmat, a Europa, 5 casos humans d'infecció d'EBLV (taula 10).

Taula 8. Resum dels primers aïllaments de ràbia en quiròpters europeus

País	Data	Espècie	Referència bibliogràfica
Sèrbia-Montenegro (Iugoslàvia)	1954	<i>Nyctalus noctula</i>	Nicolic i Jeselic, 1986
Alemanya (R.F.A.)	1954	?	Mohr, 1957
Turquia	1956	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	Tunçman, 1958
Alemanya (R.D.A.)	1963	<i>Eptesicus serotinus</i>	Pitzschke, 1965
Ucraïna (U.R.S.S.)	1964	<i>Eptesicus serotinus</i>	Selimov <i>et al.</i> 1986
Polònia	1972	<i>Eptesicus serotinus</i>	Komorowski <i>et al.</i> 1974
Dinamarca	1985	<i>Eptesicus serotinus</i>	Bitsch <i>et al.</i> 1985
Finlàndia	1985	Humà	Lumio <i>et al.</i> 1986
Holanda	1987	<i>Eptesicus serotinus</i> <i>Myotis dasycneme</i>	King i Crick, 1988
Espanya	1987	<i>Pipistrellus pipistrellus</i> <i>Eptesicus serotinus</i>	King i Crick, 1988
França	1989	<i>Eptesicus serotinus</i>	Kissi <i>et al.</i> , 1995
Suïssa	1992	<i>Myotis daubentonii</i>	Nadin-Davis <i>et al.</i> , 1994
Regne Unit	1996	<i>Myotis daubentonii</i>	Whitby <i>et al.</i> , 2000

Taula 9. Casos de ràbia en quiròpters europeus. Període 1977 - 2007, segons el *Rabies Bulletin Europe*, de l'Organització Mundial de la Salut

País	Nombre de casos 1977 - 2007
Alemanya	198
Dinamarca	229
Eslovàquia	2
Espanya	20
Federació Russa	8
França	29
Holanda	293
Hongria	1
Polònia	64
Regne Unit	5
República Txeca	4
Suïssa	3
Ucraïna	12
TOTAL	868

Taula 10. Casos de ràbia humana a Europa transmesa per quiròpters

Anys	País	Espècie quiròpter	Genotip	Observacions	Referència bibliogràfica
1977	Ucraïna	?	EBLV	Nina de 15 anys mossegada al dit. No va rebre tractament postexposició. Morí a les 4-5 setmanes de la infecció.	Anonymous, 1986
1985	Rússia	?	EBLV	Nina d'11 anys mossegada al llavi. No va rebre tractament postexposició. Morí a les 4-5 setmanes de la infecció.	Selimov <i>et al.</i> , 1989
1985	Finlàndia	?	EBLV-2	Zoòleg mossegat a Malàisia durant 4 anys i a Suïssa i Finlàndia un any abans de la seva mort. Mai no va ser vacunat ni va rebre tractament postexposició.	Lumio <i>et al.</i> , 1986 Roine <i>et al.</i> , 1988 Amengual <i>et al.</i> , 1997
2002	Regne Unit	<i>Myotis daubentonii</i>	EBLV-2	Conservacionista de 55 anys. Mai no va ser vacunat ni va rebre tractament postexposició.	Fooks <i>et al.</i> , 2003 Nathwani <i>et al.</i> , 2003
2005	Ucraïna	?	?	?	Rabies Bulletin Europe (WHO)

No s'ha aïllat mai EBLV-2 en cap animal que no fos un quírròpter (Fooks *et al.*, 2003) en canvi, EBLV-1 sí ha estat aïllat a partir de quatre espècies animals que no són quírròpters europeus. Aquestes han estat: ratapinyades frugívores del Parc Zoològic de Dinamarca, ovelles a Dinamarca, un *Martes foina* a Alemanya i un moix a França.

EBLV-1 ha estat aïllat a partir de colònies de quírròpters frugívors egipcis (*Rousettus aegyptiacus*) mantingudes en captivitat en parcs zoològics d'Europa. Els *Lyssavirus* es varen detectar en *R. aegyptiacus* del Parc Zoològic d'Odense (Dinamarca) que havien estat importats des del Parc Zoològic de Rotterdam (Holanda) (Ronsholt *et al.*, 1998; van der Poel *et al.*, 2000; Wellenberg *et al.*, 2002).

A l'any 1998 es va aïllar EBLV-1 a partir d'ovelles procedents de tres ramats de Dinamarca. Es tractava de la primera incidència d'un EBLV present en mamífers terrestres (Ronne, 1999). Novament, a l'any 2002 es va detectar una ovella positiva (Ronsholt, 2002). Es va veure que, durant el dia, les ratapinyades es refugiaven a les mateixes construccions que les ovelles, la qual cosa hauria permès el contacte entre les dues espècies (Fooks *et al.*, 2003).

A l'agost del 2001, un mart (*Martes foina*) va ser trobat viu en un parc de Sachsen - Anhalt, Alemanya. No presentava símptomes de malaltia, però sí falta de timidesa. Després

d'intents d'allunyar-lo del parc va intentar agredir algú i va ser sacrificat. Va resultar negatiu per immunofluorescència, però positiu per PCR i mostrà presència d'EBLV-1 (Muller *et al.*, 2001). Aquest és l'únic cas d'infecció d'EBLV-1 detectat en un mamífer salvatge europeu no quírròpter. S'espera que aquesta infecció podria ser el resultat d'un atac del mart cap a un grup de quírròpters i durant el qual hagués rebut una mossegada. S'ha descrit que sovint els *Martes foina* depreden quírròpters durant el període d'hibernada, quan les ratapinyades romanen dormides a l'interior del refugi (Fooks *et al.*, 2003).

El 10 novembre de 2007 va morir una moixa, anomenada Mitsie, originària de Fontenay-le-Comte, Vendée, França. Les anàlisis veterinàries varen demostrar que la causa de la mort era ràbia transmesa per ratapinyades (infecció per EBLV-1). Es tractava d'un moix que sortia molt poc de casa, però sovint visitava el teulat de casa seva i un graner. Les 14 persones que varen tenir contacte amb el moix varen estar sota vigilància mèdica. Quatre d'elles, que havien estat esgarrapades o mossegades, varen rebre tractament de postexposició.

Des de 1977, Espanya es considera lliure de ràbia en mamífers terrestres. Únicament es registren casos de ràbia clàssica endèmica a les ciutats de Ceuta i Melilla del nord d'Àfrica.

A l'any 1987, però, es va detectar el primer cas de ràbia en un quiròpter (Sánchez, 1999). Els anys posteriors s'han anat detectant nous casos fins a un total de 21 positius per immunofluorescència, segons la Xarxa Nacional de Vigilància Epidemiològica (Sánchez i Abellán, 2003).

1.10. PLANTEJAMENT DE L'ESTUDI DELS LYSSAVIRUS EN QUIRÒPTERS DE LES ILLES BALEARS.

A l'any 1995, en el marc d'un estudi estatal sobre els *Lyssavirus* de les ratapinyades espanyoles, es varen detectar els primers quiròpters seropositius a les Illes Balears. L'estudi havia estat promogut pel Ministeri de Sanitat i Consum després del primer cas de ratapinyada positiva detectada a Espanya i dut a terme pel nostre equip. L'espècie en què es trobaren els antics rúbics era *Myotis myotis* i les ratapinyades varen ser capturades a dues coves mallorquines properes a Lluçmajor i a Inca. A partir dels resultats obtinguts es va plantejar, amb el suport de la Conselleria de Salut i Consum del Govern de les Illes Balears, un estudi multidisciplinari que tenia com a principals objectius:

- Posar a punt una tècnica poc invasiva que permetés obtenir un nombre significativament elevat de mostres en animals vius.
- Conèixer quines espècies eren afectades per la infecció.

- Estimar el percentatge d'individus infectats en les colònies.
- Conèixer la dinàmica temporal de la infecció rúbica.
- Estimar el risc per a la salut pública i contribuir a clarificar el debat sanitari existent els darrers anys sobre la perillositat de les ratapinyades com a vectores de *Lyssavirus*.

Però per aconseguir aquests objectius era necessari:

- Localitzar refugis de ratapinyades.
- Conèixer la dinàmica anual de les colònies de ratapinyades.
- Estimar la mida de les colònies.
- Conèixer els moviments estacionals.
- Seguir durant diversos anys l'evolució de les colònies infectades.
- Estimar la taxa de supervivència de les colònies.
- Modelitzar la dinàmica temporal de la infecció.

Així doncs, era imprescindible iniciar estudis ecològics alhora que es posaven a punt les tècniques de mostreig i es realitzaven anàlisis virològiques, epidemiològiques i genètiques. La present monografia dona a conèixer els resultats dels estudis rúbics realitzats a les Illes Balears des de l'any 1995 fins al 2006.

2. MATERIAL I MÈTODES

2.1. CAPTURA DE RATAPINYADES I OBTENCIÓ DE MOSTRES

L'estudi s'ha centrat en la infecció per EBLV-1 a l'espècie *Myotis myotis*. L'estudi d'una sola espècie ens ha permès aprofundir en el coneixement de la dinàmica temporal de la infecció. Alhora, però, també s'han analitzat altres espècies de ratapinyades per tenir més informació de conjunt sobre l'afectació de la infecció a la comunitat de ratapinyades de les Illes Balears. La major part de les mostres biològiques s'han obtingut a partir de dues colònies de quiròpters situades als municipis de Lluçmajor i d'Inca, en les quals s'havia detectat infecció per EBLV-1 a l'any 1995 (Serra-Cobo *et al.*, 2002 i Amengual *et al.*, 2007a). Totes les ratapinyades capturades varen ser sexades i anellades a l'avantbraç per facilitar el seguiment individual de la infecció i els seus moviments estacionals entre colònies.

Les ratapinyades de la colònia 1 (Lluçmajor) han estat estudiades des de 1995 fins a 2006. El darrer any es varen obtenir molt poques mostres i per aquesta raó no han estat considerades en les anàlisis del present estudi. En el decurs del mateix període varen ser capturades ratapinyades de la colònia 2 (Inca). Tots els quiròpters varen ser capturats i mostrejats a l'atzar. Les poques carcasses analitzades durant l'estudi corresponen a individus tro-

bats morts en els refugis. Les carcasses varen ser estocades a -80°C fins al moment de ser analitzades.

La mida de les colònies va ser calculada indirectament emprant la tècnica de captura – marcatge – recaptura. Les sessions de caça de parany es varen dur a terme a la primavera durant períodes de sis (2001-2006) i set anys (2000-2006) a les colònies 1 i 2, respectivament. Les mides de les colònies han estat estimades emprant la metodologia de Jolly-Seber per a poblacions obertes incorporada en el programa Mark (Pollock *et al.*, 1990).

L'extracció de sang de les ratapinyades s'ha efectuat realitzant una petita incisió a la vena mediana a nivell de l'epífisi proximal del radi. De cada animal s'ha extret de 50 a 200 µl de sang en funció de l'espècie analitzada. A continuació, s'ha aplicat una gasa sobre la ferida pressionant amb els dits durant uns segons, fins confirmar que no existia hemorràgia. Finalment, s'ha donat a beure aigua glucosada a les ratapinyades i se les ha alliberat. La sang s'ha conservat a 4 °C durant unes hores. A continuació, s'ha centrifugat i separat el contingut cel·lular del sèrum. Les mostres serològiques i cel·lulars s'han conservat a -20 °C.

2.2. BREU DESCRIPCIÓ DE *MYOTIS MYOTIS* (BORKHAUSEN, 1797)

La ratapinyada de morro llarg (Família Vespertiliònids) és l'espècie més gran del gènere *Myotis*. Té les orelles molt

desenvolupades. El seu aspecte és robust i la seva dentició està ben desenvolupada (figura 6). Se'l pot reconèixer pel vol pesat i lent que realitza amb les seves amples ales. La seva dieta es basa, principalment, en coleòpters que pot caçar a terra. Els seus depredadors més importants són les òlibes, a les egagròpiles de les quals s'han trobat molts d'esquelets.



Figura 6. Característiques biomètriques de *Myotis myotis*.

Cap - tronc: 67-79 mm
Cua: 45-60 mm
Avantbraç: 54-68 mm
Orella: 26-31 mm
Envergadura alar: 350-450 mm
Longitud còndil-basal: 22-24 mm
Pes: 28-40 g

Forma colònies nombroses a finals de primavera i començaments d'estiu. La hibernació sol tenir lloc en coves fredes i humides. Pot cohabitar amb altres espècies, com per exemple *Miniopterus screibersii*.

Habita al centre i sud d'Europa. És relativament abundant a Mallorca (Figura 7). A la resta de les Illes Balears

sols s'han trobat restes òssies a Eivissa (Alcover i Muntaner, 1986).

Una petita part de les femelles ja té cries al primer any de vida. L'aparellament es produeix a partir de l'agost. L'ovulació i la fecundació, en canvi, es realitzen a la primavera. Durant el període comprès entre els mesos de maig i juny, es produeix el part. Cada femella té una sola cria, la qual és capaç de volar als 20-24 dies d'edat i 40 dies després d'haver nascut ja són autosuficients.

2.3. RECERQUES DE LABORATORI

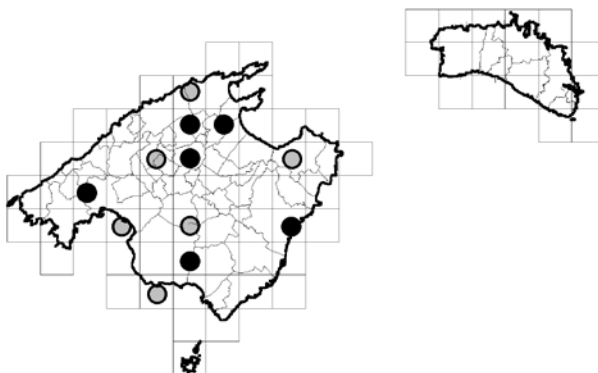
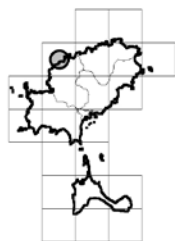
Les ratapinyades mortes varen ser autopsiades en un laboratori de seguretat biològica de nivell 3 i se n'obtingueren mostres de: cervell, faringe – esòfag, tràquea, pulmó, cor i llengua (Bourhy *et al.*, 1992).

La tècnica utilitzada per detectar la presència d'antigen en teixit cerebral ha estat la immunofluorescència (Bourhy *et al.*, 1989; Serra-Cobo *et al.*, 2002; Amengual, 2005).

Es va utilitzar la tècnica de la nRT-PCR per detectar ARN viral dels precipitats sanguinis i dels òrgans, amplificant el gen de la nucleoproteïna d'EBLV-1 (Amengual *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 2005).

La tècnica utilitzada per a la detecció d'anticossos antiEBLV-1 és una adaptació del *Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test* (RFFIT) (Serra-Cobo *et al.*, 2002; Reynes *et al.*, 2004).

Figura 7. Mapa de distribució de *Myotis myotis* a les Illes Balears. En gris, citacions sols comprovades abans de 1993. En negre, citacions verificades després de 1993 (Serra-Cobo *et al.*, 2007a i b).



Cada anàlisi serològica es repetí dues vegades per a cadascuna de les mostres, i es prengué com a resultat la mitjana aritmètica de les dues repeticions. Per descartar falsos positius que fossin fruit de reaccions creuades, es consideraren sèrums positius aquells que tenien una titulació superior a 27 en ambdues repeticions.

Els percentatges anuals de seropositius de cada colònia varen ser comparats amb el test de la χ^2 per comprovar si hi havia diferències interanuals significatives en cadascuna de les colònies.

2.4. ANÀLISIS DE SEQÜÈNCIES

Es va efectuar una anàlisi comparativa entre les seqüències del gen de la nucleoproteïna de *Lyssavirus* obtingudes a les Illes Balears i les soques representatives d'EBLV-1, EBLV-2 (Davis *et al.*, 2005) i Duvenhage virus (Thompson *et al.*, 1997).

A partir de les mostres de sang, el gen mitocondrial citocrom b va ser

seqüenciat per comprovar que les ratapinyades capturades pertanyien a l'espècie *Myotis myotis* (Bickham *et al.*, 2004).

2.5. TAXA DE SUPERVIVÈNCIA

La probabilitat de supervivència aparent (Φ) de les colònies 1 i 2 de *M. myotis* va ser estimada durant períodes de sis (2001-2006) i set anys (2000-2006), respectivament. Els individus juvenils foren exclosos de les anàlisis. La taxa de supervivència va ser modelada seguint la metodologia de captura – marcatge – recaptura (Lebreton *et al.*, 1992) i utilitzant el programa Mark (White i Burnham, 1999). El model seleccionat ha estat el més parsimoniós d'un conjunt de models candidats (Amengual *et al.*, 2007a).

2.6. DINÀMICA TEMPORAL DE LA INFECCIÓ PER EBLV-1

La taxa bàsica de reproducció (R_0) del virus a *M. myotis* va ser calculada utilitzant l'equació $R_0 = 1/x^*$, on x^* representa la fracció de la població d'hostes que és susceptible de ser infectada en situació d'equilibri (Anderson i May, 1991). R_0 és un concepte fonamental

en epidemiologia i ens indica la mitjana d'infeccions secundàries que es produeixen quan un individu infectat s'introdueix en una població d'hostes susceptibles. El valor x^* va ser estimat a partir de les dades serològiques observades a la colònia 1 des de 1995 fins a 2005. La taxa de seroconversió (v) va ser calculada per a la colònia 1 a partir de les equacions Núms. 6.4, 6.11, 6.12 (Anderson i May, 1991). La durada mitjana de la infecciositat (D) va ser obtinguda utilitzant l'equació $D = 1/v$. Per predir el

model temporal de la infecció per EBLV-1 es va utilitzar un model dinàmic amb tres categories (Figura 8). Les colònies varen ser dividides en ratapinyades susceptibles (X), infectades (Y) i immunes (Z). Els canvis de percentatges en les tres categories s'obtingueren substituint en el model les dades ecològiques i epidemiològiques obtingudes, concretament utilitzant les equacions diferencials Núms. 6.1–6.4 proposades per Anderson i May (1991). El model va ser desenvolupat emprant el software Maple v9.01.

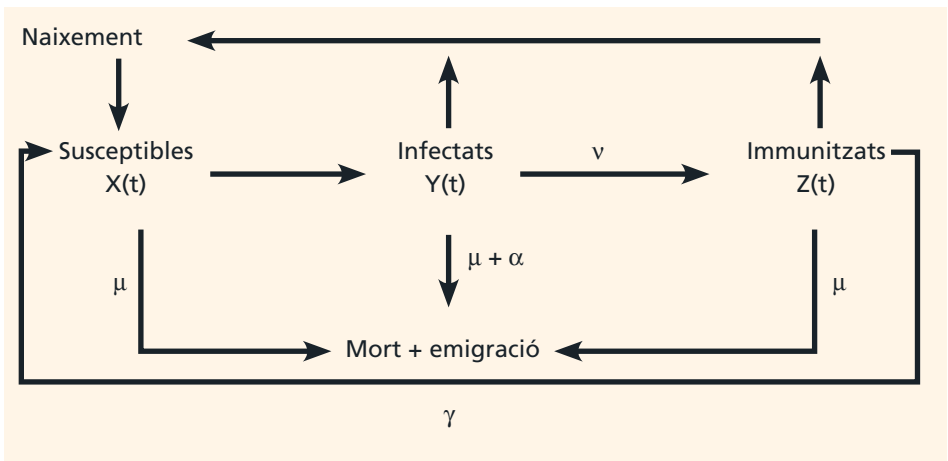


Figura 8. Representació esquemàtica del model epidemiològic utilitzat.

3. RESULTATS

3.1. ECOLOGIA DE *MYOTIS MYOTIS*

Les anàlisis del gen citocrom b varen demostrar que les ratapinyades capturades pertanyien a l'espècie *M. myotis*. A la figura 9 es pot observar com les seqüències dels quiròpters procedents de les colònies mallorquines s'agrupen clarament amb l'espècie *M. myotis* de referència.

El seguiment de la dinàmica anual del refugi 1 ha permès comprovar que s'hi allotja una colònia pluriespecífica de cria de ratapinyades de *M. myotis*, *Myotis schreibersii* i *Myotis capaccinii*. Els *M. myotis* arriben cada any a mitjans d'abril i comencen a partir de principis d'agost. L'estimació de la mida de les colònies ha mostrat que el refugi 1 allotja una mitjana de 212 *M. myotis* (interval de confiança del 95 %, IC = 162-300).

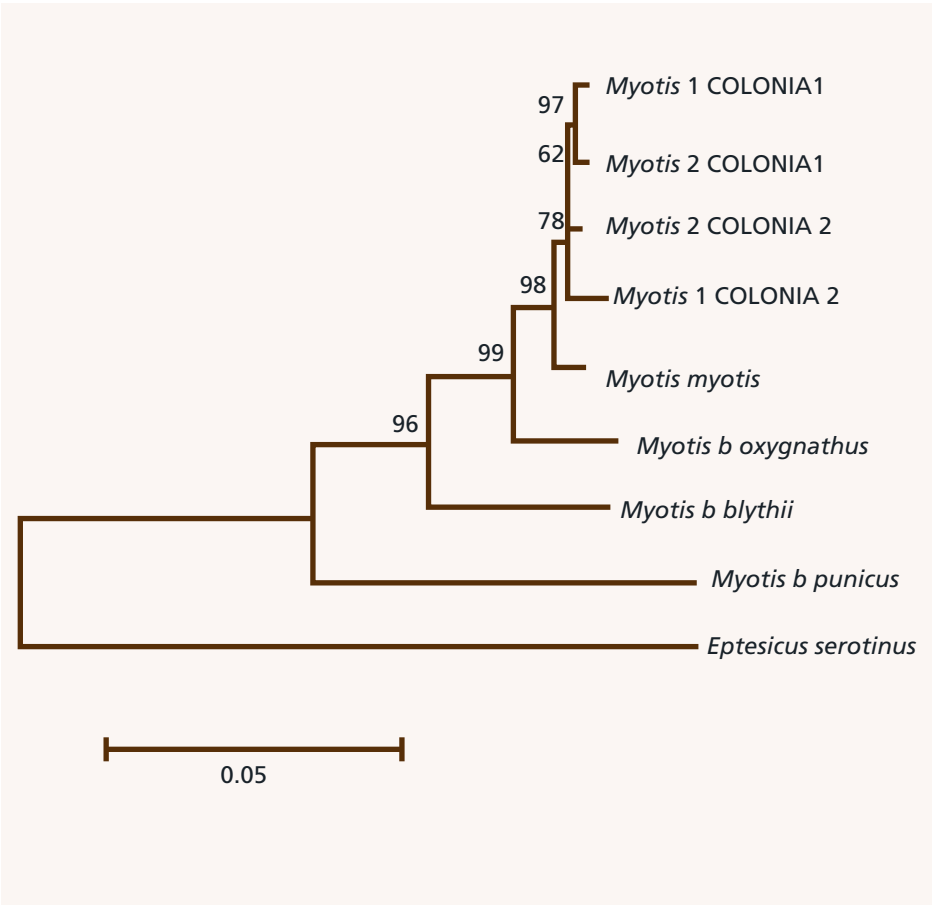


Figura 9. Arbre filogenètic on es mostren la relació dels *Myotis* analitzats amb l'espècie *Myotis myotis*.

El refugi 2 allotja una colònia pluriespecífica de ratapinyades de les següents espècies: *M. myotis*, *M. schreibersii*, *M. capaccinii*, *Myotis escaleraei*, *Rhinolophus ferrumequinum* i *Rhinolophus hipposideros*. S'ha observat que totes les espècies excepte *R. hipposideros* crien en aquest refugi. L'agrupació de cria de *M. myotis* és de 591 ($IC_{95\%} = 377-804$), els quals arriben a mitjans de primavera i parteixen de la cova durant la tardor (Serra-Cobo et al., 2007a i b).

3.2. FLUCTUACIÓ EN EL PERCENTATGE DE RATAPINYADES SEROPOSITIVES

La tècnica posada a punt en el projecte ha estat molt eficient per obtenir mostres de sang en animals vius. Les ratapinyades recapturades una setmana després de l'extracció sanguínia no presentaven cap traça de la incisió (Serra-Cobo et al., 2002).

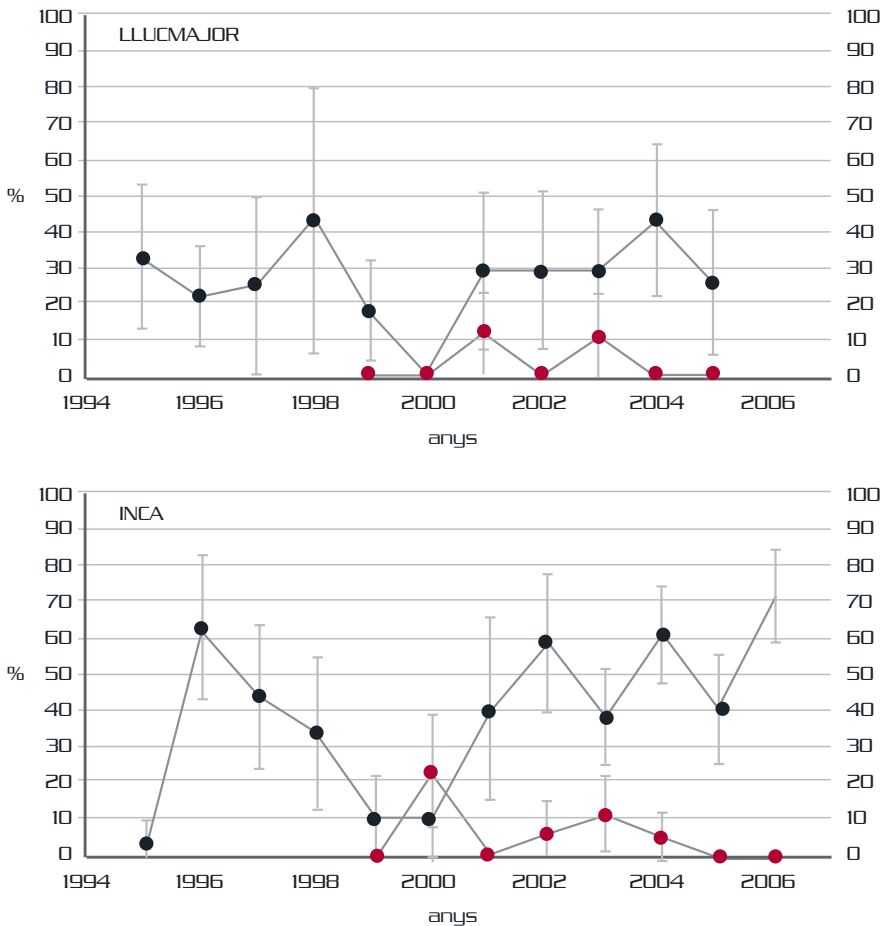


Figura 10. Variació temporal del percentatge de sèrums i pòsits sanguinis positius a les dues colònies de ratapinyades estudiades. El tant per cent de seropositius està indicat en negre, mentre que en vermell s'ha indicat el percentatge de pòsits positius. Els segments verticals indiquen els intervals de confiança del 95%.

Taula 11. Resultats serològics i de nRT-PCR obtinguts a partir del seguiment efectuat a les dues colònies de *M. myotis*

Localitat	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	TOTAL
Colònia 1	A/B 7/21	7/32	3/12	3/7	5/28	0/6	5/17	5/17	8/28	9/21	5/19	nr	57/208
	X±SD 122±45	207±159	218±136	412±454	106±61	NA	65±40	68±32	159±125	67±31	81±68	nr	
	Rang 83-195	53-442	129-374	87-930	29-176	NA	56-126	36-117	36-334	36-107	35-190	nr	
	C/D nr	nr	nr	nr	0/28	0/6	2/17	0/17	3/28	0/21	0/19	nr	5/136
	E/F nr	nr	nr	0/2	0/4	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	0/6
Colònia 2	A/B 1/30	16/27	11/27	7/22	3/30	3/30	6/16	17/31	22/59	35/61	17/45	38/57	176/435
	X±SD 90	348±237	191±225	718±657	78±27	58±42	37±24	55±17	87±79	115±81	62±45	115±47	
	Rang NA	49-908	29-783	79-1677	47-95	29-107	31-94	39-123	36-348	36-370	29-146	35-177	
	C/D nr	nr	nr	nr	0/30	6/29	0/16	2/32	4/38	3/43	0/45	0/57	15/290
	E/F nr	0/2	nr	nr	0/4	1/3	0/1	nr	1/1	nr	nr	nr	2/11

A, nombre de ratapinyades seropositives. B, nombre de sèrums de ratapinyades analitzats. X, titulació mitjana de seroneutralització de sèrums positius. SD, desviació estàndard. C, nombre de pòsits sanguinis positius. D, nombre de pòsits sanguinis analitzats. E, nombre de carcasses positives. F, nombre de carcasses analitzades. nr, no realitzat, NA, no aplicable.

Els resultats de les anàlisis serològiques mostren l'existència d'elevada exposició de *M. myotis* a EBLV-1 (36,24 %, n = 643), amb significatives diferències entre les dues colònies. La taxa de seroprevalença no difereix significativament entre adults i juvenils ni entre mascles i femelles. Tampoc no s'han observat diferències significatives interanuals en el tant per cent de ratapinyades seropositives de la colònia 1 ($\chi^2 = 6,55$, gll = 9, $p > 0,5$) detectades durant el període d'estudi (1995-2005) (figura 10 i taula 11). Per tant, aquesta colònia va ser considerada en estat d'equilibri i es va prendre la mitjana de ratapinyades susceptibles durant aquest període (58,62 %, $IC_{95\%} = 51,99\% - 65,25\%$) per calcular la taxa bàsica de reproducció del virus ($R_0 = 1,706$, $IC_{95\%} = 1,533 - 1,923$) (Amengual *et al.*, 2007a).

A diferència del que succeïa a la colònia 1, s'han observat variacions significatives en el percentatge de ratapinyades seropositives a la colònia 2 ($\chi^2 = 69,56$, gll = 9, $p > 0,0001$). Quatre màxims d'individus seropositius han estat identificats en el decurs dels 12 anys d'estudi: 1995-1996 ($\chi^2 = 18,92$, $p < 0,001$); 2000-2002 ($\chi^2 = 12,57$, $p < 0,001$); 2003-2004 ($\chi^2 = 4,03$, $p < 0,05$); 2005-2006 ($\chi^2 = 7,33$, $p < 0,001$) (figura 10 i taula 11).

L'obtenció de diverses mostres en els mateixos individus (de 2 a 4 vegades) en intervals d'1 a 8 anys ha possibilitat seguir l'evolució a través dels anys dels títols de seroneutralització de 46 ratapinyades (taula 12). Set individus

varen ser capturats i analitzats més de dues vegades a intervals d'un a diversos anys. Una ratapinyada va ser analitzada quatre vegades entre 1996 i 2004. El seguiment realitzat demostra que els anticossos antiEBLV-1 d'alguns *M. myotis* continuen sent detectables un any després de la seroconversió. Denou d'aquestes 46 ratapinyades han presentat titulacions negatives d'anticossos en les següents recaptures després d'uns anys, fet que demostra que han sobreviscut diversos anys després de la seroconversió.

3.3. PRESENCIA D'ARN D'EBLV-1

Totes les ratapinyades trobades mortes (n = 17) varen ser analitzades per immunofluorescència i per nRT-PCR. Tots els resultats de les anàlisis per IF foren negatius. Al contrari, 2 *M. myotis* recol·lectats a la localitat 2 varen ser positius per nRT-PCR (el cervell d'un i el cor i la llengua de l'altre).

Tots els pòsits de sang foren analitzats per nRT-PCR a partir de 1999. El 3,68 % i el 5,17 % varen ser positius a les colònies 1 i 2, respectivament. Les anàlisis comparatives de totes les seqüències amplificades indicaren que els ARN obtinguts en l'estudi pertanyien al genotip EBLV-1. El percentatge de divergència de les seqüències obtingudes va ser calculat per comparació amb 4 soques diferents d'EBLV-1. El rang observat era de 0 a 4,9 % respecte als EBLV-1 francesos i alemanys i de 1,6 a 4,1 % respecte a les dues soques espanyoles. El percentatge de

divergència augmentava del 20,5 al 23 % quan les mostres de l'estudi es comparaven amb una soca de Duvenhage (serotip 4) i del 23 al 27,9 % quan la comparació era amb dues soques d'EBLV-2 de França i Finlàndia (Amen-gual *et al.*, 2007a).

Únicament dues de les 429 mostres sanguínies analitzades per nRT-PCR i seroneutralització varen ser posi-

tives per ambdues tècniques ($\chi^2 = 8,91$, $p < 0,01$). Els resultats mostren el valor que té la tècnica d'obtenció de mostres sanguínies desenvolupada en el present estudi, que permet obtenir informació complementària a partir d'anàlisis serològiques i de nRT-PCR. La combinació de les dues tècniques d'anàlisi permet aportar valuosa informació sobre la infecció per EBLV-1.

Taula 12. Seguiment d'individus capturats en diverses ocasions

Localitat	Anys	S ₁	C ₁	Anys	S ₂	C ₂	Anys	S ₃	C ₃	Anys	S ₄	C ₄
Colònia 1	2002	45,8	-	2003	85,8	-						
	2002	0	-	2005	189,8	-						
	2003	65	-	2004	52,7	-	2005	0	-			
	2003	0	-	2004	35,5	-						
	2004	35,5	-	2005	126,6	-						
	2004	0	-	2005	35,5	-						
	2004	106,6	-	2005	0	-						
Colònia 2	1996	0	nr	2002	62,6	-	2003	44,4	-	2004	0	-
	1996	709	nr	2002	69,2	-						
	1997	0	nr	2001	35,5	-						
	1997	29,3	nr	2001	0	-						
	1997	783,2	nr	2001	35,5	-						
	1997	0	nr	2004	67	+						
	1998	79,5	nr	2003	0	-	2004	0	-			
	2000	29	-	2001	38,8	-						
	2000	0	-	2001	40,5	-						
	2000	0	-	2002	50,3	-						
	2000	39	-	2002	48,6	-	2003	38,7	-			
	2001	35,5	-	2003	105,3	-						

Localitat	Any ₁	S ₁	C ₁	Any ₂	S ₂	C ₂	Any ₃	S ₃	C ₃	Any ₄	S ₄	C ₄
	2002	84,1	-	2003	0	-						
	2002	62,6	-	2003	71,1	-						
	2002	52,7	-	2003	0	-						
	2002	110,3	-	2003	349	-						
	2002	0	-	2004	85,8	-						
	2002	94,8	+	2004	35,5	-						
	2002	116,2	-	2004	107	-	2006	169	-			
	2002	81,4	-	2005	0	-						
	2002	44,3	-	2005	0	-						
	2003	106,6	-	2004	0	-						
	2003	106,6	-	2004	35,5	-						
	2003	46,8	-	2004	0	-						
	2003	87,9	-	2004	107	-						
	2003	38,7	-	2004	149	-						
	2003	84,1	-	2004	155	-						
	2003	281,4	-	2004	154	-	2005	0	-			
	2003	123,5	-	2004	116	-	2006	147	-			
	2003	56,2	-	2005	0	-						
	2003	348,4	-	2005	0	-						
	2004	370	-	2005	0	-						
	2004	35,5	-	2005	0	-						
	2004	41,9	-	2005	0	-						
	2004	140	-	2005	0	-						
	2004	38,7	-	2005	0	-						
	2004	35,5	-	2005	0	-						
	2004	65	-	2006	107	-						
	2004	107	-	2006	116	-						

Cada fila correspon a un individu analitzat diferents vegades, a intervals d'un any o més. Any₁ correspon al primer any d'anàlisi i Any₂, Any₃, Any₄ corresponen als anys en què s'han efectuat les següents recaptures, els següents mostres i les anàlisis. S, Títol d'anticossos en sèrum. C, nRT-PCR resultats obtinguts en els pòsits. Els pòsits sanguinis no varen ser analitzats (nr) per nRT-PCR abans de 1999. -: resultats negatius per nRT-PCR, +: resultats positius per nRT-PCR.

3.4. SUPERVIVÈNCIA DE *M. MYOTIS*

La taxa de supervivència aparent de la colònia 1 va ser estimada a partir de 93 *M. myotis* capturats. La taxa de supervivència del millor model estimat era constant i no mostrava evidència de ser dependent ni del sexe ni del temps ($\Phi = 0,719$, $IC_{95\%} = 0,407-0,905$). Per estimar la taxa de supervivència a la colònia 2 es varen capturar 799 *M. myotis*. El millor model també mostrava taxa de supervivència constant ($\Phi = 0,708$, $IC_{95\%} = 0,637-0,769$) malgrat haver hagut infeccions de *Lyssavirus* a la colònia, tal com ho demostren les variacions temporals de la taxa de seroconversió i els resultats de les anàlisis per nRT-PCR. Aquests resultats indiquen que la taxa de mortalitat no ha estat modificada pels cicles epidèmics recurrents i que la mortalitat induïda per la infecció d'EBLV-1, α , podia ser considerada despreciable en la nostra anàlisi. Les taxes de supervivències de les colònies 1 i 2 no eren significativament diferents.

3.5. DINÀMICA TEMPORAL DE LA INFECCIÓ D'EBLV-1

El patró de la dinàmica temporal de la infecció d'EBLV-1 va ser determinada utilitzant un model dinàmic (Anderson i May, 1991), la taxa de mortalitat ($\mu = 0,281$, $IC_{95\%} = 0,095-0,593$) i els paràmetres epidemiològics calculats durant l'estudi ($R_0 = 1,706$, taxa de reconversió, $\nu = 0,719$, $IC_{95\%} = 0,407-0,905$). L'estimació de la durada de la infecció era de $D = 5,077$ dies ($CI_{95\%} = 4,033 - 8,968$).

El model mostra que després de la introducció inicial d'EBLV-1 en una colònia de ratapinyades susceptibles, la seroprevalença tendeix a oscil·lar seguint períodes i amplituds que disminueixen any rera any fins assolir la situació d'equilibri. Els resultats obtinguts a la colònia 1 indiquen que aquesta es troba en la fase final del model, i, per tant, és propera a la situació d'equilibri. Això no obstant, les oscil·lacions observades en el nombre de ratapinyades seropositives indiquen que la colònia 2 està en la fase inicial del model (figures 10 i 11). Aquestes anàlisis mostren que hi ha bona aproximació entre els valors predits i els observats (Amengual et al., 2007a; Amengual et al., 2008).

3.6. ALTRES ESPÈCIES INFECTADES PER EBLV-1

La taula 13 mostra els resultats serològics obtinguts a altres espècies, cadascuna d'aquestes representa una família de ratapinyades (Rinolòfids, Minioptèrids i Molòssids). S'han detectat ratapinyades seropositives a set localitats diferents de les Illes Balears. És la primera vegada que s'observa la presència d'anticossos neutralitzants específics antiEBLV-1 a *M. myotis*, *R. ferrumequinum*, *M. schreibersii* i *T. teniotis* (Serra-Cobo et al., 2002). Durant l'estudi es detectà presència d'ARN d'EBLV-1 al cervell d'un *Myotis nattereri*, un *M. schreibersii* i dos *R. ferrumequinum*, un dels quals també va ser positiu al cor, la llengua i els pulmons.

Finalment, en un *R. ferrumequinum* en què l'anàlisi del cervell va ser negativa, es detectà ARN d'EBLV-1 a la faringe-esòfag i als pulmons. El treball

ha aportat la primera detecció d'ARN d'EBLV-1 per nRT-PCR en les espècies *R. ferrumequinum*, *M. schreibersii* i *M. escaleraei* (Serra-Cobo et al., 2002).

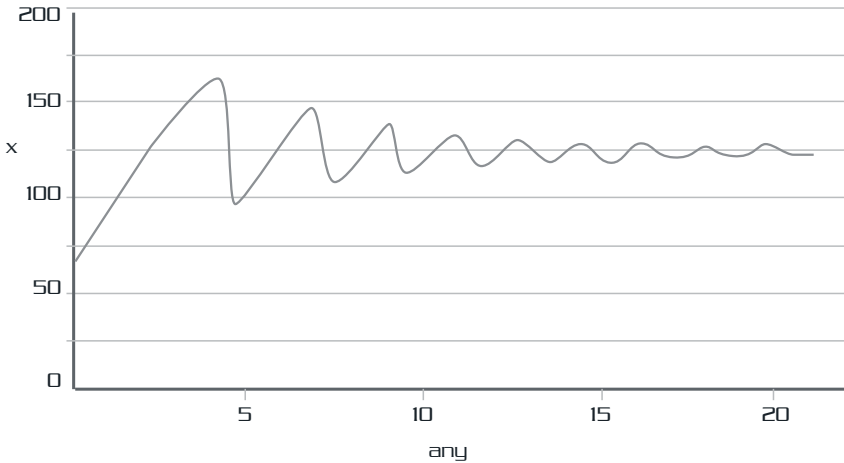


Figura 11. Patró temporal de la variació del nombre de ratapinyades susceptibles $X(t)$ a colònies de *M. myotis*, obtingut a partir del model d'Anderson i May (1991), utilitzant $R_0 = 1,706$.

Taula 13. Altres espècies de ratapinyades en les quals s'han detectat individus seropositius

Espècie	A/B	Rang
<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	2/36	34 - 515
<i>Miniopterus schreibersii</i>	6/112	31 - 8.505
<i>Tadarida teniotis</i>	2/12	42 - 444

A, nombre de ratapinyades seropositives. B, nombre de sèrums de ratapinyades analitzats.

3.7. MOVIMENTS ESTACIONALS

S'han estudiat els moviments estacionals de quatre espècies de ratapinyades: *R. ferrumequinum*, *M. myotis*, *Myotis capaccinii* i *M. schreibersii*. La taula 14 mostra el nombre d'individus anellats, recapturats i analitzats a les colònies 1 i 2. Malgrat ser relativament

elevada (26,32%) la taxa de recaptura de *M. myotis* i estar situades les dues coves a 35 Km de distància, sols tres de les ratapinyades anellades a Llucmajor s'han desplaçat a Inca durant el període d'estudi. No s'ha comprovat que cap *M. myotis* anellat a Inca s'hagi desplaçat vers Llucmajor (Amengual et al., 2007a).

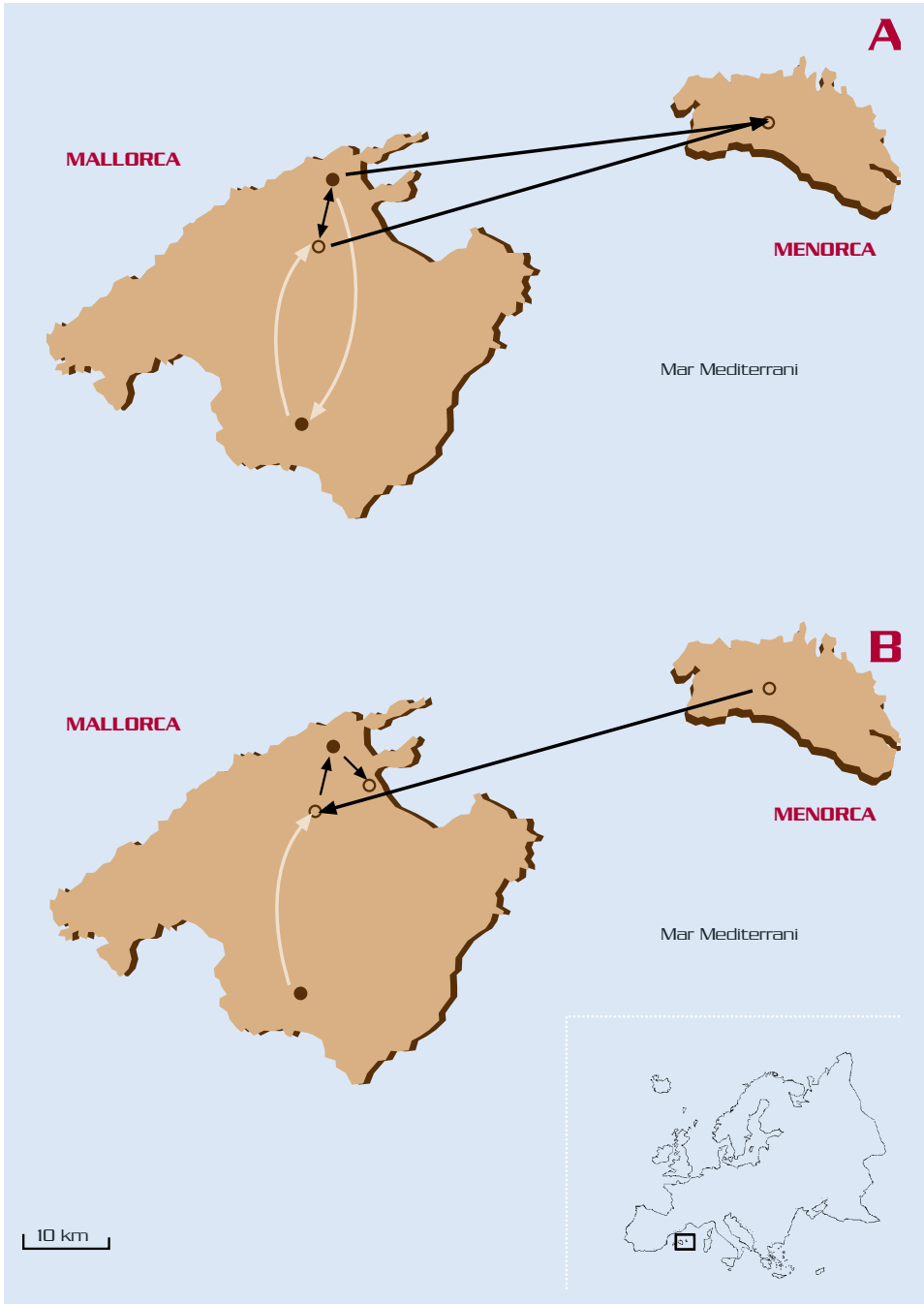


Figura 12. Moviments estacionals de ratapinyades de colònies mallorquines. Els punts negres indiquen refugis on s'allotja *M. schreibersii*, *M. capaccinii* i *M. myotis*. Els punts buids indiquen la presència de *R. ferrumequinum*. **A.** Moviments estacionals de *M. schreibersii*. **B.** Moviments estacionals de *M. myotis* (color blanc) i *M. capaccinii* (color negre) (Serra-Cobo et al. 2007a, b).

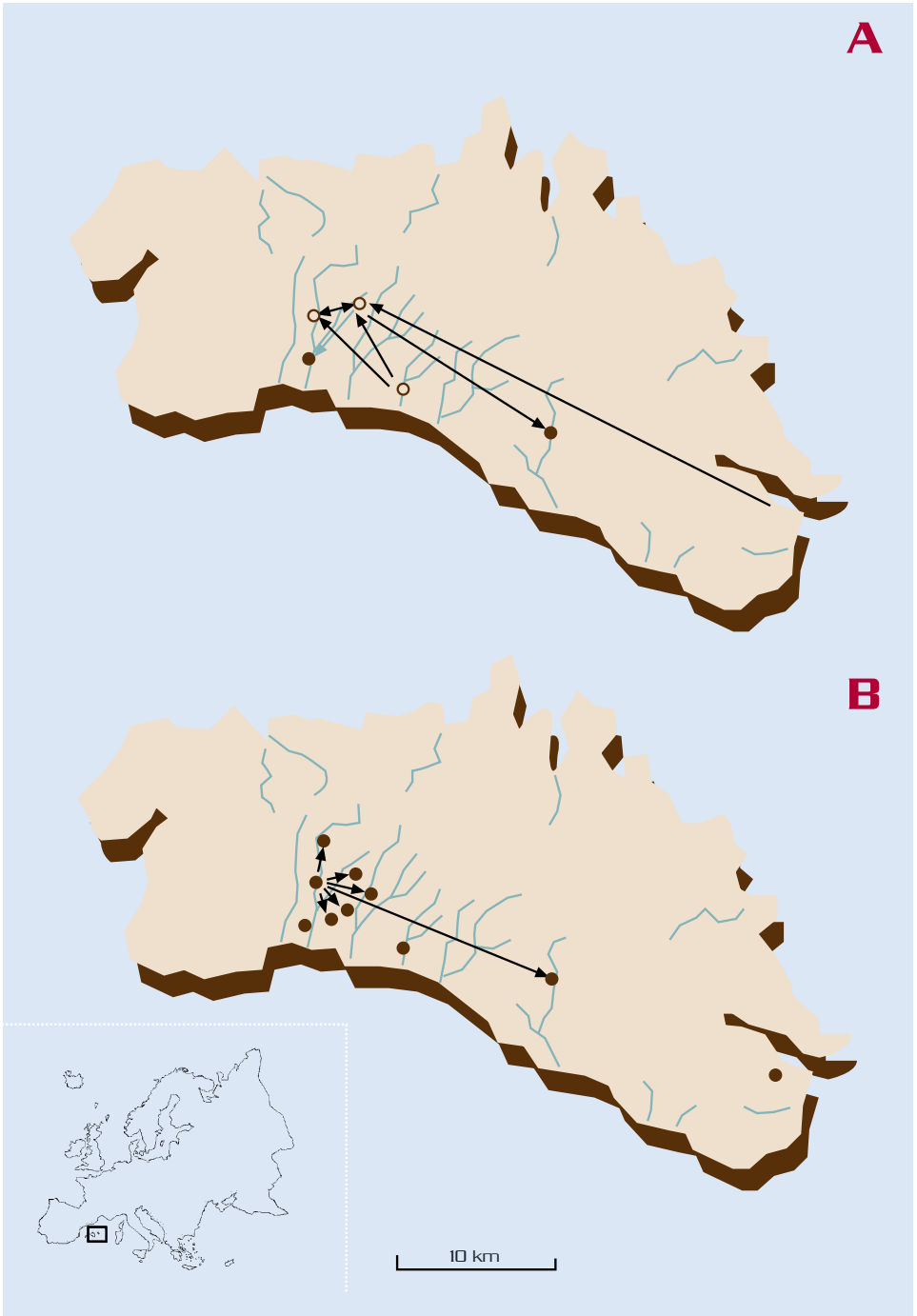


Figura 13. Moviments estacionals de ratapinyades de colònies menorquines. **A.** Moviments estacionals de *M. schreibersii*. Els punts buids són refugis on també s'hi allotja *M. capaccinii*. **B.** Moviments estacionals de *R. ferrumequinum* (Serra-Cobo et al. 2007a, b).

Les figures 12 i 13 il·lustren els moviments comprovats. Són els primers desplaçaments estacionals de ratapinyades verificats a les Illes Balears (Serra-Cobo *et al.*, 2007a i b). L'estudi

també ha permès comprovar per primera vegada el desplaçament entre les illes de Mallorca i Menorca de les espècies *M. schreibersii* i *M. capaccinii* (Amengual *et al.*, 2007b).

Taula 14. Nombre de *M. myotis* recapturats i analitzats a les colònies 1 i 2, 1996-2006

Categoria	Nombre
Nre. de ratapinyades anellades a la colònia 1 i 2	1.260
Nre. de ratapinyades anellades i recapturades a la mateixa colònia	352
Nre. de ratapinyades anellades que s'han desplaçat entre les colònies 1 i 2	3
Nre. de ratapinyades anellades i analitzades ^a	
Una vegada	406
Dues vegades	72
Tres vegades	12
Quatre vegades	3
Nre. de ratapinyades analitzades i no anellades	45

^aLes successives anàlisis realitzades en els mateixos individus varen ser efectuades en intervals de ≥ 1 any.

4. DISCUSSIÓ

El treball ha dedicat gran esforç a identificar la dinàmica temporal d'EBLV-1 a colònies de *Myotis myotis*, però per aconseguir-ho el projecte requeria una aproximació multidisciplinària. Per aquest motiu, es va recórrer a realitzar anàlisis microbiològiques, genètiques, ecològiques, epidemiològiques, bioinformàtiques i matemàtiques.

L'estructura espacial de les poblacions de ratapinyades és variable i pot influir en la dinàmica de la infecció. Algunes espècies gregàries tenen una estructura poblacional en metapoblació que consisteix en una repartició discreta en subpoblacions i interaccions estacionals (Calisher *et al.*, 2006). Les dades de marcatge - captura – recaptura de *Myotis myotis* mostren que l'intercanvi entre les colònies estudiades és limitat i, per tant, poden ser considerades com a subpoblacions de pocs centenars d'individus espacialment discretes. La distribució discreta de les espècies que poblen més d'una illa, per exemple *Rhinolophus ferrumequinum*, *Miniopterus schreibersii*, *Myotis capaccinii* i *Myotis escalerai*, és encara més evident (Serra-Cobo *et al.*, 2007a i b). Per mantenir la circulació vírica a través del temps en aquestes subpoblacions, la relació entre virus i hostes probablement segueix certs compromisos en termes de taxa de mortalitat, desenvolupament de la immunitat i nombre de ratapinyades susceptibles.

Les significatives fluctuacions en el percentatge de ratapinyades seropositives observades a la colònia 2 són indicatives d'haver-hi hagut diferents episodis d'infeccions per EBLV-1 a la colònia 2 durant el període d'estudi. Això no obstant, els esmentats episodis d'infecció no han modificat significativament la taxa de supervivència de la colònia de *M. myotis*. Cap de les ratapinyades capturades (incloses totes les seropositives i ARN positives) presentava conducta anòmala que pogués ser relacionada amb ràbia. A més, 19 ratapinyades varen sobreviure després d'un any d'haver caracteritzat anticossos neutralitzants antiEBLV-1 en el seu sèrum. Aquestes dades proporcionen la primera evidència que la mortalitat de les colònies salvatges de *M. myotis* no augmenta significativament després de produir-se episodis d'infecció per EBLV-1. Així doncs, l'avaluació del risc de transmissió de *Lyssavirus* als humans no pot ser determinada en base a observacions de mortalitat anormal en les colònies de ratapinyades. Cal tenir en compte que la manca de simptomatologia ràbica en les ratapinyades infectades pot conduir a minimitzar l'avaluació del risc que comporta manipular quiròpters. Les dades del present treball contrasten amb les observacions realitzades en condicions naturals en carnívors no voladors salvatges (Coyne *et al.*, 1989; Harris i White, 2004) i en altres espècies de ratapinyades (Van der Poel *et al.*, 2005; Bourhy *et al.*, 1992) en les quals sí que s'ha observat alteració de la conducta.

Les infeccions ràbiques en animals no voladors és el paradigma per estudiar malalties cícliques en animals salvatges (Coyne *et al.*, 1989; Bacon, 1985; Grenfell, 2002). En el present estudi establím que la infecció per EBLV-1 segueix la mateixa tendència cíclica. El model epidemiològic utilitzat (Anderson i May, 1991) es basa en infeccions humanes i, per tant, s'ha emprat com a una aproximació. No obstant, el model emprat explica el patró de la infecció per *Lyssavirus* que s'ha observat a les colònies de *M. myotis*. Les dades observades i esperades (donades pel model) referents a les variacions en el percentatge de *M. myotis* seropositius són concordants. La infecció per *Lyssavirus* a *M. myotis* es caracteritza per un elevat grau d'immunitat a les ratapinyades després de la circulació de virus (pot arribar a ser del 60 % dels individus de la colònia). L'esmentat elevat tant per cent de ratapinyades seropositives després de la infecció és indicativa que la transmissió vírica entre individus és eficient i la circulació vírica dins la colònia és ràpida. Aquestes troballes no són sorprenents en una espècie de ratapinyada gregària com és *M. myotis*. La colònia s'agrupa en menys d'un metre quadrat del refugi, característica que produeix una elevada taxa de contactes entre individus (Serra-Cobo *et al.*, 2007a i b).

Després de la introducció inicial d'EBLV-1 en una colònia de ratapinyades susceptibles, la seroprevalença tendeix a oscil·lar (com s'ha observat en la colònia 2) i l'amplitud de l'oscil·-

lació disminueix gradualment fins assolir l'equilibri, com s'observa en la colònia 1. Les fluctuacions en seroprevalença són característiques d'infeccions que indueixen immunitat de llarga durada (Anderson i May, 1991; Cox, 1993). Les ratapinyades generen ràpidament anticossos davant de la infecció i desenvolupen un grau de protecció immunològica enfront de futures infeccions. Les dades de recaptures i el seguiment serològic individual mostra que aquesta immunitat pot persistir durant més d'un any. L'interval entre ones depèn de la taxa d'entrada de ratapinyades susceptibles a la colònia com a conseqüència de naixements, immigració i pèrdua d'immunitat específica antiEBLV-1 en animals que havien estat prèviament infectats. Quan la colònia de ratapinyades assoleix una fracció d'individus susceptibles suficient, el virus es propaga si arriben de nou a la colònia individus infectats.

Un cop determinat que el model corrobora les característiques de la dinàmica de la infecció per EBLV-1 a *M. myotis*, aquest s'ha utilitzat com a base per a l'estudi de la dispersió local de la infecció. El treball aporta la primera estimació de la taxa bàsica de reproducció de *Lyssavirus* en una colònia de ratapinyades insectívores. El valor obtingut ($R_0 = 1,706$) és menor del que presenten la majoria de les malalties infeccioses humanes (Anderson i May, 1991). La predicció de la durada del període infecció també és la primera vegada que s'obté.

En resum, el present estudi demostra infeccions cícliques d'EBLV-1 a subpoblacions espacialment discretes de *M. myotis* a les Illes Balears amb oscil·lacions periòdiques en el nombre de ratapinyades susceptibles, immunes i infectades i sense que es produeixi cap increment significatiu de mortalitat associada. La immunitat persisteix en algunes ratapinyades més d'un any. El model temporal dinàmic prediu una baixa taxa de reproducció del virus i un curt període d'infecciositat. Aquestes observacions poden ser atribuïdes a un llarg establiment de la infecció en aquesta espècie i a un procés de coevolució entre virus i hoste, tal com indica la baixa taxa de creixement viral a la colònia de ratapinyades. Els resultats obtinguts són especialment importants per desenvolupar mesures per protegir els humans del risc d'infecció per *Lyssavirus* de ratapinyades. Es confirma el potencial risc de transmissió ràbica als humans, sí bé aquest és relativament baix a *M. myotis* a causa del curt període d'infecciositat.

S'ha detectat infecció a quatre espècies de ratapinyades de les Illes Balears, representant totes les famílies de quiròpters que viuen a Europa (Vespertiliònids, Rinolòfids, Miniopètrids i Molòssids). Tenint en compte aquest resultat i altres inèdits encara no publicats, es pot dir que totes les espècies de ratapinyades són potencialment reservoris de virus ràbic.

L'estudi dels desplaçaments estacionals té suma importància en l'anàlisi

de la dinàmica espacial de la infecció i, en conseqüència, en l'anàlisi epidemiològica d'aquesta zoonosi. S'han comprovat dos tipus de desplaçaments: els curts, de pocs quilòmetres de recorregut i que poden dispersar els virus entre colònies properes, i els desplaçaments relativament més llargs (Serra-Cobo *et al.*, 1998, 2000b). Aquests darrers, els realitzen espècies migradores regionals que poden dispersar els virus entre colònies més allunyades, per exemple les situades a illes diferents. Els desplaçaments de *R. ferrumequinum* i *M. myotis* són relativament curts i contribueixen a la dispersió local dels virus (Amengual, 2005). Al contrari, *M. schreibersii* i *M. capaccinii* poden contribuir a la dispersió vírica a més llarga distància. La importància de *M. schreibersii* en la dispersió de *Lyssavirus* pot transcendir més enllà de les Illes Balears. *M. schreibersii* és relativament abundant a les dues ribes de la Mediterrània i forma colònies mixtes en les quals sovint està directament en contacte amb espècies de *Myotis*. Així doncs, *M. schreibersii* podria ser un dels vectors d'EBLV-1 al sud d'Europa i nord d'Àfrica (Serra-Cobo *et al.*, 1998, 2002).

Els resultats del present estudi tenen importants implicacions en la gestió de les colònies de ratapinyades i en la salut pública. Malgrat que el període d'infecciositat sigui curt (uns cinc dies) s'ha de reduir i controlar la possibilitat que les persones tinguin contacte amb les colònies infectades. Per aquest

motiu, la Conselleria de Medi Ambient del Govern de les Illes Balears ha controlat i restringit l'accés a les dues coves estudiades. Queda per realitzar una important tasca de divulgació sobre la zoonosi ràbica en quiròpters que permeti donar a conèixer les mesures preventives i les de postexposició que s'han de prendre.

El treball efectuat a les Illes Balears ha estat reconegut per l'Organització Mundial de la Salut en el seu *Rabies Bulletin Europe* i està servint de model en estudis realitzats a altres països, com per exemple: Marroc, Egipte, Tunísia, Algèria, Bèlgica, Itàlia, Cambodja, etc.

5. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- Alcover JA, Muntaner J. Els quiròpters de les Balears i Pitiüses: una revisió. *Endins*, 1986;12: 51-63.
- Amengual B, Whitby JE, King A, Serra-Cobo J, Bourhy H. Evolution of European bat lyssaviruses. *Journal of General Virology*, 1997; 78: 2319-2328.
- Amengual B. Evolució i poder patogen dels *Lyssavirus* en quiròpters. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona, 2005.
- Amengual B, Bourhy H, López-Roig M, Serra-Cobo J. Temporal dynamics of European Bat Lyssavirus type 1 and survival of *Myotis myotis* bats in natural colonies. *PLoS ONE*, 2007a; June, Issue 6, e566.
- 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*, Karger, 2008; 131: 531-537.
- Amengual B, López-Roig M, Serra-Cobo J. First record of seasonal over sea migration of *Miniopterus schreibersii* and *Myotis capaccinii* between Balearic Islands (Spain). *Acta Chiropterologica*, 2007b; 3: 319-322.
- Anderson RM, May RM. *Infectious Diseases of Humans*. Oxford Univ Press, Oxford, 1991.
- Anonymous. Isolations of Lagos bat virus in West Africa. Internal Reports of Centre Collaborateur OMS de Référence et Recherche pour les Arbovirus. Institut Pasteur, Dakar, Senegal, 1985.
- Anonymous. Bat rabies in the Union of Soviet Socialist Republics. *Rabies Bulletin Europe*, 1986; 10: 12-14.
- Arai YT, Kuzmin IV, Kameoka Y, Botvinkin D. New Lyssavirus Genotype from the Lesser Mousse-eared Bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. *Emerging Infectious Diseases*, 2003; 9(3): 333-337.
- Arguin PM, Murray-Lillibridge K, Miranda M, Smith J, Calaor AB, Rupprecht C. Serologic Evidence of Lyssavirus Infections among Bats, the Philippines. *Emerging Infectious Diseases*, 2002; 8(3): 258-262.
- Bacon PJ. A System Analysis of Wildlife Rabies Epizootics. In: Bacon P J, editor. *Population Dynamics of rabies in wildlife*. Academic Press, London, 1985.
- Badrane H, Bahloul C, Perrin P, Tordo N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct

- pathogenicity and immunogenicity. *Journal of Virology*, 2001; 75: 3268-3276.
- Badrane H, Tordo N. Host Switching in *Lyssavirus* History from the Chiroptera to the Carnivora Orders. *Journal of Virology*, 2001; 75(17): 8096-8104.
 - Baker RJ, Longmire JL, Maltbie M, Hamilton MJ, Van Den Bussche R. DNA synapomorphies for a variety of taxonomic levels from a cosmids library from the New World bat *Macrotus waterhousii*. *Systematic Biology*, 1997; 46: 579-589.
 - Banerjee AK. Transcription and replication of rhabdoviruses. *Microbiological Reviews*, 1987; 51: 68-87.
 - Bickham JW, Patton JC, Schlitter DA, Rautenbach IL, Honeycutt RL. Molecular phylogenetics, karyotypic diversity, and partition of genus *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004; 33: 333-338.
 - Bishop DH, Emerson SU, Flamand A. Reconstitution of infectivity and transcriptase activity of homologous and heterologous viruses: vesicular stomatitis (Indiana serotype), Chandipura, vesicular stomatitis (New Jersey serotype), and Cocal viruses. *Journal of Virology*, 1974; 14: 139-144.
 - Bitsch V, Westergarrd JM i Valle M, 1985. *MMWR* 35: 430-432.
 - Botvinkin AD, Poleschuk EM, Kuzmin IV, Borisova TI, Gazaryan SV, Yager P Rupprecht CE. Novel Lyssaviruses Isolated from Bats in Russia. *Emerging Infectious Diseases*, 2003; 9(12): 1623-1625.
 - Boulger LR, Porterfield JS. Isolation of a virus from Nigerian fruit bats. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1958; 52: 421-424.
 - Bourhy H. Développements récents de l'épidémiologie des infections à lyssavirus et conséquences pour l'homme. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 2003; 156(2): 5-11.
 - Bourhy H, Kissi B, Audry L, Smreczak M, Sadkowska-Todys M, Kulonen K, Tordo N, Zmudzinski JF, Holmes EC. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *Journal of General Virology*, 1999; 80: 2545-2557.
 - Bourhy H, Kissi B, Lafon M, Sacramento D, Tordo N. Antigenic and Molecular Characterization of Bat Rabies Virus in Europe. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992; 30: 2419-2426.
 - Bourhy H, Kissi B, Tordo N. Molecular diversity of the Lyssavirus Genus. *Virology*, 1993; 194: 70-81.
 - Bourhy H, Tordo N, Lafon M, Sureau P. Complete cloning and molecular organization of a rabies-related virus: Mogola virus. *Journal of General Virology*, 1989; 70: 2063-2074.

- Brass DA. Rabies in bats: Natural history and public health implications. Connecticut: Livia Press, Ridgerfield, 1994.
- Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006; 19: 531-545.
- Charlton KM. The pathogenesis of rabies. In "Rabies" (J.B.Campbell and K.M.Charlton, Eds.), Kluwer Academic Publishers, Boston, 1988.
- Charlton KM i Casey GA. Experimental rabies in skunks: persistence of virus in denervated muscle at the inoculation site. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 1981; 45: 357-362.
- Chattopadhyay D, Banerjee AK. Phosphorylation within a specific domain of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus regulates transcription in vitro. *Cell*, 1987; 49: 407-414.
- Chong LD, Rose JK. Membrane association of functional vesicular stomatitis virus matrix protein in vivo. *Journal of Virology*, 1993; 67: 407-414.
- Chenik M, Schnell M, Conzelmann KK, Blondel D. Mapping the interacting domains between the rabies virus polymerase and phosphoprotein. *Journal of Virology*, 1998; 72: 1925-1930.
- Constantine DG. Rabies transmission by air in bat caves. In Public Health Service Publication, Education and Welfare, Atlanta, 1967.
- Constantine DG. Airbone transmission of rabies in bat caves. *Seminário Internacional Morcegos como transmissores da raiva. Memorial da América Latina. 3 a 6 dezembro 2001 Sao Paulo, Brasil, 2001.*
- Constantine D, Herbenick T. Rabies in *Myotis thysanodes*, *Lasiurus ega*, *Euderma maculatum* and *Eumops perotis* in California. *Journal of Wildlife Diseases*, 1979; 15: 343-345.
- Coulon P, Derbin C, Kucera P, Lafay F, Prehaud C, Flamand A. Invasion of the peripheral nervous systems of adult mice by the CVS strain of rabies virus and its avirulent derivative AvO1. *Journal of Virology*, 1989; 63: 3550-3554.
- Coulon P, Rollin P, Aubert M, Flamand A. Molecular basis of rabies virus virulence. I. Selection of avirulent mutants of the CVS strain with anti-G monoclonal antibodies. *Journal of General Virology*, 1982; 61: 97-100.
- Cox J, Dietzschold B, Schneider L. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infect.Immunity*, 1977; 16: 754-759.

- Cox FEG. Modern parasitology. Blacwell Scientific Publications, Oxford, 1993.
- Coyne MJ, Smith G, McAllister FE. Mathematic model for the population biology of rabies in raccoons in the Mid-Atlantic States. American Journal Veterinary Research, 1989; 50: 2148-2154.
- Crick J, Tignor GH i Moreno K. A new isolate of Lagos bat virus from the Republic of South Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1982; 76:211-213.
- Davis NL, Wertz GW. Synthesis of vesicular stomatitis virus negative-strand RNA in vitro: dependence on viral protein synthesis. Journal of Virology, 1982; 41: 821-832.
- Davis P, Bourhy H, Holmes EC. The Evolutionary History and Dynamics of Bat Rabies Virus. Infection Genetics and Evolution, 2005; 6: 464-473.
- De BP, Banerjee AK. Specific interactions of vesicular stomatitis virus L and NS proteins with heterologous genome ribonucleoprotein template lead to mRNA synthesis in vitro. Journal of Virology, 1984; 51: 628-634.
- De BP, Thornton GB, Luk D, Banerjee AK. Purified matrix protein of vesicular stomatitis virus blocks viral transcription in vitro. PNAS USA, 1982; 79: 7137-7141.
- Delpietro H, Russo RG. Aspectos ecológicos y epidemiológicos de la agresión del vampiro y de la rabia paralítica en la Argentina y análisis de las propuestas efectuadas para su control. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics), 1996; 15(3): 971-984.
- Dietzschold B, Cox JH, Schneider LG. Rabies virus strains: a comparison study by polypeptide analysis of vaccine strains with different pathogenic patterns. Virology, 1979; 98: 63-75.
- Dietzschold B, Wunner WH, Wiktor TJ, Lopes AD, Lafon M, Smith CL, Koprowski H. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. PNAS USA, 1983; 80: 70-74.
- Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. Annual Review of Microbiology, 1997; 51: 151-178.
- Echevarría JE, Avellón A, Juste J, Vera M, Ibáñez C. Screening of Active Lyssavirus Infection in Wild Bat Populations by Viral RNA Detection on Oropharyngeal Swabs. Journal of Clinical Microbiology, 2001; 39(10): 3678-3683.
- Emerson SU. Transcription of vesicular stomatitis virus. In The Rhabdoviruses, pp. 245-269. Edited by R.R. Wagner. Plenum Press, New York , 1987.

- Fekadu M, Shaddock JH. Peripheral distribution of virus in dogs inoculated with two strains of rabies virus. *American Journal of Veterinary Research*, 1984; 45: 724-729.
- Field H, McCall B, Barret J. Australian Bat Lyssavirus Infection in a Captive Juvenile Black Flying Fox. *Emerging Infectious Diseases*, 1999; 5(3): 438-440.
- Foggin CM. Rabies and rabies-related viruses in Zimbabwe: historical, virological and ecological aspects. Ph.D. thesis: University of Zimbabwe, Harare, 1988.
- Foley HD, McGettigan JP, Siler CA, Dietzschold B, Schnell M. A recombinant rabies virus expressing vesicular stomatitis virus glycoprotein fails to protect against rabies virus infection. *PNAS USA*, 2000; 97(26): 14680-14685.
- Fooks AR, McElhinney LM, Pounder DJ, Finnegan CJ, Mansfield K, Johnson N, Brookes SM, Parsons G, White K, McIntyre PG, Nathwani D. Case report: isolation of a European Bat Lyssavirus type 2a from a fatal human case of rabies encephalitis. *Journal of Medical Virology*, 2003; 71: 281-289.
- Fraser GC, Hooper PT, Lunt RA, Gould AR, Gleeson LJ, Hyatt AD, Russell GM, Kattenbelt JA. Encephalitis caused by a Lyssavirus in fruit bats in Australia. *Emerging Infectious Diseases*, 1996; 2(4): 327-331.
- Gaudin Y, Tuffereau C, Knossos M, Flamand A. Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology*, 1992; 187: 627-632.
- Gosztanyi G. Propagation of viruses along neuron networks by transsynaptic passage – a contribution to the pathogenesis of rabies. *Tierärztliche Praxis – Supplement*, 1986; 14: 199-204.
- Gosztanyi G. Reproduction of lyssaviruses: ultrastructural composition of lyssavirus and functional aspects of pathogenesis. In *Lyssaviruses*, pp.43-68. Edited by C.E.Rupprecht, B.Dietzschold & H.Korowski. Springer-Verlag, Berlin, 1994.
- Gould A, Hyatt AD, Lunt R, Kattenbelt JA, Hengstberger S, Blacksell SD. Characterisation of a novel lyssavirus isolated from Pteropid bats in Australia. *Virus Research*, 1998; 54: 165-187.
- Grauballe PC, Baagoe HJ, Fekadu M, Westergaard JM, Zoffman H. Bat rabies in Denmark. *Lancet*, 1978; 14: 378-379.
- Grenfell B. Rivers dam waves of rabies. *PNAS USA*, 2002; 99: 3365-3367.
- Hammond DC, Lesnaw JA. The fate of undermethylated mRNA cap structure of vesicular stomatitis virus (New Jersey) during in vitro transcription. *Virology*, 1987; 159: 229-236.

- Harris S, White PCL. Epidemiological Models. In: King A, Fooks AR, Aubert M, Wandeler AI, editors. Rabies in Europe and the Mediterranean Basin. Office International des Épizooties, Paris, 2004.
- Hercyk N, Horikami SM, Moyer SA. The vesicular stomatitis virus L protein possesses the mRNA methyltransferase activities. *Virology*, 1988; 163: 222-225.
- Hunt DM, Mehta R, Hutchinson KL. The L protein of vesicular stomatitis virus modulates the response of the polyadenylic acid polymerase to S-adenosylhomocysteine. *Journal of General Virology*, 1988; 69: 2555-2561.
- Iseni F, Baudin F, Blondel D, Ruigrok RW. Structure of the RNA inside the vesicular stomatitis virus nucleocapsid. *RNA*, 2000; 6(2): 270-81
- Jackson AC, Reimer DL. Pathogenesis of experimental rabies in mice: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathologica*, 1989; 78: 159-165.
- Kaplan C, Turner GS, Warrell DA. Rabies: the facts. 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, 1986.
- Kappeler A. Bat Rabies surveillance in Europe. *Rabies Bulletin Europe*, 1989; 13(4): 12-13.
- Kawai A. Transcriptase activity associated with rabies virion. *Journal of Virology*, 1977; 24: 826-835.
- Keene JD, Thornton BJ, Emerson SU. Sequence-specific contacts between the RNA polymerase of vesicular stomatitis virus and the leader RNA gene. *PNAS USA*, 1981; 78: 6191-6195.
- King A, Crick J. Rabies-related viruses. In J.B. Campbell i K.M. Charlton (ed.), Rabies. Kluwer Academic Publishers, Boston, 1988.
- Kissi B, Badrane H, Audry L, Lavenu A, Tordo N, Brahimi M, Bourhy H. Dynamics of rabies virus quasispecies during serial passages in heterologous hosts. *Journal of General Virology*, 1999; 80: 2041-2050.
- Kissi B, Tordo N, Bourhy H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. *Virology*, 1995; 209: 526-537.
- Komorowski A, Szankowska Z, Ramisz A. *Przeglad Epidemiologie*, 1974; 11.
- Kucera P, Dolivo P, Coulon P, Flaman A. Pathways of the early propagation of virulent and avirulent rabies strains from the eye to the brain. *Journal of Virology*, 1985; 55: 158-162.
- Kuzmin IV, Orciari LA, Arai YT, Smith JS, Hanlon CA, Kameoka Y, Rupprecht CE. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Cen-

- tral Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. *Virus Research*, 2003; 97(2): 65-79.
- Lafon M, Sureau P. Identification of two rabies-related viruses isolated from bats in Poland and in Senegal by means of monoclonal antibodies, p.341-344. *In* P.Thongcharoen and E. Kurstak (ed.), *Virus disease in Asia*. Mahidol University, Bangkok, Thailand, 1988.
 - Lebreton JD, Burnham KP, Clobert J, Anderson DR. Modelling survival and testing biological hypotheses using marked animals: a unified approach with case studies. *Ecological Monographs*, 1992; 62: 67-118.
 - Lentz TL, Wilson PT, Hawrot E, Speicher DW. Amino acid sequence similarity between rabies virus glycoprotein and snake venom curare-mimetic neurotoxins. *Science*, 1984; 226: 847-848.
 - Lumio J, Hillborn M, Roine R, Ketonen L, Halthia M, Valle M, Neuvonen E, Lahdewita J. Human rabies of bat origin in Europe. *Lancet*, 1986; 15: 378.
 - Lyles DS, McKenzie M, Parce JW. Subunit interactions of vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein stabilized by binding to viral matrix protein. *Journal of Virology*, 1992; 66: 349-358.
 - McColl KA, Gould AR, Sellek PW, Hooper PT, Westbury HA, Smith JS. Polymerase chain reaction and other laboratory techniques in the diagnosis of long incubation rabies in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 1993; 70: 84-89.
 - Mackenzie JS, *Emerging Viral Diseases: An Australian Perspective*. *Emerging Infectious Diseases*, 1999; 5(1): 1-8.
 - Mannen K, Hiramatsu K, Mifune K, Sakamoto S. Conserved nucleotide sequence of rabies virus cDNA encoding the nucleoprotein. *Virus genes*, 1991; 5: 69-73.
 - Mebatsion T, Cox JH, Frost JW. Isolation and characterization of 115 street rabies virus isolates from Ethiopia by using monoclonal antibodies: identification of 2 isolates as Mokola and Lagos bat viruses. *Journal of Infectious Diseases*, 1992; 166: 972-977.
 - Medeiros JL, Heckmann RA. *Euderma maculatum* from California infected with rabies virus. *Journal of Mammalogy*, 1971; 52:858.
 - Meredith CD, Rossouw AP, van Praag Kock H. An unusual case of human rabies thought to be of chiropteran origin. *South African Medical Journal*, 1971; 45: 767-769.
 - Meredith CD i Standing E. Lagos bat virus in South Africa. *Lancet*, 1981; 1: 832-833.

- Mollgard S. Bat rabies in Denmark. Rabies Bulletin Europe, 1985; 9(3):8.
- Mohr W. Medizinische Klinik, 1957; 24: 1057-1060.
- Mondul AM, Krebs JW, Childs JE. Trends in national surveillance for rabies among bats in the United States (1993-2000). JAVMA., 2003; 222: 633-639.
- Morimoto K, Hooper DC, Carbaugh H, Fu ZF, Koprowski H, Dietzschold B. Rabies virus quasispecies: implications for pathogenesis. PNAS USA, 1998; 95: 3152-3156.
- Muller T, Cox J, Peter W. Infection of a stone marten with European Bat Lyssavirus (EBL1). Rabies Bulletin Europe, 2001; 25: 9-11.
- Nadin-Davis SA, Casey GA, Wandler AI. A molecular epidemiological study of rabies virus in Central Ontario and Western Quebec. Journal of General Virology, 1994; 75: 2575-2583.
- Nathwani D, McIntyre PG, White K, Shearer AJ, Reynolds N, Walker D, Orange GV, Fooks AR. Fatal human rabies caused by European Bat Lyssavirus Type 2a infection in Scotland. CID, 2003; 37: 598-601.
- Nicolic M i Jeselic Z, 1986. Rabies Bull. Europe, WHO, 10(1):12.
- Odenwald WF, Arnheiter H, Dubois-Dalcq M, Lazzarini RA. Stereo images of vesicular stomatitis virus assembly. Journal of Virology, 1986; 57: 922-932.
- Ogden JR, Pal R, Wagner RR. Mapping regions of the matrix protein of vesicular stomatitis virus which bind to the ribonucleocapsids, liposomes and monoclonal antibodies. Journal of Virology, 1986; 58: 860-868.
- Ongradi J, Cunningham C, Szilagyi JF. The role of polypeptides L and NS in the transcription process of vesicular stomatitis virus New Jersey using the temperature-sensitive mutant tsE1. Journal of General Virology, 1985; 66: 1011-1023.
- Pape J, Fitzsimmons TD, Hoffman RE. Risk for rabies transmission from encounters with bats, Colorado, 1977-1996. Emerging Infectious Diseases, 1999; 5(3): 433-437.
- Patton JT, Davis NL, Wertz GW. N protein alone satisfies the requirement for protein synthesis during RNA replication of vesicular stomatitis virus. Journal of Virology, 1984; 49: 303-309.
- Perrin P, Portnoï D, Sureau P. Étude de l'adsorption et de la pénétration du virus rabique: interactions avec les cellules BHK-21 et les membranes artificielles. Annales de Virologie (Inst. Pasteur), 1982; 133: 403-422.

- Pitschke H, 1965. *Zblt. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.*, 196: 411-415.
- Pollock RH, Nichols JA, Brownie C, Hines JE. Statistical inference for capture-recapture experiments. *Wildlife Society Monographs*, 1990; 107:1-97.
- ProMED-mail post.. Rabies, humans, vampire bats – Brazil (Para) (05). *Financial Times, Reuters Report*, Wed 26 May 2004 [edited], 2004.
- Reynes JM, Molia S, Audry L, Hout S, Ngin S, Walston J, Bourhy H. Serologic evidence of Lyssavirus infection in bats, Cambodia. *Emerging Infectious Diseases*, 2004; 10(2): 2231-2234.
- Roine RO, Hillbom M, Valle M, Haltia M, Ketonen L, Neuvonen E, Lumio J, Lahdevirta J. Fatal encephalitis caused by a bat-borne rabies-related virus. *Brain*, 1988; 111: 1505-1516.
- Ronne T. Rabies virus in Danish Bats. *Epi-News. National Surveillance of Communicable Diseases*, 1999; 22: 1-2.
- Ronsholt L, Sorenson KJ, Brusckke CJM. Clinically silent rabies infection in (zoo) bats. *The Veterinary Record*, 1998; 142: 519-520.
- Ronsholt L. A new case of European Bat Lyssavirus (EBL) infection in Danish sheep. *Rabies Bulletin Europe*, 2002; 2: 15.
- Sagara J, Tsukita S, Yonemura S, Tsukita S, Kawai A. Cellular actin-binding ezrin-radixin-moesin (ERM) family proteins are incorporated into the rabies virions and closely associated with viral envelope proteins in the cell. *Virology*, 1995; 206: 485-494.
- Sánchez LP. Rabia Transmitida por Murciélagos insectívoros en España. *Bol Epidemiol Semanal* 1999; 7:149-53.
- Sánchez LP, Abellán C. The new face of rabies in Spain: infection through insectivorous bats, 1987-2002. *Euro-surveillance weekly*, 2003; 7(27).
- Schneider LG. Antigenic variants of rabies virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 1982; 5: 101-107.
- Schneider LG, Barnard BJH, Schneider HP. Application of monoclonal antibodies for epidemiological investigations and oral vaccination studies. I. African viruses, *in Rabies in the tropics*, edited by E. Kuwert, C. Mérieux, H. Koprowski i K. Bögel, Springer-Verlag, Berlin, 1985.
- Schoehn G, Iseni F, Mavrikis M, Blondel D, Ruigrok RW. Structure of recombinant rabies virus nucleoprotein-RNA complex and identification of the phosphoprotein binding site. *Journal of Virology*, 2001; 75(1): 490-498.
- Seif I, Coulon P, Rollin PE, Flamand A. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence character-

- rization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *Journal of Virology*, 1985; 53: 926-934.
- Selimov MA, Tatarov AG, Antonova LA, Scherbak YN, Shablovskaya EA, Smekhov AM i Mogilevsky BY, 1986. *Rabies Info. Exch.*, 14: 9-12.
 - Serra-Cobo J. Migratory movements of *Miniopterus schreibersii* in the north-east of Spain. *Acta Theriologica*, 1998; 43(3): 271-283.
 - Serra-Cobo J, López-Roig M, Marquès Bonet, Martínez-Rica JP. Body condition changes of *Miniopterus schreibersii* in autumn and winter. *La Terre et la Vie*, 2000a ; 55: 351-360.
 - Serra-Cobo J, López-Roig M, Marquès-Bonet T, Lahuerta E. Rivers as possible landmarks in the orientation flight of *Miniopterus schreibersii*. *Acta Theriologica*, 2000b; 45 (3): 347-352.
 - Serra-Cobo J, Amengual B, Abellán C, Bourhy H. European Bat Lyssavirus Infection in Spanish Bat Populations. *Emerging Infectious Diseases*, 2002; 8(4): 413-420.
 - Serra-Cobo J, Amengual B, López-Roig M, Márquez J, Torres M, Ripoll A, Sánchez A, Oliver JA. Catorze anys d'estudis quiropterològics a les Illes Balears (1993-2006). *Bolletí de la Societat d'Història Natural de les Balears*, 2007a ; 49: 89-107.
 - Serra-Cobo J, Amengual B, López-Roig M, Márquez J, Bayer X, Guasch C, Sánchez A i Oliver JA. Quinze anys d'estudis quiropterològics a les illes balears (1993-2007). *Endins*, 2007b; 31: 125-140.
 - Shankar V, Dietzschold B, Koprowski H. Direct entry of rabies virus into the central nervous system without prior local replication. *Journal of Virology*, 1991; 65: 2736-2738.
 - Selimov MA, Tatarov AG, Botvinkin AD, Klueva EV, Kulikova LG, Khismatullina NA. Rabies-related Yuli virus; identification with a panel of monoclonal antibodies. *Acta Virologica*, 1989; 33: 542-545.
 - Shipley JB, Pal R, Wagner RR. Antigenicity, function and conformation of synthetic oligopeptides corresponding to amino-terminal sequences of wild-type and mutant matrix proteins of vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology*, 1988; 62: 2569-2577.
 - Shope RE, Murphy FS, Harrison AK, Causey OR, Kemp GE, Simpson DIH, Moore DL. Two African viruses serologically and morphologically related to rabies virus. *Journal of Virology*, 1970; 6: 690-692.
 - Shope RE, Tesh RB. The ecology of rhabdoviruses that infect vertebrates. In: Wagner RR, ed. *The rhabdoviruses*. New York, 1987.

- Smith JS, Orciari LA. Human rabies – Alabama, Tennessee and Texas, MMWR, 1995.
- Sokol F, Clark H. Phosphoproteins, structural components of rhabdovirus. *Virology*, 1973; 52: 246-263.
- Sokol F, Koprowski H. Structure-function relationships and mode of replication of animal rhabdoviruses. *PNAS USA*, 1975; 72: 933-936.
- Sokol F, Schlumberger HD, Wiktor TJ, Koprowski H, Hummeler K. Biochemical and biophysical studies on the nucleocapsid and on the RNA of rabies virus. *Virology*, 1969; 38: 651-665.
- Superti F, Hauttecoeur B, Morelec MJ, Goldoni P, Bizzini B, Tsiang H. Involvement of gangliosides in rabies virus infection. *Journal of General Virology*, 1986; 67: 47-56.
- Superti F, Derer M, Tsiang H. Mechanism of rabies virus entry into CER cells. *Journal of General Virology*, 1984; 65: 781-789.
- Sureau P, Germain M, Hervé JP, Geoffroy B, Cornet JP, Heme G, Robin Y. Isolement du virus Lagos-bat en Empire Centrafricaine. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 1977; 70: 467-470.
- Sureau P, Tignor GH, Smith AL. Antigenic characterization of the Bangui strain (ANCB-672d) of Lagos bat virus. *Annals of Virology*, 1980; 131: 25-32.
- Swanepoel R. Rabies, in *Infectious diseases of livestock: with special reference to Southern Africa*. Edited by J.A.W. Coetzer, G.R. Thomson, R.C. Tustin & N.P.J. Kriek. Oxford University Press, USA, 1995.
- Swanepoel R, Barnard BJH, Meredith CD, Bishop GC, Brückner GK, Foggini CM, Hübschle OJB. Rabies in southern Africa. *Onderstepoort J Vet Res*, 1993; 60:325-346.
- Teeling EC, Springer MS, Madsen O, Bates P, O'Brien SJ, Murphy WJ. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science*, 2005; 307: 580-584.
- Teeling EC, Scally M, Kao DJ, Romagnoli ML, Springer MS, Stanhope MJ. Molecular evidence regarding the origin of echolocation and flight in bats. *Nature*, 2000; 403: 188-192.
- Teeling EC, Madsen O, Van Den Bussche RA, Jong WW, Stanhope MJ, Springer M. Microbat paraphyly and the convergent evolution of a key innovation in Old World rhinolophoid microbats. *PNAS USA*, 2002; 99(3): 1431-1436.
- Teeling EC, Madsen O, Murphy WJ, Springer MS, O'Brien SJ. Nuclear gene sequences confirm an ancient link between New Zealand's short-tailed bat and South American noctilionoid bats. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003; 28: 308-319.

- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997; 24: 4876-4882.
- Tignor GH, Murphy FA, Clark HF, Shope RE, Madore P, Bauer SP, Buckley SM, Mederith CD. Duvenhage virus: morphological, biochemical, histopathological and antigenic relationships to the rabies serogroup. *Journal of General Virology*, 1977; 37: 595-611.
- Tordo N, Pock O, Ermine A, Keith G. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: segmented homology with VSV. *Nucleic Acids Research*, 1986; 14: 2671-2683.
- Tordo N, Badrane H, Bourhy H, Sacramento D. Molecular epidemiology of lyssaviruses: focus on the glycoprotein and pseudogenes. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 1993; 60: 315-323.
- Tordo N, Poch O. Structure of rabies virus. In *Rabies*, Edited by J.B. Campbell & K.M. Charlton. Kluwer Academic Publishers, Boston, 1988.
- Tsiang H, Superti F. Ammonium chloride and chloroquine inhibit rabies virus infection in neuroblastoma cells. *Archives of Virology*, 1984; 81: 377-382.
- Tsiang H, Lycke E, Ceccaldi PE, Ermine A, Hirardot X. The anterograde transport of rabies virus in rat sensory dorsal root ganglia neurons. *Journal of General Virology*, 1989; 70: 2075-2085.
- Tuffereau C, Leblois H, Bénéjean J, Coulon P, Lafay F, Flamand A. Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in mice. *Virology*, 1989; 172: 206-212.
- Tunçman ZM, 1958. *Mikrobiol. Dergisi. Turk.*, 11: 81.
- Van der Merwe M. Bats as vectors of rabies. *South African Journal of Science*, 1982; 78: 421-422.
- Van der Poel WH, Van der Heide R, Van Amerongen G, Van Keulen LJ, Wellenberg GJ, Bourhy H, Schaffenaar W, Groen J, Osterhaus AD. Characterisation of a recently isolated lyssavirus in frugivorous zoo bats. *Archives of Virology*, 2000; 145: 1919-1931.
- Van der Poel WHM, van der Heide R, Verstraten ERAM, Takumi K, Lina PHC. European bat lyssaviruses, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 2005; 11: 1854-1959.
- Vargas F. Ataques a humanos y transmisión de la rabia por murciélagos hematófagos en México. *Seminário Internacional Morcegos como transmissores da raiva. Me-*

morial da América Latina, Sao Paulo, Brasil, 2001.

- Volleth M, Heller DG, Pfeiffer RA, Hameister H. A comparative ZOO-FISH analysis in bats elucidates the phylogenetic relationships between Megachiroptera and five microchiropteran families. *Chromosome Research*, 2002; 10: 477-497.
- Wellenberg GJ, Audry L, Ronsholt TL, van der Poel WHM, Brusckke CJM, Bourhy H. Presence of European bat lyssavirus RNAs in apparently healthy *Rousettus aegyptiacus* bats. *Archives of Virology*, 2002; 147: 349-361.
- Whitby JE, Heaton PR, Black EM, Wooldridge M, McElhinney LM i Johnstone P. First isolation of a rabies-related virus from a Daubenton's bat in the United Kingdom. *Vet Rec* 2000; 147(14): 385-388.
- White GC, Burnham KP. Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. *Bird Study*, 1999; 46:120-138.
- Wiktor TJ, Gyorgy E, Schlumberger HD, Sokol F, Koprowski H. Antigenic properties of rabies virus components. *The Journal of Immunology*, 1973; 110: 269-276.
- Wunner WH, Calisher CH, Dietzgen RG, Jackson AO, Kitajima EW, Lafon M, Leong JC, Nichol ST, Peters D, Smith JS, Walker P. The Rhabdo-
- viridae. In: *Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp 275-288. Edited by Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA i Summers MD. Vienna & New York: Springer Verlag, 1995.
- Wunner WH, Reagan KJ, Koprowski H. Characterization of saturable binding sites for rabies virus. *Journal of Virology*, 1984; 50: 691-697.
- Wunner WH, Clark HF. Regeneration of DI particules of virulent and attenuated rabies virus: genome characterization and lack of correlation with virulence phenotype. *Journal of General Virology*, 1980; 51: 69-81.
- Zaides VM, Krotova LI, Selimova LM, Selimov MA, Elbert LB, Zhdanov VM. Reevaluation of the proteins in rabies virus particules. *Journal of Virology*, 1979; 29: 1226-1228.

DOCUMENTS

de recerca en salut



Govern de les Illes Balears

Conselleria de Salut i Consum