

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN VIRUS RÁBICO, OBTENIDO DE UN MURCIÉLAGO NO HEMATÓFAGO EN LA CIUDAD DE MÉXICO

Elizabeth Loza-Rubio^{*}
Cecilia C. de Mattos^{**}
Álvaro Aguilar Setién^{***}
Carlos A. de Mattos^{**}

Abstract

The objective of this study was to characterize antigenically and genetically a rabies virus isolate obtained from an insectivorous bat *Tadarida brasiliensis* in Mexico City in 1995. At the time of the capture, the animal was presented with incoordination, hirsute hair and general weakness. The bat was positive for rabies using the direct immunofluorescence test. The antigenic characterization was carried out by the indirect immunofluorescence technique with a panel of 8 monoclonal antibodies produced against the viral nucleoprotein. A positive rabies sample isolated from a bovine bitten by a vampire bat, *Desmodus rotundus*, was used as a control. Genetic studies were done by the limited sequencing analyses of a portion of 320 base pairs between positions 1094 and 1413 of the nucleoprotein gene. The genetic comparison of the samples was performed using the Pile Up- and Distance programs of the Genetic Computer Group package (GCG) version 8.1. The antigenic characterization showed that the bat sample was antigenic variant 9 which reservoir is the non-hematophagous bat *Tadarida brasiliensis*. The control virus was the antigenic variant 3. This variant is widely distributed throughout Latin America, and its reservoir is the *Desmodus rotundus*. Genetically, the *Tadarida brasiliensis* virus was 91.7% homologous to the bovine isolate, but showed a high degree of homology (99.7%) with rabies isolates obtained from *Tadarida brasiliensis* in the US. This finding suggests the possible occurrence of rabies endemic cycles in the *Tadarida brasiliensis* population of Mexico. The high diversity and population density of non hematophagous bats in Mexico and the results presented here emphasize the need to further study about the role of non-hematophagous bats in rabies epidemiology in this country and other parts of Latin America.

Key words: RABIES, NON-HEMATOPHAGOUS BATS, ANTIGENIC-, GENETIC CHARACTERIZATIONS.

Recibido el 15 de septiembre de 1998 y aceptado el 17 de febrero de 1999.

^{*} Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Carretera-México Toluca, Km, 15.5, Col. Palo Alto, 05110, México, D.F. Correo electrónico: manban@data.net.mx

^{**} Centers for Disease Control and Prevention, División of Viral and Rickettsial Diseases, MSG33, 1600 Clifton Road NE, Atlanta, Georgia, 30333, USA.

^{***} Unidad de Inmunología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Apartado postal 73-032, 03220, México, D. F.

Resumen

El objetivo de este estudio fue caracterizar antigénica y genéticamente un aislamiento del virus de la rabia obtenido de un murciélago insectívoro (*Tadarida brasiliensis*) encontrado en la ciudad de México en 1995. Al momento de la captura, el animal presentaba incoordinación de miembros, pelo hirsuto y debilidad general. El murciélago fue positivo a la prueba de inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de rabia. Para la caracterización antigénica se efectuó un panel de ocho anticuerpos monoclonales dirigidos contra la nucleocápside viral, mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Como testigo se usó una muestra positiva a rabia proveniente de un bovino agredido por un murciélago vampiro (*Desmodus rotundus*). La tipificación genética se realizó a través del secuenciado de una posición del ADN complementario de la nucleoproteína viral, comprendida entre las posiciones 1094 y 1413. Para los estudios genéticos comparativos se aplicaron los programas PilUp y Distances Programa Genetic Computer Group (GCG) versión 8.1. La caracterización antigénica determinó que el virus aislado del *Tadarida brasiliensis* pertenecía a la variante antigénica 9 y el testigo a la variante 3. Esta última se encuentra distribuida en toda América Latina y su reservorio es el *Desmodus rotundus*. La caracterización genética demostró que la muestra problema compartía un porcentaje de homología del 91.7% con el testigo, pero siendo altamente homóloga (99.7%) a aislamientos obtenidos de *Tadarida brasiliensis* en Estados Unidos de América. Esto último sugiere la posible presencia de ciclos endémicos del virus de la rabia en las poblaciones de estos murciélagos en México. La alta diversidad y densidad de murciélagos en el país, así como los resultados obtenidos en este estudio, enfatizan la necesidad de efectuar investigaciones más detalladas acerca del papel que juegan los murciélagos no hematófagos en la epidemiología de la rabia en México.

Palabras clave: RABIA, MURCIÉLAGOS NO HEMATÓFAGOS, CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA Y GENÉTICA.

El virus de la rabia pertenece al género *Lyssavirus* de la familia *Rhabdoviridae*. Su genoma, constituido por una cadena simple de ARN de sentido negativo, es de aproximadamente 12 000 nucleótidos de longitud y está formado por cinco genes ordenados desde el extremo 3' al 5' de la siguiente manera: N, NS, M, G y L. Cada uno de ellos codifica para una proteína viral (1).

La rabia se presenta en dos ciclos epidemiológicos diferentes: el urbano y el silvestre. El perro es el principal reservorio y transmisor del virus en el ciclo urbano en México y en el resto de América Latina. Los reservorios del ciclo silvestre varían en las diferentes regiones del mundo, en Latinoamérica el principal es el murciélago hematófago, *Desmodus rotundus* (2). Esta especie transmite la rabia parestante bovina, responsable de cuantiosas pérdidas económicas para la ganadería (3). Las otras dos especies de murciélagos hematófagos presentes en esta región, *Diphylla ecaudata* y *Diaemus youngii*, no son considerados de importancia en el mantenimiento del ciclo silvestre de la rabia (4).

Los murciélagos no hematófagos también son reservorios de la rabia y mantienen ciclos endémicos independientes (5, 6). El primer caso de rabia notificado en Estados Unidos de América ocurrió en Florida en 1953, en un murciélago insectívoro de la especie *Lasiurus intermedius*. Desde entonces, la rabia en murciélagos no hematófagos autóctonos ha sido registrada en todos los estados, con excepción de Hawaii. Entre 1981 y 1997 ocurrieron 20 casos de rabia en humanos transmitida por estos animales en los Estados Unidos (7), lo que indica claramente la importancia de los mismos como reservorio de la enfermedad (8, 9).

En Europa se han identificado dos nuevos genotipos de *Lyssavirus* (European Bat *Lyssavirus* 1 y 2) aislados de las especies *Epseticus serotinus* y *Myotis dasycneme*, que son de importancia en salud pública (10-12).

En el caso particular de América Latina, existen aproximadamente 250 especies de murciélagos no hematófagos y la mayoría son altamente beneficiosos para el mantenimiento del equilibrio ecológico de la

región . Algunos contribuyen a la polinización, al alimentarse del néctar (nectívoros) y polen (polinívoros) de las flores; otros se alimentan de frutos (frugívoros), y ayudan a la diseminación de las semillas, y otros se nutren de insectos, muchos de ellos dañinos para la agricultura (insectívoros) (13-15).

La importancia de los murciélagos no hematófagos como reservorios de la enfermedad en América Latina, ha sido demostrada en Chile, donde la rabia canina ha sido erradicada desde 1985. En este país, la enfermedad se mantiene en su ciclo silvestre, principalmente, por la especie *Tadarida brasiliensis* (16, 17).

En México, la primera identificación del virus de la rabia se realizó en un murciélago no hematófago del género *Artibeus rda* (17). Desde entonces, numerosas especies de murciélagos han sido diagnosticados con rabia en este país (17).

Dada la continua disminución de casos de rabia canina en México (7, 18) como consecuencia de la ejecución de eficaces programas de control de la rabia urbana, se hace evidente la importancia epidemiológica de los murciélagos no hematófagos como reservorios del virus en los centros urbanos (18). Al mismo tiempo, cobra importancia la caracterización molecular de las variantes virales que circulan en las poblaciones de estos animales, a fin de establecer una correcta vigilancia epidemiológica de estas especies y diseñar medidas apropiadas para la protección de la población humana.

En respuesta a las necesidades que derivan de esta nueva situación epidemiológica en México, el objetivo de este estudio fue caracterizar antigénica y genéticamente un aislamiento del virus de la rabia obtenido de un murciélago insectívoro *Tadarida brasiliensis*. Este animal fue capturado en 1995, frente a una escuela en la colonia Condesa, que corresponde a la delegación Cuauhtémoc en la ciudad de México. Al momento de la captura, el murciélago presentaba incoordinación de los miembros, pelo hirsuto y debilidad general. Su clasificación taxonómica se basó principalmente en las siguientes características taxonómicas: hoja nasal, apéndice auricular, fórmula dental y cola (14, 15, 19, 20).

A la muerte del animal, se extrajo el encéfalo y se llevó a cabo la técnica de inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de rabia, obteniéndose un resultado positivo. Posteriormente, se hizo una suspensión al 20% en una solución salina fosfatada, que se inoculó en 6 ratones albinos lactantes (20, 21). Cuando los animales presentaron la correspondiente semiótica, fueron sacrificados, para extraer el cerebro como material de estudio en la caracterización antigénica y genética. Como testigo se utilizó un aislamiento a partir de un bovino agredido por un murciélago hematófago en Escuintla, Chiapas, México.

La caracterización antigénica se realizó mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta sobre improntas de cerebro de ratón lactante infectado, fijadas en acetona (22). Se usó un panel de ocho anticuerpos monoclonales (AM) (Cuadro 1) reconocido por el Consorcio Institucional Multinacional de Laboratorios Subregionales para el Diagnóstico y Caracterización de la Rabia en América Latina. La selección de dichos anticuerpos producidos por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Atlanta, Georgia (EUA) estuvo basada en un estudio conjunto efectuado entre el Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ) y el CDC (23).

Para llevar a cabo la caracterización genética, se extrajo el ARN viral de la muestra infectada mediante Trizol^{*} siguiendo el protocolo del fabricante. El ADN complementario, para la reacción de secuenciado, fue obtenido a través de la transcripción reversa del ARN viral y su posterior amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, con los iniciadores 10 g y 304 (24). El

secuenciado del ADN complementario se llevó a cabo con el ADN Sequencing Kit^{**} por el método del Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction^{***} en un aparato de secuenciado automático Applied

* Gibco-BRL. Inc., Grand Island, N.Y.

** Applied Biosystems, Foster City, Ca.

*** Applied Biosystems, Foster City, Ca.

Biosystems 377 DNA Sequencer[®]. La región del gen de la nucleoproteína, comprendida entre las posiciones 1094 y 1413 (320 pares de bases), fue analizada con los programas PileUp y DISTANCES del programa Genetics Computer Group (GCG) versión 8.1 (25). Para determinar las distancias genéticas entre las muestras comparadas se utilizó el algoritmo del modelo de los dos parámetros de Kimura (26).

En el análisis genético comparativo se utilizaron muestras de otras áreas de América, donde la rabia es endémica en los perros domésticos, vampiros y murciélagos no hematófagos, obtenidas del banco de datos del CDC de Atlanta, Georgia, Estados Unidos de América, y que fueron gentilmente cedidas para este estudio (datos no mostrados).

La caracterización antigénica del aislamiento de *Tadarida brasiliensis* en este estudio reveló que pertenecía a la variante antigénica 9 (AgV9). El virus usado como testigo, obtenido a partir de un bovino fue tipificado como variante antigénica 3 (AgV 3) (Cuadro 1).

El Cuadro 2 muestra la comparación de una región de 320 nucleótidos de la nucleoproteína viral entre estos dos virus. La caracterización genética del virus problema demostró que compartía 91.25% de homología del con el testigo, pero un mayor porcentaje de homología (99.7) con muestras obtenidas de *Tadarida brasiliensis* en Texas y Alabama, en 1993 y 1994, respectivamente.

Este resultado indica su estrecha relación genética con representantes del ciclo endémico de la rabia en esta especie en EUA. El virus testigo presentó un porcentaje alto de homología genética (97.8) con dos muestras clasificadas como AgV3 aisladas de bovinos atacados por vampiros en Venezuela en 1993 (27). Esta variante antigénica se encuentra distribuida por toda América Latina y su reservorio es el murciélago vampiro *Desmodus rotundus* (24, 28).

La variante antigénica 9 ha sido previamente identificada en EUA, y se mantiene en forma endémica en las poblaciones de murciélagos de esta especie (5). En el caso particular de Chile y Argentina, la variante antigénica detectada en esta especie de murciélagos es la variante 4 (28). La comparación genética entre el aislamiento mexicano y dos muestras obtenidas de *Tadarida brasiliensis*, en Chile en 1985 y en Argentina en 1991, reveló un porcentaje más bajo de homología genética (86.6) con estas dos variantes virales. Esta situación es la probable consecuencia del comportamiento migratorio de la especie *Tadarida brasiliensis*, que ha sido cuidadosamente estudiada en el hemisferio norte (29). En este hemisferio, aunque algunas subpoblaciones son relativamente no migratorias, la mayoría de ellas realizan extensos movimientos estacionales, desde el sur de Estados Unidos hasta la región central de México (13, 29). Este comportamiento contribuiría a la amplia distribución de la misma variante viral entre estos dos países.

Los estudios filogenéticos de muestras provenientes de México y otros países del continente americano indican que las muestras obtenidas de *Tadarida brasiliensis* en el hemisferio norte (Estados Unidos y México) segregan formando un grupo monofilético claramente diferenciado de aquellos constituidos por los aislamientos virales de vampiros y otros murciélagos provenientes de otras áreas geográficas (30). En otro estudio comparativo entre el virus rábico y una muestra de *Tadarida brasiliensis* obtenida en el estado de Veracruz, México, pero en este caso utilizando el seudogen del genoma viral, se obtuvieron resultados similares a los presentados aquí (31).

Con el control progresivo de la rabia urbana en América Latina, el impacto de la rabia silvestre se hace más evidente. La estrecha relación entre los murciélagos y los seres humanos en las áreas urbanas y la demostración de la presencia del virus rábico en estos animales, aún con baja frecuencia, los convierten en una importante fuente de infección para los humanos y animales domésticos (32). La alta diversidad y densidad de murciélagos en México, así como los resultados obtenidos en este estudio, enfatizan la

[®] Applied Biosystems, Foster City, Ca.

necesidad de efectuar investigaciones más detalladas acerca de la importancia que tienen los murciélagos no hematófagos en la epidemiología de la rabia en México.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (K0020-B).

Referencias

1. Tordo N, Kouknetzoff A. The rabies virus genome: an overview. *Onderstepoort J Vet Res* 1993;60: 263-269.
2. Acha PN, Arambulo III PV. Rabies in the tropics: history and current status. In: Kuwert E, Mérieux C, Koprowski H, Bögel K, editors. *Rabies in the tropics*. Berlin, Germany: Springer Verlag, 1985:343-359.
3. Álvarez E, Ruiz A. La situación de la rabia en América Latina de 1990 a 1994. *Bol Ofic Sanit Panam* 1995;119:451-456.
4. Brass DA. Vampire bats of the American tropics. In: Brass DA, editor. *Natural history and public health implications*. Ridgefield, Connecticut: Livia Press, 1994:57-82.
5. Smith JS. Rabies virus epitopic variation: use in ecologic studies. *Virus Res* 1989;36:215-253.
6. Brass DA. Prevalence and distribution of rabies in insectivorous bats. In: Brass DA, editor. *Natural history and public health implications*. Ridgefield, Connecticut: Livia Press, 1994:131-162.
7. Krebs JW, Smith JS, Rupprecht CF, Childs JE. Rabies surveillance in the United States during 1996. *J Am Vet Med Assoc* 1997;211:1525-1539.
8. Dressen DW, Orciari LA, Rupprecht CE. The epidemiology of bat rabies in the southeastern United States 1990-1994. VII Annual International Meeting Advances Towards Rabies Control in the Americas; 1996 December 9-13; Atlanta (Ge). Atlanta (Ge): Panamerican World Organization, 1996:37.
9. Noah DL, Drenzek CL, Smith JS, Crebs JW, Orciari L, Shaddock J, Sanderlin D, Whintfield S, Sekadu M, Olson JG, Rupprecht CE, Childs JE. Epidemiology of human rabies in the United States, 1980 to 1996. *Ann Intern Med* 1998;128:922-930.
10. Lumio J, Hillborn M, Roine R, Ketonen L, Halthia M, Valle M, Neuvonen E, Lähdevita J. Human rabies of bat origin in Europe. *Lancet* 1986;1:378.
11. Selimov MA, Tatarov AG, Botvinkin AD, Klueva EV, Kulikova LG, Khismatullina NA. Rabies-related Yuli virus: identification with a panel of monoclonal antibodies. *Acta Virol* 1989;33:542-545.
12. King A, Davies P, Lawrie A. The rabies viruses in bats. *Vet Microbiol* 1990;23:165-174.
13. Tuttle MD. *America's neighborhood bats*. Austin, Texas: University of Texas Press, 1989.
14. Flores CR, Labrandero IE. Características más importantes para diferenciar a los murciélagos. Folleto técnico N° 1. División Pecuaria. México (DF): Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 1996:1-10.
15. Favi CM, Catalán GR. Rabia en murciélagos en Chile. *Avanc Cienc Vet* 1986;1:73-76.
16. Favi CM, Durán RJC. Epidemiología de la rabia en Chile (1929-1988) y perspectivas en mamíferos silvestres. *Avanc Cienc Vet* 1991;6:13-21.
17. Baer GM, Smith JS. Rabies in non-hematophagous bats. In: Baer GM, editor. *The natural history of rabies*. Boca Raton (Fl): CRC Press, 1991:341-366.
18. Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Programa regional para la eliminación de la rabia humana en América Latina: análisis de progreso 1990-1996. X Reunión Interamericana de Salud Animal a Nivel Ministerial; 1997 abril 23-25; Washington (DC). Washington (DC): OPS/OMS, 1997:1-17.
19. Barbour WB, Wayne HD. *Bats of America*. Lexington (Ke): The University Press of Kentucky, 1969.
20. Kaplan MM, Koprowski H. *La rabia: técnicas de laboratorio*. Génova, Suiza: Organización Mundial de la Salud, 1976:389.
21. Loza-Rubio E, Vargas R, Hernandez E, Batalla D, Aguilar SA. Investigation of rabies virus strains in Mexico with a panel of monoclonal antibodies used to classify lyssavirus. *Bull Panam Health Org* 1996;30:31-35.
22. Smith JS, King AA. Monoclonal antibodies for the identification of rabies and non-lyssaviruses. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva, Switzerland: WHO, 1996:145-156.
23. Díaz AM, Papo S, Rodríguez A, Smith JS. Antigenic analyses of rabies virus isolates from Latin American and the Caribbean. *J Vet Med B* 1994;41:153-160.

24. Smith JS. Rabies virus. In: Murray RP, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH, editors. Manual of clinical microbiology. Washington (DC): ASM Press; 1995:997-1003.
25. Genetics Computer Group. Program Manual for the Genetics Computer Group package, version 8.1. Madison (Wis): Genetics Computers Group, 1997.
26. Kimura MA. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111-120.
27. de Mattos CA, de Mattos CC, Smith JS, Miller ET, Papo S, Utrera A, Osburn BI. Genetic characterization of rabies field isolates from Venezuela. *J Clin Microbiol* 1996;34:1553-1558.
28. Favi CM, Yung PV, Pavletic BC, Ramirez VE. Role of insectivorous bats in the transmission of rabies in Chile. Antigenic characterization of field isolates. The 8th Annual Rabies in the Americas Conference; 1997 November 2-6; Kingston, Ontario, Canada. Kingston, Ontario, Canada: Queen's University, 1997:37.
29. Hill JF, Smith JD. Bats-a natural history. London (UK): British Museum of Natural History, 1984.
30. de Mattos CC, de Mattos CA, Favi CM, Yung PV, Ramirez VE, Orciari LA, Smith JS. Genetic characterization of rabies isolates in Chile. The 8th Annual Rabies in the Americas Conference; 1997 November 2-6; Kingston, Ontario, Canada. Kingston, Ontario, Canada: Queen's University, 1997:40.
31. Bahloul Ch, Badrane H, Sacramento D, Morgeaux S, Loza-Rubio E, Brochier B, *et al.* Molecular epidemiology of rabies and cross protection in Latin America. *J Infect Dis* 2000 (In press).
32. Lord R. Importancia de los murciélagos en la epidemiología de las zoonosis con énfasis en la rabia bovina. *Publ Cient Org Panam Salud* 1976;334:89-97.

Cuadro 1

PATRÓN DE REACCIÓN DE LAS VARIANTES 3, 4 Y 9 CON EL PANEL DE OCHO ANTICUERPOS MONOCLONALES DIRIGIDOS CONTRA LA NUCLEOPROTEÍNA VIRAL

	Anticuerpos monoclonales								V Ag ¹ Lab ⁴
	C1	C4	C9	C10	C12	C15	C18	C19	
CVS	+	+	+	+	+	+	+	+	
Vampir									
o	-	+	+	+	+	-	-	+	3
T. br ²	-	+	+	+	+	-	-	-	4
T.brm ³	+	+	+	+	+	-	-	-	9

1. V ag. Variante antigénica
2. T. br. *Tadarida brasiliensis*
3. T.brm. *Tadarida brasiliensis mexicana*
4. Cepa de laboratorio

Cuadro 2

COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LA MUESTRA OBTENIDA DEL *Tadarida brasiliensis* (MXTBBT 3150) Y DEL BOVINO ATACADO POR UN MURCIÉLAGO VAMPIRO (MXBV3130).

	1	50
Vag3 ¹ mxbv3130	--g-----a-----a-----	-----a--
Vag9 mxtbbt3150	--a-----g-----g-----	-----c--
Consenso ²	GA-AAGGA-C	TTCA-GAATA TGAGGCAGCT GAATTGACAA AAGCTGA-AC
	51	100
Vag3 ¹ mxbv3130	----c-----c-a-----	---t-----
Vag9 mxtbbt3150	----t-----t-g-----	---c-----
Consenso ²	GGCC-TGGCA	GATGA-GG-A CAGTCAATTC TGA-GATGAG GACTACTTCT
	101	150
Vag3 ¹ mxbv3130	-----	---ac--a--
Vag9 mxtbbt3150	-----	---ta--g--
Consenso ²	GGAGGTAGAC	CAGGAGTCCA GAGGCAGTTT ACAC--G-AT CATGATGAAT
	151	200
Vag3 ¹ mxbv3130	-----	---g-----
Vag9 mxtbbt3150	-----	---a-----
Consenso ²	GGAGGTAGAC	TAAAAAGATC ACACATAAGG AG-TATGTCT CAGTCAGCTC
	201	251
Vag3 ¹ mxbv3130	-----	---t-----g-g-----a---
Vag9 mxtbbt3150	-----	---c-----t-a-----g---
Consenso ²	TAATCATCAA	ACTCGCCCTA A-TCGTTTGC -GA-TTTTTA AACAA-ACAT
	251	300
Vag3 ¹ mxbv3130	-c-----g-g-g-----g--t---a-----c--	
Vag9 mxtbbt3150	-t-----t-a-a-----t--g---g-----a--	
Consenso ²	A-TCGAGTGA	CTC-T-A-GA GTTGAACAAC A-GAT-GTAA -CACCAA-GA
	301	320
Vag3 ¹ mxbv3130	-----t-----	
Vag9 mxtbbt3150	-----c-----	
Consenso ²	GATGTATACA	TC-CTCATGA

1. Variante antigénica
2. Indica la secuencia nucleotídica compartida por las dos muestras.