



01672
10
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CARACTERIZACION MOLECULAR DEL VIRUS
DE LA RABIA EN FAUNA DOMESTICA Y
SILVESTRE MEXICANA

T E S I S
para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
presentado por

JAVIER ROLANDO REYNA GRANADOS

Tutor: J. ALVARO AGUILAR SETIEN
Comité Tutorial: RAUL VARGAS GARCIA
JUAN ANTONIO MONTAÑO HIROSE

México, D.F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

MVZ. JAVIER ROLANDO REYNA GRANADOS

AUTOR

DEDICATORIAS:

A Verónica Ortiz Encinas,

Por ser la compañera ideal, por compartir mis inquietudes, mis estudios, ideas e investigaciones, por tolerar mis desvelos y mis compromisos; y por lo más importante, por ser "*mi esposa*".

A mis padres; Anastasio Reyna G. y Remedios Granados de Reyna (†), porque a ellos debo gran parte de lo que soy y seguiré siendo, los amo por siempre.

A mis hermanos; Chacha, Paloma, Tachito y Helios, por apoyarme y darme su amor fraternal y lograr ser siempre un impulso en mi desarrollo profesional.

Al Kiki, Humberto, Lolys, Carlos Enrique, Paola, Jesús Humberto C, Francisco Javier, Carlos Javier y Pablo Ricardo, por saber mantener una familia que me llena de gozo y presumo de ella.

A mis suegros; Don Alfonso Ortiz y Doña Belia Encinas de Ortiz, por brindarme su gran apoyo, cariño y alentar mis actividades y propósitos al lado de su hija, los quiero mucho.

A mis familias, Cuevas Ortiz, Melicoff Ortiz, Ramos Ortiz, Danese Ortiz, Rojas Ortiz y Trujillo Ortiz, por compartir momentos familiares indescriptibles y por darnos todo el apoyo que necesitamos en nuestra estancia en México.

A todos mis familiares, tíos, primos, sobrinos, abuelos y padrinos con mucho cariño y que por el hecho de no mencionarlos quiera decir que no me acuerdo de ellos.

AGRADECIMIENTOS:

A Dios, por darme enseñarme el camino de la vida. Señor dame más vida al lado de mi familia para poder seguir dando y haciendo más.

Al Dr. J. Alvaro Aguilar Setien, por ser un gran investigador y un excelente padrino en el ámbito de la investigación. Agradezco además, el entusiasmo que me generó para la realización de esta investigación y de otros proyectos que están en marcha.

A los Tutores, Dr. Juan Antonio Montaña Hirose, Dra. Vilma Carolina Becker Méndez y Dr. Eliseo Hernández Baumgarten, por haber compartido incondicionalmente sus experiencias y conocimientos; y en especial al *Dr. Raúl Vargas García*, por haberme orientado con gran calidad, en este campo de la docencia y de la investigación, infinitamente gracias.

Al Dr. Juan García García y al CENID-MICROBIOLOGIA del INIFAP, por apoyarme en la realización de este estudio, habiéndome brindado las herramientas indispensables con las que sin ellas, no hubiera iniciado esta investigación, en especial a mis directores, *Dra. Elizabeth Loza Rubio, Dr. Octavio De Paz Villafán y Dr. Miguel Cámara*, quienes integraban el "*Proyecto Rabia*", además quiero agradecer al *Dr. José Weimershemer Rubí*, por haberme permitido trabajar en el laboratorio de Producción del mismo Instituto.

Al Dr. Roberto Kretschmer y al la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, del Centro Medico Nacional Siglo XXI del IMSS, por haberme permitido culminar mi investigación en sus áreas de biología molecular, en especial al *Dr. Aguilar, Lety, Emma Lucia, Yola, Mara, Carolina y Emiliano*, gracias por su cooperación.

Al Dr. Baltazar Cortés García y al Centro Nacional de Constatación en Salud Animal (CENASA) en Tecámac, Edo. De México, y a su Departamento de Virología en Rabia, por haberme brindado la mayoría de las muestras trabajadas y haber colaborado en los diagnósticos de rabia iniciales, gracias Baltazar.

Al MIIB. José Carmen Gudiño del laboratorio de Biología Molecular en VIH del INDRE, por su gran aporte a la técnica del RFLP, sin sus consejo no hubiera culminado esta investigación.

Al Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango, por la amistad, la confianza y grandes conocimientos que depósito en mí.

Al Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública Veterinarias y a todos sus integrantes por haberme apoyado durante mi estancia en la facultad.

Al Departamento de Morfología y a todos sus integrantes, en especial a los *Doctores Santiago Aja Guardiola y Luis Miguel Berjón Macías*, por haber compartido valiosos momentos de su vida personal y profesional, gracias de nuevo.

A mis grandes académicos *Dr. Jorge Cárdenas Lara, Dr. Marco Antonio Casillas Fabila, Dr. Raúl Vargas García, Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango, Dr. José Juan Martínez Maya, Dr. Marco Antonio Méndez Ochoa, Dr. Carlos Rosales, Dra. Alejandra León, Dr. Jorge Lecumberry, Dra. Graciela Tapia y Dr. Jesús Reynaga Obregón*, por haber brindado infinidad de conocimientos, experiencias y ética veterinaria, en los temas que desarrollaron durante la maestría.

A mis compañeros de maestría, Omar Valdez, Zaira Padrón, Héctor Aguila, Adrián Castillo, Dora Luz Pantoja, Alfredo Gutierrez, Ramón Molina, Eduardo Fano y Orbelín Soberanis, y a todos los que me compartieron estos momentos de estudio en los cuales pasé gratos momentos y emocionantes presiones, gracias colegas. Un agradecimiento especial a *OMAR*, por su valiosa ayuda en los trámites de este trabajo.

Al Dr. Luis Núñez Ochoa, Dr. Bouda, Dra. García, Salvador, Gerardo, Luz María, Ana y al personal que conforma el Departamento de Patología Clínica de la facultad de MVZ de la UNAM, por los momentos que apoyaron a mí esposa en la obtención de su grado de Especialidad; porque a mí también me hicieron sentir bien.

A la SAGAR, a la CPA, al SIVE, a su personal y a sus laboratorios, por permitirme tomar y conocer las herramientas necesarias y elaborar una noción más certera para la toma de decisiones en esas enfermedades que se encuentran en vigilancia y en control en nuestro país.

Al Instituto Tecnológico de Sonora, en especial al departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por haberme permitido desarrollarme en mi ambiente profesional, gracias.

Al Departamento de MVZ del ITSON y a mis compañeros académicos Javier, Ana Laura, Isabel, Ricardo, Raymundo, Ramón, Carlos, Pablo, Lupita, José María, Alberto y Juan Manuel, y al demás personal que ahí labora.

Al PROMEP, por haberme dado el apoyo económico para realizar mis estudios de Maestría en Ciencias veterinarias.

A todos aquellos que de una u otra forma fueron participes de mi estancia en México y en el desarrollo de mis estudios de Posgrado.

ÍNDICE

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Epidemiología y situación de la rabia en los últimos años	2
1.2.1. Rabia en Europa	2
1.2.2. Rabia en Asia	2
1.2.3. Rabia en África	2
1.2.4. Rabia en América Latina	3
1.2.5. Rabia en América del Norte	4
1.2.6. Rabia en México	4
1.3. Formas de presentación en la transmisión de la rabia	5
1.3.1. Presentación silvestre de la rabia	5
1.3.2. Presentación urbana de la rabia	6
1.4. Clasificación, propiedades y características del virus rábico	7
1.4.1. Clasificación del virus	7
1.4.2. Características morfológicas del virus	9
1.4.2.1. El genoma rábico	9
1.4.3. Propiedades del virus rábico	11
1.4.4. El hospedador	11
1.5. La biología molecular para el estudio y diagnóstico de rabia	12
1.5.1. Técnicas de reacción en cadena de la polimerasa	12
1.5.2. Otras pruebas utilizadas en biología molecular	13
1.5.3. Realización de algunos estudios de rabia por medio de biología molecular	13

2. MATERIAL Y METODOS	17
2.1. Recolección de muestras positivas	17
2.2. Propagación de aislamientos en ratón	18
2.3. Extracción de ARN	18
2.4 Empleo de oligonucleótidos específicos	19
2.5 Elaboración de ADNc	19
2.6 Amplificación de productos por PCR	20
2.7 Endonucleasas empleadas para el análisis del polimorfismo de los fragmentos largos de restricción (RFLP)	20
2.8. Cortes enzimáticos por medio de la técnica de análisis del polimorfismo de los fragmentos largos de restricción (RFLP)	21
2.9. Observación de los cortes enzimáticos en un gel de agarosa por medio de la técnica de electroforesis	21
3. RESULTADOS	22
4. DISCUSION Y CONCLUSIONES	23
5. LITERATURA CITADA	35

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1	Sitios de restricción obtenidos por las endonucleasas para las cepas de referencia	27
Cuadro 2	Sitios de restricción obtenidos por las endonucleasas para las muestras de especies domésticas	28
Cuadro 3	Sitios de restricción obtenidos por las endonucleasas para las muestras de especies silvestres	29
Cuadro 4	Sitios de restricción obtenidos por las endonucleasas para una muestra de humano	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de las estructuras del virus rábico	8
Figura 2	Representación esquemática del genoma del virus de la rabia	11
Figura 3	Organización general de las zonas de secuencias para diagnóstico y epidemiología molecular del virus de la rabia tomando como modelo al serotipo Mokola	16
Figura 4	Estados de República Mexicana, de donde proceden las muestras positivas a rabia para este estudio	31
Figura 5	Amplicones del virus de la rabia en gel de agarosa por medio de la técnica de PCR	32
Figura 6	Patrones de digestión en los amplicones de una cepa rábica terrestre y otra aérea en gel de agarosa, por medio de la técnica de RFLP	33
Figura 7	Patrones de digestión en los amplicones de una cepa rábica hipervariable y otra terrestre en gel de agarosa, por medio de la técnica de RFLP	34

RESUMEN

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE LA RABIA EN FAUNA DOMESTICA Y SILVESTRE MEXICANA. JAVIER ROLANDO REYNA GRANADOS. 2000. ASESORES: DR. JOSE ALVARO AGUILAR SETIEN, DR. RAUL VARGAS GARCIA Y DR. JUAN ANTONIO MONTAÑO HIROSE.

Con la finalidad de conocer la variabilidad en el genoma del virus de la rabia en México, se tomaron 32 muestras positivas a rabia por la técnica de inmunofluorescencia (IF) y una vez realizada una amplificación por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés), se analizaron por medio de la prueba del polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés). Dichas muestras proceden de varios estados del país y entre ellas se encuentran muestras de fauna doméstica como bovinos, perros, caballos, cabras y cerdos, al igual que muestras de fauna silvestre como murciélagos (*Desmodus rotundus*), zorrillo (*Mephitis mephitis*), tejón (*Taxidea taxus*) y gato montés (*Felis sylvestris*). En este estudio en lugar de utilizar cuatro enzimas de restricción ó endonucleasas, como se ha establecido en trabajos previos, se utilizaron únicamente dos: BamHI y BsrGI. Los cortes se llevaron a cabo en un segmento del genoma conocido como pseudogen (Ψ) porción que une a la proteína G y L del virus rábico. Se observaron los “sitios de restricción” establecidos para el ciclo conocido como “terrestre” (perros, gato montés, etc) y el ciclo “aéreo” (murciélagos hematófagos), mientras tanto las muestras de un zorrillo y un bovino no presentaron ningún “sitio de restricción” para las endonucleasas utilizadas (BamHI y BsrGI). Al igual que en trabajos precedentes, en este estudio, el virus rábico circulante en zorrillo puede clasificarse en un ciclo aparte denominado “hipervariable”, exclusivo de esta especie. Respecto a la muestra bovina procedente de Chiapas que tampoco presentó cortes con las enzimas de restricción (único caso) podemos sospechar de una agresión por zorrillo con virus rábico lo que nos da evidencias de otra posible fuente de infección de rabia en bovinos (enfermedad del derriengue) sin embargo es necesario comprobar esto mediante un análisis de la muestra por secuenciación.

Palabras claves: caracterización molecular, fauna domestica, fauna silvestre, PCR, RFLP, ciclos aéreo, silvestre e hipervariable, zorrillo, sitio de restricción, México.

SUMMARY

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF RABIES VIRUS IN DOMESTIC AND WILD FAUNA IN MEXICO. JAVIER ROLANDO REYNA. 2000. ADVISERS: DR. JOSE ALVARO AGUILAR SETIEN, DR. RAUL VARGAS GARCIA AND DR. JUAN ANTONIO MONTAÑO HIROSE.

Aiming to study the variability of rabies virus genome in Mexican isolates, 32 rabies positive samples, as diagnosed by the fluorescent antibody test (FAT), were reverse-transcribed and amplified by the polymerase chain reaction (RT-PCR). The products were treated with endonucleases to analyze the restriction fragments length polymorphism (RFLP). The samples were collected in different Mexican states from domestic (cattle, dogs, horses, goats and pigs) and wild (bats (*Desmodus rotundus*), skunks(*Mephitis mephitis*), badgers (*Taxidea taxus*) and wild cats (*Felis sylvestris*)) animals. Restriction enzymes (endonucleases) were used to cut known segments of the pseudogen (y), a portion of the genome localized between the genes coding the G and L proteins of rabies virus. The migration patterns in gel showed the restriction sites typical of the terrestrial and aerial cycles. Nevertheless, the skunks isolates as well as a bovine one did not present any restriction site for the endonucleases used (BamHI and BsrGI). The results suggest that the rabies virus circulating in the skunk population can be considered as a variant in the terrestrial cycle. The bovine isolate from the state of Chiapas, that did not present any restriction site appears to be of skunk origin.

Key words: molecular characterization; domestic fauna, wild fauna; aerial and wild cycles; PCR; RFLP; skunks; restriction site; Mexico.

1. INTRODUCCION

1.1. Antecedentes

La rabia es una de las enfermedades más antiguas en la memoria del hombre. Los científicos se aproximaron a la enfermedad solamente como un intento tardío en el siglo XIX, primero por Pierre-Victor Galtier (1879), después por Louis Pasteur (1880) y su famoso "método para la prevención de la rabia después de una mordedura" ¹.

La rabia, descrita en perros y otros animales domésticos desde 500 años A.C. ha sido una de las enfermedades mortales más temidas del hombre antes de nuestra era ².

Plutarco asevera que se le observó por primera vez en la humanidad en los días de los asclepiadeos, los descendientes del dios de la medicina: Esculapio. Se cree que Homero se refiere a la rabia cuando menciona que Sirio, la estrella perro del Orión, ejerce una influencia maligna sobre la salud de la humanidad. La estrella perro se asociaba con perros rabiosos a través de todo el Mediterráneo oriental y Egipto y posteriormente en Roma ³.

Zinke, en 1804 reconoció la naturaleza infecciosa de la saliva y Pasteur demostró en 1881 por primera vez el neurotropismo del virus de la rabia. Corresponde a Pasteur el mérito de haber sugerido la inoculación con vacuna antirrábica de un niño mordido por un perro rabioso en 1885. Remlinger, en 1903, mostró la naturaleza viral de este agente por su calidad filtrante y en el mismo año Negri señaló el valor diagnóstico de las inclusiones intracitoplasmáticas específicas (cuerpos de Negri) en las células nerviosas de los animales rabiosos ^{2, 4}.

En México no existe un conocimiento suficiente sobre las posibles variantes del virus de la rabia tanto en fauna silvestre como doméstica.

En otros lugares como en Estados Unidos, Canadá y algunos países de Europa y Africa han reportado variantes además de serotipos y genotipos del virus, mientras que en nuestro país, en donde por su situación geográfica existen una gran variedad de especies susceptibles sólo se ha realizado un estudio, por los doctores Aguilar, Loza y Tordo, en el Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria. Debido a esto, encontramos necesario continuar con investigaciones para caracterizar a nivel molecular el virus de la rabia proveniente de especies domésticas y silvestres mexicanas. Para ello, se utilizaran las técnicas de biología molecular: transcriptasa reversa de la reacción en cadena

de la polimerasa (RT-PCR) y el análisis del Polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLP).

1.2. Epidemiología y situación de la rabia en los últimos años

El virus de la rabia clásica (serotipo 1) está presente en todos los continentes excepto en Australia y la Antártida ⁵.

1.2.1. Rabia en Europa

La historia de la rabia ha evolucionado mucho en el curso del último siglo. Luego de la erradicación de la rabia canina gracias a la vacunación de los perros domésticos y de la eliminación de perros callejeros, varios países de Europa del Oeste han permanecido indemnes de rabia durante períodos más o menos largos ⁶.

Los casos autóctonos de rabia humana son escasos en Europa y ocurren sobre todo en los países del este europeo a pesar de que la rabia canina es poco frecuente (menos de 10 casos por año). Por lo común, las personas que llegan a presentar la enfermedad en el continente europeo fueron mordidas o agredidas por animales rabiosos en regiones endémicas ⁶.

1.2.2. Rabia en Asia.

El principal vector es el perro, y es aquí, el continente donde se han identificado la mayoría de los casos de rabia humana en el mundo; generalmente se acepta que el número estimado de muertos (cifra superior al número oficialmente declarado) es del orden de 36000, de los cuales la mayoría de los casos se encuentran en la India. Ciertos países han establecido programas nacionales de lucha contra la rabia los que han hecho disminuir sensiblemente el número de muertos (China, Indonesia, Malasia y Tailandia) ^{1,3}.

1.2.3. Rabia en África.

En África, algunas especies silvestres, como la mangosta amarilla (Cynictis penicillata), el chacal de lomo negro (Canis mesomelas), el chacal rayado (Canis adustus) y el zorro orejas de murciélago (Vulpes inacrotis), juegan papeles significantes en ciertas áreas ⁷. Sin embargo, el perro continúa siendo el principal vector de rabia en Africa (alrededor del 90%) ^{8, 9}. En Sudáfrica, la epidemiología de la rabia involucra una gran diversidad de

especies animales entre las cuales se incluyen a los chacales (Canis mesomelas), los zorros voladores (Otocyon megalotis), las mangostas amarillas (Cynictis penicillata) y los gatos salvajes (Felis lybica)^{10, 11}. En Kenya, el resultado de un muestreo de animales salvajes reportó la detección de anticuerpos de virus rábico en 72 hienas y 18 perros salvajes⁴.

1.2.4. Rabia en América Latina.

En 1994, quince de los veintiún países latinoamericanos reportaron 144 casos de rabia en humanos. Esta cifra es la más baja desde que en 1969 comenzó a operar el Sistema Continental de Información para la Vigilancia Epidemiológica de la Rabia que coordina la OPS/OMS y resulta inferior en 36% al promedio del cuatrienio 1990-1993. El área andina, dentro de ella Perú, fue la subregión y el país que presentó mayor número de casos, 41.7% y 28.5%, respectivamente¹².

En lo que respecta a la rabia en animales, el perro continúa siendo la especie más frecuentemente incriminada como fuente de infección. No obstante, puede observarse una disminución sostenida de su importancia relativa en los últimos años. En cuanto a otras especies, salvo Belice y Uruguay, los países informaron al Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ) la ocurrencia de 8876 casos, de éstos 5795 fueron animales de compañía (perros y gatos), 2519 animales domésticos de interés económico (bovinos, caprinos, ovinos y porcinos), y el resto (454) animales silvestres. La mayor cantidad de casos descritos correspondió a perros (62.8%) y a bovinos (23.9%)³.

En el conjunto de América latina, el programa de vacunación ha permitido disminuir el número de casos de rabia humana (alrededor de 200 casos por año). Aparte de la rabia canina, los murciélagos (esencialmente los murciélagos hematófagos o vampiros) son un reservorio importante de la rabia, transmitiéndola a humanos y animales domésticos de cría, de los cuales los bovinos son los más atacados¹².

Los murciélagos vampiros transmiten la rabia paralítica bovina en regiones endémicas del trópico que se extienden desde el norte de México, al norte de Argentina y al Caribe. De los tres géneros de murciélagos hematófagos, *Desmodus*, *Diphilla* y *Diaemus*, el primero tiene la más amplia distribución ya que se encuentra en toda la región tropical y subtropical de América Latina, prefiere la sangre bovina y es transmisor muy eficaz de la rabia. *Diphilla*

y *Diaemus* tienen una distribución más limitada y al preferir sangre de aves, su importancia como vectores de la rabia es mínima ¹⁴.

1.2.5. Rabia en América del Norte.

En Norteamérica, más específicamente en los Estados Unidos de América, los zorrillos y los mapaches son los mamíferos terrestres implicados en la rabia epidémica ¹⁴. En 1995, 7877 casos no humanos declarados rabiosos con una mayoría de animales fueron salvajes (92%). Los principales animales incriminados son los mapaches, los zorrillos, los zorros y los coyotes. El murciélago nectívoro, conocido como murciélago de pelo plateado (*Lasiurus noctivagans*) juega un papel importante por ser responsable de muertes humanas ¹⁴.

1.2.6. Rabia en México

La zona enzoótica de rabia paralítica bovina comprende los estados de Campeche, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco, Veracruz y Yucatán; en forma parcial los estados de Chihuahua, Durango, Hidalgo, México, Puebla, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas. En el periodo comprendido entre 1990 y junio de 1995, ocurrieron 440 brotes de rabia paralítica bovina con 2,185 muertes animales entre los que destacaron dos que ocurrieron en los estados de Chiapas y Michoacán durante 1991, los que presentaron 1,151 cabezas de ganado muertas. Se realizaron 272 operativos de captura de murciélagos hematófagos, de los cuales 23 fueron con características de emergencia, ya que además se informó de agresiones a población humana en Tomatlán, Jalisco, en 1990, así como en los estados de Chiapas, Chihuahua, Durango, Guerrero, Jalisco, México, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa, Veracruz y Yucatán en 1992, y en los estados de Chihuahua y Tamaulipas en 1993 y Oaxaca e Hidalgo en 1995 ³.

Los casos de rabia animal confirmada por laboratorio entre 1989 y 1994, con un promedio por año de 2,658 casos, observa una reducción sostenida a partir de 1990, con un rango de 4,668 en 1989 y 1,443 para 1994. El perro fue en el 91% de los casos la especie más afectada, seguida por el gato 3.4%, el quiróptero 0.3% y el restante 5.3 por otras especies ³.

En el periodo de 1989 a 1995, ocurrieron en el país 265 casos de rabia humana, con un periodo promedio de 44 casos anuales y un rango entre 24 y 69 casos. De estos mismos casos, el 67% correspondieron a hombres y 33% a mujeres; por otro lado, la mayor frecuencia ocurrió en el grupo de edad entre 5 y 14 años, representando el 57% del total. La principal especie agresora fue el perro, el cual contribuyó con 226 casos (86%), seguida de la quiróptera con 22 (8.4%), gatos 8 (3%) y 6 casos (2.6%) provocados por otras especies en donde intervinieron bovinos, zorros, mapaches, coyotes, gatos montés y zorrillos ³.

En general, la principal especie responsable en la transmisión de la rabia a los humanos es el perro en 82% aproximadamente, siguiendo los quirópteros con un 6.5 a 8%, y el resto se debe a otro tipo de fauna (silvestre o doméstica) ¹³. En nuestro país es de importancia social la presentación de casos de rabia en diferentes animales, incluyendo al hombre, pues México ocupa uno de los primeros lugares en incidencia en América Latina ¹⁵.

Uno de los principales problemas de la ganadería de este país en las áreas tropicales es la rabia parálitica bovina (derriengue) transmitida por la mordedura del murciélago hematófago, ya que en nuestro país se reportaban pérdidas entre 20 y 30 mil cabezas anualmente, hoy en día se reporta pérdidas de aproximadamente 4,000 ó 5,000 cabezas ^{9, 16}.

1.3. Formas de presentación en la transmisión de la rabia.

1.3.1. Presentación silvestre de la rabia:

En esta presentación se cuenta con la participación de mamíferos silvestres como los zorrillos, mapaches, lobos, zorros y otros ya mencionados, donde existe una gran diversidad de factores condicionantes, por lo general complejos y poco conocidos. Con base en la aplicación de las medidas de control, se ha observado en los países desarrollados una disminución de la rabia urbana, mientras que por el contrario se ha notificado un incremento aparente de la rabia silvestre, incluso en la IX Reunión Internacional sobre Avances en la Investigación y Control de la Rabia en las Américas realizada en la Ciudad de Puerto Vallarta, Jalisco, México en 1998, el Dr. Jorge Domínguez Ojeda y sus colaboradores reportaron en un estudio que este comportamiento se presenta por primera vez en la historia moderna de la rabia en México. En algunos países de Asia, África y de América principalmente, la rabia urbana es aún de prevalencia elevada y en sus áreas

tropicales de América Latina la rabia silvestre transmitida por vampiros constituye un problema de salud animal y pública. Es poco el conocimiento que se tiene, sin embargo, sobre la rabia silvestre en otras especies. En Estados Unidos de América y Canadá se sabe que las especies con mayor importancia epidemiológica son los zorrillos, mapaches, zorros y murciélagos.

En Europa la rabia es de predominio silvestre. En promedio el 78.8% de los casos notificados ocurren en estos animales; el zorro rojo (Vulpes vulpes) es responsable del 74% de estos casos. Otras especies silvestres son notificadas con menor frecuencia, muchas de ellas probablemente víctimas del zorro rojo al compartir el mismo hábitat ^{1,3}.

1.3.2. Presentación urbana de la rabia:

En la presentación urbana, la población cada vez más abundante de perros, por razones de seguridad y protección, pudiera ser la razón de un incremento de perros comunitarios, lo que garantiza que el ciclo se mantenga activo, aun cuando no hubiese contacto con fauna silvestre transmisora en las áreas limítrofes o de interfase entre la ciudad y el medio rural, y en ocasiones con el medio silvestre, sabiendo de antemano que no existe transmisión entre los reservorios, o al menos no ha sido reportada. El gato es afectado accidentalmente con rabia y representa un riesgo para la infección humana, pero no juega un papel importante en la cadena de transmisión y mantenimiento de la actividad viral en este medio. La rata no juega papel alguno en la epidemiología de la enfermedad. En el mundo no existe un solo caso convenientemente documentado de rabia humana a partir de la mordedura de esta especie ^{1,3}.

La mordida es la única ruta de infección en perros, siendo los animales jóvenes, con una edad promedio de 4 meses, más susceptibles que los adultos. La rabia canina causada por virus de reservorios naturales como zorros, zorrillos o mapaches resultan menos frecuentes que la rabia urbana que se presenta de perro a perro o de perro a otras especies animales domésticas ¹².

En los países afectados la rabia no está uniformemente distribuida, pudiéndose encontrar zonas libres, de baja y de alta endemicidad, así como áreas con brotes epidémicos ^{3,17}.

La propagación y transmisión por aerosoles ha llegado a ocurrir en cavernas con grandes poblaciones de murciélagos donde sus orinas contienen virus rábico, ya que encuentran

temperaturas y humedad adecuadas, o en laboratorios donde se trabaja con grandes volúmenes de virus concentrados ^{18, 19}.

1.4. Clasificación, propiedades y características del virus rábico.

1.4.1. Clasificación del virus.

El orden Mononegavirales agrupa a virus que poseen ARN de una sola cadena, no segmentado y de polaridad negativa. Comprende cuatro familias: *Paramyxoviridae*, *Filoviridae*, *Bornaviridae* y *Rhabdoviridae*. Los rhabdovirus que infectan a los mamíferos se dividen en tres: los Vesiculovirus (modelo : virus de la estomatitis vesicular, VSV); los Ephemerovirus (modelo : virus de la fiebre efimera bovina); los Norvirhabdovirus (modelo : virus de la necrosis hematopoyética infecciosa); y los Lyssavirus (modelo : virus de la rabia) ^{17, 20, 21, 22, 23, 24, 25}.

Los rhabdovirus son virus envueltos, con espículas, estructura helicoidal interna y estructura morfológica muy particular en la forma de bala de fusil ^{1, 20, 21, 22, 26, 27}.

En el género Lyssavirus se han caracterizado diferentes serotipos gracias al empleo de anticuerpos monoclonales y al análisis de las secuencias del genoma:

Serotipo 1, Virus de la rabia clásica: comprende a la cepa prototipo de "desafío" (Challenge Virus Standard o CVS), y a la mayoría de los virus de campo aislados de mamíferos terrestres, así como el murciélago insectívoro de Norteamérica y murciélagos hematófagos de Latinoamérica; también incluye cepas del virus fijo de laboratorio. Se encuentra distribuida en el mundo entero excepto Australia, Reino Unido, Irlanda, Nueva Zelanda, Japón, Hawai, Antártida y Escandinavia. Afecta a humanos, carnívoros domésticos y salvajes, herbívoros y murciélagos.

Serotipo 2, Virus Lagos bat: Primeramente aislado de una mezcla de cerebro de murciélagos en Nigeria (Lagos bat 1), después se aisló en un murciélago de la República Centroafricana (Lagos bat 2) y un tercero aislado en un murciélago de Guinea y un gato en Zimbabwe (Lagos bat 3). Este virus se encuentra distribuido en Nigeria, República Centroafricana, Sudáfrica, Zimbabwe, Guinea, Senegal y Etiopía y afecta a murciélagos frugívoros, gatos y perros.

Serotipo 3, Virus Mokola: Aislado por primera vez de musarañas de Nigeria y luego de un humano (Mokola 1), después se encontró en las musarañas de Camerún (Mokola 2) y luego fue aislado de perros de Zimbabwe (Mokola 3). Se encuentra distribuido en Nigeria, República Centroafricana, Zimbabwe, Camerún y Etiopía y afecta a humanos, musarañas, gatos, perros y roedores.

Serotipo 4 , Virus Duvenhage: Primero se aisló de un humano de Sudáfrica (Duvenhage 1), después de un murciélago de Sudáfrica (Duvenhage 2) y finalmente de murciélago de Zimbabwe (Duvenhage 3). Se distribuye en África del sur y Zimbabwe, afectando a hombres y murciélagos insectívoros ².

Lyssavirus no clasificados, Lyssavirus de Murciélago Europeo 1(EBL1): se encuentra distribuido en Holanda y afecta a hombres y murciélagos insectívoros (géneros Epseticus pipistrellus). Lyssavirus de Murciélago Europeo 2(EBL2): se distribuye en Holanda y afecta a hombres y murciélagos insectívoros (géneros Myotis) y Lyssavirus del murciélago australiano ^{1, 3, 13, 22, 28, 29, 30, 31}.

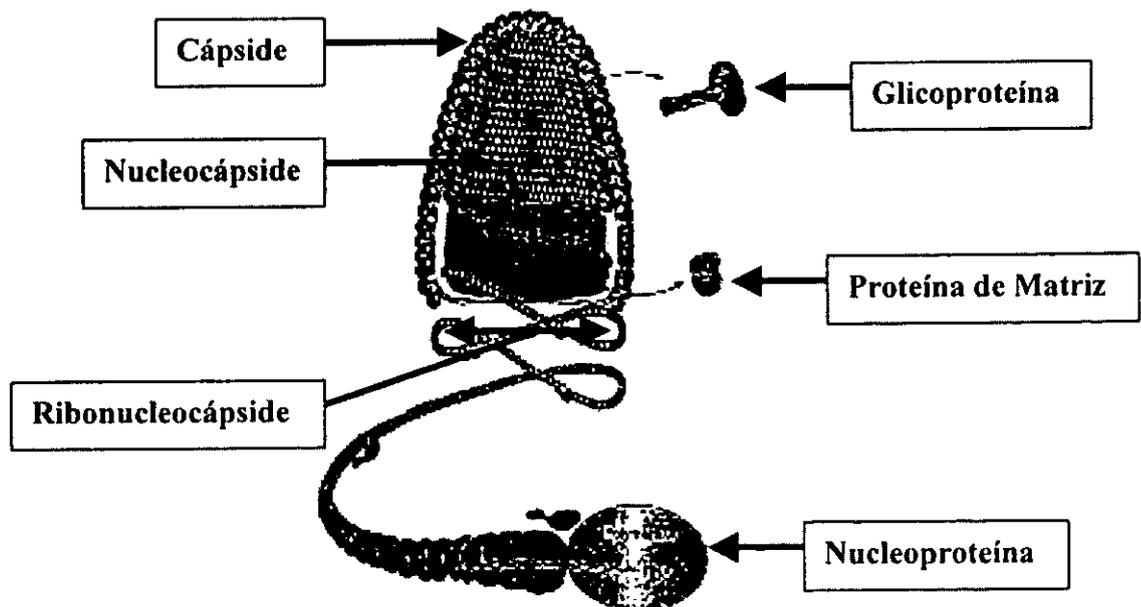


Figura 1. Esquema de las estructuras del virus rábico.

1.4.2. Características morfológicas del virus.

Observado con microscopio electrónico, el virión rábico presenta un diámetro aproximado entre 75 y 80 nm, a la base de las espículas ($1 \text{ nm} = 10^{-9}$ metros) y un largo que varía entre 130 y 240 nm; La envoltura viral está erizada de espículas de 9 a 12 nm de longitud. Está constituido de una doble envoltura fosfolipídica, de un ácido ribonucleico enrollado en espiral, de cadenas sencilla y en sentido negativo, y de cinco proteínas mayores. La replicación del genoma viral tiene lugar en el citoplasma celular ^{2,3}.

Una sola molécula de ARN está presente por virión, constituida de aproximadamente 12,000 nucleótidos. El ARN del genoma es de polaridad negativa, indicando que no es infeccioso por sí mismo. Luego de la penetración en la célula, el ARN genómico, debe ser transcrito en moléculas complementarias positivas, capaces de producir las proteínas virales (Figura 1).

El virión contiene 67% de proteína, 26% de lípidos, 4% de RNA y 3% de carbohidratos vinculados en forma covalente al lípido y proteína. Se han identificado cinco polipéptidos del virus ^{2, 32}.

El virus de la rabia esta compuesto de 2 unidades estructurales:

1. Una ribonucleocápside interna (RNC), donde ARN genómico interactúa fuertemente con la nucleoproteína (N) y menor contacto con la fosfoproteína (NS) y la polimerasa (L), 2 proteínas involucradas en la transcripción y en la replicación,
2. Una membrana circundante que comprende la matriz (M) y la glicoproteína G, el principal antígeno viral ¹.

1.4.2.1. El genoma rábico.

Como ya se mencionó, el genoma del Lyssavirus tiene aproximadamente 12 Kb ²⁰.

Cada una de las 5 proteínas que constituyen el virus rábico es codificada por un gen. La secuenciación de los 11932 nucleótidos del genoma de la cepa Pasteur virus (PV) del virus de la rabia ha permitido estudiar los elementos reguladores de la transcripción y de la replicación. La secuencia completa de aminoácidos fue deducida de la secuencia de los genes que codifican respectivamente las 5 proteínas: N, NS, M, G y L, (Figura No.2). Por otro lado, el análisis de las secuencias parciales de diferentes Lyssavirus ha permitido su estudio comparativo y "evolutivo" ^{3, 20, 26, 32}.

Una peculiaridad del genoma del virus de la rabia es la existencia de un gran intergen entre los cistrones G y L que comprenden 423 nucleótidos. Esta región no codificante hipervariable fue denominada pseudogen Ψ ^{20, 32}.

Como se mencionó el genoma rábico codifica para 5 proteínas :

La nucleoproteína N (450 aminoácidos), estrechamente asociada al ARN viral. Esta es expresada en abundancia en el huésped después de una infección por virus rábico. La proteína N es una de las más conservadas y se utiliza para estudios de diagnóstico de lyssavirus ^{31, 33, 34}.

La fosfoproteína NS o M1 (297 aminoácidos), se acumula en el citoplasma de las células infectadas. Inicialmente se había propuesto que esta proteína hacía parte de la envoltura, por esta razón, le fue atribuida la denominación M1, por primera proteína de membrana no glicosilada. Posteriormente, se demostró que no forma parte de la membrana sino de la nucleocápside . La proteína M1 rábica y la NS de VSV son dos denominaciones de la misma proteína y solamente la denominación NS debe de ser empleada para todos los Rhabdovirus ^{28, 35}. Todavía se desconoce qué papel juega esta proteína en la protección.

La proteína L (2142 aminoácidos): Denominada “L” por “large”, traducido a “grande” en español, responsable de la transcripción y de la replicación del ARN viral. Es la más conservada de todas las proteínas de los virus ARN monocatenarios de polaridad negativa. Esta estabilidad aparentemente resulta de la necesidad de conservar funciones enzimáticas vitales para el virus ^{28, 35}. Ningún anticuerpo monoclonal específico de la proteína L del virus rábico ha sido obtenido hasta hoy, lo que aparentemente refleja el carácter “universal” de los motivos antigénicos que ella posee ^{28, 35}.

Estas tres proteínas (N, NS y L), asociadas al ARN viral, constituyen la nucleocápside.

La proteína M (202 aminoácidos), se localiza sobre la cara interna de la envoltura lipídica. Es la menor de las proteínas del virus de la rabia. A diferencia de VSV, la proteína M del virus de la rabia no está fosforilada.

La glicoproteína G (504 aminoácidos) está inserta en la membrana lipídica del virus; ella es responsable de la inducción de los anticuerpos neutralizantes y de la estimulación de los linfocitos T, y es la única proteína externa del virión, representa aproximadamente un tercio de la masa proteínica viral ^{2, 26, 29, 32}.



FIGURA 2. Representación esquemática del genoma del virus de la rabia. ^{1,26.}

1.4.3. Propiedades del virus rábico.

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

El VSV ha sido el más estudiado y sirve de virus de referencia de los rabdovirus. A pesar del gran parecido, la analogía antigénica entre los diferentes géneros de rabdovirus es poca; por ejemplo, las proteínas G del virus de la rabia y de VSV solamente tienen 20% de homología en frecuencia de aminoácidos ^{3, 22, 32, 36.}

1.4.4. El hospedador.

La rabia es una enfermedad transmisible que la padecen todos los mamíferos. Su letalidad es del 100%. La susceptibilidad varía de acuerdo a diferentes especies animales: es muy alta para los zorros, coyotes, chacales, lobos, ratas y ratones; alta para hámsters, zorrillos, mapaches, gatos y murciélagos; moderada para perros, ovejas, cabras, caballos y primates; y media para las zarigüeyas ^{12.}

La transmisión se efectúa por medio de la saliva de un animal rabioso, la saliva sirve al virus como medio de transporte o vehículo para que se introduzca por medio de mordedura o lamedura en una lesión reciente de la piel ^{12.}

La transmisión natural de la rabia canina a humanos depende de la relación existente entre perros y humanos, de la densidad y del estado inmune de la población canina ^{8.}

1.5. La biología molecular para el estudio y diagnóstico de rabia.

1.5.1. Técnicas de reacción en cadena de la polimerasa.

El término de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se aplica al proceso bioquímico *in vitro*, mediante el cual cadenas de ADN son duplicadas por la acción de una ADN polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 20 y 30) que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso. En general, los componentes requeridos para una PCR son: ADN, iniciadores (oligonucleótidos) específicos que flanquean al gen o segmento que actúa como blanco para la amplificación; mezcla de desoxinucleótidos (dNTP's); solución amortiguadora de reacción, y ADN polimerasa.

Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos, que son:

Desnaturalización (92-98°C, 30 a 90 segundos), en el cual se separan o desnaturalizan las dos cadenas complementarias del ADN blanco.

Alineamiento (50-60°C, 30 a 60 segundos), en el que ocurre el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de ADN blanco desnaturalizado.

Extensión (70-74°C, 30 a 90 segundos), en el que el ADN polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados al ADN blanco, al ir polimerizando los desoxinucleótidos libres, resultan nuevas cadenas complementarias a las dos sencillas presentes al inicio de la reacción.

El ciclo siguiente se inicia en el mismo tubo, con los mismos componentes de la mezcla de reacción, pero contiene ahora el doble de cadenas sencillas de ADN blanco que el anterior y finaliza convirtiendo éstas en cadenas dobles.

Con la sucesión de ciclos se logra una síntesis exponencial (2^{17}) del segmento de ADN blanco, cuyo tamaño se define desde los primeros ciclos de la reacción. La longitud del segmento amplificado por la PCR es el resultado de la suma de la longitud de los iniciadores más la distancia de ADN blanco, flanqueado por éstos³⁷.

1.5.2. Otras pruebas utilizadas en biología molecular

La epidemiología molecular se ha definido muy recientemente como la ciencia que se enfoca a estudiar la contribución de factores potenciales de riesgo ambiental o genético, identificados a nivel molecular, sobre la etiología y la prevención de enfermedades dentro de la familia y sobre las poblaciones ³⁸.

El diagnóstico molecular permite el estudio de los genes, además, estas técnicas permiten identificar brotes y la relación que éstos tienen en común o por separado; la identificación de diferentes cepas resistentes a fármacos involucradas en cadenas epidemiológicas y el movimiento de los agentes etiológicos de una región endémica a una región libre, entre otros.

Algunas técnicas de biología molecular que se usan además de la PCR, son la transcriptasa reversa de la PCR (RT-PCR), el polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismo por amplificación de secuencias aleatorias (RADP's), repeticiones cortas en serie (STR's), amplificación de secuencias caracterizada (SCAR's), secuencias polimórficas cortadas y amplificadas (CAP's), entre otras ³⁸.

1.5.3. Realización de algunos estudios de rabia por medio de biología molecular

Desde el inicio de sus investigaciones, Louis Pasteur clasificó los virus de la rabia en 2 categorías: los virus de la calle y los virus fijos. El nombre virus de la calle se refiere a las cepas aisladas en medio urbano, mientras que el de virus fijo se refiere a la fijación de tiempo de incubación en una especie determinada.

Las pruebas diagnósticas para la detección del virus rábico son las pruebas de anticuerpos fluorescentes, la cual detecta el antígeno viral en tejido nervioso por medio de anticuerpos fluorescentes, y el aislamiento viral.

Con el desarrollo de las técnicas de anticuerpos monoclonales fue posible demostrar las distintas variantes antigénicas circulantes en las diferentes poblaciones hospedadoras ⁵.

Wiktor y Koprowski (1978), fueron los primeros en hacer notar la importancia de las diferencias antigénicas ³⁹.

Charlton y col. Estudiaron 19 cepas de virus rábico, provenientes en su mayoría de fauna silvestre de diferentes regiones de Canadá usando anticuerpos monoclonales; este trabajo

permitió reconocer tres grupos de virus con diferentes patrones de nucleocápside, así como diferencias entre un aislamiento en Ontario y dos de Manitoba ^{13,39}.

La tecnología del PCR para el diagnóstico de Lyssavirus, tipificación y epidemiología molecular se ha desarrollado desde el principio de los noventa¹.

Las variaciones en el virus de la rabia, impulsó al Instituto de Investigación Agrícola y de Enfermedades Animales de Canadá, a realizar estudios empleando técnicas de biología molecular donde el gen N de diversos aislamientos independientes fue amplificado usando PCR y los resultados fueron comparados por análisis de enzimas de restricción (REA), y en algunos casos, por secuenciación del genoma. Este análisis confirmó que no hubo realmente una variación específica para un huésped particular en la porción del genoma viral bajo estudio, pero que, no obstante, son muy claras y consistentes las diferencias en virus de distintas regiones geográficas ^{40,41}.

Los anticuerpos monoclonales contra la proteína N pueden, por su parte, distinguir aislamientos de diferentes áreas o de diferentes especies de la misma área ^{13,40}.

De acuerdo con estudios realizados en el Instituto Pasteur de París, se pueden considerar el gen más conservado para un diagnóstico general y luego uno más variable para el diagnóstico más específico, respectivamente. De esta manera el gen N es importante, porque gracias a él se puede diagnosticar de manera general a los Lyssavirus. Por otro lado, el gen G variable y el pseudogen Ψ hipervariable son muy útiles para observar las diferencias antigénicas existentes entre los Lyssavirus.

El gen N que es el más conservado puede ser usado para diagnóstico, taxonomía y tipificación, mientras que el gen G (glicoproteína) y el pseudogen Ψ pueden ser utilizados también para tipificación pero sobre todo para estudios inmunológicos y epidemiológicos finos (figura 3) ^{27,28,31}.

El producto amplificado por PCR puede ser sucesivamente analizado por la prueba del polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (siglas en inglés: RFLP) usando paneles específicos de restricción de enzimas para tipificar ^{42,43}.

En México, en 1996, Loza y col., analizaron el genoma (regiones hipervariables: gen G y pseudogen Ψ) de más de 60 aislamientos mexicanos de rabia provenientes de reservorios terrestres (perros, gatos, zorros y zorrillos) y aéreos (vampiro), así como de otras especies susceptibles (bovinos, caballos, cerdos y humanos). Estos aislamientos provenían de 13

estados de la república. Con los resultados obtenidos se configuró un árbol genealógico, utilizando el programa CLUSTAL r, método realizado por Ettiene, J., en 1996. En este árbol se observó que las muestras pueden agruparse en tres ciclos bien definidos: i) reservorios aéreos; ii) reservorios terrestres y iii) muestras procedentes de zorrillos. Las muestras aisladas de murciélagos hematófagos (ciclo aéreo, grupo i) forman un grupo más compacto que aquellas aisladas de animales terrestres (grupo ii). Las muestras aisladas de zorrillos (grupo iii) forman un grupo separado que difiere aproximadamente en un 19% con respecto a las que conforman los grupos i y ii ^{44, 45, 46}.

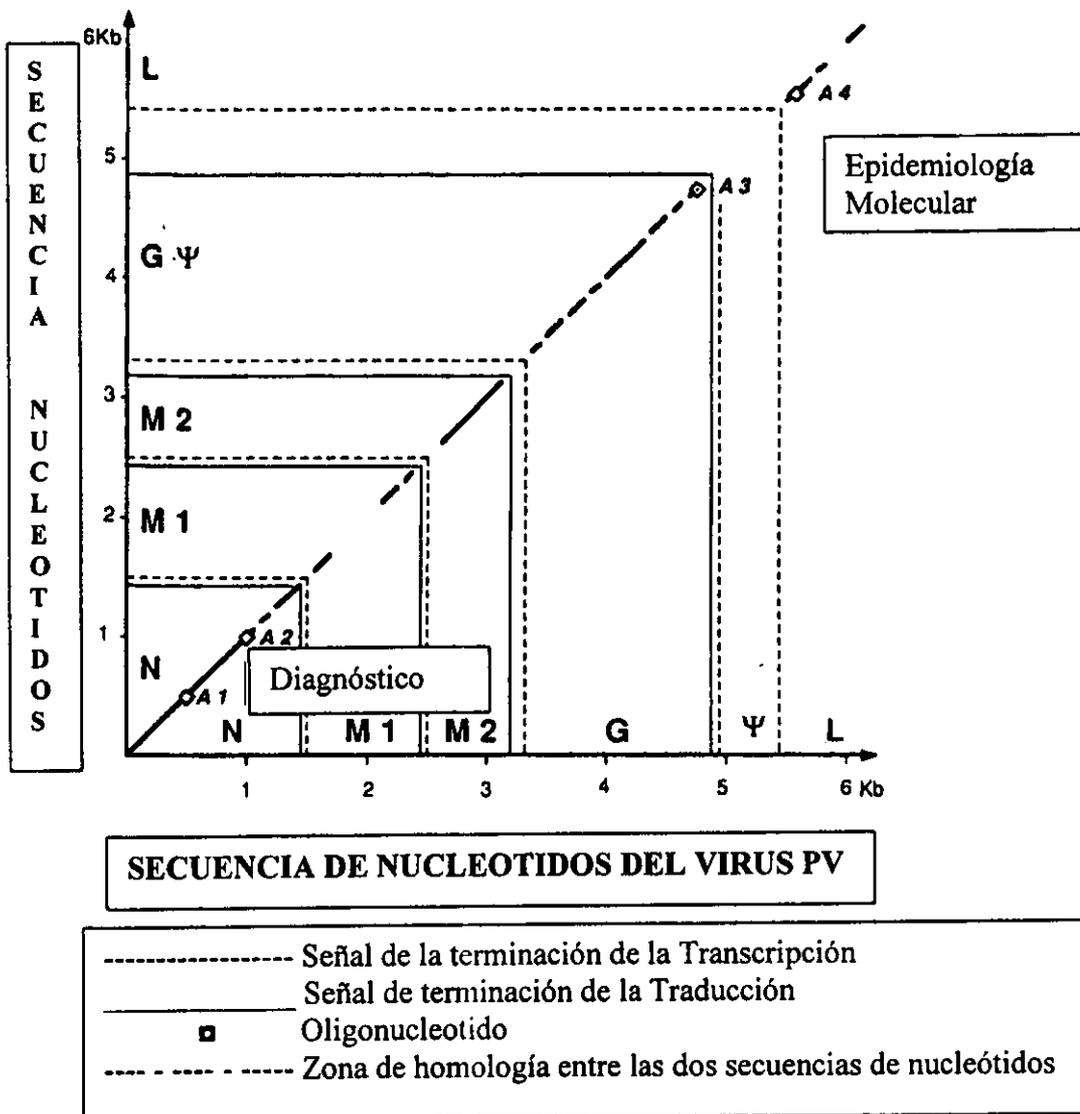


Figura 3. Organización general de las zonas de secuencias para diagnóstico y epidemiología molecular del virus de la rabia tomando como modelo al serotipo Mokola.

Tomado de: Bohury, H., Sureau, P. and Montaña-Hirose. J. A. 1991.

2. MATERIAL Y METODOS

Clasificación del estudio:

Este estudio es de tipo observacional, descriptivo ⁴⁷.

Criterios de inclusión:

Se incluyeron todas aquellas muestras recolectadas de los diferentes centros de referencia oficiales para rabia y/o de las capturas de fauna silvestre que se realizaron en estados del país y que resultaron positivas a rabia por la técnica de anticuerpos fluorescentes (prueba de inmunofluorescencia directa, IFD).

2.1. Recolección de muestras positivas

Las 32 muestras que llenaron el criterio de inclusión, procedían, 24 del laboratorio para el diagnóstico de rabia del Centro Nacional de Sanidad Animal (CENASA, Santa Ana Tecamac, Estado de México, México), 6 muestras de los laboratorios de diagnóstico del Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria (INIFAP, Palo Alto, México, D.F.) ambos institutos dependientes de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR) y 2 muestras de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Centro Médico Nacional Siglo XXI de la Coordinación de Investigación Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). 24 aislamientos fueron obtenidos de especies domésticas (12 cánidos, 9 bovinos, 1 porcino, 1 caprino y 1 equino), 1 humano, 5 de especies silvestres (1 zorrillo, 1 tejón, 1 murciélago insectívoro, 1 murciélago hematófago y 1 muestra de gato montés) y 2 cepas de referencia (CVS y CASS88). Las especies pertenecían a 11 estados del país: Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Estado de México, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas.

Es necesario mencionar que algunas de las cepas ya fueron trabajadas por Loza-Rubio, Aguilar y Tordo, en 1997, como lo son las cepas CVS, CASS88, cabra, murciélagos insectívoro y hematófago, zorrillo y humano.

2.2. Propagación de aislamientos en ratón

Con la finalidad de replicar el virus rábico y además con la intención de formar un cepario, se inocularon ratones con las muestras originales. Para esto, se prepararon suspensiones de tejido infectado macerándolo en una dilución 1:5 de BAPS (solución de sales de fosfatos buferada, PBS, con 0.75% de albúmina de bovino) y se centrifugaron a 3000 gravedades (g), durante 20 minutos, se obtuvieron los sobrenadante y se almacenaron a -70°C hasta su uso. Se tomaron 0.03 ml de cada suspensión y se inocularon de forma intracerebral a 7 ratones albinos de la línea CD-1. Una vez que los ratones manifestaron la signología clínica típica de rabia (debilidad, incoordinación, pelo erizado, parálisis y coma) se les realizó la extracción de encéfalos y se confirmó la presencia de rabia por medio de la prueba de IFD⁴⁸.

2.3. Extracción de ARN

Para permitir la disociación de los complejos nucleoproteicos se colocaron 0.5 cm^3 de encéfalo de ratón positivo a rabia en un tubo eppendorff de $1.9\ \mu\text{l}$ y se homogenizó en presencia de Trizol (1ml) y se incubó durante 5 minutos a una temperatura de entre 15 a 30°C . Enseguida se separó el ARN de las muestras con 0.2 ml de cloroformo e incubándose durante 2 o 3 minutos a la misma temperatura (temperatura de laboratorio de 15 a 30°C). Se procedió a centrifugar, a 13000 g durante 15 minutos de, 2 a 8°C . La capa superior acuosa contiene el ARN. Se transfirió la fase acuosa a otro microtubo y se precipitó el material genético con 0.5 ml de alcohol isopropílico (15 a 30°C durante 10 minutos). El material obtenido se centrifugó a 13000 g durante 10 minutos a una temperatura de 2 a 8°C . Se decantó el sobrenadante y el botón se lavó con 1ml de etanol al 75%, se mezcló vigorosamente hasta desprenderse y se volvió a centrifugar a 6000 g durante 3 minutos a una temperatura entre 2 y 8°C . Finalmente se suspendió el ARN, otra vez en etanol, decantando de nuevo el sobrenadante y colocando el microtubo boca abajo para un secado completo. Una vez seco, se disolvió el botón de ARN con $50\ \mu\text{l}$ de agua pirolizada y se incubó a baño maría a una temperatura entre 55 y 60°C durante 10 minutos para luego almacenarse a $-70\ ^{\circ}\text{C}$ ^{42, 43}.

2.6. Amplificación de productos por PCR

Para amplificar el fragmento de ADNc de interés (porción G-ψ-L) se procedió a diluir 5 µl de ADNc (1 µg/µl) en 43 µl de reacción compuesta por 2 µl de los cebadores GCII y 2 de G8 (200 ng/µl, c/u), 1 µl de cada nucleótido trifosfato (10 mM), 5 µl de solución buferada (20 mM Tris-HCl, 1mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1 M KCl, 0.5% Nonidet P40 (v/v), 0.5% Tween 20 (v/v), 50% glicerol (v/v), pH 8.0 (4°C) y 0.7 µl de taq-polimerasa recombinante (1 unidad/0.2 µl). Se aforó con 29.3 µl de agua pirolizada y se ajustó el termociclador a 30 ciclos contemplando una temperatura de desnaturalización de 95°C durante 60 segundos, una de alineamiento a 45°C durante 90 segundos y una de elongación a 72°C durante 150 segundos^{42, 43, 49}.

2.7. Endonucleasas empleadas para el análisis del polimorfismo de los fragmentos largos de restricción (RFLP)

Endonucleasas de restricción: En trabajos previos realizados por Loza y col. en 1996, han determinado cuatro enzimas de restricción para cortar específicamente dentro de cada grupo (aéreo ó terrestre):

Grupo A: clasificadas para el grupo aéreo.

BsaW I (WCCGGW) producen 2 fragmentos de 465/140 pares de bases (pb) una mutación sencilla entre las cepas aéreas.

BsrG I (TGTACA) producen 2 fragmentos de 350/255 pb una mutación sencilla entre las cepas aéreas .

Grupo B: clasificadas para el grupo terrestre.

BamH I (GGATCC) producen 2 fragmentos de 472/133 pb una mutación sencilla entre las cepas terrestres.

Stu I (AGGCCT) producen 2 fragmentos de 345/260 pares de bases (pb) una mutación sencilla entre las cepas terrestres^{44, 45, 46, 49}.

Para la realización del presente trabajo, se seleccionaron sólo dos enzimas: BsrGI y BamHI.

2.8. Cortes enzimáticos por medio de la técnica de análisis del polimorfismo de los fragmentos largos de restricción (RFLP)

Se efectuaron digestiones de los amplicones obtenidos por la técnica de PCR, estos cortes fueron realizados por medio de endonucleasas de restricción estandarizadas como se muestra a continuación:

- Para la enzima clasificadas para cortar grupos terrestres (BamHI) se mezclaron 8 μ l de amplicón de PCR, con 1 μ l de enzima (10 unidades/ μ l), 1 μ l de su respectivo buffer 10X.
- Para la enzima clasificada para cortar grupos aéreos (BsrG I) se mezclaron 7 μ l de amplicón de PCR, con 1 μ l de enzima (10 unidades/ μ l) , 1 μ l de su respectivo buffer 10X, 1 μ l de BSA 10X ^{44, 45, 46, 49}.

2.9. Observación de los cortes enzimáticos en gel de agarosa por medio de electroforesis.

Cada amplicón obtenido fue analizado por la digestión de cada una de las endonucleasas al observarse con una prueba de electroforesis en un gel de agarosa al 1% en solución de TAE buferada con bromuro de etidio (1 ng/ml). Se efectuó la migración de las muestras con la aplicación de una corriente de 100 volts durante 35 minutos. La observación de tal migración fue realizada por medio de un transluminador de luz ultravioleta. Se tomaron fotografías de los patrones de migración con una cámara Polaroid ^{44, 45, 46, 49, 50, 51}.

3. RESULTADOS

Se amplificaron las 32 (100%) muestras por medio de la técnica de PCR (incluyendo las dos cepas de referencia CVS y CASS88). Los productos de PCR (amplicones) obtenidos fueron digeridos por dos endonucleasas de restricción la que sirvieron para detectar tres diferentes patrones de migración. Primeramente se observaron 17 amplicones (53%) que fueron cortados con la enzima BsrGI, y corresponden al ciclo aéreo; el segundo patrón marcó un corte para 13 amplicones (41%) que fueron digeridos con la enzima BamHI y corresponden al ciclo terrestre, y por último, un tercer patrón que no cortó 2 amplicones (6%) con ninguna de las dos enzimas.

En la figura 1 se muestra el mapa de la República Mexicana, en el cual se señalan aquellos estados de donde se obtuvo como mínimo una muestra para este estudio.

En el cuadro 1, se señalan los cortes realizados por cada una de las enzimas en las cepas de referencia. Aquí puede ser observado cómo la enzima BsrGI corta aquellos amplicones que provienen de un ciclo aéreo, mientras que la endonucleasa BamHI corta aquellos amplicones que provienen de un ciclo terrestre.

De igual forma, en los cuadros 2, 3 y 4 se listan las muestras de fauna doméstica, silvestre y de un humano, respectivamente, que fueron digeridas con las enzimas ya mencionadas, en donde el comportamiento para los cortes para cepas aéreas y terrestres fue de manera similar a las cepas de referencia, en tanto que las muestras que no son digeridas (bovino, Chiapas y zorrillo, Baja California Sur) por ninguna enzima se consideran como un ciclo diferente a los anteriores, "ciclo hipervariable".

4. DISCUSION Y CONCLUSIONES

La mayoría de los mamíferos, incluyendo al hombre, son susceptibles a la rabia. Sin embargo algunas especies como los perros, los coyotes, los mapaches, los murciélagos hematófagos etc., se comportan como reservorios y vectores de la enfermedad, pues es en ellas que el virus se mantiene y circula y es a partir de ellas que se contaminan otras especies que sólo son víctimas de las primeras, como los bovinos, caprinos, equinos y el propio ser humano. En trabajos precedentes por Loza-Rubio, Aguilar y Tordo, en 1997, se ha observado que el virus de la rabia se adapta a los animales reservorios adquiriendo características en su genoma que pueden ser detectadas por técnicas de biología molecular. De esta manera, en América Latina se han detectado tres principales variantes de virus de la rabia clásico (genotipo 1) : el ciclo aéreo que circula en murciélagos hematófagos, el ciclo terrestre, que circula principalmente en perros, pero también en coyotes, zorros y otros mamíferos terrestres y un ciclo terrestre descrito recientemente que circula en zorrillos estudiados por Loza, R. E. y Aguilar, S. A., en 1996. El propósito de este estudio fue identificar por medio de técnicas de biología molecular, diferencias en los genomas del virus de la rabia obtenidos de fauna doméstica y silvestre mexicanas, y por ende poder catalogarlas en alguno de los tres principales ciclos epidemiológicos descritos.

Las técnicas realizadas en este estudio para el análisis molecular de los diferentes ciclos encontrados fueron las de PCR y RFLP. Se amplificó una región del genoma del virus localizada entre los genes que codifican las proteínas "G" y "L" y que tienen relación con porción del "pseudogen (Ψ)" (Aguilar, S. A. y Loza, R. E. en 1996 y Sacramento, D. Boury, H. and Tordo, N., 1991) ya que esta porción es la más variables en dicho genoma y es útil para estudios de epidemiología molecular al contrario de lo que sucede con la región "N", que es la más conservada y sirve para diagnóstico de Lyssavirus en una forma general como lo indican Bohury, H., Sureau, P. y Montañó, H. J. A. 1991, Sacramento, D. Boury, H. y Tordo, N., 1991 y Bourhy, H, Kissi, B., Lafon, M, Sacramento, D. y Tordo, N., 1992.

Para la realización del presente trabajo se seleccionaron sólo dos enzimas, BsrGI para detectar a las cepas aéreas y BamHI para detectar a las terrestres. De las 32 muestras

trabajadas solamente en dos (6%) no se encontró corte con las dos enzimas utilizadas; una de ellas perteneciente al ciclo "hipervariable" del zorrillo y la otra procedente de un bovino. Este bajo porcentaje (6%) de muestras en las que ninguna de las dos enzimas utilizadas tuvo efecto, valida la utilización de estas dos enzimas como un primer paso que nos permite catalogar rápidamente a las muestras en tres categorías: 1. - de ciclo terrestre; 2.- de ciclo aéreo y 3.- no cortadas. Las muestras que pertenezcan a la última categoría (no cortadas), será necesario posteriormente tratarlas con las otras dos enzimas restantes y/o efectuar la secuenciación completa del amplicón obtenido a fin de asignarlas de manera clara al ciclo hipervariable. El utilizar sólo dos enzimas reduce los costos y aumenta la accesibilidad de la prueba. Sin embargo todas las muestras que no sean cortadas por las dos enzimas utilizadas tendrán que ser analizadas posteriormente utilizando las cuatro enzimas recomendadas en trabajos precedentes y de ser necesario por secuenciación; tal es el caso de la muestra bovina procedente de Chiapas que no presentó cortes con las enzimas de restricción utilizadas. En esta muestra, se puede sospechar de una agresión por zorrillo rabioso lo que daría evidencias de otra posible fuente de infección de rabia en bovinos, sin embargo, como se mencionó, es necesario comprobar esta afirmación mediante un análisis más preciso (utilización de las 4 enzimas y/o secuenciación).

Al igual que en estudios precedentes, en el presente trabajo no se encontró, en ningún canino, una variante que correspondiera al ciclo aéreo (cuadro No. 2), a pesar de que algunos perros compartían nichos ecológicos con murciélagos hematófagos (muestras No. 10, 12, 13, 17, 18 y 19 del cuadro No. 2). Esto confirma el hecho de que el virus se adapta más a la especie reservorio-vector que a una zona geográfica determinada. Se puede decir que la contaminación de un reservorio terrestre con virus procedentes de murciélagos hematófagos es un hecho que en los escasos trabajos realizados en México, nunca se ha reportado.

En el caso de los animales domésticos que no son vectores de la enfermedad y que son considerados sólo víctimas y que además comparten nichos ecológicos poblados por dos o más reservorios-vectores la prueba resulta de especial utilidad. Tal es el caso de la muestra No. 22, 23 y 24 correspondientes a un equino, una cabra y un cerdo en los que la fuente de la enfermedad era difícil de determinar.

Es necesario también el estudio más detallado sobre la muestra de la cabra procedente de Tlaxcala, la cual cortó como cepa aérea, ya que la presencia de dicho ciclo en esta región no ha sido reportado y se puede asumir que el animal en cuestión pudo haber sido trasladado de alguna otra región.

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que en este trabajo se emplea para la tipificación del virus rábico, empleando otros cebadores podrá usarse para el diagnóstico del padecimiento, en casos donde la prueba de referencia (inmunofluorescencia directa) no funcione, como es el caso de muestras fijadas en formalina o paraformaldehído, muestras putrefactas, muestras conservadas a una temperatura no ideal, y/o detección de virus de rabia en saliva de diferentes especies.

La técnica de RFLP podrá ser transferida a los laboratorios que posean la infraestructura mínima necesaria para llevarla a cabo, para que de esta manera puedan determinar qué ciclo circula en su entidad o durante algún brote, y así tomen las acciones adecuadas para el control de la enfermedad.

Este estudio confirma la presencia de un ciclo hipervariable en zorrillos, el cual no presentó sitios de restricción para ninguna de las enzimas trabajadas, por lo cual fue diferente a los ciclos conocidos comúnmente conocidos en México aéreo y terrestre, que presentan sitios de restricción con las enzimas BamHI y BsrGI, respectivamente), reportados por Loza-Rubio, E., Aguilar-Setién y Tordo, N., en 1997.

Se tiene que señalar la utilización confiable, con un estricto patrón de restricción presentado por la enzima BamHI para el ciclo rábico terrestre transmitido por perros y por la enzima BsrGI para el ciclo rábico aéreo transmitido por murciélagos.

Este es uno de los pocos trabajos que se han realizado sobre el estudio del genoma rábico prevalente en especies domésticas y silvestres mexicanas y permitió sugerir la necesidad de generar nuevas medidas de control sobre esta importante zoonosis.

Se recomienda proseguir investigaciones más detalladas sobre el genoma rábico, realizando el método de secuenciación en algunas de las porciones genómicas o, de ser posible, en la totalidad del gen de la rabia. Además, con este tipo de técnicas de biología molecular, se podrán detectar a las especies con rabia que se desconocen y han atacado a humanos en los últimos años, con la finalidad de identificarlas y poder continuar con los métodos de control establecidos para ellas, o bien, si no existen dichos controles, generarlos.

Cuadro 1. Sitios de restricción obtenidos por las endonucleasas para las cepas de referencia.

MUESTRA	ESPECIE	ORIGEN	PATRON DE DIGESTION	
			BamHI	BsrGI
CVS*	Referencia	-----	+	-
CASS88**	Referencia	-----	-	+

* Perro, cepa desafio

** Vampiro, cepa desafio

+ Existió digestión por las endonucleasas utilizadas

- No existió digestión por las endonucleasas utilizadas

Cuadro 2. Sitios de restricción obtenidos por las endonucleasas para las muestras de especies domésticas.

MUESTRA	ESPECIE	ORIGEN	PATRON DE DIGESTION	
			BamHI	BsrGI
1	Bovino	Hidalgo	-	+
2	Bovino	*	-	+
3	Bovino	Chiapas	-	+
4	Bovino	Veracruz	-	+
5	Bovino	Veracruz	-	+
6	Bovino	Hidalgo	-	+
7	Bovino	Puebla	-	+
8	Bovino	Chiapas	-	+
9	Bovino	Chiapas	-	-
10	Canino	Oaxaca	+	-
11	Canino	Edo. México	+	-
12	Canino	Oaxaca	+	-
13	Canino	Oaxaca	+	-
14	Canino	Edo. México	+	-
15	Canino	Edo. México	+	-
16	Canino	Edo. México	+	-
17	Canino	Tabasco	+	-
18	Canino	Oaxaca	+	-
19	Canino	Puebla	+	-
20	Canino	Edo. México	+	-
21	Canino	Oaxaca	+	-
22	Equino	Edo. México	+	-
23	Cabra	Tlaxcala	-	+
24	Cerdo	Puebla	+	-

* No identificado.

+ Existió digestión por las endonucleasas utilizadas

- No existió digestión por las endonucleasas utilizadas

Cuadro 3. Sitios de restricción obtenidos por las endonucleasas para las muestras de especies silvestres.

MUESTRA	ESPECIE	ORIGEN	PATRON DE DIGESTION	
			BamHI	BsrGI
25	Zorrillo	B. Calif. Sur	-	-
26	Tejón	S. L. Potosí	+	-
27	Gato montes	Chihuahua	+	-
28	Mur. Insec.*	Edo. México	-	+
29	Mur. Hema.**	Veracruz	-	+

* *Tadarida*

** *Desmodus rotundus*

+ Existió digestión por las endonucleasas utilizadas

- No existió digestión por las endonucleasas utilizadas

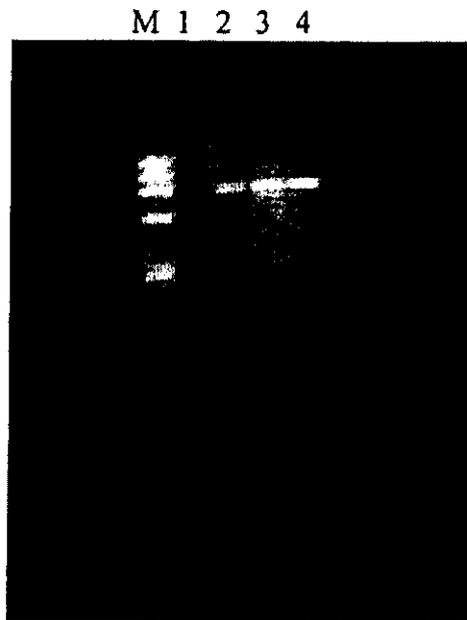
Cuadro 4. Sitios de restricción obtenidos por las endonucleasas para una muestra de humano.

MUESTRA	ESPECIE	ORIGEN	PATRON DE DIGESTION	
			BamHI	BsrGI
30	Humano	Edo. México	+	-

- + Existió digestión por las endonucleasas utilizadas
- No existió digestión por las endonucleasas utilizadas

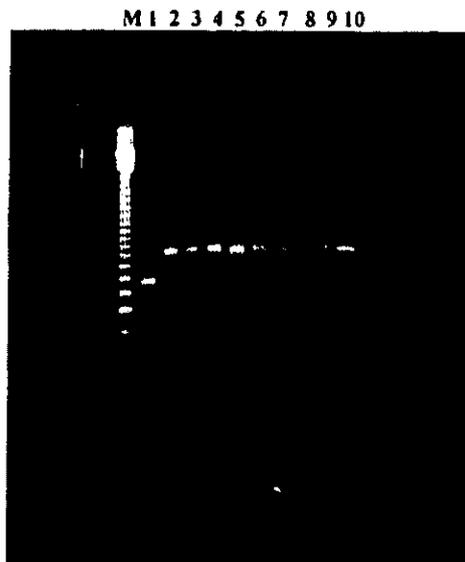


Figura 4. Estados de la República Mexicana, de donde proceden las muestras positivas a rabia para este estudio.



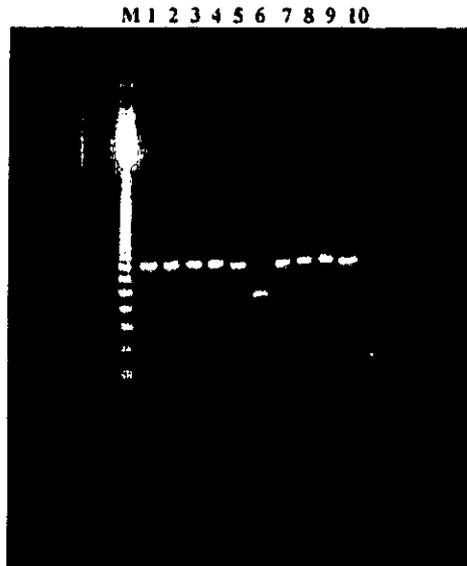
El carril M, marca el peso molecular el cual corresponde al ϕ X174 DNA, el carril 1, representa al testigo negativo y los carriles 2, 3 y 4 nos representa el peso molecular de 874 pb, obtenido de muestras positivas a rabia de un canino, de un bovino y de un zorrillo, respectivamente.

Figura 5. Amplicones del virus de la rabia en gel de agarosa, por medio de la técnica de PCR.



El carril M, se marca el peso molecular el cual corresponde al DNA Ladder 123 pb, el Carril 1 representan los cortes efectuados, en un amplicón rábico de canino, por la enzima de restricción BamHI y los carriles 2, 3 y 4, son los amplicones con las enzimas StuI, BsrGI y BsaWI, respectivamente, los cuales no fueron cortados por lo que se observan similares al amplicón original, carril 5. El carril 8 representa los cortes efectuados, en un amplicón rábico de bovino, por la enzima de restricción BsrGI y los carriles 6, 7 y 9, son los amplicones con las enzimas BamHI, StuI, y BsaWI, respectivamente, en los cuales no se cortaron por lo que se observan similar al amplicón original, carril 10. Los carriles del 1 al 5 indican la presencia de un ciclo terrestre, mientras tanto, los carriles del 6 al 10, indican la presencia de un ciclo aéreo.

Figura 6. Patrones de digestión en los amplicones de una cepa rábica terrestre y otra aérea en gel de agarosa, por medio de la técnica de RFLP



En el carril M, se marca el peso molecular el cual corresponde al DNA Ladder 123 pb, los carriles 1, 2, 3 y 4 contienen al amplicón de una muestra de zorrillo a la cual se les añadieron las enzimas BamHI, StuI, BsrGI y BsaWI, respectivamente, las cuales no presentaron cortes por las endonucleasas de restricción, tal evento nos permite observar que los amplicones se mantuvieron igual que el amplicón original (sin endonucleasas), carril 5. Referente al carril 6, se representan los cortes efectuados, a un amplicón rábico de humano, por la enzima de restricción BamHI y los carriles 7, 8 y 9, son los amplicones con las enzimas StuI, BsrGI y BsaWI, respectivamente, los cuales no fueron cortados, dicho evento nos manifiesta una observación idéntica al amplicón original, carril 10. Los carriles del 1 al 5 indican la presencia de un ciclo hipervariable, mientras tanto, los carriles del 6 al 10, indican la presencia de un ciclo terrestre.

Figura 7. Patrones de digestión en los amplicones de una cepa rábica hipervariable y otra terrestre en gel de agarosa, por medio de la técnica de RFLP.

5. LITERATURA CITADA

1. Tordo, N., and Badrane, H. Molecular Epidemiology of wild isolates of Lyssaviruses Practical Course. Institut Pasteur. Paris. 1995, pp. 15-22.
2. Mohanty, S.B. Dutta, S.K. Virología Veterinaria. 1a. Edición. México, D.F. Interamericana. 1985, pp. 234-236.
3. Vargas, G.R. y Cárdenas, L.J. Epidemiología de la Rabia: situación actual en México. Ciencia Veterinaria 7- TALLERES EDITORES DE LA UNAM. México, D.F., 1996, pp. 331-360.
4. Alexander, K.A., Smith, J.S., Macharia, M.J. and King, A.A. Rabies in the Massai Mara, Kenya: preliminary report. Onderstepoort J. of Vet. Res. 1993. 60(4), pp. 411-414.
5. Wandeler, A.I. Wildlife rabies in perspective, Onderstepoort J. of Vet. Res. 1993. 60(4), pp. 347-350.
6. Larski, Z. Virología para veterinarios. 2ª Edición. Prensa Medica Mexicana. México, D.F. 1980, pp. 426, 431.
7. Perry, B.D. Dog ecology in eastern and southern Africa: implications for rabies control. Onderstepoort J. of Vet. Res. 1993. 60(4), pp. 429-436.
8. Fekadu, M. Canine rabies. Onderstepoort J. of Vet. Res. 1993. 60(4), pp. 421-427.
9. Cuevas, R.S., Morales, R.J., Hernández, B.E. Antigenicidad e Inocuidad de la Vacuna Antirrábica NOBI-VAC (INTERVET) en Bovinos. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México en 1987. México, D.F. 1987, pp. 56.
10. Beingham, J. and Foggin, C.M. Jackal rabies in Zimbabwe. Onderstepoort J. of Vet. Res. 1993. 60(4), pp. 365-366.
11. Nel, L.H., Thompson, G.R. and Teichman, V. Molecular epidemiology of rabies virus in South Africa. Onderstepoort J. of Vet. Res. 1993. 60(4), pp. 301-306.
12. World Health Organization. Guidelines for dog rabies control. Geneva. 1994, pp. 1-5.
13. Loza-Rubio, E. Detección de variantes antigénicas del virus de la rabia proveniente de diversas regiones de México, identificadas por anticuerpos monoclonales (Tesis

- de Maestría). México (DF). México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 1993.
14. Chomel, B.B. The modern epidemiological aspects of rabies in the world. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 1993. 16 (1), pp. 11,20.
 15. Martínez, B.J., Vargas, M.G., Moguel, P.A., Casar, S.A., Reyes H.A. Avances de técnicas comparativas para el diagnóstico de rabia y su incidencia en el estado de Tamaulipas. *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México en 1987.* México, D.F. 1987, pp. 49.
 16. Villagómez, J.A., Barradas, L., Cuevas, S., Morales, E. Evaluación Serológica de la Inmunización de Bovinos contra Derriengue con Vacuna Cepa "ERA" y Refuerzo de Cepa "ACATLAN" Inactivada en un Brote. *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México en 1987.* México, D.F. 1987, pp. 57.
 17. Loza-Rubio, E.: Técnicas Serológicas para el Diagnóstico de Rabia. Folleto de Divulgación No.1. INIFAP. Proyecto Vigilancia Epidemiológica. 1995. 1, pp. 2-4.
 18. Constantine, D.C. Transmission experiment whit bat rabies isolate: response of certain carnivore to rabies virus isolated from animals infectd by non bite route. *Am. Journ. Vet. Res.* 1996; 27 (116): 13
 19. Baer, M.G. y col. Rabia: epidemiología, diagnóstico, vacunación, prevención y tratamiento en el hombre. PRENSA MEDICA MEXICANA, S.A. México, D.F., 1982, pp. 126-129.
 20. Acha, N.P. y Szyfres, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2ª Edición. OPS/OMS. 1991. pp.502-526
 21. Coulon, P., Lafay, F. and Flamand, A. Rabies Virus Antigenicity: an overview. *Onderstepoort J. of Vet. Res.* 1993. 60(4), pp. 271-275.
 22. Horaux, J.M., Nicolas, J.C., Agut, H. *Virologie.* Flammarion, PARIS, 1985, pp. 199-206.
 23. Bourhy, H., Kissi, B. and Tordo, N. Taxonomy and evolutionary studies on Lyssaviruses whith special reference to Africa. *Onderstepoort J. of Vet. Res.* 1993. 60(4), pp. 277-282.

24. Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Mayo, M.A. and Summer, M.D. Virus Taxonomy. Sixth report of the ITCV. Arch. of Virol. 1995. 10, Springer Verlag.
25. Van-Regenmortel, M.H.V, Fauquet, C.M, Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A. McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses., VIIth report of the ICTV. Academic Press, San Diego, Cal., U.S.A., 2000. 1167pp.
26. Tordo, N. and Kouknetzoff, A. The rabies virus genome: an overview. Onderstepoort J. of Vet. Res. 1993. 60(3), pp. 263-269.
27. Montaño, H.J.A. y Mata, V.A.E. Estructura antigénica y mecanismos de infección del virus de la rabia. Ciencia Vet., Vol 7. TALLERES EDITORES DE LA UNAM. México, D.F., 1996, pp. 67-102.
28. Bouhry, H., Kissi, B., Lafon, M., Sacramento, D., and Tordo, N. Antigenic and Molecular Characterization of Bat Rabies Virus in Europe. J. Clin. Microbiol. 1992. 30(9), pp. 2419, 2426.
29. Heaton, P.R., Johnstone, P., McElhinney, L.M., Cowley, R., O'Sullivan, E. and Whitby, J, E. Heminsted PCR Assay for detection of six Genotypes of Rabies and Rabies-Related Viruses. J. Clin. Microbiol. 1997. 35(11), pp. 2762-2766.
30. Oelofsen, M.J. and Smith, M.S. Rabies and bats in a rabies endemic area of southern Africa: application of two commercial test kits for antigen and antibody detection. Onderstepoort J. of Vet. Res. 1993. 60(3), pp. 275-260.
31. Bahloul, Ch., Immunisation génique: Immunogénicité de la glycoprotéine rabique et vaccins élargis aux Lyssavirus. Thèse Présentée à l'Unité de formation et de recherche , Université de Paris XI pour l'obtention du grade de Docteur, Paris 1997, pp181.
32. Swanepoel, R., Barnard, B.J.H., Meredith, C.D., Bishop, G.C., Brückner, G.K., Fuggin, C.M. and Hübschle, O.J.B. Rabies in Southern Africa. Onderstepoort J. of Vet. Res. 1993. 60(4), pp. 325-346.
33. Smith, J.S., Orciari, L.A., Yager, P.A., Seidel, H.D. and Warner, C.K. Epidemiologic and Historical Relationships among 87 Rabies Virus Isolates as

- Determined by Limited Sequence Analysis. *J. of Infec. Diseases*. 1992. 166(2), pp. 296,307.
34. Tordo, N., Bourhy, H. and Sureau, P. Rabies and rabies-related viruses. First Congress of the European Society for Veterinary Virology. Contribution of Molecular Biology to Veterinary Virology. Liege, Belgium, pp. 5-7 april 1989. 3.
 35. Montaña-Hirose, J.A., Bourhy, H. and Lafon, M. A reduce panel of antinucleocapside monoclonal antibodies for bat rabies virus identification ion Europe. *Res. Virol.*, 1990, 141:571-581.
 36. World Health Organization. Expert committee on Rabies. Eighth Report. WHO # 824. Geneva. 1992, pp. 1-25.
 37. Barrera, S. H. A., Ortiz, L.R., Rojas, M. A. Y Reséndez, P. D. Reacción en cadena de la polimerasa. Una nueva época dorada en la biología molecular. *Cien. y Des.* Enero 1993, pp. 51-60.
 38. Milián, S. F. "La epidemiología molecular: generalidades". *Memorias: Introducción a la biología molecular aplicada a la medicina veterinaria*. CENID-MICROBIOLOGIA Palo Alto, México, D.F. 1998.
 39. Charlton, K.M., Casey, G.A., Wandeler, A.I. and Nadin-Davis, S. Early events in rabies virus infections of the central nervous system in skunks (*Mephitis mephitis*). *Acta Neuropath.* 1996. 91(1), pp. 89.
 40. Nadin-Davis, S.A., Casey, G.A. and Wandeler, A. A molecular epidemiological study of rabies virus in central Ontario and Western Quebec. *J. of Gen. Virol.* 1994. 75 (10), pp. 2575.
 41. Nadin-Davis, S.A., Casey, G.A. and Wandeler, A. Identification of regional variants of the rabies virus within the Canadian province of Ontario. *J. of Gen. Virol.* 1993. 74 (5), pp. 829.
 42. Tordo, N, Bradane, H., Bourhy, H. and Sacramento, D. Molecular epidemiology of lissaviruses: focus on the glycoprotein and pseudogenes. *Onderstepoort J. of Vet. Res.* 1993. 60(4), pp. 315-323.

43. Sacramento, D., Bourhy, H. And Tordo, N. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Mol. Cell. Probes.* 1991 5, pp. 229,240.
44. Loza-Rubio, E. y Aguilar-Setien, A. Epidemiología Molecular de la Rabia en México. Memorias del Curso de Rabia, 9 de noviembre de 1998. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.. México, D.F. 1998, pp. 41,45.
45. Loza-Rubio, E., Aguilar-Setien, A. y Tordo, N. Evidencias de una nueva variante de virus de rabia en México, que circula en zorrillos. Folleto de Investigación y divulgación No. 1., División Pecuaria, CENID-Microbiología INIFAP. México, D.F. 1998, pp. 10,12.
46. Aguilar-Setien, A. y Loza-Rubio, E. El árbol genealógico de la rabia en México. *Cien. y Des.* 1999. 149 (mayo-junio).
47. Beth, Dawson-Sanders y Trapp, R.G. Bioestadística Médica. MANUAL MODERNO. Primera Reimpresión. 1993. Pp 58-86.
48. Bohury, H., Sureau, P. and Montañó-Hirose J.A. Methodes de laboratoire pour le diagnostic de la rage. COMMISSION DES LABORATOIRES DE REFERENCE ET D'EXPERTISE DE L'INSTITUT PASTEUR UNITE DE LA RAGE, Paris, France. 1991. 67, pp. 103-152.
49. Aguilar-Setien, A. y Loza-Rubio, E. Epidemiología Molecular del Virus de la Rabia en México. Anteproyecto de Investigación, CENID-INIFAP. SISTEM DE PRODUCCION-SALUD ANIMAL. SAGAR. México, D.F. 1996, pp. 22,24.
50. Loza-Rubio, E., Aguilar-Setién, A., Bahloul, Ch., Brochier, B., Pastoret, P.P. and Tordo, N. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in Mexico. *Arch. of Med. Res.* 1999. 30 (10), pp. 144-149.
51. Kurstack, E., Marusyk, R.G., Murphy, F.A., and Van Regenmortel, M.H.V. Applied Virology Research. Vol. 3 New diagnostic procedures. Plenum Publishing Corporation. New York, N.Y., U.S.A., 1994, pp. 145-147.