

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA



Epidemiología Molecular de la Rabia en México

Candidato a Doctor en Ciencias Biomédicas

M. en C. Andrés Velasco Villa
dly3@cdc.gov

Directora de Tesis
Dra. Ana Flisser Steinbruch

Comité tutorial
Dra. Valeria Souza Saldivar
Dr. Alejandro García Carrancá



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

"Mi ambición ha sido siempre hacer realizables los sueños."
Bill Gates

*"La Ciencia es más que un simple conjunto de conocimientos:
es una manera de pensar."*
Carl Sagan

*"No importa que te amen o te critiquen, te respeten, te honren
o te difamen, que te coronen o te crucifiquen; porque la mayor
bendición que hay en la existencia es ser tú mismo".*
Osho

DEDICATORIA

A las personas más importantes en mi vida, quienes me han ayudado a ser un hombre de provecho y un hombre de ciencia.

A mi querida tutora Ana Flisser, por haberme brindado la oportunidad de poder trascender en el mundo de la Ciencia y por tener una inquebrantable paciencia y fe en mí. Gracias por haberme abierto la puerta que me llevará a donde pudiera hacer cumplir mis sueños mas anhelados. Te considero mi madre académica, aunque reconozco no he sido el hijo ejemplar que toda buena madre merece. Sobre todo te agradezco infinitamente por dejarme ser.

A Carmen Martínez por su amor, paciencia, cariño, compañía y apoyo incondicional. Gracias por haberme ayudado a organizar y embellecer este trabajo, sin tu ayuda nunca hubiera terminado. Te estaré eternamente agradecido.

A mí estimado amigo Charles E. Rupprecht, por haberme brindado el honor de poner mi granito de arena en la batalla cotidiana para tener un mundo mejor. Desde luego por todo el apoyo brindado para culminar este trabajo.

A mi familia padres (Rosendo y Maria de la Paz), hermanos (Antonio, Ana, Alberto y Verónica), tíos y primos, por siempre darme aliento y animo de continuar en la batalla diaria de vivir y tratar de ser alguien trascendente.

A Amanda Castillo y Valeria Souza por haberme introducido al maravilloso mundo de la bioinformática y evolución molecular.

Agradecimientos

A la Secretaria de Salud, mi casa desde mis estudios de grado.

Al InDRE, en especial a todos los integrantes del Laboratorio de Rabia pero en especial a Mauricio Gómez Sierra, Víctor Juárez Islas y Gustavo Hernández Rodríguez quienes contribuyeron significativamente al desarrollo de este trabajo.

Al CENAVECE y a su Programa de Nacional de Zoonosis encabezado por el Dr. Fernando Vargas Pino, con quien aprendí mucho sobre la historia de la rabia en México.

A los Laboratorios Estatales de Salud Pública de los 30 estados donde recibí muestras y a los dirigentes estatales del Programa de Zoonosis, quienes recolectaron la mayoría de muestras analizadas en este trabajo.

A los CDC de Atlanta, GA, EEUU, por su invaluable apoyo en la obtención de las secuencias nucleotídicas de las muestras aquí estudiadas.

Al CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de los estudios de doctorado.

A la gloriosa UNAM y sus académicos que me acogieron en su seno y han compartido conmigo su mas grande tesoro, su conocimiento, experiencia y prestigio.

CONTENIDO

Dedicatoria	iv	11. Penetración y desnudamiento.	23
Agradecimientos	v	12. Transcripción y traducción.	24
Contenido	vii	13. Procesamiento de la proteína G (G proceso).	25
Resumen/ Abstract	xi	14. Replicación.	25
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1	15. Ensamblaje.	27
A. Antecedentes de la rabia en México	3	16. Taxonomía y clasificación.	27
B. Justificación	8	B. Otras especies del género <i>Lyssavirus</i> y sus reservorios	29
CAPÍTULO II. OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y DISEÑO DEL ESTUDIO	10	1. <i>Lyssavirus</i> Serotipo 2: Lagos bat virus (LBV) ó <i>Lyssavirus</i> de murciélago de Lagos	29
A. Objetivo general	10	2. <i>Lyssavirus</i> Serotipo 3: Mokola virus (MOKV)	30
B. Objetivos específicos	10	3. <i>Lyssavirus</i> Serotipo 4: Duvenhage virus (DUVV)	31
C. Hipótesis	11	4. <i>Lyssavirus</i> Serotipo 5: European bat <i>Lyssavirus</i> (ENL1 y EBL2) ó <i>Lyssavirus</i> de murciélagos europeos	31
D. Diseño del estudio	11	5. Australian bat <i>Lyssavirus</i> (ABLV)	32
CAPÍTULO III. EL AGENTE PATÓGENO	12	6. Nuevos <i>Lyssavirus</i> de Asia central y Rusia	32
A. El virus	12	7. <i>Lyssavirus</i> Aravan	33
1. Morfología y propiedades fisicoquímicas.	12	8. <i>Lyssavirus</i> Khujand	33
2. Proteínas estructurales y su función.	13	9. <i>Lyssavirus</i> Irkut	33
3. Proteína N	13		
4. Proteínas P, NS ó M1	15		
5. Proteína M	17		
6. Glicoproteína G.	18		
7. Proteína L.	20		
8. El Genoma	21		
9. Ciclo de replicación	22		
10. Adsorción y adherencia	23		

10. <i>Lyssavirus</i> del oeste del Caucazo	34	8. Otras especies susceptibles que generalmente se encuentran infectadas	
11. Virus Kotonkan y Obodhiang	34	9. Roedores y lagomorfos	58
CAPÍTULO IV. RESERVORIOS Y VECTORES	37	10. Bovinos y ganado en general	59
A. Epizootiología de la rabia	37	E. Historia natural de la infección y patogénesis	60
B. Principales reservorios de la rabia o del genotipo uno	39	CAPÍTULO V. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR	64
1 Perros	39	A. Tipificación molecular de las variantes del virus de la rabia con anticuerpos monoclonales	68
2. Zorros	40	B. Tipificación genética	69
3. Zorrillos	42	C. Fundamentos del uso de la filogenética molecular y métodos para construcción de árboles filogenéticos	71
4. Mapaches	43	D. Métodos fenéticos o de matriz de distancia	72
5. Coyotes	45	1. El método de grupo pareado	72
6. Mangostas	46	2. El algoritmo de unión de vecinos (N-J)	73
7. Perro-mapache	47	E. Método de parsimonia máxima	73
C. Reservorios murciélagos	48	F. Método de probabilidad máxima	74
1. Murciélagos hematófagos	49	G. Método de Bayes o Bayesiano	74
2. Murciélagos insectívoros	50	CAPÍTULO VI. MATERIALES Y MÉTODOS	76
D. Principales vectores de la rabia.	52	1. Búsqueda de información	76
1. Gato doméstico	52	2. Muestras	76
2. Lobos	53	3. Criterios de inclusión	77
3. Chacales	54	a. Tipo de muestra	77
4. Hurones	55		
5. Felinos salvajes.	56		
6. Primates	56		
7. Otros mamíferos carnívoros: mustélidos (Fam. Mustelidae), procyonidos (Fam. Procyonidae) y vivérridos (Fam. Viverridae)	57		
8. Otras especies susceptibles generalmente halladas infectadas	57		

Epidemiología Molecular de la Rabia en México

b. Representación espacial y temporal	77	3. Diversidad del virus de la rabia y sus reservorios en México	99
4. Comprobación de la presencia de virus rábico en las muestras de encéfalo	78	4. Diversidad molecular del virus de la rabia asociada a carnívoros terrestres en México y su comparación con la rabia en carnívoros terrestres en los EEUU	108
5. Propagación del virus de la rabia por inoculación en ratones lactantes	78	a. Rabia asociada a perros.	116
6. Determinación de la diversidad viral en los aislamientos elegidos por caracterización antigénica del virus rábico con un panel reducido de anticuerpos monoclonales	79	b. Extinción de sublinajes del virus de la rabia asociado a perros dentro de focos enzoóticos de larga duración	120
7. Selección del marcador genético usado para la parte de epidemiología molecular	79	c. Rabia asociada a perros y coyotes	122
8. Amplificación de la región de interés y secuenciación nucleotídica	80	d. Rabia asociada a zorros grises	122
9. Construcción de los árboles filogenéticos y edición	80	e. Rabia asociada a zorrillos.	123
CAPÍTULO VII. RESULTADOS.	83	f. Rabia asociada a zorrillos en Yucatán W7	124
Primera parte		Tercera Parte	126
1. Búsqueda del marcador genético ideal para realizar epidemiología molecular de la rabia en México	84	5. Diversidad molecular del virus de la rabia asociado con murciélagos en México y otros países de América	126
2. Optimización del marcador genético para hacer la epidemiología molecular de la rabia una prueba rutinaria	92	a. Escrutinio de la diversidad antigénica de las variantes del virus de la rabia asociadas con murciélagos en México.	126
Segunda parte	99	b. Diversidad molecular del virus de la rabia asociada a murciélagos en México y en América.	127

c. Análisis de la secuencias nucleotídicas y distribución de las variantes genéticas de los virus de la rabia asociados con murciélagos hematófagos o "vampiros" en México.	139	CAPÍTULO VIII. DISCUSIÓN. Primera Parte Segunda Parte Tercera Parte	152 152 158 169
d. Comparación de la rabia asociada con murciélagos hematófagos en México y América del Sur y su relación molecular con la rabia asociada con murciélagos insectívoros de cola libre	140	POSTERIORES CAPÍTULO XI. LITERATURA CITADA APÉNDICE I. Medidas de bioseguridad en el laboratorio	185 192 194 210
e. Estructura genética del virus de la rabia en <i>Tadarida brasiliensis</i> en toda América	146	APÉNDICE II. Toma, preparación y envío de muestras. APÉNDICE III: Técnicas para el diagnóstico y estudio molecular del virus de la rabia.	213 219
f. Presencia de rabia en otras especies de murciélagos insectívoros diferentes a <i>Tadarida brasiliensis mexicana</i> en México y su impacto en la salud pública.	147	ÍNDICE DE FIGURAS ÍNDICE DE TABLAS PUBLICACIONES	268 273
g. Rabia en seres humanos	150		

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Virus de la rabia y distribución de sus proteínas estructurales y ácido nucleico; corte semilongitudinal, izquierda; corte transversal derecha	13
Figura 2. Posición dentro del genoma de los 5 cistrones que codifican para las proteínas estructurales del virus de la rabia. Ácido nucleico RNA de cadena sencilla de polaridad negativa de aproximadamente 12 kb de longitud.	22
Figura 3. Muestra todas las fases del ciclo de replicación del virus de la rabia dentro del citoplasma de una neurona.	26
Figura 4. Epizootiología de la rabia. Muestra algunas de las especies que juegan el papel más importante en el manteniendo de la rabia en la naturaleza (reservorios), las especies que pueden transmitir la enfermedad de forma circunstancial al hombre (vectores) y las especies susceptibles.	38
Figura 5. Perro doméstico (<i>Canis familiaris</i>)	40
Figura 6. Especies de zorro. A. Zorro rojo (<i>Vulpes culpes</i>); B. Zorro ártico <i>Alopex lagopus</i> ; Zorro gris (<i>Urocyon cinereoargenteus</i>)	42
Figura 7. Especies de zorrillo. A. Zorrillo moteado (<i>Spilogale putorius</i>); B. Zorrillo rayado (<i>Mephitis mephitis</i>)	43
Figura 8. Mapache (<i>Procyon lotor</i>)	44
Figura 9. Coyote (<i>Canis latrans</i>)	46
Figura 10. A. Mangosta asiática importada al caribe (<i>Herpestes javanicus auropunctatus</i>); B. Mangosta amarilla africana (<i>Cinictis penicillata</i>)	47
Figura 11. Perro mapache <i>Nyctereutes procyonoides</i>	48
Figura 12. Distribución natural de los murciélagos vampiros en el continente Americano. A. <i>Diphylla ecaudata</i> ; B. <i>Diaemus youngi</i> ; C. <i>Desmodus rotundus</i>	50
Figura 13. Especies insectívoras. A. Vampiro (<i>Desmodus rotundus</i>); B. Murciélago café grande (<i>Eptesicus fuscus</i>); C. Murciélago de pelo plateado (<i>Lasiurus noctivagans</i>); D. Murciélago de pelo cenizo (<i>Lasiurus cinereus</i>); E. Murciélago rojo (<i>Lasiurus borealis</i>); F. Murciélago de cola libre (<i>Tadarida brasiliensis mexicana</i>).	51
Figura 14. Gato domestico (<i>Felis catus</i>)	53
Figura 15. Lobos (<i>Canis lupus</i>)	54
Figura 16. Chacal (<i>Canis aureus</i>)	55
Figura 17. Hurones (<i>Mustela nigripes</i> o <i>Mustela furo</i>)	55
Figura 18. Felinos salvajes. A. Ocelote; B. León, Leopardo y Tigre; C. Puma	56
Figura 19. Mono sagui (<i>Callithrix jacchus</i>)	57
Figura 20. A. Marmota o perro de la pradera (<i>Marmota morax</i>); B.	59

Índice de figuras

Castor (<i>Castor canadensis</i>)	
Figura 21. Kudu (<i>Tragelaphus streptoceros</i>)	60
Figura 22. Vías de diseminación. A. Centrípeta. Sistema nervioso periférico (SNP) hacia el sistema nervioso central (SNC). B. Centrifuga. Sistema nervioso central (SNC) hacia diferentes órganos de la economía.	62
Figura 23. Diagrama de flujo que describe la metodología empleada en el estudio de la epidemiología molecular de la rabia en México. A. Recolección; B. Detección; C. Aislamiento; D. Caracterización; E. RT-PCR; Análisis.	78
Figura 24. Diagrama de la forma de generar los árboles filogenéticos que solo incluyen secuencias consenso de cada grupo monofilético asociado con un reservorio específico, con el fin de poder apreciar mejor la relación filogenética entre estos grupos. Además dichos árboles también se utilizan para inferir el reservorio en una secuencia nueva. A. Búsqueda en el GenBank; B. Análisis y ordenamiento; C. Generación de secuencias consenso; D. Construcción de un árbol filogenético.	82
Figura 25. Historia de la búsqueda del marcador genético más apropiado.	85
Figura 26. Árbol filogenético Bayesiano del gen que codifica para la nucleoproteína.	88
Figura 27. Árbol filogenético Bayesiano del gen que codifica para la fosfoproteína	89
Figura 28. Árbol filogenético Bayesiano del gen que codifica para la glicoproteína	90
Figura 29. Árbol filogenético obtenido con los 264 nucleótidos del extremo carboxilo terminal del gen que codifica para la nucleoproteína virus de rabia. El árbol se reconstruyó por el método de Neighbor-Join usando secuencias de todo el mundo asociadas a diferentes reservorios de la enfermedad. Como grupo externo se usaron secuencias de otras especies de <i>Lyssavirus</i> (EBL-1, EBL-2, Aravan, Mokola) En morado está el clado o filogrupo que a su vez está integrado por diferentes linajes asociados a diferentes reservorios carnívoros terrestres, o linajes asociados al mismo reservorio pero representando focos de la enfermedad en diferentes regiones del mundo (caso de los perros, zorros, zorrillos). En verde se observa el clado o filogrupo asociado a murciélagos.	93

en cual a su vez despliega diferentes linajes asociados a diferentes especies de murciélagos en toda América.

Figura 30. Árbol filogenético reconstruido por el método de Neighbor- 95
Joining usando secuencias completas del gen que codifica para la
nucleoproteína

Figura 31. Árbol filogenético de distancia (Neighbor-Joining) que 96
muestra la diversidad espacial, temporal y de reservorio específico
del virus de la rabia en América. En la reconstrucción de este árbol
se usaron secuencias parciales con los 264 nucleótidos del extremo
carboxilo terminal del gen que codifica para la nucleoproteína del
virus de rabia. Cada color agrupa una serie de linajes y sublinajes de
los virus de la rabia asociados a un reservorio específico o región
geográfica.

Figura 32 . a) Distribución geográfica del patrón antigénico V1 104
detectado en hospederos reservorios y no reservorios; b) Proyección
amplificada del área sombreada que representa a los estados con
mayor número de casos con la variante antigénica V1. Los símbolos
indican las especies de las cuales fueron aislados los virus de la
rabia: La figura de humano, humanos; trébol, perros; chile, zorros;
estrella de cinco picos, zorrillos; cruz cardinal, coyotes; símbolo de
Tauro, vacas; gota, gatos; corazón, cerdos; listón, humanos, vacas
y perros; timón de barco; humanos y cerdos; símbolo de equilibrio,
humanos, gatos y perros; relámpago, humanos y vacas. Los
símbolos más grandes denotan mayor número de casos.

Figura 33. Distribución geográfica de las variantes antigénicas del 105
virus de la rabia asociadas con carnívoros terrestres silvestres en
México

Figura 34. Distribución geográfica de las variantes antigénicas del 106
virus de la rabia asociadas a murciélagos en México.

Figura 35. Árbol filogenético reconstruido por el método de 114
Neighbor-Joining, muestra los diferentes focos enzoóticos de rabia
asociados a perros y carnívoros silvestres terrestres en México y los
EEUU.

Figura 36. Árboles filogenéticos reconstruidos por un método a) 115
cladístico (máxima probabilidad) y b) fenético (Neighbor-Joining)
que muestran la relación entre los diferentes linajes de virus de la
rabia asociados a diferentes especies de carnívoros terrestres en
México y los EEUU. Cada taxa esta representando la secuencia
consenso del clado respectivo marcado la figura 1 (D1-D11 y W1-
W13), que a su vez representan diferentes focos enzoóticos de la

Índice de figuras

enfermedad. Los taxa que segregaron de forma independiente en la figura 1, se incluyeron como tales en estas figuras.	
Figura 37. Distribución de los principales focos de rabia asociados a carnívoros terrestres en México. D1-D11 se refiere a los sublinajes del virus de la rabia asociados a perros domésticos y coyotes. W1-W13, representan los clados del virus de la rabia asociados a carnívoros terrestres silvestres. La nomenclatura de los linajes en el mapa es la misma mostrada en las figuras 35 y 36.	116
Figura 38. Patrones de variación en la secuencia de amino ácidos asociados de forma específica a ciertos linajes.	118
Figura 39. Árbol filogenético y distribución de los focos enzoóticos de rabia asociada a perros y coyotes en México. La figura muestra el periodo de circulación y distribución de los diferentes linajes encontrados en este estudio. Algunos linajes han dejado de circular durante la década de los 90's, atribuido principalmente a las acciones masivas de control y prevención de la rabia en perro.	120
Figura 40. Árbol filogenético que demuestra la diversidad del virus de la rabia en el estado de Yucatán y su evolución en el tiempo. En el se observa la reducción de la diversidad genética, como consecuencia de la desaparición de ciertos linajes (Dg1 y Dg2), del virus de la rabia asociado a perros; la aparición de un linaje asociados a zorrillos manchados y la diversidad del virus de la rabia asociado a murciélagos hematófagos en la península.	121
Figura 41. Distribución de los principales focos enzoóticos de rabia asociados a carnívoros terrestres silvestres en México y en los EEUU. Cada foco fue designado con el código de letra y numero empleado en los árboles filogenéticos de las figuras 1 y 2	125
Figura 42. Distribución de los principales linajes del virus de la rabia asociados a murciélagos en México	130
Figura 43. Diversidad genética del virus de la rabia asociado a murciélagos en México y su comparación con virus de la rabia asociados a murciélagos en otros países de América.	135
Figura 44. Árboles filogenéticos reconstruidos por un método a) fenético (Neighbor-Joining) y b) cladístico (máxima probabilidad) que muestran la relación entre los diferentes linajes de virus de la rabia asociados a diferentes especies de murciélagos en México y en varios países de América. Cada taxa esta representando la secuencia consenso del clado respectivo marcado en la figura 43.	136
Figura 45. Patrones de variación en la secuencia de amino ácidos relacionados de forma específica a varios linajes y sublinajes del virus de la rabia asociados a diferentes especies de murciélagos en México y varios países de América.	137
Figura 46. Distribución geográfica de las secuencias asociadas con rabia transmitida por murciélagos hematófagos en varios países de	141

América. Las cruces rojas indican la localización geográfica aproximada de los focos analizados.

- Figura 47.** Distribución geográfica diversidad antigénica del virus de la rabia asociada a *Demodus rotundus* (AgV 3, 11, 8/atípica) contrastada con la diversidad antigénica del virus de la rabia asociada a *Tadarida brasiliensis mexicana* y *Tadarida brasiliensis brasiliensis* (AgV 4 y 9). 142
- Figura 48.** Relaciones filogenéticas de los virus de la rabia asociados a murciélagos vampiros (*Desmodus rotundus*) y guaneros (*Tadarida brasiliensis mexicana* y *Tadarida brasiliensis brasiliensis*) de México con los de otros países de América. 144
- Figura 49.** Inmunofluorescencia directa en muestras positivas y negativas 232
- Figura 50.** Inmunofluorescencia directa en muestras negativas, evidencia de fluorescencia inespecífica 234
- Figura 51.** Posición de alineamiento de los iniciadores en el genoma del virus de la rabia 251
- Figura 52.** Productos parciales y del gen completo de la nucleoproteína obtenidos por RT-PCR 254
- Figura 53.** Secuenciación nucleotídica por el método de Sanger modificado, usando ddNTP marcados con diferentes fluorocromos 257

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las proteínas del virus de la rabia.	21
Tabla 2. Clasificación de los <i>Lyssavirus</i>	35-36
Tabla 3. Patrones antigénicos encontrados en los virus de la rabia de México	99
Tabla 4. Variantes del virus de la rabia aisladas en México de hospederos reservorios y no reservorios.	100
Tabla 5. Distribución espacial y temporal de las variantes antigénicas del virus de la rabia en México.	101- 102
Tabla 6. Valores de identidad y distancia genética (distancia "p") de las secuencias de amino ácidos y de nucleótidos entre los linajes del virus de la rabia asociados a carnívoros terrestres y algunos murciélagos en México y EEUU.	109
Tabla 7. Muestras de México tipificadas genéticamente.	110- 111
Tabla 8. Secuencias históricas del virus de la rabia representando los principales focos de rabia terrestre en México y los Estados Unidos.	111- 113
Tabla 9. Elementos descriptivos y diversidad intralínea e intrasublínea de los grupos del virus de la rabia usados para	119

obtener las secuencias consenso

Tabla 10. Tipificación genética de muestras relacionadas con rabia mantenida y transmitida por murciélagos en México. **128-129**

Tabla 11. Matriz de distancia y similitud de nucleótidos y aminoácidos de los principales linajes y sublinajes del virus de la rabia asociado a murciélagos en México y en varios países de América. **131**

Tabla 12. Secuencias del virus de la rabia, asociadas a murciélagos en varios países de América, que se usaron para la reconstrucción de los árboles filogenéticos. **132-134**

Tabla 13. Diversidad molecular del virus de la rabia asociado a murciélagos hematófagos en diferentes países de América. **140**

Tabla 14. Diversidad genética de las variantes antigénicas asociadas a vampiros y murciélagos guaneros en varios países de América. **141**

Tabla 15. Distancia genética e identidad nucleotídica promedios entre linajes asociados a diferentes variantes antigénicas del virus de la rabia de vampiros de México y América del Sur. **143**

Tabla 16. Resumen de cálculos para diluir el conjugado **226**

Índice de figuras

Tabla 17. Para realizar la dilución de adsorción 1:5, según la alícuota del conjugado almacenado a la dilución de trabajo. **227**

Tabla 18. Patrones de reacción más frecuentes de los anticuerpos monoclonales con los virus de la rabia asociados a reservorios de la enfermedad en América Latina **248**

Tabla 19. Iniciadores para amplificar el gen completo y regiones parciales de la nucleoproteína del virus de la rabia **250**

Tabla 20. Tamaños de los amplicones esperados de acuerdo con el grupo de iniciadores que se usaron durante la RT-PCR. **254**

ABSTRACT

Rabies remains a public health problem in the Americas because of the great diversity of wild reservoirs that maintain the virus in nature. Here we report the molecular characterization of 456 rabies viruses isolated from 243 samples obtained from nonreservoir hosts and 213 samples from reservoir hosts collected in 30 states of Mexico during 1976-2004. Ten out of 11 antigenic variants, previously reported in the United States and some countries of the Americas, were detected in Mexico. Some rabies virus variants were isolated for the first time from their natural reservoirs, which were also taxonomically identified. Terrestrial reservoirs included stray dogs mainly associated with V1, *Urocyon cinereoargenteus* (gray foxes) with V7, *Spilogale putorius* skunks related with three antigenic viral variants V8, V10 and one atypical; and *Mephitis mephitis* skunks associated with V1. Bat hosts included *Tadarida brasiliensis mexicana* associated with V9-V4, *Lasiurus cinereus* with V6 and *Desmodus rotundus* with V3-V5-V11. Variants V9 and V11, were isolated from their natural reservoir hosts, while V3, V5, V6 and V11 were isolated from livestock, humans, dogs, cats and bats whose species was not determined. Several samples presented atypical antigenic patterns, particularly those related with not determined bat species and one related with *Spilogale putorius* skunks in Yucatan. Antigenic variant 1 was found associated with dogs throughout the country and with multiple wild terrestrial animals, such as coyotes, skunks and foxes, in Northern Mexico. Combined antigenic and genetic analyses were further used to solve the ambiguities in the inference of the most likely reservoir as well as to address finer aspects of the molecular epidemiology and evolution of the disease in Mexico. A short but highly informative nucleoprotein fragment was used as a molecular marker to infer most likely reservoirs of rabies within the country. Independent origins are suggested for rabies in Mexican carnivores. One group shares ancestry with canine rabies, while the other group appears to share a common origin with bat rabies in North America. More than 12 sublineages were found in rabid dog populations, suggesting at least six major spatio-temporal foci. Coyote rabies was found as independent enzootic foci that probably emerged via spillover from dog rabies, translocated from major foci in the southcentral and western regions of

Mexico. One focus of gray fox rabies was widely distributed in northwestern Mexico, overlapping with a focus in the same species in the state of Arizona, United States. Three other skunk foci share a common ancestor with canine rabies and were distributed in northwest Mexico and Yucatan. A skunk rabies focus distributed in the northcentral Mexican states appears to share a common origin with bat rabies foci in North America, and is a close relative of southcentral skunk and raccoon rabies in the United States.

Bat rabies and its transmission to humans and other species in Mexico were investigated. Eighty-nine samples obtained from rabid livestock, cats, dogs, and humans in Mexico were studied by antigenic typing and partial sequence analysis. Samples were further compared with enzootic rabies associated with different species of bats in the Americas. Patterns of nucleotide variation allowed the definition of at least 20 monophyletic clusters associated with 9 or more different bat species. Several lineages associated with distinctive antigenic patterns were found in rabies viruses related to rabies in vampire bats in Mexico. Vampire bat rabies virus lineages associated with antigenic variant 3 are widely spread from Mexico to South America, suggesting these lineages as the most likely ancestors of vampire bat rabies and the ones that have been moved by *Desmodus rotundus* populations throughout the tropical Americas. Rabies viruses related to *Lasiurus cinereus*, *Histiotus montanus*, and some other not yet identified species of the genus *Lasiurus* were found circulating in Mexico. Long-range dissemination patterns of rabies are not necessarily associated with migratory bat species, as in the case of rabies in *Desmodus rotundus* and *Histiotus montanus*. Human rabies was associated with vampire bat transmission in most cases, and in one case, rabies transmission from free-tailed bats was inferred. The occurrence of rabies spillover from bats to domestic animals was also demonstrated. Genetic typing of rabies viruses allowed us to distinguish trends of disease dissemination and to address, in a preliminary fashion, aspects of the complex evolution of rabies viruses in different host-reservoir species.

RESUMEN

La rabia sigue siendo un problema de salud pública en América por la gran diversidad de reservorios silvestres que mantienen circulado al virus en la naturaleza. En el presente trabajo se informan los resultados de la caracterización molecular de 456 aislamientos del virus de la rabia que se obtuvieron de 243 muestras de hospederos no reservorios y 213 hospederos reservorios. Estas se colectaron de 30 estados a lo largo de todo el país dentro del periodo 1976 al 2004. De las 11 variantes antigénicas previamente reportadas en los Estados Unidos y en algunos países de América, 10 fueron encontradas en México. Algunas de estas variantes antigénicas fueron aisladas por primera vez de sus reservorios naturales, los cuales también fueron identificados taxonómicamente. Los reservorios terrestres identificados incluyeron perros domésticos callejeros, los cuales principalmente se encontraron asociados con V1, zorros grises *Urocyon cinereoargenteus* asociados con V7, zorrillos de la especie *Spilogale putorius* relacionadas con tres variantes antigénicas V8, V10 y una variante atípica y zorrillos de la especie *Mephitis mephitis* asociados con V1. Los reservorios murciélagos incluyeron a *Tadarida brasileinsis mexicana* asociada con las V4 y V9, *Lasiurus cinereus* asociada con V6 y *Desmodus rotundus* relacionado con V3, V5 y V11. Las variantes V9 y V11 fueron aisladas de sus reservorios naturales los cuales fueron confirmados taxonómicamente, mientras que las variantes V3, V5, V6 y V11 fueron aisladas de ganado, humanos, perros, gatos y murciélagos no identificados. Se encontraron varias muestras con variantes atípicas, particularmente aquellas asociadas a especies de murciélagos que no se determinaron y una con zorrillos de la especie *Spilogale putorius* en Yucatán. La variante antigénica 1, se encontró asociada a perros a lo largo de todo el país pero también con varios reservorios terrestres silvestres como coyotes, zorrillos y zorros, en el Norte de México. La tipificación antigénica y genética acoplada al análisis filogenético fueron usados posteriormente para resolver ambigüedades en la inferencia del reservorio mas probable y para abordar aspectos mas finos sobre la epidemiología molecular y evolución de esta enfermedad en México. Se utilizo un fragmento corto pero altamente informativo dentro de la nucleoproteína como marcador molecular para inferir los reservorios

más probables de la rabia en el país. Los resultados sugieren un origen independiente de la rabia asociada a carnívoros terrestres en México. Uno de los grupos comparte ancestría con la rabia asociada a cánidos mientras que el otro se encontró relacionado con la rabia asociada con murciélagos en América del Norte. Se encontraron más de 12 sublinajes del virus de la rabia circulando en poblaciones de perros, sugiriendo al menos seis focos rábicos espacial y temporalmente independientes. La rabia en coyotes se encontró como un foco de rabia independiente el cual muy probablemente surgió a partir de la diseminación de la rabia de perros que se encuentra circulando en la región centro sur y noroeste del país. Se encontró un foco de rabia asociado a zorros grises, el cual esta ampliamente distribuido en la región noroeste de México cercana a la frontera con los Estados Unidos, en donde se superpone con un foco en la misma especie en Arizona. Tres focos independientes asociados a zorrillos en la región noroeste de México y en Yucatán compartieron un origen común, pero distante, con la rabia de perros. Un foco de rabia en zorrillos que se encuentra distribuido en los estados del centro norte del país parece tener un origen muy cercano al de la rabia de murciélagos de América del Norte y es pariente muy cercano a la rabia de zorrillos que se encuentra distribuida en la región centro sur de los Estados Unidos.

También se investigo la rabia asociada a murciélagos y su transmisión a seres humanos y a otras especies en México. Se estudiaron 89 muestras obtenidas de muestras positivas a rabia de ganado bovino, humanos gatos y perros en México por medio del análisis de su perfil antigénico y de secuencias parciales del gen que codifica para la nucleoproteína. Estas muestras fueron comparadas posteriormente con virus de la rabia asociados a diferentes especies de murciélagos en varios países de América. Los patrones de variación nucleotídica permitieron la identificación de al menos 20 grupos monofiléticos asociados con 9 o más especies de murciélagos. Varios linajes asociados de forma específica con ciertas variantes antigénicas fueron encontrados en asociación con murciélagos hematófagos de México. Los linajes del virus asociados con murciélagos vampiros, que además fueron V3, se encontraron ampliamente dispersos desde México hasta América del Sur, sugiriendo estos linajes como los ancestros mas

probables de la rabia de vampiro en América y los cuales han sido dispersados por *Desmodus rotundus* en toda la América tropical. Rabia asociada a *Lasiurus cinereus*, *Histiotus montanus* y a otras especies de murciélagos dentro del género *Lasiurus* todavía no identificadas, fue detectada circulando en México. Patrones de diseminación de rabia, a larga distancia, se encontraron asociados con especies de murciélagos no necesariamente consideradas como migratorias. Como en el caso de la rabia asociada a *Desmodus rotundus* e *Histiotus montanus*. La rabia en seres humanos estuvo principalmente relacionada con la transmisión por murciélagos hematófagos y en un solo caso estuvo asociada a *Tadarida brasiliensis mexicana*. La diseminación de la enfermedad a animales domésticos a partir de murciélagos también fue demostrada en este estudio. La tipificación genética del virus de la rabia nos permitió identificar tendencias de diseminación de la enfermedad y abordar en forma preliminar aspectos de la evolución del virus en diferentes especies consideradas como sus reservorios.

I. INTRODUCCION

La rabia como enfermedad ha sido conocida y documentada por varias culturas desde hace miles de años. Probablemente, su asociación con el hombre es casi tan antigua como la domesticación del perro (Steele y Fernández., 1991; Wilkinson, 2002). El termino que hace alusión a la enfermedad deriva del sánscrito *rabhas* que significa violencia y los griegos la denominaban *Lyssa* o *Lytta*, lo cual significa locura. Las imágenes de perros enloquecidos y con espuma en la boca descritas por escritores, legisladores, médicos y filósofos simbolizan el temor histórico de la humanidad hacia la enfermedad. El antecedente documentado más antiguo que posiblemente asocia a la rabia con perros enloquecidos y furiosos aparece en el código de Eshnunna de Mesopotamia hace 2,300 años antes de cristo (A. C), el cual precede al mejor conocido código de Hammurabi de la antigua Babilonia. Aristóteles, 400 años A. C., mencionó en sus escritos que la enfermedad era transmitida a perros sanos y a otros animales a través de mordeduras de perros enloquecidos y que además ésta era letal. Celsus, el llamado doctor romano, en el año 100 D. C describió la manera en la que la enfermedad debía ser tratada de acuerdo a los conocimientos de aquellos tiempos. A mediados del siglo XVIII varios brotes de rabia en animales y humanos diseminados ampliamente en Europa, la América colonial, Rusia y China motivaron la investigación de métodos terapéuticos. En 1804, Zinke logró producir la enfermedad en perros sanos al inocularles saliva de animales enfermos, con lo que contribuyo a comprobar la propiedad transmisible de la enfermedad (Steele y Fernández, 1991). El desarrollo de la primera vacuna antirrábica y su aplicación por primera vez a un ser humano en julio de 1885 por Luis Pasteur, ha sido el hecho más sobresaliente desde que se conoce la enfermedad. Pasteur, hábilmente aprovecho todos los estudios realizados por Pierre-Victor Galtier acerca de la producción de la enfermedad en

conejos. Dicho modelo animal fue utilizado para obtener una cepa del virus de la rabia con periodo de incubación corto y fijo, clave para obtener cantidades suficientes de virus y poder producir una vacuna potente y afectiva (Steele y Fernández, 1991).

En 1903, Paul Remlinger demostró la etiología viral de la enfermedad y en ese mismo año Negri, descubrió los cuerpos de inclusión que llevan su nombre. Este último hallazgo contribuyó al diagnóstico histopatológico de la enfermedad (Steele y Fernández, 1991).

En América, no existen antecedentes de la enfermedad tan antiguos como los descritos en Asia, a pesar de la existencia de perros en el continente desde hace más de ocho mil años. La raza autóctona "Itzcuintli" era usada como compañía, alimento y en la deidad de Xolotl, dios emisario de la muerte, era el encargado de acompañar a los difuntos en su viaje al más allá. En ninguna cultura prehispánica existe manifestación, en ninguna de las formas de expresión de la época, de la presencia de problemas asociados a sobrepoblación canina o a los perros en general. Por otro lado, los murciélagos que actualmente son reconocidos como reservorios e importantes transmisores de la enfermedad a animales y humanos tenían representaciones, en forma de glifos, en calendarios y otros monolitos de las culturas Totonaca, Zapoteca y Maya que datan de hace más de 300 años A. C. Accesorios con forma murciélagos también simbolizaban deidades, tales como Zot el dios murciélago, y eran usados en ceremonias y rituales, sin embargo al igual que con el perro no existe ninguna interpretación en códices o estelas en la que se les haya asociado con enfermedades (Secretaría de Salud, 2001; Steele y Fernández, 1991).

ANTECEDENTES DE LA RABIA EN MÉXICO.

Los primeros problemas documentados de salud pública asociados al exceso de perros callejeros en la ciudad de México datan de 1519 cuando los colonizadores españoles empezaron a traer perros de cacería. La cruce de estos perros españoles con perros autóctonos produjo nuevas estirpes, que rápidamente se adaptaron y generaron sobrepoblación canina. En 1581 el cabildo de México promueve campañas de control de la población canina mediante el sacrificio. La primera epizootia de rabia en perros callejeros se registró en la ciudad de México en 1709 y se extendió rápidamente a la ciudad vecina de Puebla presentándose casos de rabia en humanos y ganado. En 1841 se instauran multas por sacar a perros sin correa a la calle y poco después el entonces presidente, Antonio López de Santa Ana, cobra un impuesto por la tenencia de cada perro. Si dicho impuesto no era pagado los perros eran confiscados y sacrificados (Secretaria de Salud, 2001).

El Consejo Superior de Salubridad, en 1900, crea el primer instituto antirrábico en donde se consideró la producción de vacuna antirrábica para proporcionar profilaxis a seres humanos agredidos por perros rabiosos. En 1924 el Departamento de Salud Pública declara que la rabia en animales debía ser de aviso obligatorio. En 1925 el gobierno reglamenta la vacunación antirrábica canina y registro de perros y en 1932 se instituye su gratuidad. Debido a su alto costo y al bajo impacto en la prevención de la enfermedad en los perros callejeros, el gobierno decidió retirar la vacunación antirrábica canina en 1938. En 1950 surge el primer reglamento de campañas antirrábicas en el cual se escribe un apartado sobre el tratamiento antirrábico para humanos (Secretaria de salud, 2001).

En el periodo 1939 a 1969 los certificados de defunción suman 1,785 casos de rabia en seres humanos que abarcaron 31 estados del país con

excepción de Quintana Roo. Los diez estados con mayor número de casos, en ese periodo, fueron el DF, Jalisco, Puebla, Guanajuato, Veracruz, Estado de México, Sonora, Sinaloa, Michoacán y Guerrero, representando el 62.7% del total. Para aquella época existe una correlación evidente entre densidad poblacional, urbanización y número de casos (Secretaría de Salud, 2001).

En 1968, por motivo de la Olimpiada y debido al reconocimiento de la rabia canina como un problema de salud pública se realiza la primera campaña de vacunación masiva, se inicia el proyecto binacional para el control de la rabia en la frontera norte y se inicia la producción de la vacuna antirrábica tipo Fuenzalida-Palacios para su aplicación en perros y humanos (Secretaría de Salud, 2001).

De 1969 a 1989 se realizan los primeros intentos de formalizar un sistema de vigilancia epidemiológica de la rabia con la intención de priorizar recursos para su control y prevención. Se crea un programa estatal para el control de la rabia, empezando por aquellos estados en donde el problema era mayor. Se designó un encargado, médico cirujano o médico veterinario con entrenamiento para diagnosticar la enfermedad por datos clínicos y con conocimiento de herramientas básicas de epidemiología descriptiva para determinar y estratificar áreas de riesgo. Se realizan los primeros esfuerzos para obtener censos de la población canina, sin embargo estos solo llegan a ser meras aproximaciones cuando se trata de considerar la población de perros callejeros. Por primera vez se logra disponer de presupuesto federal específico para actividades de control y prevención de la rabia. Se integra el programa de vacunación antirrábica canina como actividad regular de los centros de salud y se cambia la vacuna canina de una preparación que contiene virus atenuado que se debía aplicar en un esquema multidosis, por una vacuna inactivada más potente que produce inmunidad protectora en una dosis. La aplicación de vacuna antirrábica elaborada en cultivo celular (células diploides y células Vero) se empieza a

Capítulo I. Introducción

usar, en este periodo, en grupos de seres humanos considerados de alto riesgo como niños menores de dos años y adultos mayores de 60, ya que la vacuna Fuenzalida-Palacios-CRL, produjo severos efectos colaterales a una proporción de la población que la recibió. Durante el periodo 1970 a 1989 se notificaron 56 incidentes que desencadenaron en 16 defunciones por reacciones postvacunales adversas al aplicar el tratamiento postexposición con la vacuna Fuenzalida-Palacios-CRL. El producto de estos esfuerzos no impacta de forma considerable en la epidemiología de la enfermedad. Dentro de este periodo (1969 a 1989) se informan un total de 1,431 casos de rabia en humanos, con un promedio anual de más de 70 casos. Los diez estados que notifican la mayoría de casos, en orden decreciente, fueron, Estado de México, Puebla, Distrito Federal, Oaxaca, Guerrero, Morelos, Michoacán, Veracruz, Jalisco, Guanajuato y Sinaloa, en donde se concentraron el 69% del total de casos. Por medio de encuestas epidemiológicas se identificó que el 81.6% de estos casos fueron transmitidos por perro, el 7.2% por murciélagos, el 2.9% por otras especies y en el 8.3% no se pudo identificar la fuente de transmisión. La técnica de inmunofluorescencia directa se empieza a aplicar en 1970 y por ello se pudieron confirmar un total de 83,491 casos (en el periodo 1970 a 1989), de los cuales 75,977 (91%) correspondieron a perros. El promedio anual de casos varió de forma considerable con 1,510 casos detectados en 1970 y 4,303 en 1989. Este incremento en el número de casos diagnosticados en animales, tal vez refleje la mejoría en los sistemas de vigilancia y detección de la enfermedad. A este respecto los diez estados con más casos fueron, en orden decreciente, Distrito Federal, Estado de México, Guanajuato, Veracruz, Coahuila, Puebla, Michoacán, Durango, Morelos e Hidalgo los cuales sumaron el 72.4% del total de casos. Los estados que presentaron el mayor número de casos en seres humanos no coincidieron en su totalidad con aquellos que presentaron mayor número de casos en animales, lo que probablemente indica subregistro de la enfermedad en

varios estados. Durante este periodo también se informó un ascenso en la demanda de tratamientos antirrábicos postexposición en humanos de 44 mil a 117 mil, acumulándose un total de 1,784, 453 en estos 19 años. Lo que probablemente significa mayor disponibilidad de biológico y que la población en general estaba mejor informada sobre el riesgo de contraer rabia por el contacto con perros enfermos (Secretaría de Salud, 2001).

Las medidas de control de la enfermedad en perros comprendieron vacunación masiva y control de la población. Sin embargo, a pesar de que el número de dosis aplicadas se incrementó de 204,686 en 1970 hasta 487,561 en 1989, estos incrementos nunca alcanzaron a inmunizar al total de la población canina que se estimó creció de 1.5 a 3 millones en la década de los setenta a una cantidad que osciló de los 3 a los 7 millones durante la década de los ochenta. Estos rezagos en coberturas de vacunación y la baja eficiencia en control de la población canina callejera (en 19 años solo se notificó el sacrificio humanitario de 867,384 perros callejeros) propiciaron la persistencia de la enfermedad en perros y su diseminación al humano durante este periodo. La transmisión de la enfermedad al humano por fauna silvestre empezó a ser notada a través de los estudios de epidemiología descriptiva clásica y con el uso de encuestas epidemiológicas. Del total de casos asociados con la transmisión por fauna silvestre en estos 19 años, 103 se asociaron con la transmisión por murciélago hematófago, nueve por zorrillo, tres por gato montes, dos por coyote y uno por zorro. Su distribución abarcó los estados de Veracruz, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chihuahua, Querétaro, Estado de México, Morelos y Puebla. Se encontró una asociación entre la presencia de casos y el grado de urbanización en las regiones donde ocurrieron (Secretaría de Salud, 2001). De 1990 al 2003, se inició la aplicación masiva de vacunas antirrábicas caninas elaboradas en cultivo celular, las cuales son más potentes y solo requieren de la aplicación de una dosis anual o cada tres años para inducir

Capítulo I. Introducción

inmunidad protectora. El número de dosis aplicadas a la población canina ascendió gradualmente de 7 millones de dosis en 1990 a casi 15 millones de dosis en el 2003. En este periodo se logró disminuir el número de casos en humanos a 327, de los cuales el 77% (250/327) fue transmitido por perros y de este total el 44% (110/250) fue provocado por cachorros menores de tres meses. Los datos anteriores demuestran que el uso de vacunas más potentes no ha sido suficiente para erradicar la rabia canina, en gran parte debido a que la población susceptible sigue superando las coberturas de vacunación. Se desconoce la dinámica de la población canina y la distribución de los principales focos enzoóticos, no existen programas efectivos de control de la población y problemas socioculturales que evitan alcanzar coberturas de vacunación mayores y mejorar las campañas para el control de la población canina. En este sentido, la estimación real de la población canina y su distribución siguen siendo uno de los problemas centrales que han limitado el control y prevención efectivos de la enfermedad en el perro y en el humano. Por ejemplo, en los últimos 13 años (1990 a 2003) a pesar de que se han sacrificado más de 2 millones de perros, esterilizado más de 150,000 y aplicado cerca de 160 millones de dosis de vacuna antirrábica canina, los esfuerzos no han sido suficientes para erradicar la enfermedad en el perro ni el humano. Durante el año 2000, se informó el gasto de 35.3 millones de pesos (14.1 millones en vacuna fabricada en cultivo celular y 21.2 millones en gamma globulina antirrábica para humanos) en la compra de biológicos para proporcionar profilaxis antirrábica a más de 100 mil personas que acudieron ese año a centros de salud para solicitar atención médica por haber sido mordidas por perros o animales silvestres. Las cifras anteriores no contemplan el gasto por compra de vacuna antirrábica canina, el cual puede oscilar de 25 a 30 millones de pesos, considerando que el costo de un frasco con 20 dosis es de 38 pesos (precio al que fue vendido al

gobierno en el 2003) y que se aplican de 14 a 15 millones de dosis por año (Secretaría de Salud, 2001).

La presencia de rabia transmitida por animales silvestres al ser humano se empezó a notar con mayor énfasis dentro de este periodo de 13 años (1990 a 2003). En el 18% del total de casos (60/327) se informó la transmisión por murciélagos y el 5% (12/327) restante se encontró involucrados a otros animales como zorrillos, zorros, gatos y un mapache. En el 1.5% (5/327) de los casos no se obtuvo información alguna sobre la fuente de transmisión. En todos los estados de la República Mexicana con excepción de Quintana Roo, Querétaro, Colima y Baja California se confirmó, por laboratorio, la presencia de rabia en seres humanos, animales domésticos (ganado de toda clase, perros, gatos) y algunos animales silvestres. Sin embargo, en los estados donde no se informa la presencia de rabia, la vigilancia de la enfermedad es muy pobre o nula (Secretaría de salud, 2001).

JUSTIFICACIÓN

La presencia continua de casos de rabia en humanos en países desarrollados y en vías de desarrollo, se debe en gran parte, a que los reservorios de la enfermedad son desconocidos por la población en general y muchas veces por los encargados de proveer servicios de salud. Aunque en países desarrollados se ha acumulado gran cantidad de información sobre la epizootiología de la enfermedad, cada vez se informan nuevos hallazgos sobre su distribución (en sus reservorios naturales y en seres humanos), especies afectadas y número de estas involucradas en el mantenimiento del virus en la naturaleza.

El problema que se aborda en este estudio deriva de que actualmente en México se conoce parcialmente la magnitud y cantidad de especies afectadas por la rabia, las especies de animales silvestres que pudieran jugar un papel importante en el mantenimiento del virus, la distribución de

Capítulo I. Introducción

la enfermedad en las especies que funcionan como reservorios y las posibles tendencias en la dispersión y movimiento de la enfermedad en el tiempo. Dicha situación ha limitado que se puedan realizar en el país estimaciones precisas del riesgo al que están sometidas las poblaciones humanas al igual que ha impedido el uso adecuado de los recursos destinados a la prevención y control de la enfermedad en el humano (gasto excesivo en profilaxis post exposición), las especies domésticas de interés económico y en los posibles reservorios naturales (ausencia de proyectos para el control de la rabia en animales silvestres). De esta manera, en el presente trabajo la epidemiología molecular (en su definición más actual) se utilizó como una herramienta de análisis e integración para inferir los principales reservorios (domésticos y silvestres), la distribución de la enfermedad dentro de estos en México, así como conocer la dinámica espacial y temporal de la enfermedad.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y DISEÑO DEL ESTUDIO

A. OBJETIVO GENERAL.

1.- Determinar la distribución actual de la rabia en las especies que están involucradas en el mantenimiento enzoótico de la enfermedad en México.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. 1. Identificar a los animales que son afectados de manera mas frecuente por la rabia en México

1. 2. Determinar la diversidad del virus de la rabia en las especies mas afectadas por la enfermedad en México

1. 3. Encontrar un marcador molecular que permita asociar al virus de la rabia con sus reservorios principales.

1.4. Determinar el algoritmo mas eficiente (bajo costo, representatividad, reproducibilidad) para realizar epidemiología molecular de la rabia en México.

1. 5. Establecer la distribución de los principales focos de rabia asociados con diferentes reservorios en México.

1. 6. Determinar patrones de dispersión de la enfermedad por reservorio identificado.

1.7. Determinar posibles eventos de transmisión íter-específica que hayan podido derivar en el establecimiento de reservorios emergentes y nuevas enzootias de rabia.

C. HIPÓTESIS

H₀: La rabia en México sigue siendo mantenida de forma enzoótica por el perro, así como también por diversas especies de mamíferos silvestres (carnívoros terrestres y murciélagos), en enzootias independientes, los cuales en su conjunto son los responsables de la presencia continua de casos de rabia en seres humanos y en animales domésticos, así como de la persistencia de la enfermedad.

H₁: La rabia en México no es mantenida de forma enzoótica por el perro, ni por otras especies de mamíferos silvestres (carnívoros terrestres y murciélagos), en enzootias independientes, los cuales en su conjunto no son los responsables de la presencia continua de casos de rabia en seres humanos y en animales domésticos, así como no tienen relación con la persistencia de la enfermedad.

D. Diseño del estudio

El presente trabajo de investigación tiene un diseño de tipo longitudinal retro-prospectivo, descriptivo aplicativo, cuyos resultados podrán ser usados en el mejoramiento de las estrategias de control y prevención de la rabia en México tanto en sus reservorios principales como en los seres humanos.

CAPÍTULO III. EL AGENTE PATÓGENO

A. El virus

1. Morfología y propiedades fisicoquímicas

El virus de la rabia tiene un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa el cual codifica para 5 proteínas, distribuidas en 2 componentes principales: la nucleocápside (NC) que tiene una estructura helicoidal y la envoltura que es una membrana. Tiene forma cilíndrica con uno de los bordes redondeados y el otro plano, lo que le da una morfología semejante a la de una bala. Las dimensiones del virión son 180nm de longitud y 75nm de diámetro (Matsumoto, 1962, Matsumoto y Miyamoto, 1966). Su glicoproteína se proyecta en forma de espículas de 10nm de longitud la cual se encuentra anclada a una doble capa lipídica, figura 1. La composición química de la envoltura es de fosfolípidos, que cualitativamente son los mismos de la membrana de las células nerviosas que infecta, pero la proporción de estos es diferente a la de la célula sin infectar (Superti, *et al.*, 1984b). El virus de la rabia, por ser envuelto, es muy sensible a la acción de los agentes físicos y químicos que tienden a destruir o disolver la bicapa lipídica. En pocos minutos se inactiva por acción de ácidos y bases fuertes, detergentes, luz solar, radiación ultravioleta, cambios de pH, cambios en la presión osmótica y temperatura. Es fácilmente inactivado con β -propiolactona, pero es resistente a soluciones fenólicas del 0.25 al 0.5% utilizadas en las vacunas tipo Semple, donde se requiere de muchos días para obtener una inactivación completa. El coeficiente de sedimentación del virus es de 660 unidades Sdverberg y una densidad de 1.16 g/mL (Wunner, 1991, 2002).

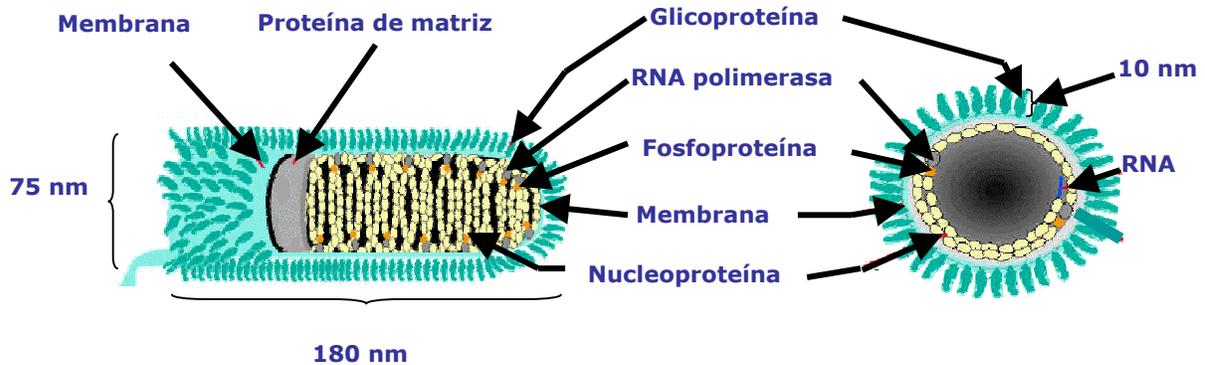


Figura 1. Virus de la rabia y distribución de sus proteínas estructurales y ácido nucleico; corte semilongitudinal, izquierda; corte transversal derecha.

2. Proteínas estructurales y su función.

Las cinco proteínas estructurales del virus de la rabia se identificaron al disgregar las partículas en condiciones suaves con dodecil sulfato de sodio (SDS). A continuación se describe cada una de ellas en el orden que están codificadas en el genoma del virus de la rabia.

3. Proteína N

La proteína N deriva su nombre de nucleoproteína, es el principal constituyente de la nucleocápside (NC), alrededor del 90%, con 1750 moléculas. Esta conformada por 450 aminoácidos y tiene un peso molecular de 57, 000 Daltones (Minamoto, *et al.*, 1994). Se encuentra íntimamente asociada al RNA viral y a las proteínas P y L (Iseni, *et al.*, 2000, Kouznetzoff, *et al.*, 1998; Mellon and Emerson, 1978). La proteína N no está glicosilada, a pesar de la existencia de sitios potenciales. A diferencia de la proteína N de VSV, la proteína N del virus de la rabia está fosforilada en el residuo de serina de la posición 389 (Kawai, *et al.*, 1999). La función principal asociada a esta proteína es la protección del RNA genómico y del precursor de la replicación (RNA + complementario al RNA-genómico) de los ataques de las nucleasas celulares (Kouznetzoff, *et al.*, 1998). Las propiedades antigénicas de esta proteína que le permiten la

activación específica del sistema inmune celular han sido estudiadas en detalle para poder ser aprovechadas en el uso de diseño de vacunas en contra del virus de la rabia (Ertl, *et al.*, 1989, 1991; Fu *et al.*, 1994). Los 450 aminoácidos de la proteína N presentan relativamente menor variación que el ectodominio de la proteína G entre las diferentes variantes del virus de la rabia hasta ahora descritas. El mas alto nivel de identidad de la secuencia de aminoácidos de la proteína N se observa para aquellas cepas denominadas como cepas fijas de laboratorio que pertenecen al genotipo 1 (Wunner, 1991, 2002), o para aquellas cepas que pertenecen a un mismo brote o son perpetuadas por el mismo reservorio dentro de una región geográfica restringida. Basándose en las secuencias completas y parciales que hasta la fecha se conocían de la proteína N, en 1995 y después en el 2005, se sugirió que los virus de la rabia y los semejantes a estos que compartieran menos del 80% de identidad en su secuencia nucleotídica y menos del 93.5% en su secuencia de aminoácidos pertenecían a diferentes genotipos (Kuzmin, *et al.*, 2005; Kissi, *et al.*, 1995). Una de las posibles razones por tal nivel de conservación, particularmente dentro de ciertas regiones dentro de la nucleoproteína se deba a la necesidad de retener funciones clave para su ciclo de replicación (Webby, *et al.*, 2004).

Como la proteína N es la más abundante durante la replicación del virus en el sistema nervioso central y los cultivos celulares, es la que se detecta en mayor proporción durante el diagnóstico por la técnica de inmunofluorescencia directa, IFD (Trimarchi y Smith, 2002). La interacción inmediata de la nucleoproteína y la fosfoproteína (P) impide la formación de agregados de N lo cual permite la encapsidación del complejo N-RNA (Buchholz, *et al.*, 1994). El sitio de unión de N al RNA posiblemente se encuentra entre los residuos 298 y 352 (Kouznetzoff, *et al.*, 1998).

El desarrollo de anticuerpos monoclonales que reconocen varios epítomos dentro de esta proteína (Dietzschold, *et al.*, 1987, Goto, *et al.*, 2000), así

como su secuenciamiento nucleotídico parcial y total en varios aislamientos del genotipo 1 han convertido a esta proteína en un elemento importante para la identificación y tipificación de variantes del virus del rabia con interés epidemiológico, epizootológico y taxonómico (Rupprecht *et al.*, 1987 y 1991, Smith, 1989).

4. Proteína P, NS ó M1

La proteína P ó NS es un componente estructural minoritario virión. Esta compuesta por 267 aminoácidos, de los cuales 40 son sitios putativos de fosforilación que yacen en serinas y treoninas (Gigant, *et al.*, 2000). Es el componente más hidrofílico de las 5 proteínas estructurales del virus porque contiene aminoácidos polares en los primeros dos tercios del extremo amino terminal (Conzelman *et al.*, 1990). Esta sólo se acumula en el citoplasma de las células infectadas durante el proceso de replicación razón por la que inicialmente se consideraba como no estructural (Capone y Ghosh, 1984).

Inicialmente se propuso que esta proteína formaba parte de la envoltura por lo que se le denominaba M1, por primera proteína de membrana no glicosilada. Posteriormente, se demostró que no forma parte de la membrana. La proteína M1 del virus de la rabia y la NS de VSV son dos denominaciones de la misma proteína, sin embargo actualmente esta proteína se conoce como P. Con auxilio de anticuerpos monoclonales han sido descritos 2 tipos antigénicos. También han sido descritos epítomos reconocidos por células T del sistema inmune, aunque todavía se desconoce el papel que juega en la protección contra la infección. Esta proteína juega un papel muy importante en la regulación de los procesos de transcripción y replicación, relacionándose con la modulación de la función de transcriptasa y replicasa de la proteína L (Chenik, *et al.*, 1998). Como se mencionó anteriormente la proteína P también juega un papel importante como chaperona de la nascente proteína N (Chenik, *et al.*,

1994), lo cual habilita a N para unirse ávidamente al RNA viral (Masters and Banerjee, 1988; Chenik *et al.*, 1994, 1998; Fu *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1998).

La replicación del virus de rabia se tiene que llevar a cabo bajo el despliegue de mecanismos de la respuesta inmune de su hospedero, incluyendo el sistema de interferones del tipo I; los cuales tienen actividad antiviral muy potente además que tienen función de adyuvantes dentro de la respuesta inmune adaptativa (Finke y Conzelman, 2005). Ahora se sabe que la fosfoproteína, P, del virus de la rabia funciona como antagonista de los interferones del sistema inmune, inhibiendo su expresión y contribuyendo de manera importante al establecimiento de la infección en el hospedero (Finke y Conzelman, 2005).

Así mismo existe evidencia que sugiere que esta proteína puede estar ligada a la virulencia del virus de la rabia, ya que esta involucrada en la inhibición de la apoptosis. Al unirse P a la cadena ligera 1 de la dineína (P-DLC1), no se pueden formar los complejos Bim-DLC1 que funcionan como bloqueadores de los Bcl2, que su vez tienen actividad anti-apoptótica. Entonces, que no halla apoptosis celular redundante en que el virus podrá propagarse más eficientemente. Esto es consistente con virus de la rabia atenuados, en los cuales se ha perdido la capacidad de ligar a DLC1 por mutaciones en P (Finke y Conzelman, 2005).

Así mismo, se ha sugerido que P también podría estar involucrada en el transporte retrogrado del virus de la rabia en el sistema nervioso central (SNC), mediante su unión a la cadena ligera 1 de la dineína (P-DLC1), ya que el transporte mediado por el complejo del motor de dineína ha sido considerado como el responsable de mover la RNP de forma retrograda dentro del SNC del hospedero durante su diseminación centrípeta (Wunner, 2002).

5. Proteína M

La proteína M, representa casi el 30% de la proteína total del virión, se trata de una proteína de naturaleza básica, no glicosilada de 202 aminoácidos de longitud. Su estructura primaria exhibe un segmento central rico en aminoácidos hidrofóbicos (aminoácidos del 89 al 107), el que le permite unirse a las membranas (Capone and Ghosh, 1984; Tordo *et al.*, 1986). Entre sus propiedades funcionales destaca la regulación negativa de la transcripción del RNA viral y el de la célula blanco. Participa en la condensación de la forma helicoidal de la nucleocapside a una forma más apretada, su asociación con membranas con configuraciones de bicapas lipídicas (Lyles, *et al.*, 1992) y su participación en la citopatogénesis (induce apoptosis celular) de las células infectadas por el virus (Ito *et al.*, 1999). La proteína M es la responsable de la forma de bala de la partícula viral y es el componente responsable de mediar la unión de la RNP a la membrana de la célula blanco (Craven, *et al.*, 1999). Promueve la gemación de las partículas virales a través de la interacción de su dominio rico en prolina (motif PPxY) con proteínas del citoesqueleto y otras proteínas involucradas en señales de transducción (E3-ubiquitina cinasa Nedd4) y regulación genética (Mebatsion, *et al.*, 1996, 1999; Sudol, 1996; Harty *et al.*, 1999; Jayakar *et al.*, 2000).

La proteína M juega un papel primordial en el control de la transcripción del RNA viral, mediante la regulación de la función de la RNA-polimerasa viral (Finke and Conzelman, 2005). Cuando M se empieza a traducir y alcanza concentraciones críticas en el citoplasma celular la producción de RNA mensajeros se limita y entonces se activa la replicación del RNA geonómico mediante la producción masiva de los intermediarios de RNA antisentido (Finke and Conzelman, 2003). De esta manera M, también juega un papel importante dentro de la regulación de la expresión proteica y garantiza la replicación del RNA geonómico dentro de las ultimas etapas del ciclo de replicación (Wunner, 1991).

6. Glicoproteína G.

Las espículas características de la envoltura de los Rhabdovirus representan aproximadamente un tercio de la masa proteica. Se estima que cada envoltura cuenta con 1,800 moléculas asociadas en trímeros los que forman consecuentemente 600 espículas. La proteína G madura y completa, contiene 504 aminoácidos para las cepas CVS, ERA y PV, y 505 para Flury y HEP, es precedida por un péptido señal de 19 aminoácidos hidrofóbicos que sirve para que la proteína penetre la membrana a nivel del retículo endoplásmico rugoso donde se lleva a cabo la traducción de su mensajero. La proteína G está constituida por 3 dominios: un externo de 438 aminoácidos, un transmembranal de 22 residuos hidrofóbicos y otro citoplasmático de 44 aminoácidos. La glicoproteína G tiene un peso molecular de 67,000 daltones, contiene 3% de carbohidratos (Benmansour *et al.*, 1992; Bourhy *et al.*, 1993)

Parte del dominio citoplasmático es indispensable para el ensamblaje correcto del virión ya que funciona como señal para que la proteína M se adhiera a la membrana citoplasmática durante la morfogénesis viral, este dominio contiene epítomos altamente inmunogénicos (Wunner, 2002).

Después de que el virión es endocitado y una vez que el fagolisosoma se formo, la proteína G bajo el efecto de pH ácido (5.7 a 6.1) sufre un cambio conformacional que le permite unir la envoltura viral con la membrana del fagolisosoma (Gaudin, *et al.* 1996). Este proceso denominado fusión, tiene por consecuencia inyectar la NC del virus en el citoplasma donde se llevará a cabo todo el ciclo de la replicación viral (Gaudin, *et al.* 1999, 2000). Esta proteína es la única que induce la producción de anticuerpos neutralizantes de la infección (Ruprecht, *et al.*, 1987, 1991, 2005; Wunner, 2002).

Se ha demostrado que cambios en la estructura primaria de la proteína G influyen sobre la patogenicidad (Conzelman, *et al.*, 1990). La sustitución de la lisina 198 por glutamato, en las cepas CVS y ERA disminuye la virulencia en el ratón adulto (Conzelman, *et al.*, 1990). La lisina 198 está

Capítulo III. El agente patógeno

en una región de la proteína G que presenta una fuerte homología con el asa o dominio neurotóxico del veneno de serpiente, ambas regiones se unen al receptor nicotínico de la acetilcolina. Por ello se ha propuesto que la región de la proteína G que abarca los aminoácidos 189 a 214 es la que se podría unir al receptor celular (Wunner, 2002).

Otro aminoácido que ciertamente juega un papel importante en la virulencia es la arginina 333, ya que su substitución por glutamina, isoleucina o glicina, hacen perder la neurovirulencia del virus cuando este es inoculado intracerebralmente en el ratón adulto. La cepa Flury Hep, que a diferencia de otras cepas no es neurovirulenta para el ratón, también posee una glutamina en la posición 333 (Iverson y Rose, 1981; Conzelman, *et al.*, 1990).

Los anticuerpos inducidos por la proteína G, en su mayoría, inhiben la infección y por lo tanto son neutralizantes. Este tipo de anticuerpos permitieron definir los 4 serotipos de *Lyssavirus* por ensayos de inhibición de la infección en modelos animales (Rupprecht, *et al.*, 1991). Esta clasificación ha sido confirmada y refinada con anticuerpos monoclonales anti-G. La proteína G ha sido expresada en virus recombinantes vaccinia (V-RG) y adenovirus humano tipo 5 (Rupprecht *et al.*, 2005). Estos vectores recombinantes inducen la formación de anticuerpos neutralizantes en las especies inoculadas y confieren protección contra la infección del virus rábico vía oral (Slate *et al.*, 2005).

Los anticuerpos neutralizantes aparentemente protegen al prevenir la adherencia del virus a su receptor celular. También es posible que actúen por inhibición de la fusión con la membrana endosomal a pH ácido (Gaudin, *et al.*, 1999).

Por su capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes, las vacunas contra la rabia son evaluadas en términos de su contenido de proteína G con la intención de predecir su poder protector. Estas pruebas se basan en el uso de la técnica de inmunodifusión radial o pruebas inmunoenzimáticas y

recientemente por ensayos de inhibición de focos fluorescentes. Los anticuerpos neutralizantes son considerados clásicamente como el factor inmunitario más importante para la protección. En consecuencia, inducirlos es el principal objetivo de la vacuna preventiva. También se utilizan en seroterapia (suero hiperinmune, homólogo o heterólogo) como complemento de la vacunación post-exposición (Rupprecht, *et al.*, 2005, Wunner, 2002).

7. Proteína L.

Denominada L por "large" (grande) tiene un peso molecular (190 kD), la proteína L posee múltiples funciones enzimáticas (Barik, *et al.*, 1990). Esta proteína es la RNA-polimerasa, dependiente de RNA y durante el proceso de replicación y transcripción está estrechamente asociada a la proteína P. Esta estabilidad aparentemente resulta de la necesidad de conservar las funciones enzimáticas vitales para el virus. La proteína contiene cuatro dominios altamente conservados situados del residuo 530 al 1177 y del 532 al 1201 los cuales forman el módulo de polimerasa de RNA (Poch *et al.*, 1989, 1990; Barik *et al.*, 1990; Delarue *et al.*, 1990). Los sitios consenso de unión y utilización de ATP han sido localizados entre las posiciones de aminoácidos 754-778 y 1332-1351 y son similares a los de las proteín-quinasas celulares (Wunner, 2002).

Actualmente la región inicial del gen que codifica para esta polimerasa, ha sido usado como marcador molecular para reclasificar a la familia Rhabdoviridae (Bourhy *et al.*, 2005; Kuzmin *et al.* 2006).

Tabla 1. Características de las proteínas del virus de la rabia.

Proteína nomenclatura	Peso molecular (Da)	Cantidad de aminoácidos	Moléculas por Virión
N	57, 355	450	1258
NS ó P ó M ₁	38, 878	297	466
M ó M ₂	26, 064	202	1200-1500
G	63, 416	504-511	1205
L	240, 707	2142-2127	50

8. El Genoma

La información genética del virus esta almacenada en RNA de cadena sencilla con polaridad negativa (ssRNA⁻). Cada una de las proteínas que lo constituyen (proteínas estructurales) esta codificada por un gen o cistrón en el ácido nucleico (Finke and Conzelman, 2005). La información contenida en 11,932 nucleótidos determinados en la cepa PV, ha permitido estudiar los elementos reguladores de la transcripción y de la replicación así como su posición dentro del genoma. Cada cistrón esta flanqueado por una secuencia de iniciación y de terminación de la transcripción y tienen el siguiente orden: N-P-M-G-Ψ-L (Conzelman, *et al.*, 1990, Tordo, *et al.*, 1986). El promotor más fuerte es el del cistrón de N y la fuerza de los promotores decrece de manera variable en la dirección 5', es decir hacia la proteína L. Por ello la proteína N es la que se expresa de forma mas abundantemente, seguida por M, G, P y hasta el último L (ver figura 2). El tamaño de las regiones intergénicas es de 2, 5, 5 y 24 a 29 nucleótidos entre N/P, P/M, M/G y G/L, respectivamente (Finke y Conzelman, 2005). Existe una región intergénica muy larga entre los cistrónes G y L de 423 nucleótidos que contiene señales de iniciación y terminación de la transcripción (Tordo, *et al.*, 1986). A pesar de esto no se ha aislado un producto de expresión ni como proteína estructural ni durante el ciclo de replicación, por ello la región es considerada como un pseudogen (Ψ). En otros miembros de la familia Rhabdoviridae que infectan plantas y peces se ha encontrado que esta región codifica para proteínas no estructurales (Kuzmin, *et al.*, 2006). Esta región que no codifica nada en los *Lyssavirus*

es hipervariable por no estar sometida a ninguna presión de selección. En algunos casos se ha observado que el complejo de transcripción puede ignorar la señal de terminación del gen G y reconocer la del Ψ produciendo un RNAm G- Ψ largo, de la proteína G. La transcripción del gen G y Ψ en un solo RNAm largo es sistemático para ciertas cepas como Flury HEP, o alternativa para otras como PV. Las dos formas de transcripción del gen G (RNAm G y RNAm G- Ψ) coexisten y se desconoce el significado biológico de este hecho. Aparentemente este fenómeno tiene un papel regulador sobre la tasa de transcripción del gen L y en consecuencia sobre la expresión del genoma (Wunner, 1991, 2002).



Figura 2. Posición dentro del genoma de los 5 cistrones que codifican para las proteínas estructurales del virus de la rabia. Ácido nucleico RNA de cadena sencilla de polaridad negativa de aproximadamente 12 kb de longitud.

9. Ciclo de replicación

Cuando un virión infeccioso encuentra una célula susceptible resultan una serie de eventos que terminan en la liberación de viriones ó progenie y muerte celular sin lisis (Hummeler, et al., 1967; Holloway y Obejesky, et al., 1980). El ciclo de replicación se lleva a cabo en el citoplasma, ya que el virus cuenta con su propia transcriptasa y replicasa (proteína L) y este solo necesita de la maquinaria de traducción de proteínas y de los nucleótidos, aminoácidos y lípidos que la célula huésped es obligada a sintetizar durante la replicación (Wunner, 2002).

10. Adsorción y Adherencia

La adsorción es el primer evento para que la infección viral se pueda llevar a cabo, es inespecífico e independiente de energía ya que sucede a 4°C, esto lo hace inestable e ineficiente. La adherencia es un proceso específico que requiere el reconocimiento del receptor en la célula blanco (células del sistema nervioso central) por la proteína G del virus (ligando), este proceso es pH y temperatura dependiente (Iwasaki, *et al.*, 1973, Superti, *et al.*, 1984a). El primer posible receptor estudiado para el virus de la rabia fue receptor nicotínico para acetilcolina (Tuffereau, *et al.*, 1998). Hasta la fecha varios experimentos *in vivo* e *in vitro* lo han corroborado como el receptor celular más probable, sin embargo hasta la fecha esto sigue en debate, ya que *in vitro*, el virus es capaz de infectar neuronas que no expresan dicho receptor (Reagan y Wunner, 1985). El receptor de baja afinidad de la neurotropina (NT que es un factor de crecimiento de células nerviosas), denominado p75NTR, expresado en la superficie de las células BSR (Tuffereau *et al.*, 1998), y la molécula de neuro adhesión, NCAM (Lentz, *et al.*, 1982) fueron demostrados como receptores del virus de la rabia (Jackson and Park 1999). Hasta la fecha ninguno de estos receptores putativos ha sido demostrado como el principal o específico para el virus de la rabia, ya que se ha observado que el virus es capaz de infectar varias líneas celulares de origen no nervioso. Por lo que se han propuesto que el virus de rabia debe ser capaz de reconocer receptores ubicuos presentes en un número amplio de células de origen no neuronal (Reagan and Wunner, 1985).

11. Penetración y desnudamiento.

Es un evento dependiente de la energía y requiere una temperatura fisiológica. El virus penetra por endocitosis a través del reconocimiento específico del receptor celular. Proceso que desencadena la entrada del virus a través de una vacuola fagocítica (Hummeler *et al.*, 1967; Iwasaki

et al., 1973; Superti *et al.*, 1984a, 1984b; Tsiang *et al* 1986). La reacción de fusión de membranas (membrana viral *versus* membrana plasmática), que favorece la inyección de la nucleocápside al citoplasma, depende de un cambio de pH cerca de 6.3 dentro de la vacuola fagocítica (Iwasaki *et al.*, 1973; Perrin *et al.*, 1982).

12. Transcripción y traducción.

El virus de la rabia se replica en el citoplasma de la célula huésped (neuronas y sus dendritas). En ella induce la formación de cúmulos de proteína viral que histológicamente se conocen como cuerpos de inclusión eosinofílicos o corpúsculo de Negri (complejos de RNP); su morfología puede ser esférica a oval y de tamaño variable, tienen una estructura basófila granular, con un halo claro que los rodea. Dado que las neuronas afectadas sufren procesos de neurolisis y neuronofagia, principalmente por acción de la microglia y los leucocitos polimorfonucleares especialmente los neutrófilos, puede surgir la impresión de que hay corpúsculos de Negri que se encuentran libres entre las células gliales. Las acumulaciones focales de microglia se llaman nódulos de Babes (Wunner, 1991).

Una vez que la nucleocápside alcanza el citoplasma el genoma inmediatamente empieza a ser transcrito por la transcriptasa viral (proteína L), que esta formando un complejo de la ribonucleoproteína. Durante este proceso se generan RNAm para cada cistrón (Flamand and Delagneau, 1978; Holloway and Obejeski, 1980). El proceso de transcripción es estrictamente necesario, dado que el genoma del virus es de cadena negativa y no puede ser directamente traducido por los ribosomas.

La transcriptasa, sintetiza los RNAm de cada cistrón con un 20 a 30% de menor eficiencia conforme avanza hacia el extremo 5' del genoma, produciéndose un gradiente de RNAsm (Flamand y Delagneau, 1978). De esta manera el RNAm más abundante es el de N, en segundo lugar el RNAm de P y así sucesivamente hasta el RNAm de L que es el que se

produce en menor cantidad (Iverson and Rose, 1981). En cada mensajero la polimerasa L coloca un cap en el extremo 5', formado por 7 metil guanosina (5'-m⁷Gppp) y está poliadenilado en su extremo 3' (Testa *et al.*, 1980; Tordo *et al.*, 1986). El proceso de traducción se lleva a cabo casi de manera simultánea a la transcripción. En cuanto el extremo 5' emerge de la transcriptasa, los ribosomas libres reconocen el codón de iniciación y empieza la traducción. Con excepción del mensajero de la glicoproteína (RNAmG) que es traducido por ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (Gaudin, *et al.*, 1997).

13. Procesamiento de la proteína G.

Esta fase del ciclo se refiere a la glicosilación de la proteína G. Una vez que el RNAm de G es traducido en el retículo endoplásmico rugoso, la proteína es finalmente glicosilada en el aparato de Golgi (Gaudin, *et al.*, 1997). Al momento de su traducción la proteína se inserta en la membrana del retículo endoplásmico en donde por continuidad es movida hacia el aparato de Golgi (Finke and Conzelman, 2005). Esa porción de membrana con la proteína G glicosilada es insertada en la membrana citoplasmática como parte del proceso de renovación de la membrana, quedando entonces partes de la membrana citoplasmática con proteína G (Gaudin, *et al.*, 1997). Esto a su vez sirve como señal para que la proteína M una vez traducida se acople en el dominio citoplasmático de la proteína G (Wunner, 2002).

14. Replicación.

Es el proceso mediante el cual la polimerasa de RNA dependiente de RNA (proteína L), produce miles de copias del genoma del virus de la rabia (ssRNA-) a partir de un molde de RNA+ denominado antígenoma o intermediario replicativo, el cual contiene toda la información, pero complementaria (Holloway y Obejeski, 1980). En esta fase se requiere que

la polimerasa L, cambie de función de transcriptasa a polimerasa. Actualmente no se conoce completamente el mecanismo mediante el cual L cambia de función, sin embargo se han asociado diferentes eventos moleculares con este proceso como; el estado de fosforilación de la proteína P, y la cantidad de proteína M en el citoplasma (Chenik, et al., 1994, 1998; Finke y Conzelman, 2005). Las copias de genoma producidas por el proceso de replicación son protegidas eficientemente de las nucleasas celulares (Kouznetzoff *et al.*, 1998; Iseni *et al.*, 2000) por la proteína N, la cual es activada para reconocer al genoma del virus por su unión a la P formada de novo. Cuando hay mucha proteína M citoplásmica, L adquiere función de replicasa (Iverson y Rose, 1981). Por lo contrario cuando N está en baja cantidad las fosfocinasas celulares son activadas, produciendo la fosforilación P que consecuentemente le confiere a L la actividad de transcriptasa (Finke, *et al.*, 2003).

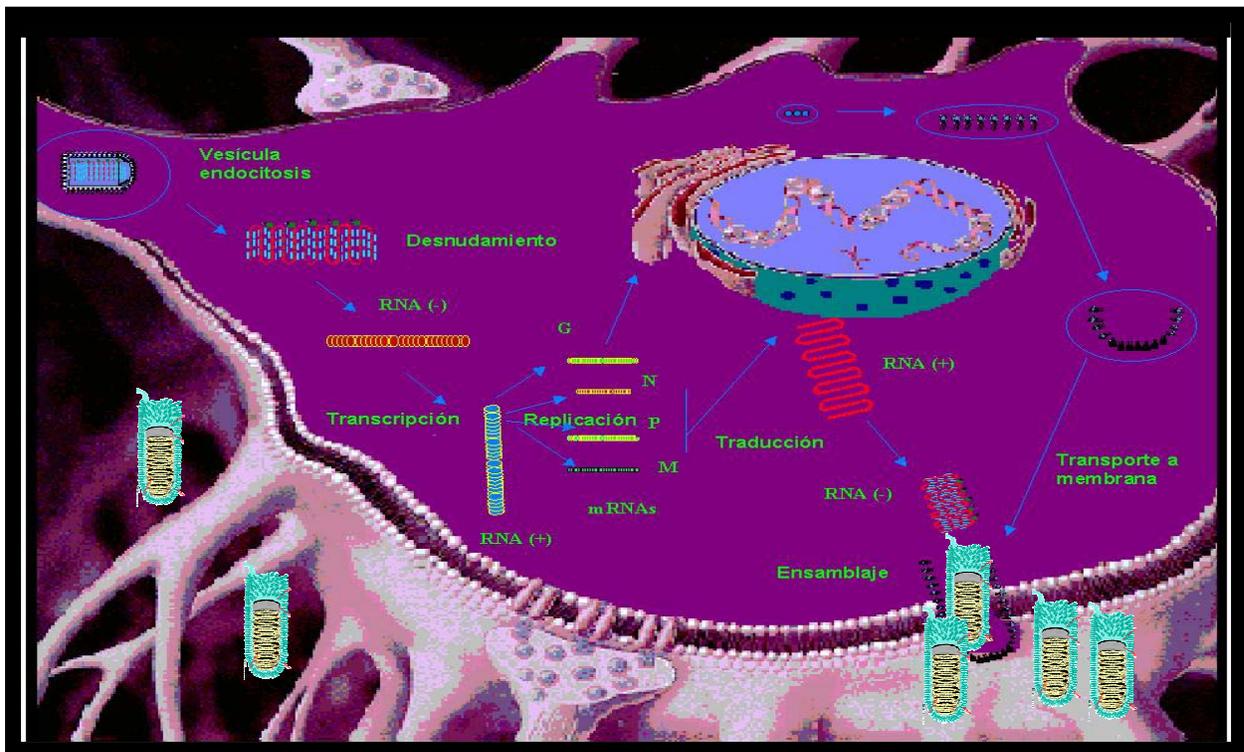


Figura 3. Muestra todas las fases del ciclo de replicación del virus de la rabia dentro del citoplasma de una neurona.

15. Ensamblaje.

Ya que se llevo a cabo la transcripción, traducción y replicación la formación de las nucleocapsides es casi espontánea. Se empaquetan los RNAss- (genoma) por complejos N-P e inmediatamente se une la proteína L para formar el complejo RNP (Buchholz *et al.*, 1994; Mellon and Emerson, 1978; Gigant, *et al.*, 2000). Los agregados de N-N se pueden formar antes de que se una P a N y son los que forman inclusiones citoplasmáticas (Matsumoto, 1962; Matsumoto and Miyamoto, 1966). La proteína M se une a todo alrededor del complejo RNP compactándolo aun mas (Capone, *et al.*, 1984, Mebatsion *et al.*, 1996) y a través de M la RNP se une a la región de la membrana en donde ya esta ensamblada G (Lyles *et al.*, 1992; Mebatsion *et al.*, 1996, 1999). En esta fase M promueve la gemación de los viriones recién formados, los cuales son liberados a los espacios intersticiales o neuronas adyacentes donde inmediatamente están listos para infectar otras células susceptibles y continuar con el ciclo propagativo (Murphy *et al.*, 1973).

16. Taxonomía y clasificación.

El virus de la rabia esta clasificado dentro del orden *Mononegavirales* por su ácido nucleico de cadena sencilla y polaridad negativa y en la familia *Rhabdoviridae* por su morfología de bala. Los miembros de esta familia, que comprende 5 géneros, pueden infectar a un gran número de hospedadores que incluye mamíferos, peces, insectos, plantas y recientemente aves. Solo tres de los cinco géneros afectan a mamíferos, *Vesiculovirus*, *Lyssavirus*, y los *Ephemerovirus*. Los miembros de los otros dos géneros afectan a plantas, insectos, peces y aves (Kuzmin, *et al.*, 2006).

En un inicio por sus diferencias a nivel antigénico, determinadas por ensayos de neutralización cruzada en modelos *in vivo* los miembros del

género *lyssavirus* fueron divididos en 5 serotipos (Rupprecht, *et al.*, 1991). Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular como la caracterización antigénica con diferentes paneles de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la glicoproteína y la nucleoproteína y el análisis de la secuencia nucleotídica, de parte de un gen estructural o la secuencia completa de varios genes estructurales, se ha logrado determinar la existencia de 11 grupos de *lyssavirus* con una distribución geográfica distintiva y asociados a diferentes especies de mamíferos. Dichos grupos, de acuerdo al "Grupo Internacional de Taxonomía Viral", deben denominarse especies ya que el término genotipo aun no esta definido para este grupo (Wunner, 2002). No obstante, debido a que en la literatura actual dichos grupos de virus son mencionados de forma indistinta en el presente trabajo serán mencionados de igual manera. El virus de la rabia o genotipo 1 es considerado como el miembro prototipo del genero *Lyssavirus*, ya que se ha encontrado asociado con la mayor cantidad de casos de encefalitis fatales en humanos y en la mayor diversidad de especies de mamíferos en casi todos los continentes del mundo (Bourhy, *et al.*, 1993). Los otros *lyssavirus*, también conocidos como virus semejantes al de la rabia, presentan una distribución geográfica restringida y se han encontrado infectando a un número reducido de especies incluyendo al humano (Wunner, 1991; Bourhy *et al.*, 2005; Kuzmin *et al.*, 2006).

Su abreviación, distribución, en que mamíferos han sido aisladas y ejemplares prototipo son mostrados en la tabla 2 (Wunner, 1991; Bourhy *et al.*, 2005; Kuzmin *et al.*, 2006).

B. Otras especies del género *Lyssavirus* y sus reservorios

El virus de la rabia o genotipo 1 es el más importante del género *Lyssavirus* porque es el que ha estado asociado con el mayor número de casos fatales de encefalitis en humanos y otros mamíferos en casi todo el mundo (Belotto, *et al.*, 2005). Aunque las otras especies de *lyssavirus* no han sido reconocidas como una amenaza, con el actual fenómeno de la globalización, existe la posibilidad de que estos virus puedan ser movidos junto con sus reservorios naturales a cualquier otra parte del mundo y ahí se puedan establecer (Cleaveland, *et al.*, 2003). La diseminación de estos *lyssavirus*, *per se*, no constituye el mayor problema sino que las vacunas actualmente disponibles no siempre ofrecen el 100% de protección (Childs, 2002; Niezgodá, 2002).

1. Lagos bat

De sus siglas del inglés "Lagos bat virus" (LBV), este virus fue aislado por primera vez en 1956 de una mezcla de cerebros de murciélagos de la especie *Eidolon helvum* capturados en un árbol de la isla de Lagos en Nigeria.

Hasta la fecha ha sido aislado de otras especies de murciélagos como *Micropteropus pusillus*, *Epomophorus wahlbergi*, *Rousettus aegyptiacus* de perros y gatos en los países de República Centro africana, Zimbabwe, Sudáfrica, Etiopía y África del norte (Niezgodá, 2002).

Solo en los casos relacionados con los gatos y perros hubo evidencia de la presencia de la enfermedad y la mayoría de los casos de los murciélagos fueron colectados muertos o hubo ausencia de signos evidentes de la enfermedad. Hasta la fecha el LBV, no se ha detectado implicado en ninguna caso de rabia en humanos (Mebatsion, *et al.*, 1992; Childs, 2002).

2. Mokola

Al estar realizando un estudio sobre la búsqueda de arbovirus en Nigeria, el lyssavirus Mokola (MOKV) fue aislado de forma accidental a partir de las vísceras de musarañas (*Crocidura sp*) en el año de 1968. No está descrita en la literatura la presencia o ausencia de enfermedad en estos animales. El primer caso de encefalitis en un ser humano con este virus se presentó en un niño en Nigeria, en el año de 1972 (Niezgoda, 2002). Nuevamente el virus se logró aislar a partir de vísceras de musarañas (*Crocidura sp*) en Camerún en el año de 1974. También ha sido aislado de ratones (*Lophuromys sikapusi*) en la República Centro Africana; en perros y gatos en Zimbabwe; y en la década de los 90's (1992-1995) fue aislado de gatos y perros con encefalitis en la región este de África y en Etiopía. Actualmente los datos epizootiológicos no son suficientes para asociar con certeza a esta especie de lyssavirus con algún reservorio natural. Sin embargo, se ha especulado que este, podría ser un murciélago o un mamífero insectívoro pequeño como la musaraña. Por su hallazgo más frecuente en gatos, este animal ha sido propuesto como especie centinela para detectar la circulación del virus en la región (Childs, 2002).

El virus Mokola junto con el virus de murciélagos de Lagos son los miembros más divergentes genética y antígenicamente del género *Lyssavirus*. Actualmente se cuenta con evidencia que conduce a pensar que el origen de este virus pudo haber sido un artrópodo, ya que fue encontrado por primera vez en mamíferos insectívoros, es el único capaz de replicarse en células de insecto y presenta cierto cruce antigénico con los virus Kotonkan (KOTV) y Obodhiang (OBDV) aislados de insectos, los cuales pertenecen a género de *Ephemerovirus* (Bourhy, et. al., 2005; Kuzmin, et. al., 2006).

3. Duvenhage

El lyssavirus Duvenhage (DUVV) fue aislado por primera vez en el año de 1970 de un ser humano con signos de rabia clásica quien había sido mordido por un murciélago en el labio mientras dormía. Se sospecha que el murciélago era de la especie *Miniopterus schreibersii*.

La posible asociación de este virus con murciélagos se fortaleció, cuando se aisló de murciélagos enfermos del género *Miniopterus* y *Nycteris thebaica* durante estudios de monitoreo en Zimbabwe (Sabeta, et al., 2003).

Al igual que con LBV y MOKV, la historia natural de DUVV es muy poco entendida entre otras cosas debido a la poca evidencia hasta ahora disponible (Childs, 2002; Niezgodá, 2002).

4. Lyssavirus de murciélagos Europeos

La presencia de rabia en murciélagos Europeos era sospechada desde principios de 1950, sin embargo no fue hasta 1988 y después en 1992 y en 1995 que fueron descritos dos subtipos denominados EBLV1 y EBLV2. Sus reservorios parecen ser murciélagos insectívoros de los géneros *Myotis* y *Eptesicus* en donde se han identificado dos variantes para cada uno EBLV1a, EBLV1b, EBLV2a y EBLV2b.

A la fecha se han notificado pocas defunciones de seres humanos debidas a estos lyssavirus. Sin embargo la más reciente se presentó en Escocia en el año del 2003 en donde se aisló EBLV2a. El mismo año se había aislado EBLV2a de un murciélago insectívoro *Myotis daubentonii* colectado en el Reino Unido (Serra-Cobo, et al, 2002; Childs, 2002).

5. Lyssavirus de murciélagos Australianos

Antes de 1996 el continente Australiano había sido considerado libre de rabia. En ese año se detecto por primera vez un nuevo *lyssavirus* en un macroquiroptero o zorra voladora negra, *Pteropus alecto.*, (Gould, et al, 1998).

Los lyssavirus de murciélagos Australianos (ABLV) fueron descubiertos por accidente, al estar haciendo la búsqueda de un paramyxovirus recientemente descubierto. En este caso, a diferencia de los lyssavirus africanos, se logro hacer diagnóstico diferencial de rabia (con los reactivos y métodos estándar) e histopatología. Confirmándose lesiones típicas causadas por otros lyssavirus. Posteriormente el mismo lyssavirus se logro aislar de varias otras especies de zorras voladoras (*Pteropus poliocephalus*, *Pteropus scapulatus*) y de una especie de microquirópteros (*Saccolaimus flaviventris*) autóctona del continente (Guyatt, et al., 2003).

Este virus es muy parecido genética y antigenicamente al virus del genotipo 1, por lo cual es neutralizado con los biológicos usados en la profilaxis contra la rabia clásica (Childs, 2002; Gould et al., 1998).

6. Nuevos Lyssavirus de Asia central y Rusia

Estos virus han sido propuestos como posibles nuevos genotipos o especies de lyssavirus, por sus diferencias genéticas y antigénicas con los demás genotipos anteriormente descritos. De estos el virus del oeste del caucaso es parcialmente neutralizado en ensayos *in vivo* e *in vitro* por los biológicos que actualmente están disponibles en el mercado para la profilaxis antirrábica, similarmente a lo observado en LBV y MOKV (Kuzmin et al., 2003, 2005).

7. Lyssavirus Aravan

Aislado por primera vez en el distrito de Aravan en la provincia de Osh al sur de Kirguistán, de un murciélago macho de la especie *Myotis blythi*. El cual al momento de su captura, no mostró signos evidentes de enfermedad. Al tipificar genética y antigenicamente la nucleoproteína de este lyssavirus no se encontró similitud alguna con los demás genotipos o especies de lyssavirus descritos hasta la fecha. Fue propuesto como posible nuevo genotipo hasta el 2003 y genéticamente solo tiene un ligero parecido con EBLV2 y Khujand (Kuzmin *et al.*, 2003, 2005).

8. Lyssavirus Khujand

Este virus fue aislado en un centro urbano al norte de Tayikistán en junio del 2001 dentro de la región de Khujand a 260 Km de donde se encontró el virus Aravan. Este se aisló del cerebro de una hembra de la especie *Myotis mystacinus*, la cual se dejó atrapar con la mano afuera de un complejo habitacional. Este virus tuvo cierta similitud antigénica con EBLV-2, pero en general se pudo diferenciar claramente de los demás genotipos descubiertos hasta la fecha.

En un análisis comparativo con base en la secuencia completa del gen que codifica para la nucleoproteína se demostró su similitud con EBLV-2 y Aravan (Kuzmin *et al.*, 2003, 2005).

9. Lyssavirus Irkut

Este virus fue aislado al este de Siberia en el pueblo de Irkutsk, a partir de un murciélago de la especie *Murina leucogaster*. Este fue capturado al meterse a un departamento en septiembre del 2002. El murciélago fue mantenido en cautiverio cerca de 10 días, cuando murió con signos notables de debilitamiento extenuación.

La nucleoproteína del virus pudo ser detectada con reactivos comunes usados en el diagnóstico de rabia por la técnica de inmunofluorescencia

directa (IFD) en Rusia y en EEUU. El virus Irkut mostró similitud antigénica de su nucleoproteína con las nucleoproteínas de DUVV y EBL1, al usar el panel de anticuerpos monoclonales del CDC y una similitud genética al analizar la secuencia completa de su nucleoproteína con los DUVV y EBL1 (Kuzmin *et al.*, 2005).

10. Lyssaviurs del oeste del caucazo

El Lyssaviurs del oeste del caucazo (WCBV), sus siglas derivadas del inglés, fue obtenido a partir del cerebro de un murciélago macho de la especie *Miniopterus schreibersi*, capturado aparentemente sano afuera de una cueva en el caucazo Ruso a 100 Km del pueblo de Krasnodar.

El antígeno presente en el cerebro pudo ser fácilmente detectado con los reactivos comunes para hacer diagnóstico de rabia por la técnica de IFD. El patrón antigénico que desplegó este virus, con el panel de anticuerpos monoclonales del CDC, fue totalmente distinto al de los demás lyssavirus, sin embargo el análisis genético de la secuencia completa del gen que codifica para la nucleoproteína demostró cierta similitud con las especies LBV y MOKV (Kuzmin *et al.*, 2005).

11. Kotonkan y Obodhiang

Este par de virus aislados de diferentes especies de mosquitos en el África fueron clasificados dentro del género *Lyssavirus* por presentar cruce antigénico con el virus Mokola y por estar aparentemente ligados a casos de encefalitis aguda en ganado en dicho continente. Actualmente, gracias a la disponibilidad de mayor número de secuencias, del gen que codifica para la nucleoproteína de diversos representantes de la familia Rhabdoviridae, se ha podido determinar que este par de virus forman parte del género *Ephemerovirus* (Bourhy H, *et. al.*, 2005; Kuzmin I, *et. al.*, 2006).

Tabla 2. Clasificación de los *Lyssavirus*

Genotipo o especie	Serotipo	Nombre o designación del prototipo (AB)	Distribución Geográfica	Animales reservorios y hospederos mas frecuentes
1	1	Virus de la rabia (RABV)	Cosmopolita; excepto en Australia, Inglaterra, Irlanda, Nueva Zelanda, Japón, Antártica, Bélgica, Suiza, Luxemburgo, Hawai.	Algunas especies de murciélagos, perros, zorros, mapaches, zorrillos, mangostas, coyotes, perros-mapaches, chacales, bovinos, cerdos, humanos, ganado en general, etc
2	2	Lagos bat (LBV)	Nigeria, Senegal, Zimbabwe, Rep. Centroafricana, Sudáfrica, Etiopia.	Murciélagos frugívoros (<i>Eidolon helvum</i>), <i>Rousettus aegyptiacus</i> , <i>Micropteropus pusillus</i> , <i>Epomophorus wahlbergi</i> , gatos, perros. Nunca hallado en humanos
3	3	Mokola (MOKV)	Nigeria, Camerún, Zimbabwe, República Centroafricana, Etiopia	Humanos, gatos, perros Musaraña (<i>Crocidura sp</i>), roedores (<i>Lophuromys sikapusi</i>)
ND	Relación antigénica con Mokola	Obodhiang (OBDV)	Sudan	Equinos, bovinos y mosquitos de la especie <i>Mansonia uniformis</i> . &Pertenece al genero <i>Ephemerovirus</i>
ND	Relación antigénica con Mokola	Kotonkan (KOTV)	Nigeria	Aislado de mosquitos del género <i>Culicoides sp</i> &Pertenece al genero <i>Ephemerovirus</i>
4	4	Duvenhage (DUVV)	Sudáfrica, Zimbabwe.	Humanos, murciélagos insectívoros <i>Miniopterus schreibersii</i> y <i>Nycteris thebaica</i>

& Basándose en el análisis filogenético del gen que codifica para su nucleoproteína, se estableció que estos dos virus son mas parecidos a los miembros del género *Ephemerovirus* que a los miembros del genero *Lyssavirus* (Bourhy *et al.*, 2005; Kuzmin, *et al.*, 2006 en prensa)

Tabla 2 Clasificación de los *Lyssavirus* continuación

Genotipo o especie	Serotipo	Nombre o designación del prototipo (AB)	Distribución Geográfica	Animales reservorios y hospederos mas frecuentes
5	Relación antigénica con DUVV	Lyssavirus de murciélagos europeos tipo 1 (EBLV-1) Variantes EBLV-1a, EBLV-1b	EBLV-1a, Holanda, Polonia, Dinamarca, Alemania, Hungría, Francia y Rusia, Bielorrusia, Lituania. EBLV-1b, Holanda, Francia y España.	Humanos y murciélagos insectívoros: <i>Eptesicus</i> y <i>Pipistrellus</i>
6	Relación antigénica con y genética con DUVV	Lyssavirus de murciélagos europeos tipo 2 (EBLV-2) EBLV- tipo 2, variante 2a variante 2b	Holanda, Alemania, Reino Unido, Ucrania. Suiza	Murciélagos insectívoros <i>Myotis dasycneme</i> , <i>Myotis daubentonii</i> y humanos.
7	Relación antigénica con RABV	ABLV	Australia, probablemente en Filipinas y Malasia	Murciélagos frugívoros zorras voladoras, <i>Pteropus alecto</i> , <i>Pteropus poliocephalus</i> , <i>Pteropus scapulatus</i> , y murciélagos <i>Saccolaimus flaviventrus</i> .
8	Relación genética con Khujand, EBLV-2	Aravan	Provincia de Osh, Kirguistan	Murciélago insectívoro, <i>Myotis blythi</i>
9	Relación genética con Aravan y EBLV-2	Khujand	Norte de Tayikistán en la región de Khujand	<i>Myotis mystacinus</i>
10	Relación genética con DUVV, EBLV-1	Irkut	Este de Liberia en el pueblo de Irkutsk	<i>Murina leucogaster</i>
11	Relación genética con LBV, MOKV	Virus del oeste del caucazo (WCBV)	Oeste del caucazo Ruso en el pueblo de Krasnodar	<i>Miniopterus schreibersi</i>

(AB); abreviatura, NU, no usado, ND no determinado

CAPÍTULO IV. RESERVORIOS Y VECTORES

A. Epizootiología de la rabia

La rabia es una zoonosis que afecta a todos los mamíferos, pero solo algunas especies dentro de los órdenes Carnivora y Chiroptera juegan un papel central para el mantenimiento y perpetuación del virus en la naturaleza (reservorios). Solamente cuando están infectados y enfermos, los reservorios son capaces de transmitir la enfermedad a miembros de su propia especie (transmisión intraespecífica) y a otras especies (transmisión interespecífica) con alta eficiencia (Smith, y Seidel, 1993). Los eventos de transmisión intraespecífica, derivados de la biología y comportamiento de los reservorios, son los principales responsables del mantenimiento enzoótico de la enfermedad en un sistema no intervenido por el hombre. Mientras que, los eventos de transmisión interespecífica derivan del contacto circunstancial de los reservorios con otras especies que pueden resultar en la interrupción de la circulación enzoótica del virus o en la adaptación del virus a nuevas especies propiciando el surgimiento de nuevos reservorios (Badrane, *et al.*, 2001, Childs, 2002, Holmes *et al.*, 2002). La combinación de factores que determinan el surgimiento de nuevos reservorios son desconocidos hasta hoy (Webby, *et al.*, 2004). Recientemente se han identificado diferentes variantes genéticas y antigénicas del virus de la rabia (estables en el tiempo) asociadas de forma específica a cada una de las especies de animales conocidas como reservorios (Bourhy, *et al.*, 1999, Holmes, *et al.*, 2002). A tales duplas también se les reconoce como ecotipos, ecotipo del perro, ecotipo de mapache, ecotipo de zorro gris, etcétera, (Smith y Seidel, 1993). Dichas variantes tienen una distribución discreta que abarca solo parte de la distribución natural de sus reservorios, existiendo de esta manera, zonas naturalmente libres de rabia (Rupprecht, *et al.*, 1987, Smith, *et al.*, 1989,

1993). Es por lo anterior que la presencia de la enfermedad depende de la coexistencia del virus y su reservorio específico y su eliminación o control esta en función del exterminio de cualquiera de los miembros de esta dupla. En este sentido la erradicación de la enfermedad del planeta dista mucho de lograrse, ya que hasta la fecha han sido identificadas varias duplas en una gran diversidad de ecosistemas y de especies de mamíferos (Rupprecht, *et al.*, 2005, Sacramento, *et al.*, 1992).

EPIZOOTIOLOGIA DE LA RABIA

RESERVORIOS DE LA RABIA

RABIA URBANA



Perro



Mapache



Coyote



Zorro gris



Zorro ártico

RABIA SILVESTRE



Vampiro



Murciélag
o café
grande



Murciélag
de pelo
plateado



Perro mapache



Zorrillo moteado



Zorrillo rayado



Mangosta



Murciélag
de pelo
cenizo



Murciélag
o rojo



Murciélag
de cola libre

RABIA ASOCIADA CON CARNIVOROS TERRESTRES

VECTORES



Gato



Hurón



Castores y perros
de la pradera



Cerdos



Humanos y
caballos



Vaca



Cabras y
borrego
s



RABIA ENZOOTICA

ESPECIES SUSCEPTIBLES

(HOSPEDEROS NO RESERVORIOS O ESPECIES TERMINALES)

Figura 4. Epizootiología de la rabia. Muestra algunas de las especies que juegan el papel más importante en el manteniendo de la rabia en la naturaleza (reservorios), las especies que pueden transmitir la enfermedad de forma circunstancial al hombre (vectores) y las especies susceptibles.

Las especies de mamíferos, entiéndase carnívoros terrestres, que fungen como reservorios de la enfermedad cursan generalmente con la forma

furiosa y durante el periodo de estado atacan inconteniblemente (Steele, *et al.*, 1992). Este tipo de comportamiento es poco conocido en los murciélagos (Constantine, 1971). El estado de portador sano en reservorios de la rabia no se ha comprobado, a pesar de que existen estudios en donde se ha detectado RNA viral en saliva y anticuerpos neutralizantes en suero de diferentes especies de murciélagos y hienas moteadas aparentemente sanos (East, *et al.*, 2001). En ninguno de estos casos se ha logrado aislar al virus de la rabia en saliva o en sistema nervioso central.

B. Principales reservorios de la rabia o del genotipo uno.

1. Perros

El perro es el animal que desde la primera civilización humana es reconocido como reservorio y principal transmisor de la enfermedad. Por lo anterior, la rabia esta muy ligada a la enfermedad en el perro y su transmisión al hombre. Desde los primero registros en el código de Eshunna, 2300 A.C., pasando por las descripciones detalladas de la enfermedad en perros y seres humanos en documentos de las grandes civilizaciones como la Griega y Romana, la rabia en el perro ha sido continuamente informada hasta la actualidad. Con excepción de algunos periodos en los que la presencia de la enfermedad tal vez fue ignorada por la presencia de epidemias asociadas a otros agentes infecciosos. La incidencia de la enfermedad en perros y en otras especies no es registrada con precisión antes de 1700 (Humphrey *et al.*, 1971, Johnson, 1971, Wilkinson, 2002).

La variante del virus de la rabia (genotipo, serotipo 1) específica de perros es la más ampliamente distribuida en el mundo. Sin embargo, en algunos países de Europa (Inglaterra, Suiza, Bélgica, Luxemburgo), Asia (Japón) y América (EEUU, Canadá, Chile, Uruguay) la variante del virus de la rabia asociada específicamente a perros ha sido erradicada y en los casos que se

llegan a presentar en estos países se han identificado variantes del virus asociadas a otros reservorios silvestres. La rabia en perro es un buen ejemplo para demostrar que la enfermedad se puede controlar, pero que para su erradicación en una especie se requiere de la eliminación simultánea de todas las variantes de virus asociadas a los demás reservorios hasta ahora conocidos (Childs, 2002).

Históricamente se tiene documentado que la introducción del virus de perro al continente Africano sucedió a partir de 1893, a través del traslado de perros infectados por los colonizadores ingleses (Johnson, *et al.*, 2004a, 2004b). Desde entonces la enfermedad se ha diseminado a varias especies de cánidos silvestres y actualmente es uno de los problemas principales que amenazan con llevar a la extinción a los perros salvajes africanos (Childs, 2002, Johnson, 1971, Smith *et al.*, 1992).

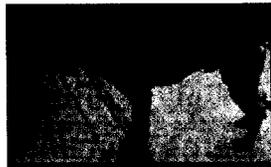


Figura 5. Perro doméstico (*Canis familiaris*)

2. Zorros.

La epizootia de rabia asociada a animales silvestres más grande informada en Europa y Norte América ocurrió en zorros rojos (*Vulpes vulpes*) a principios de 1940. En esta fecha la epizootia se detecto primero en el norte de Canadá de donde se diseminó rápidamente hacia el Sureste de Canadá y Noreste de EEUU a principios de 1960 (Wilkinson, 2002). Las variantes del virus de la rabia aisladas de zorros árticos (*Alopex lagopus*) y zorros rojos en Alaska y en Siberia son muy parecidas a las aisladas de zorros rojos en Nueva York, lo que sugiere una distribución circumpolar

Capítulo IV. Reservorios y vectores

con un posible patrón de diseminación intercontinental a través del estrecho de Berhing (Kuzmin *et al.*, 2004, Nadin-Davis *et al.*, 1999, 2006b). La información histórica y molecular hasta ahora acumulada sugiere que el origen de la variante del virus de la rabia asociada a zorros rojos en Europa proviene del virus de la rabia de perros. Sin embargo, el brote de rabia en zorros rojos en el Norte de América estuvo filogenéticamente relacionado con la variante de zorro ártico. Excluyendo la posibilidad de una diseminación masiva de la rabia de zorros de rojos de Europa hasta América, a través de l círculo polar ártico (Kuzmin *et al.*, 2004). En 1940 también se presentó una gran epizootia de rabia en el condado de Burke, Georgia, EEUU, en zorros grises (*Urocyon cinereoargenteus*) y rojos (*Vulpes vulpes*). Esta especie pronto se convirtió en la primera fuente de transmisión de rabia silvestre al ser humano en los EEUU en el periodo 1946 a 1965 (Wilkinson, 2002). Estas epizootias motivaron el desarrollo de vacunas orales para inmunizar animales silvestres a inicios de la década de los 60's en los EEUU y las primeras pruebas de campo se realizaron en Suiza en 1978 (Blancou, 1988). A pesar de que en algunos países de Europa se ha logrado erradicar la enfermedad, en muchos otros la rabia en zorro sigue siendo enzoótica (Childs, 2002).

La distribución de la rabia enzoótica en zorro gris empezó a disminuir a mediados de la década de los 60's circunscribiéndose a una pequeña región del sur de los EEUU, que actualmente comprende parte de los estados de Arizona y Texas (Krebs, *et al.*, 2002, Rhode, *et al.*, 1997, Smith, 1996). Las causas de este dramático descenso no han sido estudiadas a profundidad, sin embargo podrían estar asociadas a la disminución y fragmentación de las poblaciones de zorros por causa del hombre, entre otros factores. La vacunación oral de fauna silvestre en los EEUU inicio a principios de la década de los 80 (Rupprecht, *et al.*, 2005, Sureau, 1988).



Figura 6. Especies de zorro. A. Zorro rojo (*Vulpes vulpes*); B. Zorro ártico *Lepus arcticus*; Zorro gris (*Urocyon cinereoargenteus*)

La rabia en otras especies de zorros también se ha notificado en África (*Otocyon megalotis*) y medio oriente (*Vulpes vulpes*) como problemas enzoóticos (Sacramento *et al.*, 2002). Los datos del estudio de estas variantes a nivel genético sugieren que su origen también es el virus de perro (Steele y Fernandez 1992, Smith *et al.*, 1992). En el medio oriente también se están haciendo esfuerzos de proporcionar vacuna oral a zorros pero no sucede lo mismo en África (Rupprecht *et al.*, 2005).

3. Zorrillos.

El antecedente más antiguo sobre la presencia de rabia en zorrillos en América se registra en California, EEUU, en el año de 1826. En este, se implica al zorrillo manchado (género *Spilogale*) como transmisor de la enfermedad al hombre. Más de 15 especies de zorrillos incluidas en tres géneros habitan en norte América, pero el zorrillo rayado (*Mephitis mephitis*) es el más abundante en EEUU y Canadá (Crawford-Miksza, 1999, Johnson, 1971). Desde 1950 se han informado nueve casos de rabia asociados a la transmisión por zorrillos en EEUU y Canadá. El último caso ocurrió en Arizona en 1970 y en México se empieza a notificar a finales de 1997 (Childs, 2002). Los zorrillos fue el grupo de animales dentro de los mamíferos terrestres que más comúnmente fue registrado como rabioso en los EEUU dentro el periodo 1960 a 1990 (Krebs, *et al.*, 2002, 2005). Estudios llevados a cabo en Norte América sobre el comportamiento

epizootiológico de la enfermedad en el tiempo, han determinado que existe una recurrencia de grandes brotes de rabia en zorrillos cada 6 u 8 años con periodos a veces mas cortos de cuatro años (Childs, 2002, Johnson, 1971).

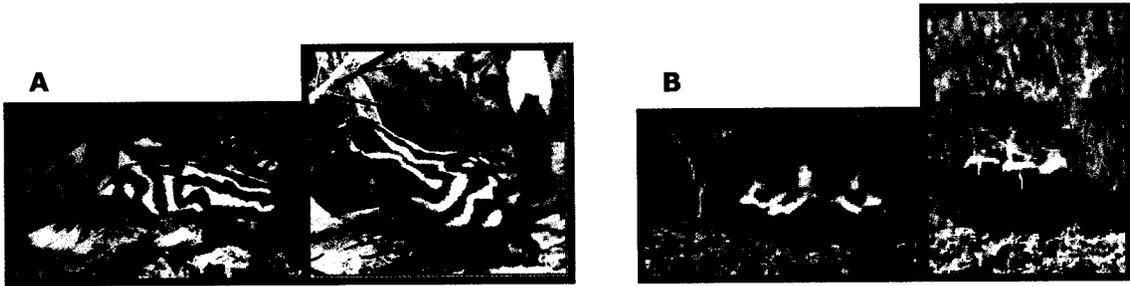


Figura 7. Especies de zorrillo. A. Zorrillo moteado (*Spilogale putorius*); B. Zorrillo rayado (*Mephitis mephitis*)

Estas fluctuaciones han estado relacionadas a incrementos en las poblaciones de zorrillos y los picos de máxima incidencia se presentan en primavera y otoño, predominando en algunas regiones el pico de primavera. En los EEUU y Canadá, la enfermedad en zorrillos esta asociada mas a ecosistemas de pradera en donde se ha comprobado que la enfermedad es el principal control biológico de las poblaciones de zorrillos (Guerra *et al.*, 2003).

4. Mapaches

La rabia en mapaches (*Procyon lotor*) se convirtió en un problema de salud pública desde el primer brote documentado en Florida en el año de 1940 (Childs, 2002, Wilkinson, 2002). La enfermedad se disemino gradualmente hacia el norte a los Estados de Georgia, Alabama y Carolina del Sur dentro del periodo 1960 a 1970. Dentro del patrón espacio temporal de diseminación de la rabia en mapache se han detectado de forma esporádica grandes saltos de la enfermedad de una zona a otra. Esto se debe a que mapaches infectados en periodo de incubación son movidos grandes distancias (translocación), con propósitos de comercialización o

cacería deportiva (Rupprecht, 1987, Smith, 1989, 1996). En ciertas ocasiones también se ha reportado translocación de animales en contenedores de basura, los cuales se han convertido en el hábitat favorito de los mapaches. El virus de la rabia asociado específicamente a mapaches es antigénica y genéticamente distinguible de otros virus asociados a otros reservorios primarios como zorrillos, zorros, perros mangostas, etcétera. Esta epizootia de rabia en mapaches se ha convertido en una de las más grandes de la historia de la rabia en animales silvestres (Niezgoda, 2002). Circunscrita solo a la costa este de los EEUU, desde Florida hasta el sureste de Canadá, se han registrado más 50, 000 casos en mapaches en el periodo que comprende desde 1975 hasta la fecha. Se ha calculado que la epizootia se ha movido a razón de 30 a 47 Km por año a través de la costa del Atlántico (a partir de Florida), extendiéndose hacia la región central de EEUU alcanzando Ohio en 1996 y Ontario, Canadá en 1999 (Childs, 2002, Nadin-Davis, *et al.*, 1993, 2006c). Este ritmo de diseminación motivó la instauración de campañas intensivas de vacunación oral, con la intención de crear barreras que limitaran su diseminación hacia el oeste y al norte, ya que la distribución natural de los mapaches prácticamente abarca la mayoría del territorio continental de los EEUU y Canadá (Slate *et al.*, 2005).



Figura 8. Mapache (*Procyon lotor*)

5. Coyotes

El coyote (*Canis latrans*) es un carnívoro con un comportamiento variable y con una capacidad muy alta de adaptación. Se encuentra distribuido desde Alaska hasta Panamá. Con la desaparición del lobo gris como principal depredador del coyote, este último ha incrementado significativamente su número y ampliado su distribución. Su organización social comprende, individuos solitarios con un área territorial de 50 Km², parejas monogamas o pequeñas jaurías (Fa y Morales, 1998, Hall, 1981).

El primer brote de rabia en coyotes fue descrito en Óregon, EEUU en el año de 1910, el cual precedió a una epizootia que abarco parte de los estados de California, Óregon, Nevada y Utah de 1915 a 1917 (Humphrey 1971). Antes de 1988 la rabia en coyotes (*Canis latrans*) solo era registrada de forma esporádica en el suroeste de los EEUU, con algunos casos esporádicos en el sur de Texas (Smith, 1989, 1996). Sin embargo, una nueva variante del virus de la rabia identificada en ese año empezó a diseminarse rápidamente en poblaciones de coyotes de sur de Texas. Dicha epizootia creció de forma moderada notificándose para 1991 un total de 42 casos, los que alcanzaron un máximo de 80 casos en 1995, solo en el estado de Texas (Krebs et al., 2002). Para este año se reportó exportación de casos a los estados de Florida y Alabama, lo que motivo el inicio de la vacunación oral en coyotes a principios de 1995 y su descenso a casi desaparición de la región en el 2003 (Krebs et al., 2005).

Hasta la fecha, las variantes de perro que circulan en México son indistinguibles antigénica y genéticamente de las que se han hallado en coyotes, por lo que se ha postulado que la variante de coyote surgió de la adaptación de la variante de perro (Smith, 1996).

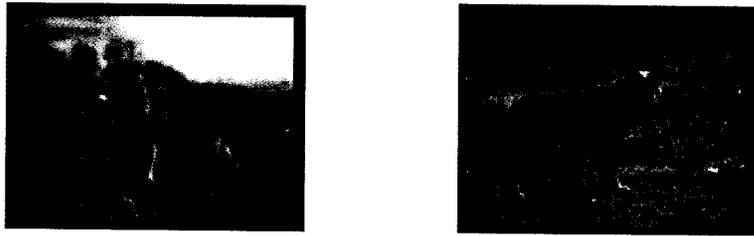


Figura 9. Coyote (*Canis latrans*)

El coyote, al igual que el perro mapache, es considerado un reservorio emergente de la rabia (Rhode, 1997, Smith y Seidel, 1993).

6. Mangostas

Las poblaciones de mangostas que ahora habitan en el Caribe fueron importadas de la India (*Herpestes javanicus auro-punctatus*) a Jamaica en 1870, para el control de las poblaciones de roedores en las plantaciones de caña de azúcar (Childs, 2002, Humphrey, 1971). Esta especie es capaz de mantener la enfermedad de forma enzoótica. Algunos autores han sugerido que la rabia pudo haber sido introducida al Caribe a través de estos animales, sin embargo, los informes oficiales sobre la presencia de la enfermedad datan de 1950, en Puerto Rico (Steele y Fernandez, 1992, Sureau, 1988). A partir de ese año la enfermedad también empezó a ser detectada en Cuba, Grenada y Republica Dominicana. Los datos sobre el secuenciamiento nucleotídico del virus de la rabia aislado de mangostas en el Caribe han permitido detectar diferentes linajes asociados a diferentes países de la región, lo que sugiere que la enfermedad en esta especie pudo haber sido introducida en la región en varios eventos independientes o que dichas diferencias se deben a aislamiento por distancia de los focos rábicos que se originaron por la diseminación de un foco primario (Smith et al., 1992). Al comparar el virus de la rabia obtenido de mangostas en Asia (Pakistán, India) y África (Sudáfrica, Nigeria y Namibia) con el de mangostas del Caribe se encontró mucha divergencia entre ellos. Sin

embargo, la similitud entre el virus de la rabia de mangostas de América y el de perros sugiere que el virus de las mangostas en América pudo haber surgido de la adaptación del virus de perro.

En África, las mangostas amarillas (*Cynictis penicillata*) también se han reportado como un reservorio estable de la enfermedad (Nel, et al., 2005). Al menos dos linajes asociados a esta especie se han encontrado circulando en el continente hasta ahora (Bourhy et al., 1993, 1999). El primer antecedente de la enfermedad en África, también está ligado a la importación de perros infectados en periodo de incubación desde Inglaterra en 1893 (Nel, et al., 2005). Sin embargo, la evidencia filogenética de ambos virus sugiere que la rabia de mangostas ya existía en el continente antes de que la rabia de perros llegara a este (Kissi et al., 1995).



Figura 10. A. Mangosta asiática importada al caribe (*Herpestes javanicus auropunctatus*); B. Mangosta amarilla africana (*Cynictis penicillata*)

7. Perro-mapache

El perro mapache (*Nyctereutes procyonoides*) es un animal físicamente muy similar al mapache pero que en realidad es un cánido. La distribución natural de la especie comprendía originalmente parte del territorio de Corea, Japón, China y el este de la ex Unión Soviética. Sin embargo durante las décadas de los 30's y 40's varios miles de ellos fueron trasladados al este de Rusia de donde fueron dispersados a Europa del Oeste para el comercio de sus pieles abarcando; Polonia, Alemania, Francia, la República Checa, República Eslovaca, Rumania, Finlandia,

Suecia, Rumania y prácticamente todos los países del Báltico (Childs, 2002). Esta especie actualmente ha jugado un papel muy importante en la diseminación de la rabia en Europa, sin embargo los brotes han estado ligados a la rabia en zorros rojos (Park *et al.*, 2005). Dada la gran susceptibilidad de esta especie para adquirir y transmitir la rabia y a que sus poblaciones y distribución han alcanzado a la de los zorros rojos en toda Europa, los perros-mapaches se han convertido en un riesgo potencial como un reservorio emergente de la enfermedad (Bourhy *et al.*, 1999).

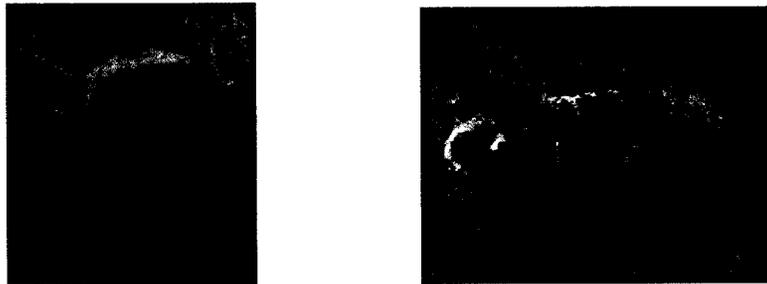


Figura 11. Perro mapache *Nyctereutes procyonoides*

C. Reservorios murciélagos

El orden Chiroptera, al cual pertenecen los murciélagos, es uno de los grupos más diversos de mamíferos. A nivel mundial están descritas más de 927 especies, las cuales habitan todos los continentes con excepción de la Antártica (Hall, 1981). Prácticamente se les encuentra en cualquier ambiente terrestre, desde las selvas tropicales hasta dentro del círculo polar Ártico y desde islas oceánicas hasta alturas de más de 3, 500 metros. Hace un poco más de 30 años los murciélagos no eran considerados como reservorios naturales de la enfermedad, sin embargo eso ha cambiado conforme el estudio de la rabia se ha profundizado y los habitats naturales de estas especies han sido invadidos o perturbados por asentamientos humanos (Messenger, *et al.*, 2002).

1. Murciélagos hematófagos

La rabia en murciélagos hematófagos probablemente ha existido en América desde antes de la colonización europea. Crónicas españolas de la época relatan sobre la muerte de soldados y caballos después de haber sido atacados por murciélagos vampiros. La rabia de murciélagos hematófagos esta íntimamente ligada a la rabia en bovinos, por ser estos, la principal fuente de alimentación de los murciélagos hematófagos (Greenhall, 1988).

El primer reporte científico sobre la presencia de rabia en bovinos fue realizado en Brasil en el año de 1908 (Carini, 1911). En 1931 se aisló por primera vez al virus a partir de diferentes especies de murciélagos rabiosos, incluyendo murciélagos vampiros (Haup y Rehaag, 1921). Después de 1932 y hasta la fecha la presencia de rabia transmitida por vampiros también ha sido encontrada en varios países del continente Americano, como; México, Guatemala, El Salvador, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Argentina, Perú, Colombia y Bolivia (Constantine, 1971, Bourhy, *et al.*, 1993, De Mattos, *et al.*, 1996, 1999, Favi, *et al.*, 2003, Ito, *et al.*, 2001, Nadin-Davis, *et al.*, 2006). Estudios sobre la variación antigénica de los virus aislados a partir de murciélagos hematófagos y bovinos rabiosos han permitido identificar al menos tres variantes con una amplia distribución en las zonas tropicales y subtropicales desde México hasta Brasil (De Mattos, *et al.*, 1999, Ito *et al.*, 2001).

La especie *Desmodus rotundus* ha demostrado ser el principal reservorio del virus de la rabia en murciélagos hematófagos (Childs, 2002, Krebs, 2004). El papel de las otras dos especies, *Diphylla ecaudata* y *Diaemus youngi*, como reservorios del virus es desconocido (Greenhall, 1988). Sin embargo, debido al bajo número de sus poblaciones y a la severa fragmentación de sus habitats naturales estas especies se han convertido en un reservorio poco probable de la enfermedad.

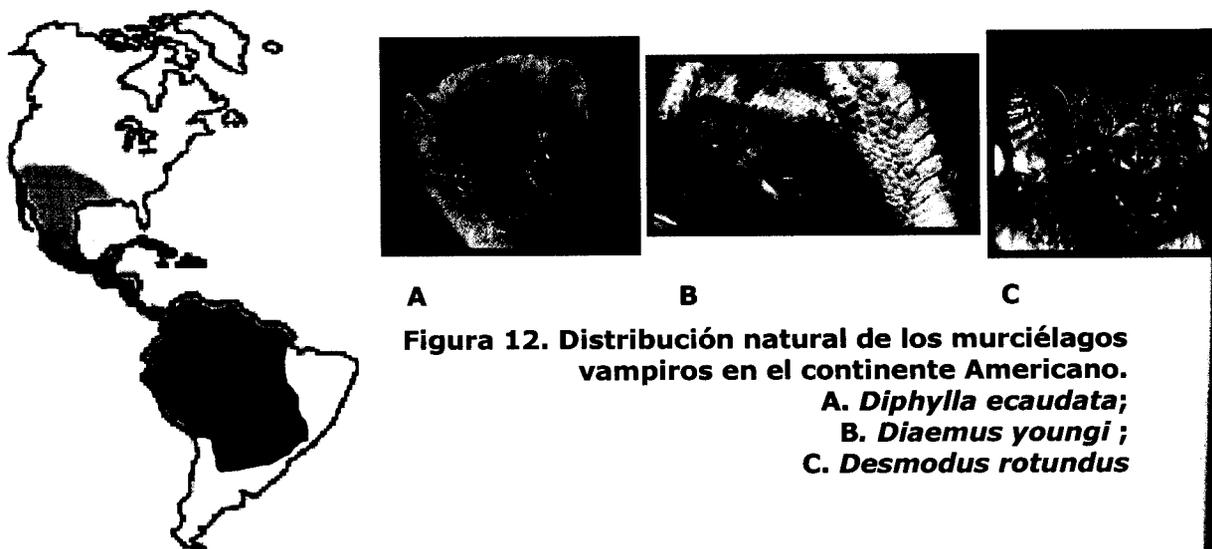


Figura 12. Distribución natural de los murciélagos vampiros en el continente Americano.
A. *Diphylla ecaudata*;
B. *Diaemus youngi* ;
C. *Desmodus rotundus*

2. Murciélagos insectívoros

El primer diagnóstico de rabia en una especie de murciélago no hematófago fue hecho en Brasil en el año de 1916 (Baer y Smith 1991), en un murciélago frugívoro (*Artibeus sp*). Desde entonces y hasta la fecha se han seguido detectando casos de rabia en murciélagos frugívoros en Brasil (*Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, entre otros), pero gracias a los grandes avances en la caracterización molecular del virus rábico ahora se sabe que el origen de la infección ha sido el murciélago hematófago *Desmodus rotundus* (Ito, et al., 1999, 2003).

La primer epizootia de rabia en murciélagos insectívoros se registro en Florida, EEUU en 1953 en la especie *Tadarida brasiliensis*, desde entonces ha habido casos esporádicos de rabia en seres humanos transmitidos por esta especie (Constantine, 1971). Esta especie de murciélago ha sido capaz de mantener independientemente la enfermedad de forma enzoótica por mucho tiempo, por lo cual es considerada como un reservorio natural al igual que los vampiros (Baer, 1991).

Durante el periodo 1990 a 2000, la mayoría de casos de rabia en seres humanos transmitidos por murciélagos (18/24) fueron provocados por dos

especies *Lasionycteris noctivagans* y *Pipistrellus subflavus* (Messenger et al., 2002, 2003). La misma variante del virus ha sido identificada en ambas especies (Smith, 2002).

Otras especies como *Eptesiscus fuscus*, *Myotis sp*, *Lasiurus cinereus* y *Lasiurus borealis* también han sido reportadas como responsables de transmitir la enfermedad a humanos en los EEUU, y han sido encontradas infectadas de manera recurrente durante al menos 40 años (Smith, 2002). Por lo anterior, también se les ha considerado como capaces de mantener enzoótica la enfermedad y por lo tanto de ser reservorios independientes (Constantine, 1971, Smith, 2002).

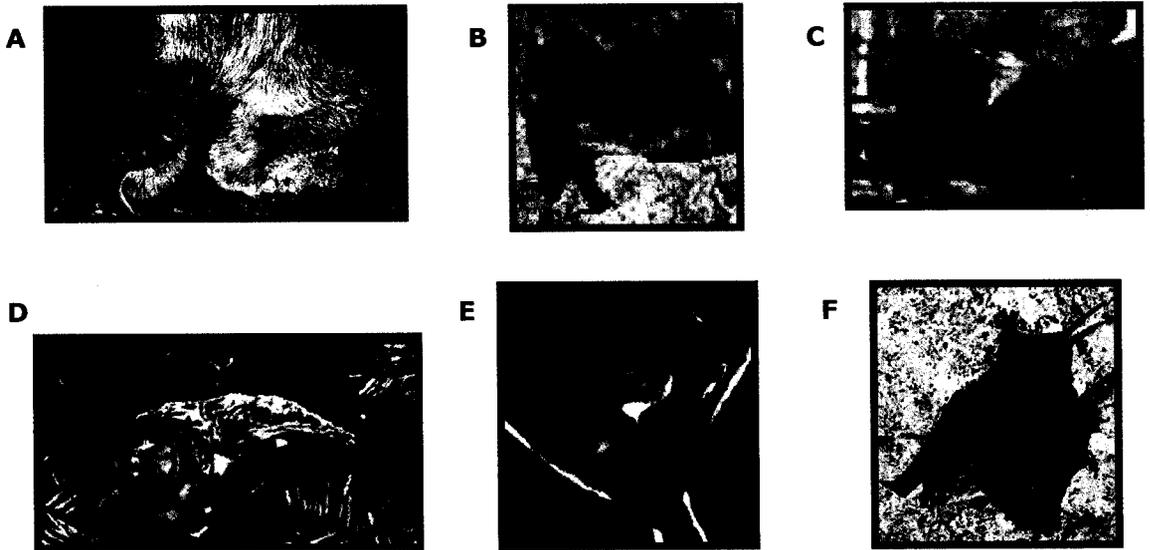


Figura 13. Especies insectívoras. A. Vampiro (*Desmodus rotundus*); B. Murciélago café grande (*Eptesicus fuscus*); C. Murciélago de pelo plateado (*Lasionycteris noctivagans*); D. Murciélago de pelo cenizo (*Lasiurus cinereus*); E. Murciélago rojo (*Lasiurus borealis*); F. Murciélago de cola libre (*Tadarida brasiliensis mexicana*).

D. Principales vectores de la rabia.

En la literatura sobre el tema se refiere como especies vector de la rabia a aquellas que al contraer la enfermedad a partir de un reservorio natural son capaces de transmitirla de forma eficiente a otras especies, sin jugar un papel central en su mantenimiento en la naturaleza (Smith, 1989, Smith y Seidel 1993). Lo anterior probablemente debido a diferencias ecológicas, socio-biológicas y demográficas con las especies que son verdaderos reservorios. Todas las especies que son reservorios de la rabia también son reconocidas como vectores, capaces de transmitir la enfermedad eficientemente, pero no todos los vectores son también reservorios. Hasta la fecha no se han identificado nuevas variantes del virus mantenidas de forma estable por estas especies (Steele y Fernandez, 1992).

1. Gato doméstico

El gato es el animal domestico en el que se reportan la mayoría de casos de rabia en países donde se ha erradicado la rabia en perro, y se ha asociado con la transmisión de rabia a seres humanos en varios países de América Latina y en países desarrollados (Belotto, et al., 2005). El último caso de rabia en humano transmitido por gato en los EEUU fue reportado en Minnesota en el año de 1975 (Krebs, et al., 2002). Actualmente en todo el mundo se proporciona tratamiento post exposición a cualquier persona agredida por un gato rabioso. La mayoría de casos de rabia en gatos han estado asociados a la transmisión de la enfermedad por otros reservorios terrestres como mapaches, zorros y zorrillos (Krebs, et al., 2004). La transmisión por murciélago también ha sido documentada, aunque en muy pocos casos. Hasta la fecha ningún felino en el mundo, ha sido registrado como reservorio estable de alguna variante del virus de la rabia (Ito, et al., 1999).



Figura 14. Gato domestico (*Felis catus*)

2. Lobos

En 1271 una epizootia de rabia en lobos con implicación de casos en humanos es reportada en la antigua Franconia. Hacia el año 1700, otros brotes que implicaron zorros y lobos también fueron reportados en Europa, pero no existen datos precisos sobre la prevalencia o incidencia de la enfermedad en esta época (Wilkinson, 2002). Más recientemente el lobo ha sido reportado como una de las especies que son capaces de transmitir la enfermedad a otras especies (buenos vectores) en Asia central (Rusia, las Republicas Bálticas, Pakistan, Afganistán, India), sin embargo el numero reducido de individuos y la fragmentación de su ecosistema han provocado que esta especie, actualmente, no juegue un papel importante para mantener la enfermedad de forma enzoótica en la naturaleza (Mebatsion, *et al.*, 2002). Los estudios genéticos de las variantes del virus asociadas a esta especie, también sugieren que ellos provienen de una diseminación y adaptación posterior del virus de zorro (David, *et al.*, 1999, 2000; Kuzmin, *et al.*, 2005; Nadin-Davis, *et al.*, 2003; Yakobson *et al.*, 2006).

Las poblaciones de lobos en Europa oriental y Asia central en alguna época estuvieron en peligro de extinción, sin embargo la cruce de lobos (*Canis lupus*) con perros (*Canis familiaris*) han producido una estirpe híbrida que es igualmente susceptible a la enfermedad y que ha demostrado podría ser un buen reservorio del virus (Holmes, *et al.*, 2002).

Actualmente las poblaciones de estos híbridos de lobos se están recuperando y podrían generar problemas de salud pública en la región si una nueva variante del virus se lograra adaptar a ellos en el mediano plazo (Blancou, 1988).

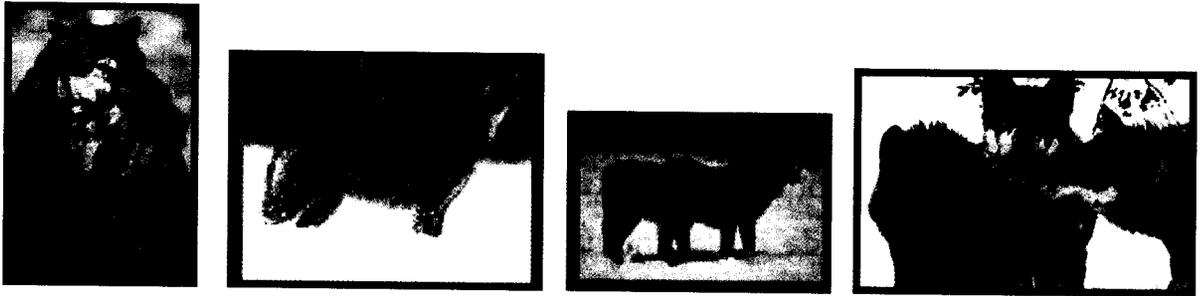


Figura 15. Lobos (*Canis lupus*)

3. Chacales

El chacal (*Canis aureus*) fue reconocido como el primer reservorio silvestre de la enfermedad en el medio oriente (Irán, Jordania, Siria, Líbano) a mediados de la década de los 50's. Sin embargo, el exterminio de la especie en la década de los 60's eliminó el problema dejando al zorro como el reservorio principal de la enfermedad en la región (Blancou, 1988, Yacobson, *et al.*, 2006).

La gran similitud de este virus con el del zorro, conduce a las mismas sugerencias que para el caso del origen de la rabia en los lobos (Bourhy, *et al.*, 1999, Kuzmin, *et al.*, 2004). En África la rabia en chacales (*Canis mesomelas*) tiene una historia muy similar y al igual que con el lobo la fragmentación de sus ecosistemas y el descenso dramático de sus poblaciones lo han convertido en una especie incapaz de mantener la enfermedad en la naturaleza (Johnson, *et al.*, 2004a, 2004b; Mebatsion, *et al.*, 1992).



Figura 16. Chacal (*Canis aureus*)

4. Hurones

Los hurones (*Mustela putorius furo*) se han convertido en una de de las mascotas mas populares de varios países. Por el número de casos de rabia detectados en esta especie la vacunación antirrábica profiláctica ha sido igualmente recomendada que para perros y gatos. Cuando se sospecha de rabia en esta especie y existe el antecedente de agresión a seres humanos, se han recomendado periodos de observación de 10 días antes de iniciar el tratamiento post exposición y el sacrificio del animal. Por estudios de patogénesis y patobiología se sabe que los hurones pueden ser buenos vectores de algunas variantes del virus de la rabia (Childs, 2002, Krebs, et al., 2002).

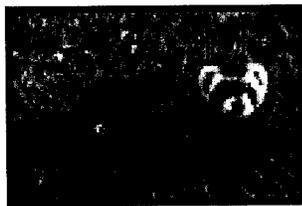


Figura 17. Hurones (*Mustela nigripes* o *Mustela furo*)

5. Felinos salvajes.

Los felinos salvajes (lince, pumas, jaguares, leones, chitas, tigres, leopardos, etcétera) al igual que lobos y chacales han demostrado ser buenos vectores de la enfermedad, pero hasta la fecha no se les ha asociado como reservorios (Johnson, 1971). Varios de estos animales han estado directamente ligados a la transmisión de la enfermedad a humanos en varias partes del mundo (Krebs, *et al.*, 2002, Mebatsion, *et al.*, 1992, Smith, *et al.*, 1996). Al igual que con otros mamíferos vectores de la rabia, factores relacionados con su ecología, biología, demografía, sociobiología, patogénesis y patología podrían estar relacionados con su impedimento para establecerse como reservorios estables de la enfermedad (Smith y Seidel 1993).



Figura 18. Felinos salvajes. A. Ocelote; B. León, Leopardo y Tigre; C. Puma

6. Primates

Durante el periodo 1991-1998 en el Estado de Ceará, Brasil se confirmaron 8 casos de rabia en seres humanos en los que el monito sagui (*Callithrix jacchus*) fue el transmisor primario (Favoretto, *et al.*, 2001). Estudios moleculares del virus identificaron una nueva variante que agrupa en un clado polifilético asociado con virus de la rabia de origen en murciélagos. Sin embargo, el grupo de aislamientos relacionados con el sagui forma un grupo monofilético, dentro del clado anterior, que segrega independientemente a cualquier otro reservorio conocido hasta la fecha en América (Favoretto, *et al.*, 2002). Aunque la variante de sagui pudiera

haber tenido un origen no reciente en un virus originalmente mantenido por murciélagos, la variante se esta registrando de forma enzoótica en la región asociada a estos primates, la divergencia genética de la variante de virus aislada con las demás variantes del virus descritas en otros reservorios de América y su relación con la transmisión eficiente al humano, sugieren que este pequeño primate pudiera ser un nuevo reservorio de la enfermedad o al menos que se ha convertido en un buen vector de una variante asociada a un reservorio murciélago no descrito hasta la fecha (Childs, 2002, Smith, 2002).



Figura 19. Mono sagui (*Callithrix jacchus*)

7. Otros mamíferos carnívoros: Otros mustélidos, procyonidos y vivérridos

Varios miembros de estas tres familias de carnívoros han sido encontrados infectados de forma circunstancial con el virus de la rabia, sin embargo su papel como posibles vectores o reservorios ha sido poco estudiado o es desconocido hasta la fecha (Childs, 2002; Krebs, *et al.*, 2005; Niezgodá, 2002).

8. Otras especies susceptibles que generalmente se encuentran infectadas

Los siguientes grupos de mamíferos se han encontrado rabiosos en regiones geográficas en donde el virus esta circulando en reservorios naturales de la enfermedad y por lo tanto las variantes del virus de la

rabia aisladas de ellos han correspondido a las descritas en estos (Childs, 2002; Niezgodá, 2002).

9. Roedores y lagomorfos

A pesar de ser el orden más grande de mamíferos por el número de especies que contiene y el número de individuos que actualmente existen en el mundo, los roedores no se han descrito como reservorios naturales de la enfermedad ni se han encontrado asociados con la transmisión de la rabia a seres humanos ni a ninguna otra especie en el mundo (Childs, 2002).

La detección de rabia en roedores depende, en parte, de varias variables que incluyen; la probabilidad de su contacto con un reservorio infectado y en periodo infectivo, la capacidad del animal de sobrevivir después de haber tenido un encuentro violento y traumático con el reservorio rabioso, la probabilidad de que un roedor ya infectado pueda evitar ser depredado antes de presentar signos de la enfermedad o cuando ya presenta daño evidente asociado con encéfalomiелitis y a la probabilidad de que el roedor sea hallado por un humano y enviado al laboratorio para su diagnóstico (Trimarchi y Smith, 2002). De esta manera la rabia solo se ha logrado diagnosticar en roedores con pesos mayores a 1 Kg y las especies que se han reportado frecuentemente infectadas son las marmotas o perros de la pradera (*Marmota flaviventris*) y castores (*Castor canadensis*). En estos la variante de virus encontrado ha sido el asociado con mapaches (Krebs, *et al.*, 2002, 2005, Niezgodá, 2002).

Hasta la fecha no existen reportes del hallazgo de otros roedores como ratas y ratones infectados naturalmente con el virus al igual que de ningún lagomorfo como conejos (Ito *et al.*, 2002).



Figura 20. A. Marmota o perro de la pradera (*Marmota flaviventris*); **B.** Castor (*Castor canadensis*)

10. Bovinos y ganado en general

Los bovinos y otras especies de ganado como caballos, cerdos, cabras, borregos, mulas, etcétera han sido encontradas infectadas con el virus de la rabia (Krebs, *et al.*, 2002, 2005). Estas especies predominantemente desarrollan cuadros clínicos de rabia paralítica o muda, aunque ocasionalmente también pueden presentar la forma furiosa. Las variantes del virus de la rabia encontradas en cualquiera de estas especies siempre son las que están circulando en los reservorios naturales de la enfermedad en la región. Por ejemplo, en América Latina la variante del virus de la rabia que más frecuentemente se ha aislado de ellos es la asociada con murciélagos hematófagos (De Mattos, *et al.*, 1999, Ito, *et al.*, 2001, 2003). En contraste con lo que sucede en EEUU, en donde la variante encontrada coincide con el reservorio terrestre más común de la región (Krebs, *et al.*, 2002, 2005).

La transmisión rumiante-rumiante, estable en el tiempo, no ha sido reportada para ninguna de estas especies. Con la única excepción de un brote que ocurrió en África, Namibia 1977 a 1983, en el que una especie de antílope (*Tragelaphus strepsiceros*) se encontró infectada con una variante de virus de perro endémica en África (Johnson, *et al.*, 2004a, 2004b). La cantidad de casos que se presentaron en esta especie rebasó, por mucho, al número de casos observados o reportados en perros. Dicho comportamiento epizootiológico hizo pensar en la presencia de transmisión

de la enfermedad antilope-antilope, lo que tampoco fue comprobado ampliamente (Childs, 2002; Mansfield, *et al.*, 2006; Smith y Seidel, 1993,).

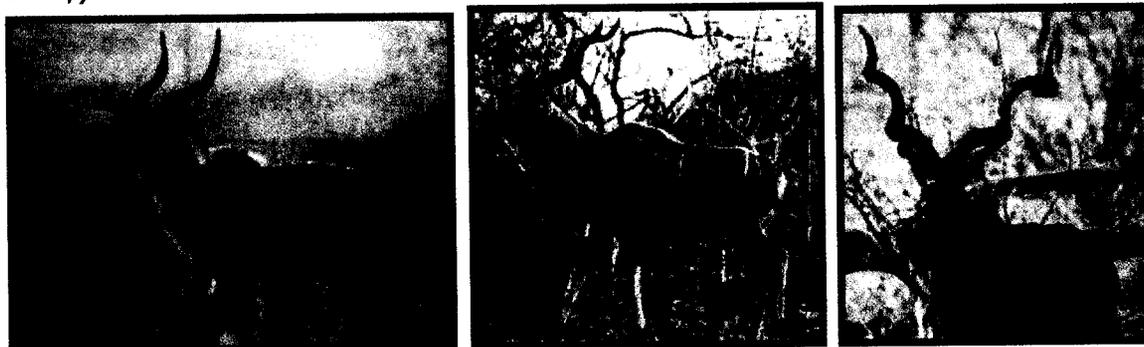


Figura 21. Kudu (*Tragelaphus strepsiceros*)

E. Historia natural de la infección y patogénesis

La rabia es una enfermedad provocada por todos los miembros del género *Lyssavirus* que afecta en forma aguda al Sistema Nervioso Central (SNC) y se transmite principalmente por la mordedura de un reservorio infectado y enfermo (Matsumoto, *et al.*, 1962). Se caracteriza por afectar a todos los mamíferos, incluyendo al hombre, en quienes produce encefalitis, cambios de conducta, parálisis, para cardio-respiratorio y muerte. Existen varias vías de infección actualmente conocidas, tales como la transcutánea, epidérmica, aérea o por aerosoles y la digestiva. Sin embargo como mecanismos de transmisión, las vías transcutánea y epidérmica (a través de mucosas lesionadas), son las únicas relacionadas con el mantenimiento enzoótico de la enfermedad. Las otras vías de transmisión documentadas son simplemente accidentes incluyendo la transmisión persona a persona (Wunner, 2002).

Al alcanzar las neuronas del sistema nervioso periférico (SNP), el virus se disemina hacia el sistema nervioso central (SNC) a través de las uniones sinápticas y el sistema rápido de transporte axonal (virus completos o solo nucleocapsides), en lo que también se conoce como diseminación centrípeta (Murphy, *et al.*, 1973; Jackson y Park, 1999; Tsiang, *et al.*,

1986). Se ha determinado que la infección avanza a razón de 50-100nm por día (Tsiang *et al.*, 1991). Como el movimiento del virus de la rabia en el sistema nervioso es estrictamente retrogrado (de los nervios periféricos hacia SNC), este se ha utilizado para descifrar las rutas neuronales en las que se ha descubierto que el virus logra alcanzar el sistema límbico, principalmente vía nervios motores y no nervios sensores (Kietdumrongwong y Hemachudha, 2005). Una vez que el virus alcanza el encéfalo este se multiplica masivamente en centros nerviosos que mantienen funciones autónomas (sistema parasimpático, respiración, presión arterial, temperatura, etcétera) y su daño irreversible es lo que conduce a la muerte a cualquier animal susceptible que es infectado y no recibe profilaxis a tiempo (Jackson y Park, 1999). Al inicio de la enfermedad, cuando los primeros signos de disfunción neuronal se presentan, no hay evidencia de cambios histopatológicos y es en esta fase cuando comienza la diseminación del virus del SNC hacia diferentes órganos y regiones anatómicas de la economía altamente inervados, en lo que también se conoce como proceso de diseminación centrifuga. El virus utiliza nervios somáticos y autónomos durante este proceso de diseminación para alcanzar músculo esquelético y cardiaco, glándulas adrenales, riñones, retina, córnea, páncreas, inervaciones de los folículos pilosos e hígado (CDC, 2004; Kietdumrongwong *et al.*, 2005; Srinivasan *et al.*, 2005). También se presenta replicación masiva y excreción abundante de virus en las glándulas salivales, por lo que existe gran cantidad de partículas virales infectivas en la saliva, las cuales son capaces de causar infección en otros mamíferos cuando existe la inoculación de estos vía una mordida o lamida.

El periodo de incubación promedio de la enfermedad es de 3 semanas a tres meses y su duración depende de las características biológicas de la variante del virus que infecta, de la magnitud del inóculo, de la inervación nerviosa en el sitio de entrada y de la proximidad de la lesión al SNC

(Wunner, 2002). Existen reportados en la literatura periodos de incubación extremos de menos de dos semanas y hasta 6 años, en los que no existió suficiente evidencia de laboratorio que respalde, inclusive, la presencia de rabia. En los casos anteriores la enfermedad fue diagnóstica únicamente por la presencia de signos y síntomas compatible con encefalitis (Childs, 2002).

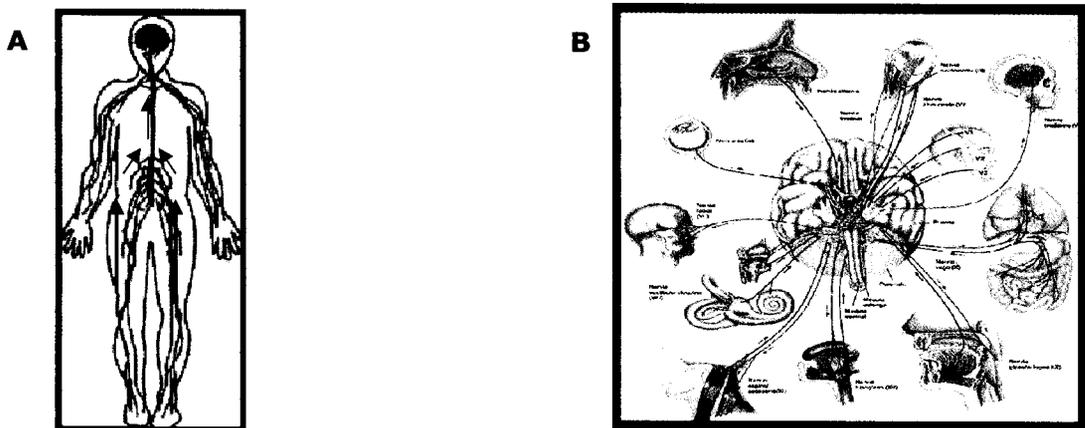


Figura 22. Vías de diseminación. A. Centrípeta. Sistema nervioso periférico (SNP) hacia el sistema nervioso central (SNC). B. Centrífuga. Sistema nervioso central (SNC) hacia diferentes órganos de la economía.

CAPÍTULO V. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

El avance exponencial de la biología molecular y la adaptación de diferentes metodologías dentro de esta disciplina para estudio de los patógenos, ha revolucionado de forma significativa la manera en la que ahora se aborda la epidemiología de las enfermedades infecciosas. El polimorfismo molecular y genético de los diversos patógenos que ahora conocemos, ha sido moldeado por las diversas fuerzas evolutivas que han actuado sobre ellos durante su interacción con el medio ambiente y sus hospederos a lo largo de su historia. Por lo tanto, es pertinente tratar de interpretar la historia de un patógeno en términos de la evolución de su genoma mediante el uso herramientas de evolución molecular. En la actualidad, la epidemiología molecular, busca la definición, identificación y el rastreo espacial y temporal de los patógenos a nivel de especies, subespecies, cepas, clonas o genes de interés mediante el uso de técnicas de biología molecular y de biología evolutiva que a su vez contemplan evolución molecular, filogenia molecular y genética de poblaciones (Tibayrenc, *et al.*, 2005). Así mismo, trata de evaluar las repercusiones que pudiera tener la diversidad genética del patógeno estudiado en sus propiedades biológicas, con interés medico tales como, patogenicidad, resistencia a drogas, capacidad de mutación y potencial para el cambio de hospederos, reservorios y hospederos finales (Tibayrenc, 2005).

Una de las suposiciones más básicas dentro de la epidemiología molecular es que dentro de las poblaciones de patógenos existen de forma natural entidades individualizadas o discretas que son estables en el tiempo y que pueden ser identificadas mediante el uso de herramientas adecuadas. El mundo de los patógenos es discontinuo, e inclusive dentro de sus subdivisiones, muchas veces no existen límites claros que permitan diferenciarlos. Estas subdivisiones, su discrecionalidad y estabilidad en el

tiempo siempre esta condicionada por la acción de las diferentes fuerzas evolutivas, de ahí la importancia del uso de la biología evolutiva en epidemiología molecular.

A continuación se explica la relación entre ambas disciplinas (epidemiología molecular y biología evolutiva) aplicando lo que actualmente se conoce sobre el virus de la rabia en todos sus aspectos.

Muchas RNA polimerasas pertenecientes a virus de RNA o retrovirus son muy propensas a cometer errores, los cuales no son sometidos a corrección durante los procesos de replicación. Lo anterior permite la existencia del virus en su hospedero como una población heterogénea integrada por una gran colección de variantes genéticas denominadas quasiespecies (Benmansour, et al., 1992., Domingo and Holland, 1994). Dentro estas poblaciones virales siempre hay una quasiespecie o entidad viral predominante denominada consenso, de la cual existen mutantes con sutiles variaciones (en su mayoría neutrales). Las quasiespecies individuales son muy difíciles de detectar y aislar por la mayoría de los métodos de observación diseñados hasta la fecha, pero dentro de la población viral obtenida de un individuo o animal enfermo se puede identificar una secuencia consenso a través de un marcador molecular apropiado. Dicha secuencia consenso a su vez representaría, a la población viral que puede estar circulando en la misma especie o en diferentes especies de animales que comparten un nicho o ecosistema específico en el mismo espacio y tiempo (Smith, 2002).

El cambio de la secuencia consenso puede suceder en un evento de transmisión a otro hospedero. Particularmente cuando solo se permite pasar a otro hospedero una pequeña subpoblación (provocándose un cuello de botella) de las variantes existentes en la población viral original (efecto del linaje fundador). Un linaje fundador con mutaciones favorables se podría propagar y diseminar dentro de una población de hospederos susceptible. Por ejemplo este nuevo linaje podría tener la capacidad de

evadir la detección del sistema inmune del hospedero confiriéndole una relativamente mayor adecuación a través del proceso de selección positiva. Sin embargo, con mayor frecuencia este linaje fundador únicamente contiene mutaciones neutras seleccionadas al azar que se generaron a través de varios eventos consecutivos de cuellos de botella. Estos eventos pueden ocurrir cada vez que el virus es transmitido de un hospedero a otro. Si los métodos moleculares de tipificación tienen suficiente poder de resolución el linaje fundador podría ser distinguido de otros linaje pre-existentes y esta información podría ser usada para estudiar patrones de transmisión de la enfermedad (Smith, 2002).

Al aplicar los principios de la epidemiología molecular al estudio de la rabia, existen varios aspectos de la epizootiología de la enfermedad que deben ser tomados en cuenta. Uno de los más importantes es que existen ciertas variantes del virus (o linajes diferenciados por métodos genéticos y antigénicos) que son transmitidos y perpetuados en la naturaleza de forma más eficiente por una sola especie de animal denominada reservorio (Blancou 1988; Smith, 1989). Esta especie además es responsable de mantener al virus en una región geográfica en particular, presumiblemente porque el virus se ha adaptado de forma específica a esa especie o porque el contacto requerido para que la enfermedad sea transmitida es más frecuente entre miembros de la misma especie (co-específicos). Conforme transcurre el tiempo, una población viral que está circunscrita o restringida por tales eventos de transmisión tan selectivos, adquiere y acumula de forma específica una serie de mutaciones que la distinguen de otras poblaciones asociadas a diferentes reservorios (Nadin-Davis, *et al.*, 1999; Smith, 2002). Las variaciones o más bien los patrones de variación específica se convierten en marcadores moleculares muy útiles para poder identificar estas poblaciones virales y poder seguirlas en el espacio y en el tiempo (Bourhy, *et al.*, 1999; Nadin-Davis, *et al.*, 1999). Los mecanismos moleculares de adaptación del virus a sus diferentes hospederos son

desconocidos hasta la fecha, sin embargo ha sido posible asociar una variante o linaje de virus a una especie en específico, por la integración de toda la información proveniente de estudios de tipificación molecular del virus con estudios epizootiológicos y de patogénesis (Kissi, *et al.*, 1999; Webby, *et al.*, 2004). Cuando una variante del virus rábico adaptada de forma específica a su reservorio es transmitida de forma circunstancial a otra especie, esta generalmente no es mantenida de forma estable y sostenida por la otra especie. Lo anterior podría deberse a que la variante del virus de la rabia debe sufrir un proceso adaptación en esa nueva especie para poder ser entonces transmitida de forma estable entre miembros de esa misma especie y a otras especies (Smith y Seidel, 1993). Dicho proceso de adaptación se esperaría sucediera después de un tiempo razonable de interacción de la variante con el nuevo hospedero y nunca como un proceso espontáneo después de un evento de transmisión interespecífica (Badrane y Tordo, 2001; Hughes, *et al.*, 2005). Así mismo, aspectos de la biología, ecología y demografía de las especies de mamíferos involucradas en estos eventos de transmisión interespecífica se ha determinado que también deben ser fundamentales en el mantenimiento de la enfermedad de forma enzoótica (Holmes, *et al.*, 2002). Hasta la fecha existen una serie de experimentos que demuestran la estabilidad de la secuencia consenso al hacer pases seriales de un aislamiento en otras especies de animales silvestres y de laboratorio, así como en cultivo celular, sin embargo evidencia de la acumulación de mutaciones no sinónimas se hizo presente al estudiar secuencias clonadas obtenidas dentro de dichas poblaciones virales (quasiespecies). El papel que pudieran jugar estas variaciones en la adquisición de nuevas propiedades biológicas y en el incremento del poder adaptativo del virus a una nueva especie no pudo ser evaluado en estos trabajos (Rupprecht et al, in Baer 1991; Kissi, *et al.*, 1999).

A. Tipificación molecular de las variantes del virus de la rabia con anticuerpos monoclonales

Los métodos moleculares de tipificación de virus difieren en su poder de resolución para diferenciar entre variantes genéticas que pertenecen a una misma población, aislamiento viral o linaje. Algunos miembros del género *Lyssavirus* difieren tan marcadamente que pueden ser fácilmente distinguibles con métodos básicos de serología usando sueros hiperinmunes producidos con los aislamientos a estudiar en ensayos de protección cruzada (Rupprecht, *et al.*, 1991). Actualmente, los métodos de tipificación antigénica se realizan exclusivamente con anticuerpos monoclonales (AcMo). Diferentes paneles de AcMo, dirigidos principalmente contra las proteínas estructurales N, G y P, en ese orden de uso, han sido utilizados para diferenciar variantes del virus de la rabia mantenidas específicamente por diferentes animales carnívoros terrestres que fungen como reservorios de la enfermedad (Dietzschold, *et al.*, 1987; Nadin-Davis *et al.*, 2000; Smith *et al.* 1989; Rupprecht, *et al.*, 1987). Cada una de estas variantes del virus de la rabia exhibe un patrón de reacción característico con estos grupos diferentes de AcMo. Los AcMo más usados hasta la fecha son aquellos dirigidos en contra de la proteína N, por ser esta la que presenta mayor cantidad de epitopos, es la más inmunogénica para producir anticuerpos en modelos animales, presenta la mayor cantidad de epitopos estables en virus provenientes de diferentes reservorios y porque es la proteína más abundante en las células y tejidos infectados (Rupprecht, *et al.*, 1987). El poder de resolución de estos métodos es proporcional al número de anticuerpos monoclonales que se usan para caracterizar al aislamiento viral, por lo que a mayor número de anticuerpos monoclonales mayor será la información epidemiológica que se puede obtener del aislamiento. Sin embargo, el número de anticuerpos que se pueden usar está limitado al número de epitopos expuestos y no sobrelapados que se encuentran presentes en la proteína obtenida a partir

de un tejido o células infectadas *in vivo* o *in vitro*. El uso de los anticuerpos monoclonales dirigidos en contra de las proteínas G y P, no ha adquirido un amplio uso en el mundo porque solo son producidos y empleados por ciertos grupos de investigación (Bourhy *et al.*, 1992; Diaz *et al.*, 1994; Mebatsion *et al.* 1992; Nadin-Davis *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1989). La tipificación antigénica sigue siendo de gran uso en la vigilancia epidemiológica de diferentes especies de *Lyssavirus* (Bouhry *et al.*, 1992; Gould *et al.*, 1998) y variantes asociadas a diferentes reservorios dentro del genotipo 1, por ser esta una técnica barata y fácil de aplicar en laboratorios de bajos recursos (Crawford-Mikszta *et al.*, 1999; De Mattos *et al.* 1996, 1999; Favi *et al.*, 1999; Kissi *et al.*, 1995; Nadin-Davis *et al.*, 2000). Aunque la secuenciación nucleotídica de algunos de los genes estructurales (N, G y P) del virus de rabia ha adquirido una gran popularidad la obtención del perfil antigénico de los virus estudiados siempre complementará y apoyará los hallazgos a nivel genético.

B. Tipificación genética

Dependiendo del método de tipificación usado es el grado de discriminación o información que puede ser obtenida de cada aislamiento viral. Por ejemplo la secuenciación nucleotídica ha demostrado tener el mayor poder resolutivo y utilidad en la investigación epidemiológica. Los métodos con el segundo lugar en poder resolutivo son la tipificación con enzimas de restricción y la hibridación con el uso de sondas variante específicas (Sacramento, *et al.*, 1992; Ito, *et al.*, 2003). Comparada con la caracterización antigénica, los resultados de la tipificación genética son más reproducibles y fáciles de cuantificar. Sin embargo por otro lado esta metodología resulta ser más costosa, técnicamente mas demandante y sus resultados tienen un grado mayor de complejidad lo que los hace difíciles de interpretar. Los métodos de tipificación genética detectan los patrones de variación o mutaciones en el RNA viral a nivel de su secuencia de

nucleótidos (Smith, 2002).

La tipificación molecular de agentes etiológicos es cada vez más común a medida que más laboratorios disponen de equipamiento para amplificar RNA por la técnica de RT-PCR y la tecnología para obtener la secuencia nucleotídica y su análisis es cada vez más fácil y accesible. Los resultados de la secuenciación nucleotídica adquieren significado y utilidad desde el punto de vista epidemiológico cuando estos son traducidos a un árbol filogenético. El árbol filogenético desde el punto de vista epidemiológico, es un esquema que refleja las relaciones entre muestras o aislamientos mediante su ordenamiento jerarquizado por lo tanto asemeja un árbol genealógico (Smith, 2002). En los ramas de los finales, también llamados nodos externos o terminales, se encuentran los taxa, estos taxa representan cada aislamiento, muestra o secuencia y están interconectados entre sí por nodos internos (Kumar, *et al*, 2001). Los taxa que emergen a partir de un nodo común se denominan clados o grupos monofiléticos (Felsenstein, 1981, 1985). Esta forma de agrupamiento indica que los taxa involucrados tienen un parentesco o, en otras palabras, sugiere que tuvieron un ancestro en común o simplemente están relacionados porque pertenecen al mismo brote, epidemia (epizootia) o endemia (enzootia). Con frecuencia la longitud de las ramas está a escala para representar el grado de divergencia entre los taxa que ellas conectan (Smith, 2002). El patrón de ramificación o agrupamiento de los taxa en un árbol filogenético se llama topología. Los árboles pueden clasificarse como árboles enraizados o árboles sin raíz. Los árboles con raíz son aquellos en los que se ha inferido un ancestro común no muy lejano (también llamado grupo externo o raíz), por lo que en ellos está dada una dirección evolutiva (Felsenstein, 1985). En este tipo de árboles se pueden establecer relaciones de parentesco con mayor certidumbre entre los taxa estudiados. Por otro lado los árboles sin raíz no pueden reflejar tales suposiciones. Un buen grupo externo o raíz es aquel taxón o aquellos taxa que

filogenéticamente estén lejanos de todos los aislamientos o muestras estudiadas, pero que no es tal la divergencia que pueda provocar topologías inconsistentes cuando los árboles se construyan por diferentes metodologías (Kumar, *et al.*, 2001).

Para el caso del virus de la rabia un buen grupo externo podría estar constituido por taxa que representen otros genotipos o especies del género *Lyssavirus* que no sean tan divergentes de los taxa estudiados. Un mal grupo externo podría ser un taxa tan divergente como un miembro o grupo de miembros de la familia Rhabdoviridae.

C. Fundamentos del uso de la filogenética molecular y métodos para construcción de árboles filogenéticos

Una vez que se obtienen las secuencias de nucleótidos de varios individuos integrantes de una población o de una comunidad, es posible determinar los lazos genealógicos entre ellas. Empíricamente, se sabe que los organismos emparentados tienden a presentar secuencias de nucleótidos muy similares y entre mas lejana es su relación de parentesco mayor es la diferencia entre sus secuencias de nucleótidos. Por lo tanto seria relativamente fácil encontrar las diferencias y similitudes entre las secuencias de nucleótidos de dos individuos, con 50 bases de largo, sin embargo hacerlo en mas de 100 individuos con secuencias de mas de 200 nucleótidos resulta ser una tarea casi imposible de realizar a simple vista. Para esto, es necesario el uso de programas computacionales que nos permitan alinear (proceso que ayuda a exponer diferencias y similitudes a lo largo de las secuencias en estudio) para después determinar las posibles relaciones de forma esquemática (dendograma o cladograma) de los individuos en estudio. Los objetivos principales de la filogenética abarcan la reconstrucción las relaciones evolutivas entre las especies y estimación del tiempo de divergencia entre dos organismos desde que estos compartieron el ancestro mas reciente en el tiempo evolutivo (Kumar *et*

al., 2001).

Actualmente existen dos grandes grupos de métodos para llevar a cabo un análisis filogenético, los fenéticos y los cladísticos. Los métodos fenéticos calculan sus árboles con base en la similitud de las secuencias analizadas y resumen todas las diferencias encontradas entre pares de secuencias en un solo número. Los árboles que se obtienen por estos métodos se denominan dendogramas y no necesariamente reflejan las relaciones evolutivas entre los organismos estudiados. Los métodos cladísticos construyen sus árboles considerando varias rutas posibles de evolución basándose en métodos de parsimonia y de probabilidad. Los árboles resultantes por estos métodos se denominan cladogramas y usan cada uno de los sitios (máxima probabilidad) o solo los sitios informativos dentro del alineamiento (máxima parsimonia) como información evolutiva para construir el árbol (Felsenstein, 1978; Kumar, *et al.*, 2001).

D. Métodos fenéticos o de matriz de distancia

Para la obtención del árbol filogenético se parte de un grupo de secuencias alineadas en los que se calculan los valores de distancia genética entre todos los pares posibles, como la suma de todas sus diferencias. Después se construye una matriz de distancia asumiendo que las secuencias con mayor similitud son las que están más cercanamente relacionadas. Los cambios de base en cualquier sitio pueden ser considerados con el mismo peso o se puede usar una matriz de sustitución en lugar de la matriz de similitud. Las inserciones y omisiones tienen un peso relativo mayor que las sustituciones así como también las inserciones y omisiones de varias bases en un mismo sitio tienen menor peso que las que se producen en varios sitios independientes. Es posible corregir la tasa de variación en sitios con sustituciones múltiples (Kumar, *et al.*, 2001).

1. El método de grupo pareado. No tiene peso pues usa promedios aritméticos (UPGMA) de Sokal y Sneath (1963), fue desarrollado en un

inicio para analizar datos morfológicos, de allí deriva el nombre de su clasificación general (fenético). En el algoritmo de este método se asume una tasa evolutiva constante en todos los taxa analizados. Este método de distancia también puede emplearse para analizar secuencias nucleotídicas. El algoritmo empieza por agrupar los dos taxa que presentan la menor distancia entre ellos y forma un clado. Este primer agrupamiento lo considera después para compararlo con el resto de los taxa, integrando el taxón que tenga la menor distancia con este primer par formando un nuevo grupo. Este método considera el uso de todos los sitios variables entre las secuencias analizadas para construir el árbol, aprovechando, de esta manera, la mayor cantidad de la información de la secuencia nucleotídica obtenida (Hall, 1999).

2. El algoritmo de unión de vecinos (N-J) fue desarrollado por Saitou y Nei en 1987 está basado en el principio de mínima evolución. Actualmente es el método de distancia más usado, ya que a diferencia del método UPGMA, éste incorpora diferentes tasas de evolución en los linajes o taxa considerados bajo un mismo estudio. A diferencia del método de UPGMA en el que se van generando las ramas en N-J se parte de un árbol en forma de estrella en el cual se da por hecho que todos los taxa en estudio tienen un ancestro común. Después, paso por paso, se van generando árboles con diferentes patrones de ramificación, de los que se van favoreciendo aquellos en los que la suma de la distancia de sus ramas sea la mínima (Saitou y Nei, 1987).

E. Método de parsimonia máxima

Método de parsimonia máxima fue desarrollado por Fitch en 1977. El método construye todos los árboles posibles para cada sitio o posición dentro del alineamiento y les asigna un valor con base al número de cambios evolutivos necesarios para explicar los cambios observados en las secuencias estudiadas. El árbol más parsimonioso es aquel que requiere el

menor número de cambios mutacionales para explicar el parentesco o relación entre los taxa en estudio considerando su ancestro común más reciente. Este método cladístico usa solamente sitios informativos, los cuales contribuyen a diferenciar un taxón de otro y permiten elegir la ruta evolutiva con el mínimo número de diferencias que explica el parentesco o relación entre los diferentes taxa en estudio.

F. Método de probabilidad máxima

Este logaritmo fue desarrollado por Felsenstein en el año de 1981. Este método también usa cada uno de los sitios en el alineamiento para producir todos los árboles posibles calculando la probabilidad de su ocurrencia por medio de un modelo explícito de evolución. Las probabilidades de cada sitio dentro del alineamiento se multiplican para calcular la probabilidad de ocurrencia de dicho árbol. En él, se elige un árbol cuya topología es la de mayor probabilidad de entre todos los árboles posibles que se obtienen con los taxa en estudio. En otras palabras el método trata de elegir el árbol más probable de entre todos los árboles posibles para el grupo de taxa bajo estudio (Felsenstein, 1981).

G. Método de Bayes o Bayesiano

A diferencia del método de probabilidad máxima este método trata de elegir el árbol filogenético más probable a partir de los datos originales que pueden ser secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. Este método es el más nuevo y usa cadenas de Markov para modelar e inferir el árbol más probable. Los tres últimos métodos también son llamados métodos exhaustivos y requieren de una capacidad de cómputo muy grande para llevar a cabo un análisis eficiente. Por ejemplo cuando se está trabajando con 10 taxa el número de árboles posibles (Felsenstein, 1978), sería de más de 2 millones si estos se obtuvieran sin raíz y cerca de 34 millones y medio si se obtuvieran con raíz. Por lo anterior, es que los tres últimos

métodos requieren una capacidad de cómputo especial. El tiempo promedio para obtener un árbol por cualquiera de los tres últimos métodos para una serie de datos que comprende más de 100 secuencias con longitudes mayores a 200 nucleótidos es de dos semanas a un mes de trabajo no interrumpido en una PC con el procesador mas rápido hasta la fecha disponible. Este tiempo se puede abatir a 1 semana en maquinas especiales, que ya entran en la categorías de supercomputadoras, con procesadores de 32 bits de velocidad neta de procesamiento. Dichas maquinas pueden contar con uno o mas procesadores de este tipo son altamente costosas y usan ambientes avanzados de programación que requieren expertos en informática para manejarlas.

CAPÍTULO VI. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección de forma general se describe la manera en la que se recabó información bibliográfica, los criterios de inclusión para la selección de las muestras utilizadas. Posteriormente se explican los métodos de caracterización antigénica, métodos de secuenciación, selección de marcador genético, edición y validación de secuencias.

1.- Búsqueda de información.

La estrategia de búsqueda comprendió básicamente medios electrónicos. Se usó la base de datos PubMed vía el servidor del Centro Nacional de información en biotecnología (NCBI,) que es parte de los Institutos Nacionales de Salud (NIH, siglas de su nombre en inglés), Bethesda, Meriland, EEUU. Así mismo se usaron libros especializados sobre el tema. Copias del material bibliográfico que resultó relevante para el presente estudio se obtuvo en las bibliotecas de las facultades relacionadas con el área médico biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y posteriormente fue ampliada en la biblioteca electrónica del Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, EEUU.

La información epidemiológica y epizootiológica sobre cada muestra se obtuvo mediante la revisión de las encuestas archivadas en el Laboratorio de Rabia del InDRE o mediante consulta telefónica a los encargados de los centros antirrábicos, centros de salud y jurisdicciones sanitarias de donde provinieron las muestras.

2.- Muestras

Como fuente de obtención del virus se usó el banco de muestras positivas del Laboratorio de Rabia del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, InDRE, Secretaría de Salud. Dicho laboratorio se encarga

de llevar a cabo el diagnóstico y confirmación rutinaria de cualquier caso de rabia detectado en humanos, animales domésticos y fauna silvestre por los laboratorios y servicios de salud de la Secretaría de Salud en todo el país.

3. Criterios de inclusión

a. Tipo de muestra. Cualquier muestra de mamífero que pudo ser reconfirmada como positiva mediante la comprobación de presencia de antígeno del virus de la rabia y que hubiese suficiente de esta en el banco de muestras del InDRE. Estas se clasificaron de acuerdo a su origen como de humanos, animales domésticos y silvestres. Los animales domésticos comprendieron perros, gatos y ganado de todas clases. La categoría de animales silvestres comprendió carnívoros terrestres y murciélagos.

b. Representación espacial y temporal. Diversidad del virus de la rabia en México; muestras positivas de cualquier año y estado de la República (disponibles en dicho banco), tratando de abarcar el intervalo mas amplio de espacio y tiempo en la circulación contemporánea del virus de la rabia en México.

Para finalmente ser incluida en el estudio cada muestra debió contar con la mínima información siguiente: a) nombre común del animal del cual fue extraída la muestra y en el caso de animales silvestre se indago la especie, cuando fue posible; b) estado de la República en donde ocurrió el caso de rabia, cada vez que fue posible se investigo la localidad; c) año en el que se detectó el caso; d) investigación retrospectiva del movimiento de animales de un estado a otro. Lo cual se realizo cuando surgió la sospecha de algún caso importado (después de haber llevado a cabo el análisis molecular) se solicitó a los responsables de los centros antirrábicos o jurisdicciones sanitarias una investigación mas profunda sobre el caso. En ciertos casos fue necesario establecer contacto con la familia que reportó

el caso o fue afectada directamente por el animal rabioso.

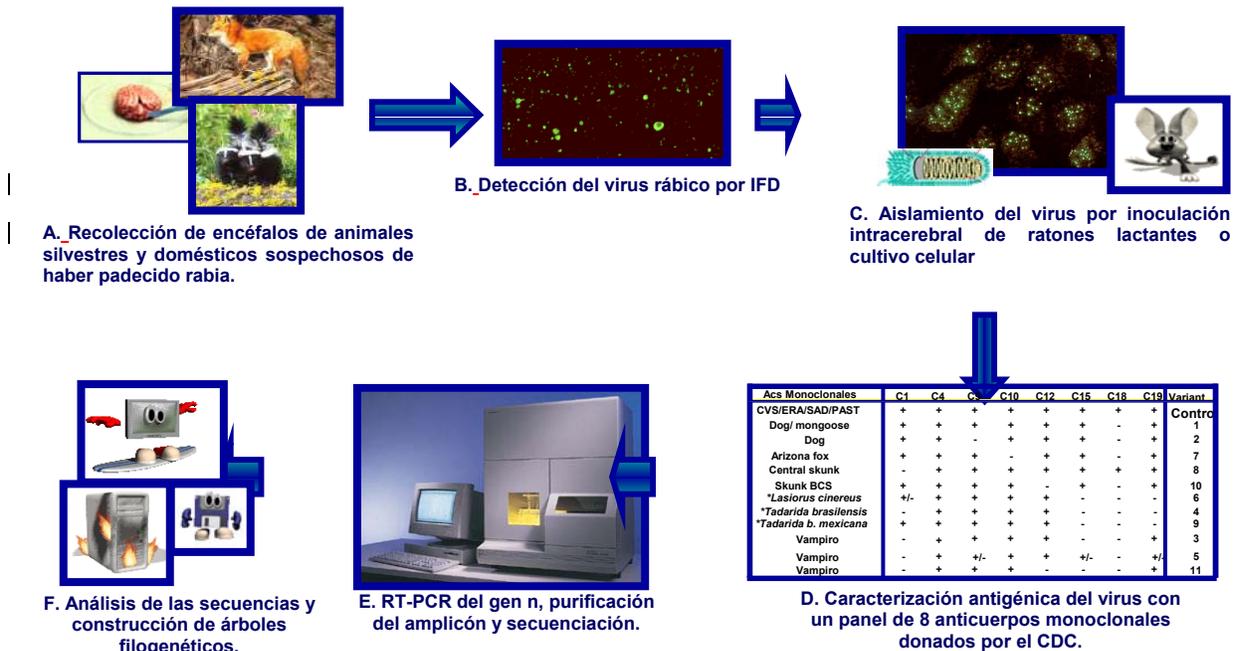


Figura 23. Diagrama que describe la metodología empleada en el estudio de la epidemiología molecular de la rabia en México. A. Recolección; B. Detección; C. Aislamiento; D. Caracterización; E. RT-PCR; Análisis.

4. Comprobación de la presencia de virus rábico en las muestras de encéfalo

La presencia del virus de la rabia en las muestras del banco se corroboró por medio de la detección de proteínas estructurales, principalmente la proteína N mediante la prueba de inmunofluorescencia directa IFD (Apéndice III).

5. Propagación del virus de la rabia por inoculación en ratones lactantes.

En las muestras en donde se observó gran cantidad antígeno (3+ a 4+) al hacer la IFD se realizó la caracterización antigénica del virus de forma directa. En aquellas muestras donde se determinó poca cantidad de antígeno se realizaron de 1 a 3 pases en cerebro de ratón lactante o en

cultivo celular, hasta alcanzar la cantidad suficiente de virus para realizar las demás pruebas. En un 85% de las muestras elegidas se tuvieron que realizar estos pasos, ya que aun en el caso donde se detectó bastante antígeno, en el laboratorio se disponía de poca muestra (Apéndice III).

6. Determinación de la diversidad viral en los aislamientos elegidos por caracterización antigénica del virus rábico con un panel reducido de anticuerpos monoclonales.

La caracterización antigénica del virus rábico se realizó con un panel de 8 anticuerpos monoclonales (AcMo) donados al InDRE por el Centro de Control de Enfermedades Infecciosas "Center for Disease Control and Prevention", CDC de Atlanta, Georgia, USA. Dicho panel permite determinar 11 patrones antigénicos (dentro del serotipo o genotipo 1) que según estudios epizootiológicos, hechos por el CDC y algunos laboratorios de referencia de América del Sur, se asocian a diferentes reservorios de la rabia del continente (Apéndice III).

7. Selección del marcador genético usado para la parte de epidemiología molecular

Se realizó una búsqueda exhaustiva en la literatura y se encontró que el polimorfismo genético del virus de la rabia ha sido estudiado en tres proteínas estructurales del virus que son P, N y G (ref). Con secuencias parciales y completas de estos tres cistrones, se han realizado estudios de epidemiología molecular del virus en Europa, Asia central, África, EEUU y Canadá, obteniéndose resultados reproducibles y robustos sobre la distribución y diseminación del virus en esos continentes o regiones. Sin embargo en la mayoría de estos estudios, siempre se han usado secuencias completas a parciales de N para descartar homoplasias, al realizar filogenias con cualquiera de los otros dos genes (P ó G).

Por todos los atributos que se demostró (ver sección de resultados) tiene

esta región de 264 nucleótidos, es el mejor candidato para realizar epidemiología molecular de la rabia en México y a nivel global. El alto rendimiento en la obtención de amplicones pequeños, su facilidad para secuenciarlos, aun con métodos manuales, la representatividad temporal y espacial que tiene esta región en el GenBank, lo hacen el marcador mas robusto, practico e ideal para realizar epidemiología molecular de la rabia de rutina, en México y en el mundo.

8. Amplificación de la región de interés y secuenciación nucleotídica

La secuenciación se realizó por el método de Sanger. En un inicio se utilizó un método de secuenciación manual. Por este método logramos leer hasta 350 bases a partir de la región donde alinea el iniciador de secuencia. Sin embargo, como segunda opción y debido al gran numero de secuencias nuevas que se procesaron, se usó un método de secuenciación automatizado para el cual fue empleado el Abbi Prism 770 de Applied Biosystems. Con este modelo de secuenciador se obtuvieron secuencias en el intervalo de 450 a 600 bases de longitud.

9. Construcción de los árboles filogenéticos y edición

Cada secuencia fue editada individualmente a partir del archivo de salida que proporciona el secuenciador ABI prism 770 de Applied Biosystems, California, Estados Unidos. Para ello se utilizo el programa BioEdit (Hall, 1999), el cual permite ver el histograma de la secuencia a la vez que se puede corregir cualquier ambigüedad (eliminación y/o corrección de las "N") dentro de la secuencia.

La región codificante dentro de cada secuencia se obtuvo al alinear con el genoma completo de la cepa fija de laboratorio SAD B19, usando el programa "BLAST dos secuencias (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Capítulo VI. Material y Métodos

Las secuencias editadas, mas todas aquellas que se usaron como información de contexto (secuencias del virus de la rabia, existentes en el GenBank, relacionadas con las obtenidas en México), se alinearon usando el programa de alineamiento múltiple CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>) o su interfase para Windows CLUSTAL X (<http://www.flu.org.cn>). Dentro de los alineamientos múltiples se incluyeron secuencias de otras especies o genotipos del género *Lyssavirus*, los cuales se usaron como grupos externos o raíces para la construcción de árboles filogenéticos.

Con el archivo producto del alineamiento múltiple de todas las secuencias, estas se editaron a un fragmento final de 264 bases (posición 1157-1420, con respecto a su posición en la cepa de referencia SAD B19). El cual codifica para los últimos 88 amino ácidos (posición 363-450, con respecto a su posición en la cepa de referencia SAD B19) del extremo carboxilo terminal de la nucleoproteína.

Los árboles filogenéticos se construyeron a partir del alineamiento múltiple editado a 264 pb, usando el programa MEGA 2.1 (Kumar et al., 2001). Se realizo corrección de la sustitución nucleotídica usando los métodos de Kimura de dos parámetros (para MEGA), Hasegawa Kishino Yano HKY85 (para PAUP) y el modelo general reversible en el tiempo de (General time reversible model GTR) para cuando se uso Mr Bayes en la reconstrucción de los árboles filogenéticos.

Los valores de "bootstrap" o soporte estadístico para cada nodo en los árboles de máxima probabilidad y de distancia, se calculó con el método de Neighbor-joining usando 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985) Como grupos externos o raíces se usaron secuencias de otras especies de *Lyssavirus* como Duvenhage and EBL2.

Para poder apreciar mejor la relación filogenética entre los diferentes clados o linajes obtenidos en los árboles filogenéticos donde se usaron todas secuencias estudiadas, cada clado o linaje se redujo a una secuencia

consenso (la cual contiene y representa toda la variación nucleotídica dentro del clado o linaje), usando el programa bioedit (Hall, 1999), la cual se uso posteriormente para reconstruir árboles filogenéticos con programas que requieren mayor capacidad de computo (máxima probabilidad, máxima parsimonia y Bayes).

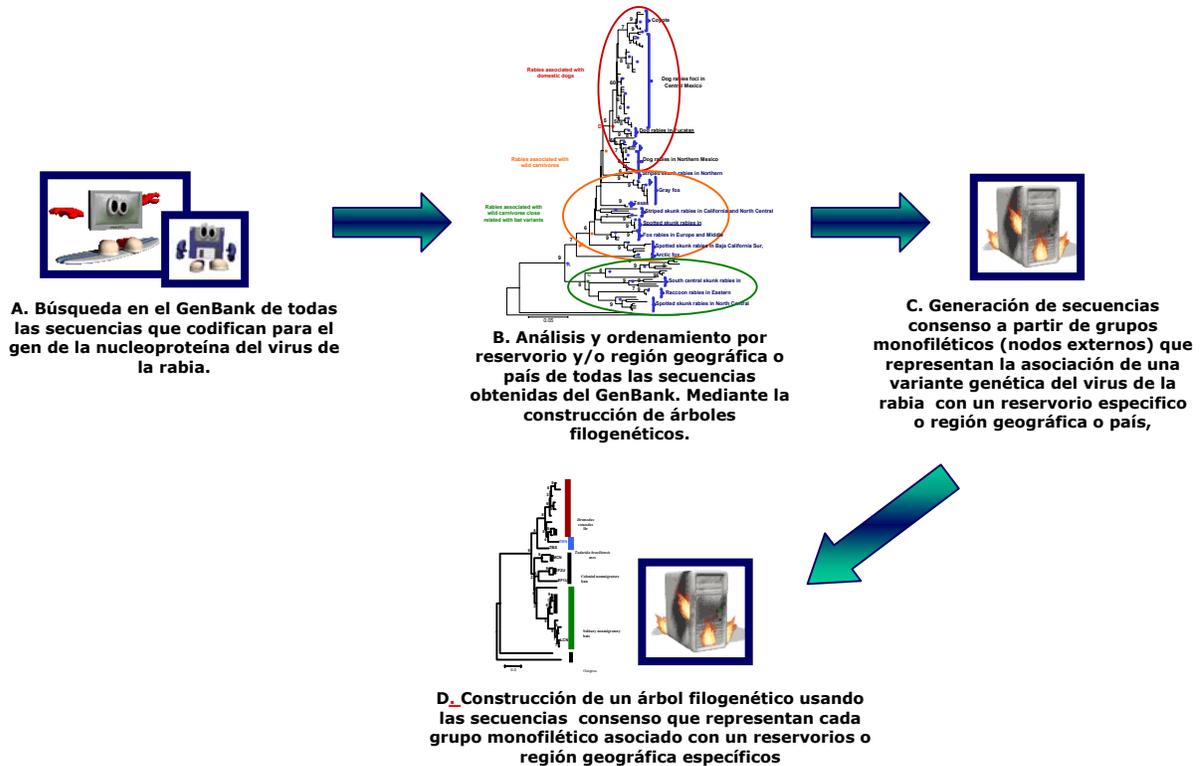


Figura 24. Diagrama de la forma de generar los árboles filogenéticos que solo incluyen secuencias consenso de cada grupo monofilético asociado con un reservorio específico, con el fin de poder apreciar mejor la relación filogenética entre estos grupos. Además dichos árboles también se utilizan para inferir el reservorio en una secuencia nueva. A. Búsqueda en el GenBank; B. Análisis y ordenamiento; C. Generación de secuencias consenso; D. Construcción de un árbol filogenético.

Se calcularon matrices de distancia, por pares, entre las secuencias consenso de cada clado o linaje. Las matrices de distancia se obtuvieron con el programa MEGA 2.1 (Kumar et al., 2001).

CAPÍTULO VII. RESULTADOS

Primera parte

Los reservorios del virus de la rabia y potenciales transmisores de la enfermedad al ser humano son diferentes especies de mamíferos terrestres y murciélagos. El virus puede ser mantenido de forma enzoótica por algunas especies dentro extensiones territoriales muy amplias, mientras que otras lo pueden mantener con una distribución geográfica muy discreta o limitada. La circulación de las diferentes especies del género *Lyssavirus* se ha detectado en todos los continentes y todas son responsables de causar encefalitis aguda (rabia) en seres humanos y otros mamíferos. No obstante pueden existir regiones libres de rabia bajo dos circunstancias, una en donde el virus de forma natural jamás ha circulado y la otra donde el virus ha dejado de circular por intervención del ser humano (vacunación y control de la enfermedad en los reservorios). Dada su complejidad epizootológica, la detección de rabia en una especie silvestre o domestica no necesariamente implica que esta sea la responsable de estar manteniendo la enfermedad enzoótica dentro de esa región. Así mismo, la distribución de la enfermedad en sus potenciales reservorios no es la misma en diferentes países o regiones, como también hay lugares en donde mas de una variante del virus, mantenida por un diferente reservorio, esta circulando simultáneamente. Todo lo anterior tiene repercusiones directas sobre la prevención y el control, a la vez que resalta la necesidad de darle un seguimiento espacial y temporal continuo a la enfermedad en sus reservorios. En esta sección se presentan los resultados que demuestran diferentes aspectos inherentes a la dinámica de la rabia en México, entre los cuales destacan; la inferencia de sus principales reservorios, las regiones donde la enfermedad es enzoótica en estas especies, así como también, en algunos casos se le dio seguimiento en el tiempo a las acciones de control y a la diseminación de la

enfermedad mediante el estudio de la diversidad genética del virus.

1. Búsqueda del marcador genético ideal para realizar epidemiología molecular de la rabia en México

La epidemiología molecular se encarga de dar seguimiento espacial y temporal a las especies, subespecies, cepas, variantes, clonas y genes de los patógenos involucrados en enfermedades transmisibles mediante el uso de técnicas moleculares y herramientas de biología evolutiva. En el caso de rabia a la unidad que se le da seguimiento son los ecotipos o variantes del virus, las cuales son entidades discretas y estables que están asociadas de manera específica a diferentes especies de mamíferos dentro de los órdenes Chiroptera y Carnivora (reservorios). La tipificación antigénica del virus de la rabia (caracterización antigénica) con anticuerpos monoclonales cumple con este fin. Sin embargo, la diversidad actual del virus de la rabia ha rebasado la capacidad resolutoria de esta técnica molecular, requiriéndose el uso de técnicas con mayor capacidad poder de discernimiento. El secuenciamiento nucleotídico de regiones altamente informativas dentro del genoma del virus de la rabia y su análisis mediante el uso de herramientas de evolución molecular, ha demostrado tener un gran poder resolutorio en el estudio de su diversidad, así como en la elucidación de las relaciones estrechas de sus variantes con sus reservorios específicos y en el delineamiento de la distribución geográfica de los focos enzoóticos de rabia asociados a cada una de estas especies.

En la presente sección, se discute y fundamenta el gen y/o región dentro del genoma que se eligió como la más adecuada para realizar la epidemiología molecular de la enfermedad en México.

El polimorfismo de los genes estructurales que codifican para la nucleoproteína, glicoproteína y fosfoproteína han sido estudiados por diversos investigadores en los últimos 14 años.

CAPÍTULO VII. Resultados

GENES Y REGIONES DEL GENOMA DEL VIRUS DE LA RABIA USADOS EN ESTUDIOS DE EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR Y EVOLUCION MOLECULAR

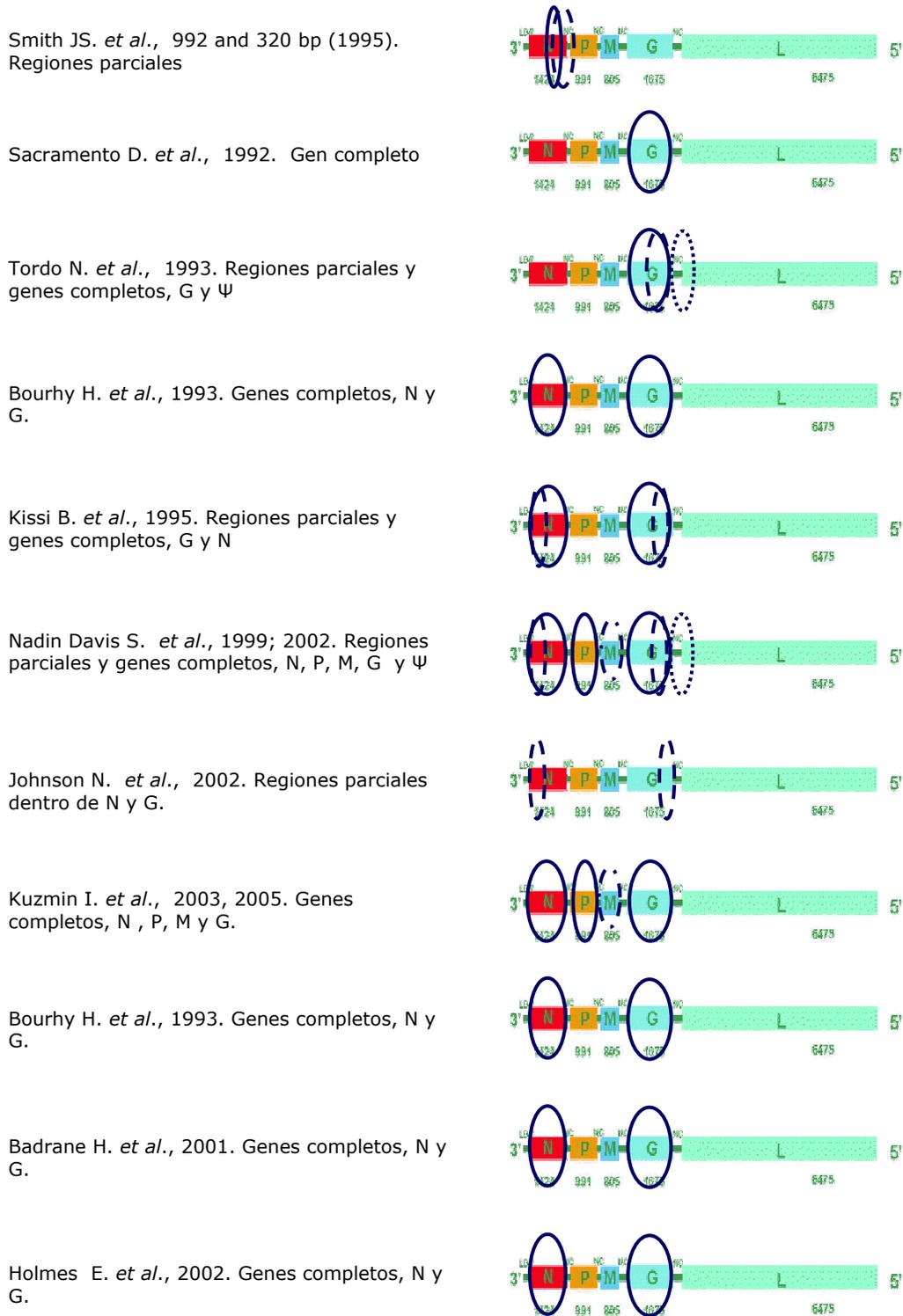


Figura 25. Historia de la búsqueda del marcador genético más apropiado.

En los trabajos sobre epidemiología y evolución molecular de la rabia, arriba citados, se observa una clara tendencia al estudio de más de un marcador genético (Bouhry, Nadin-Davis). Lo anterior para descartar homoplasias o corroborar que los grupos monofiléticos obtenidos, lo sean por haber tenido un ancestro común y no por causas diferentes. En un sentido más pragmático, lo anterior significa que había que corroborar que los patrones de agrupamiento que relacionaban un grupo de secuencias con un hospedero (reservorio) o región geográfica específicos fueran consistentes, independientemente del marcador usado o del método para reconstruir los árboles filogenéticos. En cada uno de estos trabajos se verifico que la topología de los árboles filogenéticos tuviera completa concordancia con la historia de la enfermedad en la región, definida mediante estudios de epidemiología y epizootiología descriptiva clásica.

Todos los genes estructurales hasta ahora usados (N, P y G), completos o regiones parciales, altamente informativas, han demostrado ser igualmente buenos para inferir la historia epizootiológica de la rabia en una región o país, ya que los árboles generados presentan topologías idénticas, cada vez que se usa el mismo grupo de muestras, independientemente del método usado para la reconstrucción del árbol filogenético (distancia, probabilidad máxima, Bayesianos). De esta manera, la precisión y exactitud de las inferencias realizadas sobre los reservorios más probables del virus de la rabia en una región o país, depende de que tan representativo, en espacio y tiempo, sea el grupo de secuencias que se analiza con respecto a la diversidad real del virus en ese lugar. Los árboles filogenéticos Bayesianos obtenidos para tres grupos de secuencias de tres genes estructurales diferentes (N y P) que están representando una diversidad equivalente (espacial, temporal y de reservorio específico) de los integrantes del género *Lyssavirus* hasta ahora descritos, ilustra que cualquier gen estructural esta describiendo la misma

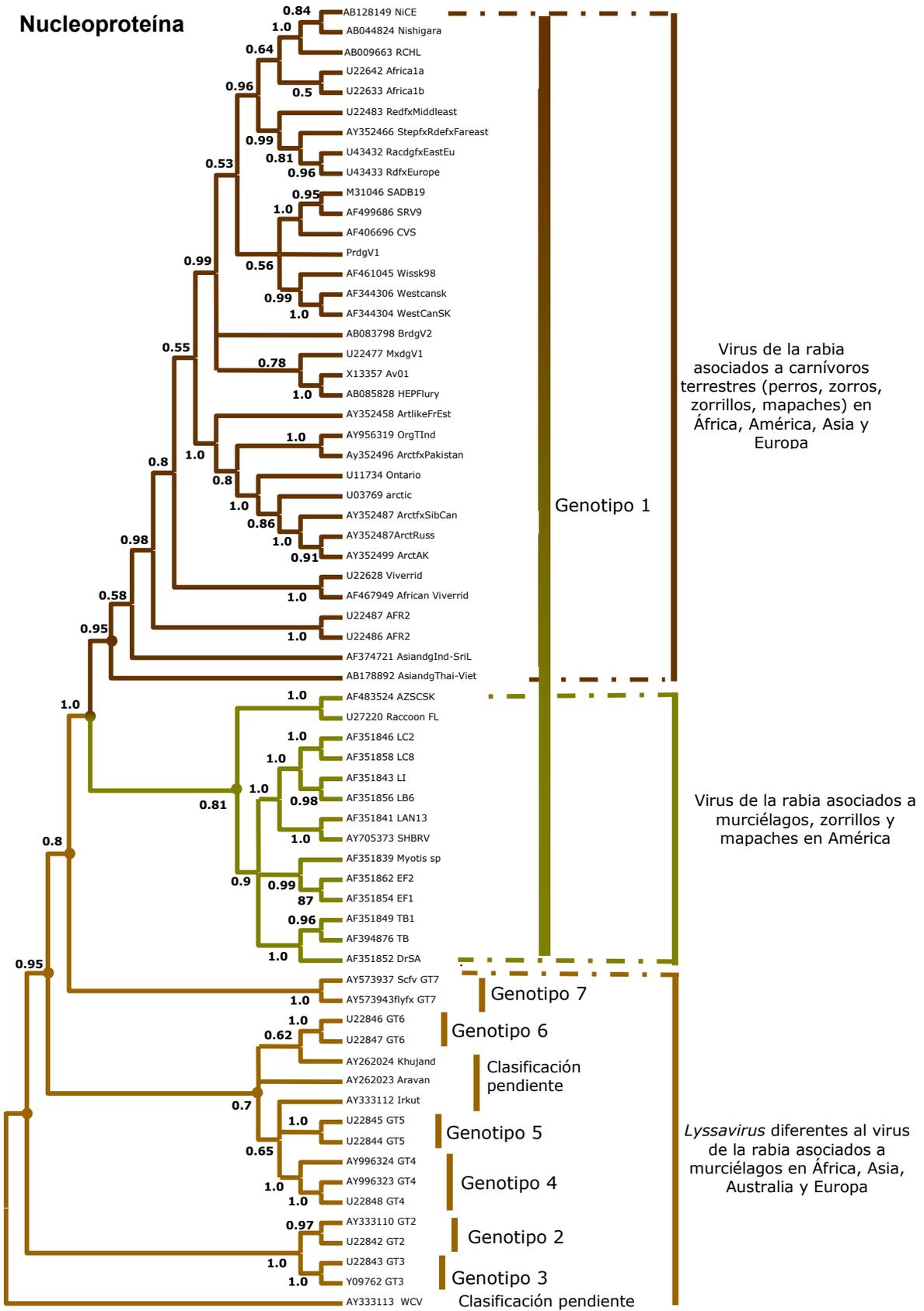
CAPÍTULO VII. Resultados

historia epizootiológica y evolutiva del virus.

Existen más de 2500 secuencias (2562), entre parciales y del gen completo, de la nucleoproteína en el banco mundial de genes (GenBank), las cuales han sido obtenidas de animales con rabia en todos los continentes y países donde actualmente se encuentra circulando el genotipo 1. Esta cantidad de secuencias y su distribución espacial y temporal aporta la mejor representación, hasta ahora posible, de la diversidad del virus de la rabia en todo el planeta. Para la fosfoproteína existen cerca de 500 secuencias (447) entre parciales y completas. Las cuales tienen una representación espacial, temporal y de reservorio específico de la diversidad del virus de la rabia aproximada a la de la nucleoproteína (figuras 26 y 27). Con respecto a la glicoproteína, se dispone de más de 1,700 secuencias (1,746), entre parciales, iniciadores y completas. Sin embargo, su representatividad de la diversidad espacial, temporal y de reservorio específico del virus de la rabia es la menor, ya que existen muchas secuencias de cepas fijas de laboratorio usadas en la elaboración de vacunas o como virus de reto en experimentos de patogénesis. Muchas otras secuencias de la glicoproteína corresponden a clonas derivadas de estas cepas fijas de laboratorio y de secuencias de iniciadores, las cuales son inútiles para la reconstrucción de un árbol filogenético.

De la proteína de matriz solo existen 31 secuencias entre completas y parciales de cepas vacunales y de algunos reservorios silvestres terrestres y murciélagos que se encuentran circulando en los EEUU y Canadá. De la polimerasa L, existen alrededor de 25 secuencias, en su mayoría parciales. En total hay 138 si se consideran todas las que se han depositado para tratar de reclasificar a la familia Rhabdoviridae.

Nucleoproteína



Fig

CAPÍTULO VII. Resultados

ura 26. Árbol filogenético Bayesiano del gen que codifica para la nucleoproteína.

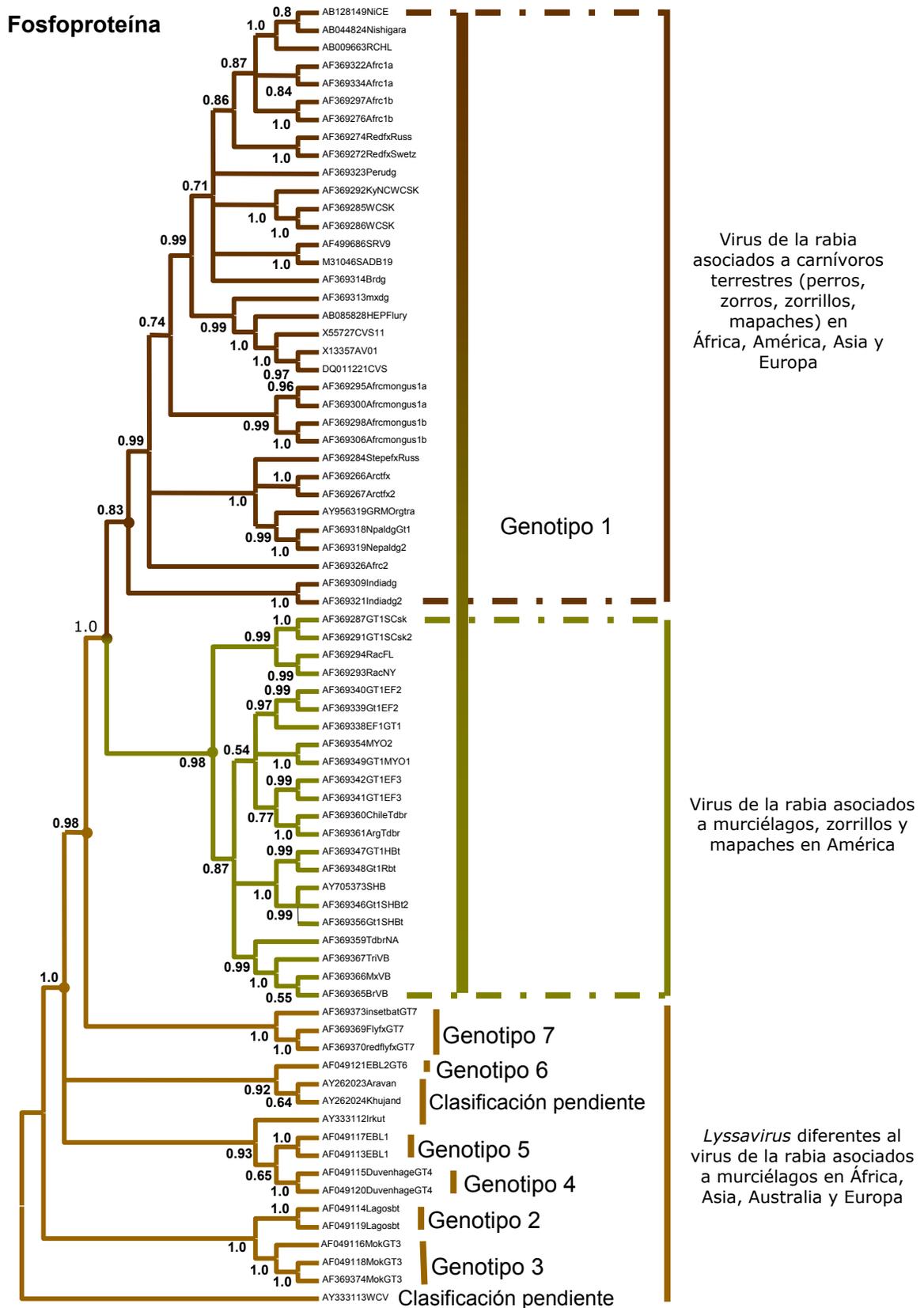


Figura 27. Árbol filogenético Bayesiano del gen que codifica para la fosfoproteína

CAPÍTULO VII. Resultados

Glicoproteína

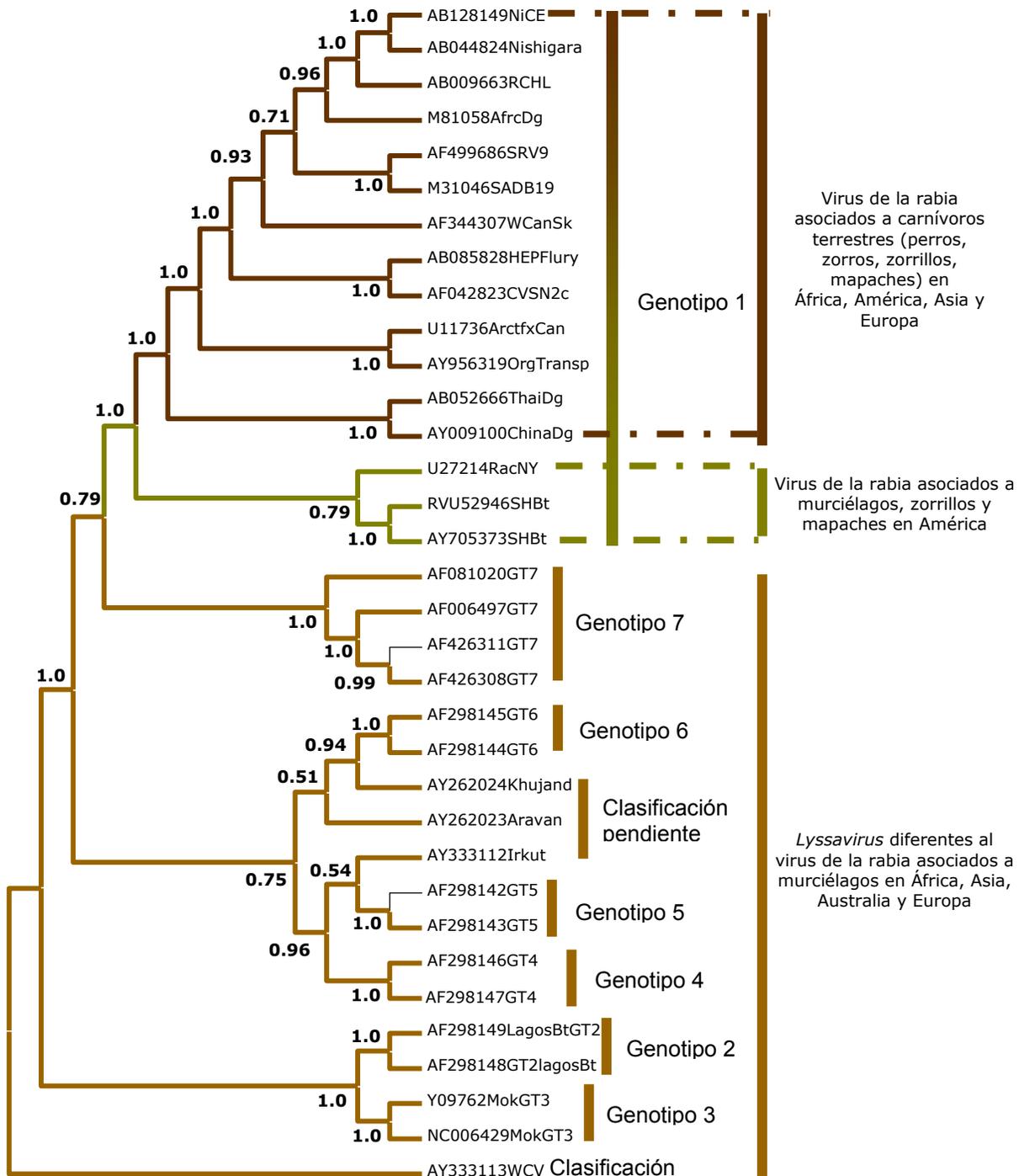


Figura 28. Árbol filogenético Bayesiano del gen que codifica para la glicoproteína

Los árboles filogenéticos de las figuras 26, 27 y 28, fueron reconstruidos por el método de Bayes usando secuencias completas de los genes que codifican para la nucleoproteína, fosfoproteína y glicoproteína, respectivamente, de todas las especies clasificadas y las que faltan por clasificar del género *Lyssavirus*. Los taxa de los tres árboles representan grupos equivalentes de secuencias asociadas a los mismos reservorios y regiones geográficas. Cada taxa, en ambos árboles, corresponde al número de registro del GenBank con el cual se puede obtener información detallada de cada uno de ellos. La topología de los tres árboles es exactamente la misma independientemente del marcador genético usado, empleando grupos de secuencias que comprenden la misma variabilidad espacial, temporal y de reservorio. Lo que sugiere que el genoma del virus de la rabia esta evolucionando como una unidad (lo que concuerda con la forma en la que se replica su genoma) y que todos sus genes estructurales están definiendo la misma historia evolutiva del virus y la epizootiología de la enfermedad.

Recientemente se han usado secuencias parciales de la polimerasa o proteína L, para reconstruir filogenias de los representantes de la familia Rhabdoviridae con propósitos de clasificación de sus miembros. Dichas filogenias coinciden totalmente en su topología con las obtenidas al usar secuencias de la nucleoproteína (comunicación personal de Ivan Kuzmin y Hevre Bourhy) de una representación similar de los miembros de la familia.

2. Optimización del marcador genético para hacer la epidemiología

CAPÍTULO VII. Resultados

molecular de la rabia una prueba rutinaria

En los países en vías de desarrollo de América Latina y de todo el mundo, las condiciones de mantenimiento de la red de frío y en específico de ultra congelación, son muy inestables. Lo que no permite conservar de manera adecuada la integridad del genoma del virus de la rabia en las muestras de encéfalo positivas. Como consecuencia, ello dificulta la amplificación del ácido nucleico del virus mediante el método estándar de RT-PCR el cual tiene como blanco la amplificación del gen completo de la nucleoproteína. Así mismo, en las muestras almacenadas bajo condiciones no óptimas, la eficiencia de obtención del amplicon del gen completo es tan baja que no sirve para realizar secuenciamiento nucleotídico; aunado a que en más del 40% de estas muestras no se obtiene producto alguno porque el RNA se encuentra parcialmente degradado.

La estrategia para superar este inconveniente, es la amplificación de regiones de no más de 500 nucleótidos de longitud dentro de regiones de la nucleoproteína altamente informativas (los primeros 500 y los últimos 400 nucleótidos que codifican para el gen de la nucleoproteína).

La región dentro de la nucleoproteína que tiene la mayor representatividad en cuanto a la diversidad espacial, temporal y de asociación con reservorio específico del virus de la rabia en toda América, la representan los últimos 264 nucleótidos que codifican para 88 aminoácidos del extremo carboxilo terminal (posición 363 a 450 con respecto al genoma de SAD B19).

Se reconstruyeron árboles filogenéticos por el método de distancia de "Neighbor-Joining", usando secuencias del todo el mundo con la intención de observar si la topología del árbol filogenético, usando el gen completo, se conserva usando la región de 264 nucleótidos del extremo carboxilo terminal. Como se observa en la figura 29, la topología del árbol es la misma a la observada en las figuras 26, 27 y 28, en su parte que contempla las secuencias del virus de la rabia.

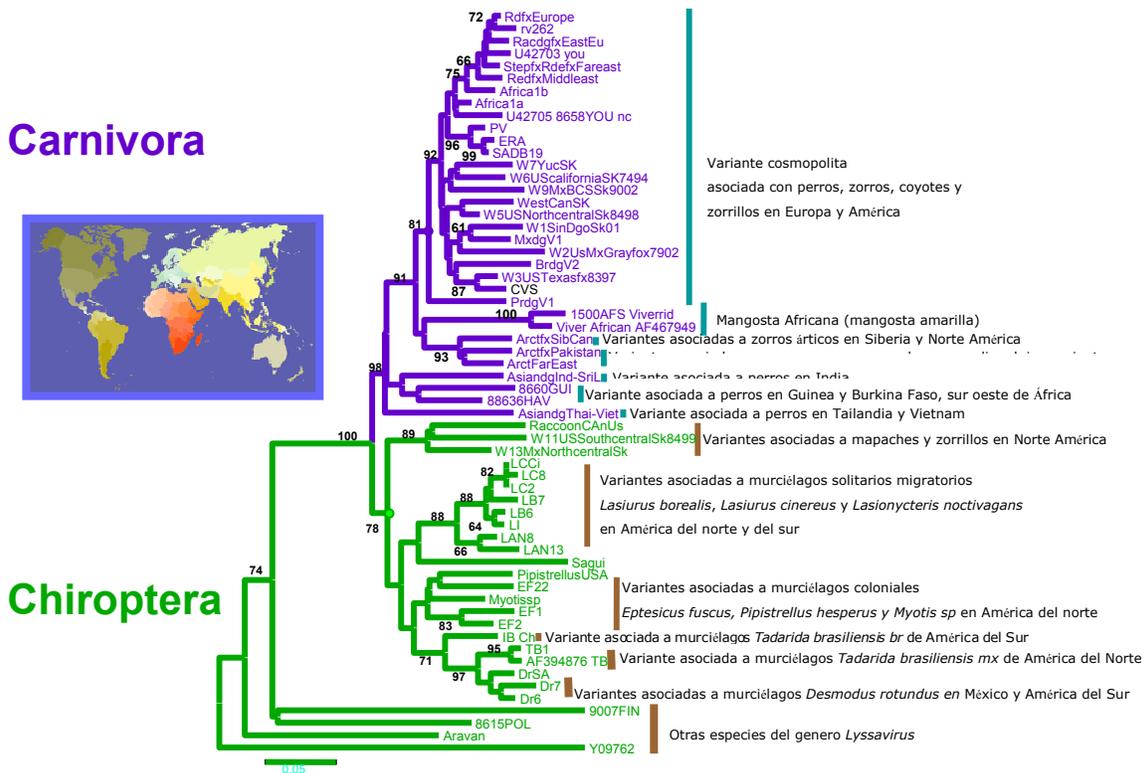


Figura 29. Árbol filogenético obtenido con los 264 nucleótidos del extremo carboxilo terminal del gen que codifica para la nucleoproteína del virus de rabia. El árbol se reconstruyo por el método de Neighbor-Joining, usando secuencias de todo el mundo asociadas a diferentes reservorios de la enfermedad. Como grupo externo se usaron secuencias de otras especies de *Lyssavirus* (EBL-1, EBL-2, Aravan, Mokola) En morado esta el clado o filogrupo que a su vez esta integrado por diferentes linajes asociado a diferentes reservorios carnívoros terrestres, o linajes asociados al mismo reservorio pero representando focos de la enfermedad en diferentes regiones del mundo (caso de los perros, zorros, zorrillos). En verde se observa el clado o filogrupo asociado a murciélagos en cual a su vez despliega diferentes linajes asociados a diferentes especies de murciélagos en toda América.

Se logro reproducir la misma topología del árbol de la figura 27, al editar las secuencias de dicho árbol al fragmento de 264 pb y usando el método de Bayes para la reconstrucción del árbol filogenético, figura no mostrada. Así mismo, pertinente mencionar que se decidió cambiar el método de reconstrucción de los árboles filogenéticos [de métodos cladísticos

CAPÍTULO VII. Resultados

exhaustivos (máxima probabilidad y Bayes) a un método fenético de distancia(Neighbor-joining)] porque el tiempo de cómputo para realizar árboles filogenético por el método de distancia Neighbor-Joining fue mucho menor (de 2 a 3 minutos) que el requerido para reconstruir las filogenias por los métodos cladísticos (de una semana) usando una computadora de escritorio convencional (con las características de memoria y capacidad de procesamiento mas actualizadas) y con el mismo numero de secuencias y de la misma longitud. Tal y como se observa en las figuras 29 y 30, el método fenético de neighbor-joining es capaz de generar árboles con la misma topología con secuencias parciales y completas del gen que codifica para la nucleoproteína.

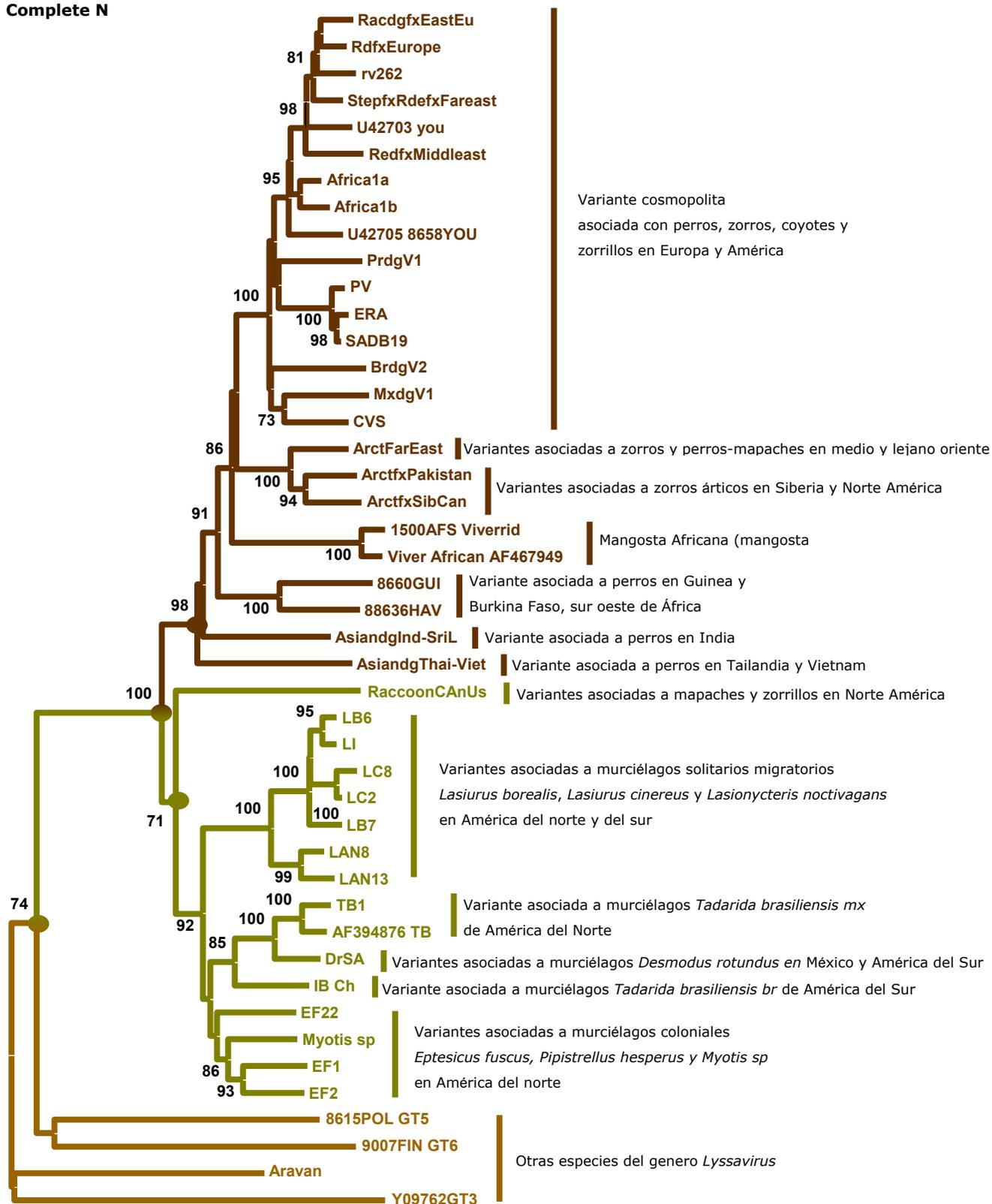
En resumen la selección del marcador molecular para realizar estudios de epidemiología molecular de la rabia en México se sustentó en:

i) El gen que codifica para la proteína N puede ser amplificado con mayor eficiencia mediante una RT-PC. La región que codifica para los últimos 88 amino ácidos (363-450), en el extremo carboxilo terminal codificado por 264 nucleótidos 1157-1420 de acuerdo con sus posiciones en la cepa de referencia SAD B19, es lo suficientemente informativa para definir más de 80 linajes en toda América (y mas de 100 en todo el mundo) del virus de la rabia asociados de forma específica (valores altos de "bootstrap" o soporte estadístico, mas 70%) con diferentes especies de carnívoros terrestres y quirópteros (reservorios) y diferentes regiones geográficas (figura 31).

ii) Esta región pequeña permite obtener concentraciones suficientes de amplicón (RT-PCR de alta eficiencia), en un programa completo de RT-PCR de 40 ciclos (Apéndice III), para realizar su secuenciamiento en un solo paso. Lo que evita realizar PCR anidados que aumentan la probabilidad de captar errores puntuales en las secuencias estudiadas, además que incrementa el costo de la prueba.

CAPÍTULO VII. Resultados

Complete N



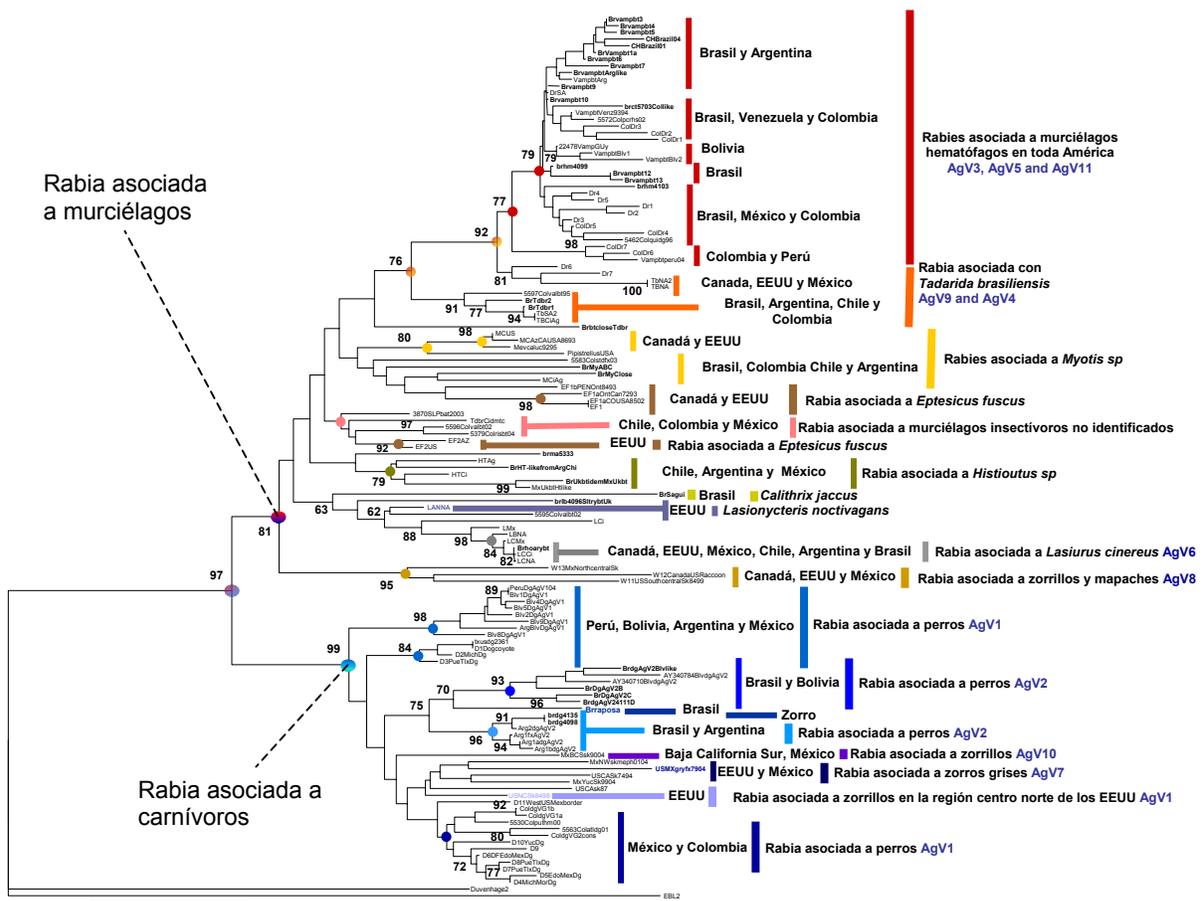


Figura 31. Árbol filogenético de distancia (Neighbor-Joining) que muestra la diversidad espacial, temporal y de reservorio específico del virus de la rabia en América. En la reconstrucción de este árbol se usaron secuencias parciales con los 264 nucleótidos del extremo carboxilo terminal del gen que codifica para la nucleoproteína del virus de la rabia. Cada color agrupa una serie de linajes y sublinajes del virus de la rabia asociados a un reservorio específico o región geográfica.

De manera que el método es accesible aun para laboratorios con bajo presupuesto (lo que es el caso de la mayoría de los laboratorios de diagnóstico de América Latina), ya que la obtención de dicha secuencia es posible mediante métodos manuales (electroforesis en gel vertical acoplado a una tinción con plata) y para muestras que no han sido almacenadas en condiciones óptimas.

CAPÍTULO VII. Resultados

iii) El gen que codifica para la proteína N tiene la mayor cantidad de secuencias, parciales y completas, reportadas en el banco mundial de genes (GenBank) con respecto a las otras proteínas estructurales del virus. Esto permitió construir árboles filogenéticos para establecer relaciones de las secuencias mexicanas con las previamente obtenidas en brotes de rabia en México y otras partes del mundo.

iv) La ausencia de recombinación y la presencia de tasas de evolución equivalentes dentro del gen "n" de diferentes linajes, que describen la variación espacial, temporal y de reservorio de los *Lyssavirus*, hacen de este gen un buen candidato como marcador para realizar estudios de epidemiología molecular y filogenéticos de la rabia en el mundo.

v) No existe un mejor marcador genético para realizar epidemiología molecular de la rabia. Las secuencias nucleotídicas de cualquiera de sus genes estructurales completos (nucleoproteína, fosfoproteína y glicoproteína) o regiones altamente informativas dentro de estos, son útiles para reconstruir la historia epizootiológica de la enfermedad en un lugar, región o en todo el planeta. La representatividad y lo completo de la historia radica en que el grupo de muestras o secuencias usado abarque la diversidad espacial, temporal y de reservorio del virus de la rabia.

vi) Siempre y cuando se use el mismo grupo de muestras o un grupo de muestras equivalente, que incluya la misma variación espacial, temporal y de reservorios del virus, la reconstrucción filogenética de la historia epizootiológica de la rabia será siempre la misma, sin importar el marcador genético o el método para la construcción del árbol filogenético.

vii) Para los propósitos del presente trabajo el mejor marcador genético lo constituyo la región del extremo carboxilo terminal de la nucleoproteína, del la cual se usaron únicamente los últimos 264 nucleótidos que codifican para 88 amino ácidos. Con este marcador fue posible reproducir la mismas historias epizootiológicas de la enfermedad que las obtenidas con

secuencias de genes completos por lo que las inferencias realizadas con este tienen la misma validez y representatividad.

viii) Este marcador genético utilizado en el presente estudio resultó fácil de amplificar a altas tasas de eficiencia aun en muestras almacenadas en condiciones inestables, sin necesidad de realizar pases de amplificación de la carga viral en ratón o en cultivo celular. Ello abarato los costos de tipificación molecular del virus de la rabia. Así mismo, el procesamiento computacional (que comprende tiempo y capacidad de computo) para reconstruir los árboles filogenéticos también se redujo de forma significativa al usar secuencias cortas y empleando el método fenético de Neighbor-Joining.

CAPÍTULO VII. RESULTADOS

Segunda parte

3. Diversidad del virus de la rabia y sus reservorios en México

Se analizaron un total de 456 muestras de las cuales 243 se obtuvieron de nueve especies de animales considerados como hospederos no reservorios del virus de la rabia y 213 que comprendieron más de 7 especies consideradas como reservorios de la enfermedad. Diez variantes antigénicas del virus de la rabia, de 11 previamente registradas para toda América Latina, fueron detectadas en 30 estados a lo largo de la República Mexicana (tablas 3, 4 y 5).

Tabla 3. Patrones antigénicos encontrados en los virus de la rabia de México

Anticuerpo monoclonal ^A Reservorio (linaje genético)	C1	C4	C9	C10	C12	C15	C18	C19	VAg*
CVS/ERA/SAD/PAST [□]	+	+	+	+	+	+	+	+	control
Perro (D1-D11, W1, W3, W5, W6)	+	+	+	+	+	+	-	+	1
Perro de América del Sur	+	+	-	+	+	+	-	+	2
Desmosdus rotundus (Dr1, Dr2)	-	+	+	+	+	-	-	+	3
Tadarida brasiliensis brasiliensis	-	+	+	+	+	-	-	-	4
Desmosdus rotundus	-	+	+/-	+	+	+/-	-	+/-	5
Lasiurus cinereus	+/-	+	+	+	+	-	-	-	6
^B Zorro gris de Arizona	+	+	+	-	+	+	-	+	7
^C Zorrillo del Centro Sur, EEUU o variante de zorrillo Centro Norte de México	-	+	+	+	+	+	+	+	8
Tadarida brasiliensis mexicana	+	+	+	+	+	-	-	-	9
Zorrillo de Baja California Sur	+	+	+	+	-	+	-	+	10
Desmosdus rotundus (Dr3, Dr4, Dr5)	-	+	+	+	-	-	-	+	11
Zorrillo de Yucatán (W7)	+	+	-	+	-	+	+	+	VA
Desmosdus rotundus del oeste (Dr6, Dr7)	-	+	+	+	+	+/-	+	+	VA
San Luis Potosí SLP	+	+	+	-	+	-	-	-	VA
Lasiurus sp México (LMX)	-	-	+	+	+	-	-	-	VA
Humano de Nuevo León	-	+	+	+	+	-	-	-	VA
Histiopus montanus (UKMx)	-	+	+/-	+	+/-	-	-	-	VA
<i>Callithrix jacchus</i> (mono sagui)	-	-	+	+	-	-	-	-	VA

VAg, variante antigénica. **VA**, variante antigénica atípica. **A**, designación de la variante antigénica de acuerdo con su reservorio más probable; entre paréntesis se encuentra la nomenclatura del linaje o sublinaje genético; en negritas se encuentran las variantes antigénicas que se encontraron en este estudio. **B**, variante antigénica originalmente descrita en Arizona, EEUU; **C**, variante antigénica tal y como fue nombrada en el panel de 8 anticuerpos monoclonales original, pero renombrada como variante de zorrillo Centro Norte de México por su distribución en el país.

Así mismo, se detectó la circulación de 6 variantes antigénicas atípicas. Una asociada a zorrillos manchados de la especie *Spilogale putorius* en el estado de Yucatán y cuatro más aparentemente asociadas a murciélagos.

Tabla 4. Variantes del virus de la rabia aisladas en México de hospederos reservorios y no reservorios.

Hospedero	Muestras analizadas	Variante viral	Porcentaje relativo por variante
NO RESERVORIOS			
Humano	40	V1, V3, V10, V8, V11, VA	75, 10, 7.5, 2.5, 2.5, 2.5
Vaca	169	V11, V3, V1, V8, V10, VA	50, 35, 10, 3, 1.2, 0.8
Gato	8	V1, VA, V8	63, 24, 13
Cerdo	6	V1, V3, V5, V8	50, 16.6, 16.6, 16.6
Caballo	6	V3, V8, V1	50, 33.3, 16.7
Gato montés	3	V7, V10	66.7, 33.3
Cabra	6	V1, V3, V11	66.7, 16.7, 16.3
Oveja	4	V3, V11	50, 50
Burro	1	V1	100
RESERVORIOS			
Perro	164	V1, V3, V5, V7, V9, V11	97, 0.6, 0.6, 0.6, 0.6, 0.6
Zorrillo	25	V8, V10, VA, V1	48, 20, 20, 12
Zorro	5	V7, V1	80, 20
Coyotes	3	V1, V7	66.7, 33.3
Murciélago insectívoro	12	V9, V4, V6, VA	59, 17, 17, 7
Murciélago hematófago	3	V11	67, 33
Murciélago frugívoro	1	V3	100%
TOTAL	456		

VA, Variante atípica

La variante atípica denominada como “*Desmodus rotundus* del oeste”, se ha encontrado predominantemente en ganado bovino y en un murciélago hematófago de la especie *Desmodus rotundus* en el estado de México. La distribución de esta variante parece ser más amplia comprendiendo los estados de Michoacán, Aguas Calientes y Nayarit.

En dos de las tres restantes variantes atípicas no se pudo determinar la especie de murciélago porque el laboratorio estatal o regional que hizo el diagnóstico de rabia primario desecho los restos del murciélago. En el caso de rabia del humano de Nuevo León, los familiares confirmaron que el fallecido relato haber tenido contacto con un murciélago mientras lavaba su ropa en el patio trasero de su casa. La exposición según los familiares fue un rasguño en el rostro. Tres semanas después la persona inicio con los signos de encefalitis aguda.

Capítulo VII. Resultados

Tabla 5. Distribución espacial y temporal de las variantes antigénicas del virus de la rabia en México.

Estado	Especie involucrada	Variante antigénica (número de casos)	Año de detección
Aguascalientes	caballo	V8 (1)	99
	vaca	Variante atípica (1)	00
	zorrillo	V8 (1)	03
Baja California Sur	humano	V10 (1,1,1)	95, 99, 00
	<i>Spilogale putorius lucasana</i>	V10 (4, 1)	98, 99
	Vaca	V10 (1); V1 (1)	98; 99
	Gato montes (<i>Lynx rufus</i>)	V10 (1)	00
	Caballo	V1 (1)	99
	Murciélago (especie no determinada)	Variante atípica (1)	02
Campeche	Vaca	V3 (7); V11 (1)	96-04; 02
Chiapas	Vaca	V11 (1, 9); V3 (1, 1)	97, 00; 00, 03
Chihuahua	Perro	V1 (1, 1)	99, 04
	humano	V1 (1)	03
	<i>Desmodus rotundus</i>	V11 (1)	00
	humano	V1 (1, 1, 1, 1)	94, 96, 97; 03
	<i>Tadarida brasiliensis mexicana</i>	V9 (1, 1)	98, 99
	Gato montés (<i>Lynx rufus</i>)	V7 (1)	03
	Zorrillo (<i>Mephitis mephitis</i>)	V1 (1)	03
Coahuila	coyotes	V1 (1)	00
	Murciélago (especie no determinada)	Variante atípica (1)	01
Distrito Federal	humano	V1 (1, 1)	93, 94
	Murciélago (especie no determinada)	Variante atípica (1)	03
	Perro	V1 (1)	03
	<i>Tadarida brasiliensis mexicana</i>	V9 (1)	98
Durango	Zorrillo	V1 (1)	00
	Perro	V1 (1, 2)	99, 00
Edo. México	humano	V1 (2, 3); V3 (1)	93, 94; 99
	Vaca	V1 (1, 2, 1)	96, 97, 00
	Perro	V1 (10, 1, 3, 5)	98, 99, 03, 04
	<i>Artibeus jamaicensis</i>	V3 (1)	00
Guanajuato	<i>Tadarida brasiliensis mexicana</i>	V9 (1)	98
	<i>Spilogale putorius leucoparia</i>	V8 (1)	99
	Perro	V1 (1)	98
	Gato	V8 (1)	97
	Murciélago (especie no determinada)	V6 (2)	98, 00
Guerrero	Humano	V1 (1)	99
	Perro	V1 (5, 3, 2, 1)	98, 99, 00, 03
	Burro	V1 (1)	99
Hidalgo	Humano	V1 (1, 1)	96, 97
	Vaca	V11 (2, 31, 4)	99, 00, 04
	Cabra	V11 (1)	99
	Caballo	V8 (1)	99
	Oveja	V11 (1, 1)	00, 03
	Perro	V1 (1, 1)	96, 98
	<i>Desmodus rotundus</i>	V11 (1)	03
Jalisco	Vaca	V8 (2, 1)	96, 00
	Gato	V8 (1)	00
Michoacán	Perro	V1 (1); V5 (1)	00; 99
	Vaca	V8 (1), variante atípica (1)	03; 03
Morelos	Perro	V1 (1)	00
Nayarit	Humano	V8 (1)	00
	<i>Desmodus rotundus</i>	V8/ variante atípica (1)	03
Nuevo León	Coyotes (<i>Canis latrans</i>)	V1 (1)	98
	Humano	Variante atípica (1)	98
Oaxaca	humano	V1 (1, 1)	97, 99
	Perro	V1 (2)	03, 04

Tabla 5. Continuación

Estado	Especie involucrada	Variante antigénica (número de casos)	Año de detección
Puebla	Humano	V1 (1, 3, 1)	96, 97, 00
	<i>Tadarida brasiliensis mexicana</i>	V9 (1)	98
	<i>Tadarida brasiliensis mexicana</i>	V4 (1)	97
	Vaca	V1 (2, 5, 1); V3 (1); V10 (1); V11 (4, 3)	96, 97, 00; 96; 96; 96, 98
	Cerdo	V1 (2, 1)	98, 00
	Cabra	V1 (1)	98
	Gato	V1 (1, 1)	96, 00
	Perro	V1 (15, 12, 1)	96, 98, 00
Querétaro	Cerdo	V5 (1)	99
Quintana Roo	vaca	V3 (11), V11 (1)	97-01, 02
San Luis Potosí	Humano	V1 (3)	96
	<i>Spilogale putorius leucoparia</i>	V8 (1, 4, 1, 2)	94, 97, 00, 03
	<i>Conepatus mesoleucus</i>	V8 (1)	98
	Vaca	V1 (1); V8 (1); V3 (10); V11 (16)	96; 96; 00, 04; 02, 04
	Cerdo	V8 (1)	99
	Gato	V8 (2)	97
	<i>Tadarida brasiliensis mexicana</i>	V9 (2)	99
	Murciélago (especie no determinada)	Variante atípica (1)	03
	Gato	Variante atípica (1)	99
Sinaloa	Gato montés (<i>Lynx rufus</i>)	V7 (1)	00
	Perro	V7 (1)	04
Sonora	Coyote	V7 (1)	99
	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	V1 (1); V7 (1, 2)	00; 00, 02, 03
	Zorrillo (<i>Mephitis mephitis</i>)	V1 (1)	03
Tabasco	Vaca	V3 (2); V11 (2)	00-02; 00-02
	Humano	V3 (1)	00
Tamaulipas	Vaca	V3 (1, 1, 1)	99, 00, 03
	Perro	V1 (1, 1, 1)	97, 02, 03
	Caballo	V3 (2)	0
Tlaxcala	Humano	V1 (1, 3, 1)	93, 94, 95
	Gato	V1 (1)	96
	Perro	V1 (6, 3, 3, 1, 4, 2)	96, 97, 98, 99, 00, 04
	Perro	V9 (1)	99
Veracruz	Humano	V1 (5), V11 (1)	97, 00
	Vaca	V11 (7, 1, 1, 1)	96, 97, 02, 03
	Perro	V11 (1)	03
Yucatán	Humano	V3 (2)	01, 04
	Vaca	V3 (23)	95, 04
	Borrego	V3 (1, 1)	00, 01
	Caballo	V3 (1)	96
	Cabra	V3 (1)	96
	<i>Spilogale putorius</i>	Variante atípica (5)	99, 00, 03, 04
	Gato	Variante atípica (1)	99
	Venado	Variante atípica (1)	99
	<i>Aguti paca</i>	Variante atípica (2)	99
	<i>Nasua narica</i>	Variante atípica (1)	04
	Perro	V1 (59)	95, 04
	Gato	V1 (2)	96, 98
	Cerdo	V3 (1)	02
Zacatecas	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>	V7 (1)	99
	<i>Spilogale putorius leucoparia</i>	V8 (1)	98
	Vaca	V1 (1)	00

Capítulo VII. Resultados

Las figuras 32, 33 y 34 muestran la distribución geográfica de cada una de estas variantes en asociación con el hospedero específico de donde fueron aisladas. El número de variantes halladas por especie de animal fue mayor en hospederos no reservorios que en reservorios de la enfermedad. Así mismo, para una misma especie de hospedero no reservorio se encontró que, entre mayor fue el número de muestras analizadas y más grande fue la extensión territorial abarcada mayor fue el número de variantes antigénicas encontradas. No se observó la misma tendencia para especies de animales consideradas como reservorios naturales de la enfermedad (tablas 3 y 4). La figura 32a, muestra la distribución geográfica de la variante antigénica 1 en México, aislada de especies consideradas como hospederos reservorios y hospederos no reservorios del virus de la rabia. La figura 32b, es la ampliación de la región que presenta mayor densidad de casos asociados con esta variante de la figura 32a. Es importante destacar que en el norte del país la variante 1 se aisló en su mayoría de animales silvestres, ganado y seres humanos habiéndose detectado en un solo perro en los estados de Tamaulipas y Durango. La figura 33 muestra la distribución de las variantes antigénicas asociadas a reservorios silvestres terrestres. Las variantes antigénicas V8 y V10 fueron aisladas principalmente de zorrillos y de forma esporádica de hospederos no reservorios como seres humanos, ganado y otros animales silvestres (tabla 5). La variante V8 fue encontrada en los estados de la región central del país en zorrillos moteados de la subespecie *Spilogale putorius leucoparia* (Aranda y López, 1999); mientras que la variante antigénica V10 se encontró circunscrita a la región sur del estado de Baja California Sur, asociada a la subespecie de zorrillo *Spilogale putorius lucasana*. De ésta última variante, se han identificado varios casos de rabia en seres humanos (tabla 5) así como en animales domésticos.

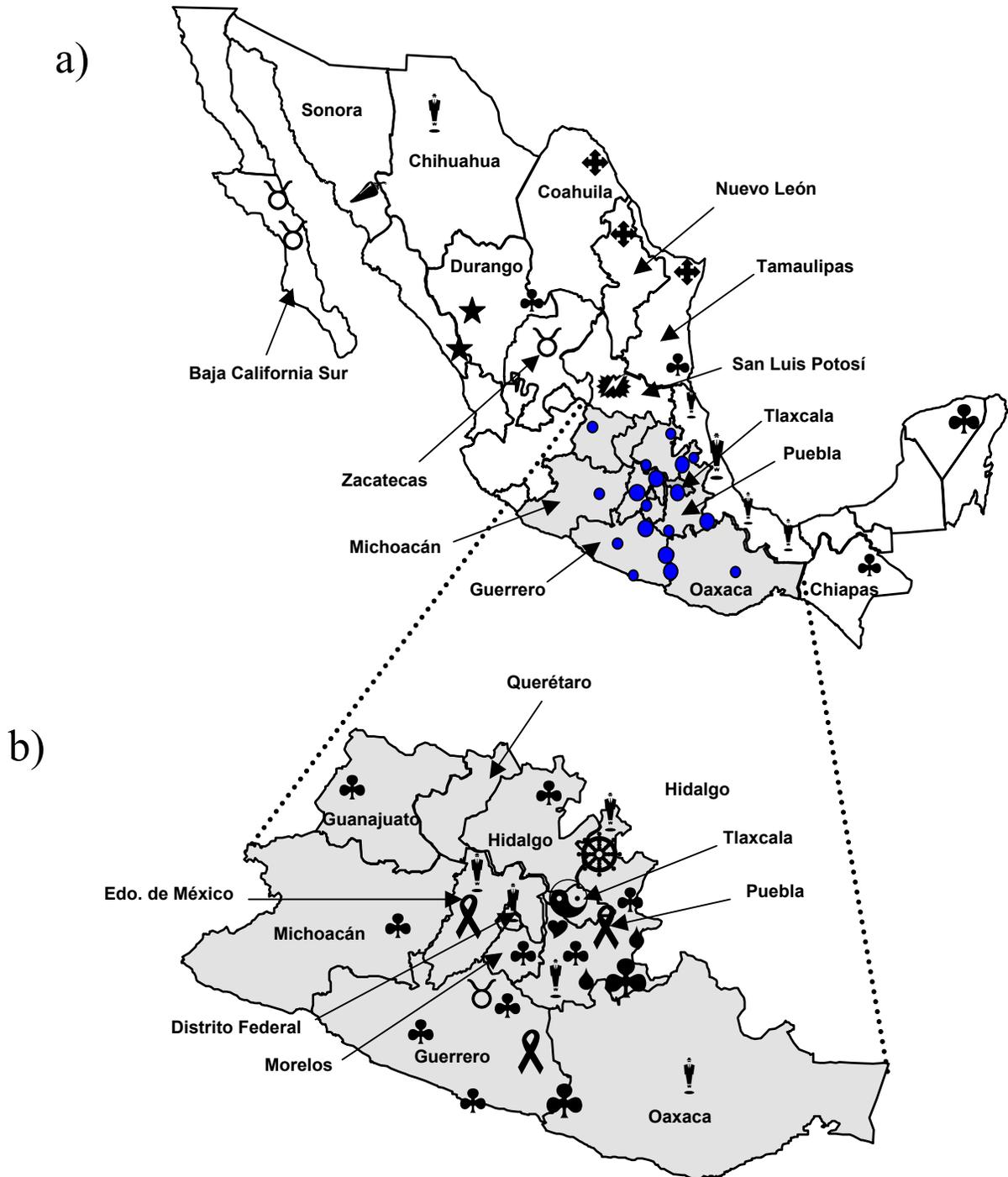


Figura 32. a) Distribución geográfica del patrón antigénico V1 detectado en hospederos reservorios y no reservorios; b) Proyección amplificada del área sombreada que representa a los estados con mayor número de casos con la variante antigénica V1. Los símbolos indican las especies de las cuales fueron aislados los virus de la rabia: La figura de humano, humanos; trébol, perros; chile, zorros; estrella de cinco picos, zorrillos; cruz cardinal, coyotes; símbolo de Tauro, vacas; gota, gatos; corazón, cerdos; listón, humanos, vacas y perros; timón de barco, humanos y cerdos; símbolo de equilibrio, humanos, gatos y perros; relámpago, humanos y vacas. Los símbolos más grandes denotan mayor número de casos.

Capítulo VII. Resultados

De forma inesperada, la variante V10 fue detectada en una vaca en el estado de Puebla y la variante V8 se aisló de un zorrillo de la especie *Conepatus mesoleucus* en el estado de San Luis Potosí. Actualmente, no se han encontrado casos nuevos de rabia asociada a zorrillos *Conepatus* spp. o vacas con estas variantes antigénicas en los estados arriba referidos, no obstante cada una de estas variantes sigue siendo aislada de zorrillos de la especie *Spilogale putorius* en ambos estados. La posibilidad de que el caso de la vaca con variante V10, detectado en Puebla, haya sido importado de Baja California Sur fue descartado, ya que se corroboró que la vaca nació y se crió en el estado de Puebla. La variante antigénica V7, fue aislada de zorros grises (*Urocyon cinereoargenteus*) en los estados de Zacatecas, Sonora, así como también de otras especies silvestres como coyotes (*Canis latrans*) y lince (*Lynx rufus*) a lo largo de la Sierra Madre Occidental dentro de los límites de los estados de Chihuahua, Durango y Sinaloa.

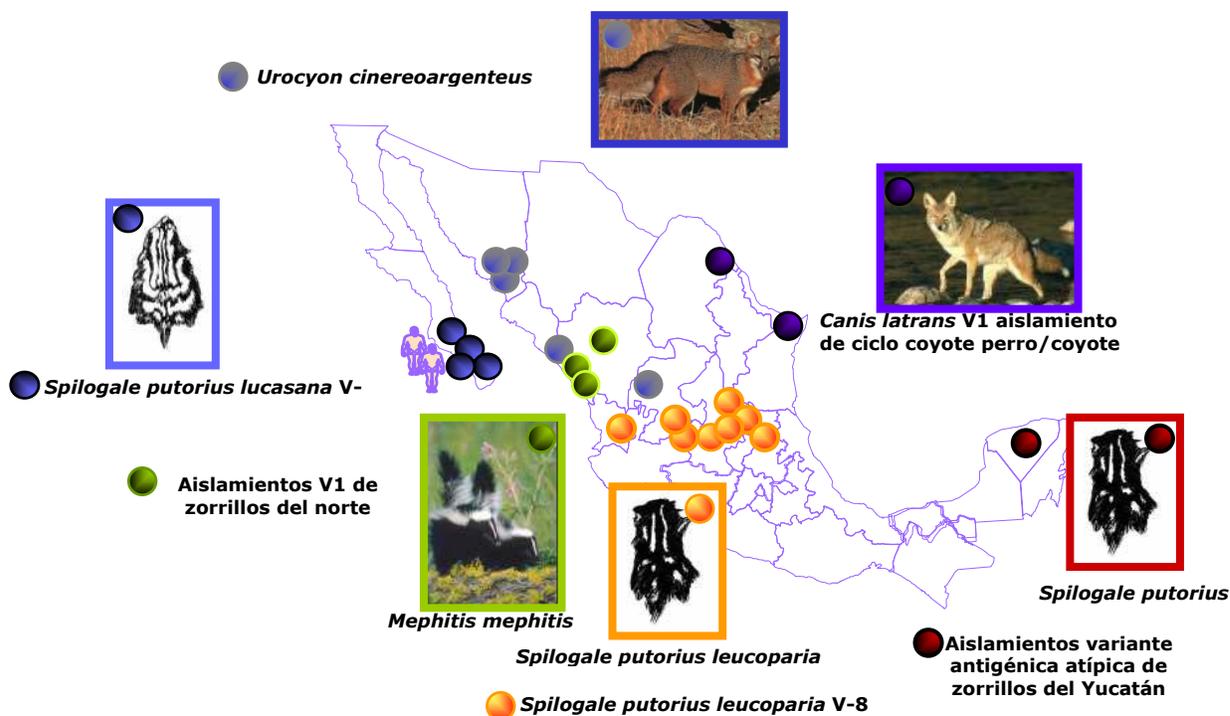


Figura 33. Distribución geográfica de las variantes antigénicas del virus de la rabia asociadas con carnívoros terrestres silvestres en México.

La figura 34 muestra la distribución de las variantes antigénicas (V3 y V11) asociadas a murciélagos hematófagos, las cuales fueron aisladas principalmente de vacas que habitan dentro de las zonas tropicales y subtropicales de los estados cercanos a la costa este (San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz, Puebla, Hidalgo), así como también parte del sureste y el caribe mexicano integrado por los estados de Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo. En las zonas tropicales y subtropicales del centro-oeste del país se encontraron las variante antigénica V3 y V5 (Estado de México y Michoacán), aunque posteriormente y principalmente como consecuencia del mejoramiento de la vigilancia epidemiológica de la rabia en el país, las variantes V11 y V8 se empezaron a detectar en ganado y seres humanos con rabia en los estados de Oaxaca, Michoacán, Estado de México, Nayarit y Aguascalientes (tablas 2 y 3).



Capítulo VII. Resultados

Figura 34. Distribución geográfica de las variantes antigénicas del virus de la rabia asociadas a murciélagos en México.

Las variantes antigénicas V3, V8 y V11 se lograron aislar de murciélagos hematófagos de la especie *Desmodus rotundus*. Sin embargo, en este punto de la investigación resultó desconcertante haber encontrado una variante antigénica asociada comúnmente a un reservorio carnívoro terrestre, como el zorrillo moteado, en un murciélago. Biológicamente, resulta difícil explicar como dicho virus pudo haber sido transmitido a murciélagos a partir de zorrillos y que actualmente dicha variante se este manteniendo de forma enzoótica en poblaciones de murciélagos hematófagos, basándose en el hecho de que dicha variante se sigue aislando de forma consistente de vacas y animales domésticos en la región centro-oeste del país. Aunque el contacto entre ambas especies sea posible (por ser especies simpátricas) y el virus de la rabia V8 este circulando de forma enzoótica en poblaciones de zorrillos moteados en esa región, es muy poco probable que un murciélago pueda sobrevivir al ataque de un zorrillo rabioso; o en el caso que llegase a sobrevivir es razonable pensar que no lo haría con la suficiente fortaleza física para poderse incorporar a su ciclo de vida y al padecer la enfermedad poder transmitir el virus a otros individuos de su misma especie o a otras especies de hospederos no reservorios.

La variante V9 fue aislada principalmente de murciélagos insectívoros de la especie *Tadarida brasiliensis mexicana* dentro de los márgenes de los estados de Chihuahua, Nuevo León, San Luis Potosí, Guanajuato y Puebla. La variante antigénica V6 asociada con *Lasiurus cinereus* fue aislada de dos murciélagos insectívoros en el estado de Guanajuato, en los cuales no se determinó la especie. La variante antigénica V4 que normalmente se ha aislado en murciélagos insectívoros en América del Sur se encontró en un murciélago *Tadarida brasiliensis mexicana* en el estado de Puebla. En varias muestras obtenidas a partir de murciélagos insectívoros, en los que

no se pudo determinar la especie, se detectaron patrones antigénicos que no correspondieron a ninguno de los 11 previamente reportados con el panel de ocho anticuerpos monoclonales estandarizado para América Latina por el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta, Georgia, CDC.

4. Diversidad molecular del virus de la rabia asociada a carnívoros terrestres en México y su comparación con la rabia en carnívoros terrestres en los EEUU

El análisis de 136 secuencias indicó la presencia de 142 sitios conservados, 178 sitios variables y 160 sitios parsimoniosamente informativos. La identidad de los nucleótidos en las 136 secuencias se extiende desde 78.7 hasta el 100% con un promedio de 97.2%. Similarmente las secuencias consenso variaron desde un 79.3 a un 97.7% con un promedio de 89.5% para la identidad de nucleótidos y desde un 90.8 a 100%, con un promedio de 97% para la identidad de aminoácidos (Tabla 1). Los patrones de variación de nucleótidos dentro de las muestras estudiadas definieron 23 linajes y sublinajes estadísticamente sustentados, divididos en dos grupos importantes (B y C) desde el nodo A (Figs. 32 and 33). El grupo B contiene todas las secuencias asociadas con especies de canidos y zorrillos, mientras que el grupo C contiene secuencias asociadas con zorrillos, mapaches y murciélagos. El nodo D agrupó varios sublinajes específicamente asociados con la rabia de perro, D1-D11, los cuales se diferenciaron de los linajes restantes relacionados con los focos de rabia asociados a fauna silvestre, específicamente zorros y zorrillos, W1-W10 (figs. 32,33, 39).

La mayoría de los linajes y de los sublinajes fueron identificados como variante antigénica (AgV) 1, asociada con perros, zorrillos y zorros,

Capítulo VII. Resultados

mientras que las variantes 7 y 8-10 estuvieron asociadas con zorros grises y zorrillos, respectivamente (Tablas 3 y 9). Ciertos linajes y/o sublinejes

Tabla 6. Valores de identidad y distancia genética (distancia "p") de las secuencias de amino ácidos y de nucleótidos entre los linajes del virus de la rabia asociados a carnívoros terrestres y algunos murciélagos en México y EEUU.

Nucleótido Amino ácido	D1	D2– D12	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12	W13	Vamp	Tdbr
D1		97.7	92	89.3	92.7	91.2	94.3	91.2	91.2	90.4	89.7	85.8	82.4	82	84.7	83.5	83.9
D1–D12	98.9 0.011	0.023	0.08 94.3	0.107 91.6	0.073 95	0.088 92.7	0.057 95	0.088 93.5	0.088 92.7	0.096 92.3	0.103 91.2	0.142 87.4	0.176 83.1	0.180 82.8	0.153 85.4	0.165 82.8	0.161 83.1
W1	97.7 0.023	98.9 0.011	0.057	90.4 0.096	93.1 0.069	90.4 0.096	92.3 0.077	91.2 0.088	91.6 0.084	88.5 0.115	90	87.7 0.100	83.5 0.123	80.8 0.165	83.1 0.192	80.8 0.169	82 0.180
W2	95.4 0.046	96.6 0.034	95.4 0.046		91.2 0.088	88.5 0.115	91.6 0.084	89.7 0.103	89.3 0.107	88.1 0.119	88.5 0.115	86.2 0.138	82.4 0.176	82 0.180	83.5 0.165	79.3 0.207	81.2 0.188
W3	98.9 0.011	100 0	98.9 0.011	96.6 0.034		92 0.080	93.9 0.061	92.3 0.077	91.6 0.084	90.4 0.096	90.8 0.092	88.9 0.111	83.1 0.169	83.9 0.161	83.9 0.161	84.3 0.157	85.1 0.149
W4	96.6 0.034	97.7 0.023	96.6 0.034	94.3 0.057	97.7 0.023		93.1 0.069	93.1 0.069	90.4 0.096	89.7 0.103	89.7 0.103	84.7 0.153	82 0.180	80.8 0.192	84.7 0.153	80.8 0.192	82 0.180
W5	98.9 0.011	100 0	98.9 0.011	96.6 0.034	100 0	97.7 0.023		93.5 0.065	92.3 0.077	92 0.088	92.3 0.077	88.9 0.111	81.6 0.184	81.6 0.184	86.2 0.138	83.9 0.161	83.1 0.169
W6	96.6 0.034	97.7 0.023	96.6 0.034	94.3 0.057	97.7 0.023	96.6 0.034	97.7 0.023		93.1 0.069	91.2 0.088	91.6 0.084	86.2 0.138	82.4 0.176	82.4 0.176	83.9 0.161	81.2 0.188	81.2 0.188
W7	96.6 0.034	97.7 0.023	96.6 0.034	94.3 0.057	97.7 0.023	95.4 0.046	97.7 0.023	95.4 0.046		90.8 0.092	91.2 0.088	88.5 0.115	80.5 0.195	80.1 0.99	82.8 0.172	82.4 0.176	82.4 0.176
W8	96.6 0.034	97.7 0.023	96.6 0.034	94.3 0.057	97.7 0.023	95.4 0.046	97.7 0.023	95.4 0.046	95.4 0.046		88.9 0.11	87 0.130	83.5 0.165	83.1 0.169	85.1 0.149	83.9 0.161	84.7 0.153
W9	96.6 0.034	97.7 0.023	96.6 0.034	96.6 0.034	97.7 0.023	95.4 0.046	97.7 0.023	96.6 0.034	95.4 0.046	95.4 0.046		87.4 0.126	82.8 0.172	80.5 0.195	85.4 0.146	82 0.180	81.6 0.184
W10	94.3 0.057	95.4 0.046	94.3 0.057	94.3 0.069	95.4 0.046	93.1 0.069	95.4 0.046	93.1 0.069	95.4 0.046	93.1 0.069	95.4 0.046		79.3 0.207	81.2 0.188	82.8 0.172	85.1 0.149	83.1 0.169
W11	96.6 0.0324	97.7 0.023	96.6 0.034	94.3 0.057	97.7 0.023	95.4 0.046	97.7 0.023	95.4 0.046	95.4 0.046	97.7 0.023	95.4 0.046	93.1 0.069		88.9 0.111	89.3 0.107	83.9 0.161	83.1 0.169
W12	94.3 0.057	95.4 0.046	94.3 0.057	92 0.080	95.4 0.046	93.1 0.069	95.4 0.046	93.1 0.069	93.1 0.069	95.4 0.046	93.1 0.069	90.8 0.092	97.7 0.023		90 0.100	83.5 0.165	83.5 0.165
W13	95.4 0.046	96.6 0.034	95.4 0.046	93.1 0.069	96.6 0.034	94.3 0.069	96.6 0.034	94.3 0.057	94.3 0.057	94.3 0.057	94.3 0.057	94.3 0.057	96.6 0.034	94.3 0.057		85.4 0.146	84.7 0.153
Vamp	93.1 0.069	94.3 0.057	93.1 0.069	90.8 0.092	94.3 0.057	92 0.080	94.3 0.057	93.1 0.069	93.1 0.069	92 0.080	94.3 0.057	90.8 0.092	94.3 0.057	92 0.080	94.3 0.057		93.5 0.065
Tdbr	94.3 0.057	95.4 0.046	94.3 0.057	92 0.080	95.4 0.046	93.1 0.069	95.4 0.046	94.3 0.057	94.3 0.057	93.1 0.069	95.4 0.046	92 0.080	93.1 0.069	90.8 0.092	93.1 0.069	98.9 0.011	

La matriz inferior con valores en negritas, muestra la identidad de aminoácidos (porcentaje) y los valores de la distancia "p" entre linajes; la matriz superior muestra los valores de identidad de nucleótidos (porcentaje) y los valores de la distancia "p" entre linajes. Vamp = vampiro; Tdbr= *Tadarida brasiliensis*

presentaron cambios específicos en su secuencia de aminoácidos que consistentemente estuvieron conservados por más de 5 años.

La mayoría de los cambios de aminoácidos tuvieron características fisicoquímicas similares, con excepción de la sustitución de aminoácidos

encontrada en los linajes W7, W11, W12 y W13 que sugiere cambios estructurales en la proteína de N (tabla 9, figura 38).

Tabla 7. Muestras de México tipificadas genéticamente.

No de identificación/ (No. de Linaje ^a)	Animal	AgV ^b	Estado	Año	Número de GenBank
247coahcy01 (D1)	Coyote	1	Coahuila	2001	AY561764
4508tampct02(D1)	Gato	1	Tamaulipas	2002	AY561762
4506tampct02(D1)	Gato	1	Tamaulipas	2002	AY561763
3288michdg00 (D2)	Perro	1	Michoacán	2000	AY561770
T4823slpdg96 (D4)	Perro	1	San Luis Potosí	1996	AY561766
T3269zacbov00 (D4)	Vaca	1	Zacatecas	2000	AY561765
3284mxgdg99 (D5)	Perro	1	Estado de México	1999	AY561774
T3260dfdg00 (D5)	Perro	1	México, DF	2000	AY561772
3267mxgdg01 (D5)	Perro	1	Estado de México	2001	AY561775
4516mxgdg02 (D5)	Perro	1	Estado de México	2002	AY561778
4511mxgdg02 (D5)	Perro	1	Estado de México	2002	AY561779
4514mxgdg02 (D5)	Perro	1	Estado de México	2002	AY561776
T3325hgogd02 (D5)	Perro	1	Hidalgo	2002	AY561788
3244mxgdg98 (D6)	Perro	1	Estado de México	1998	AY561773
4822puedg96 (D7)	Perro	1	Puebla	1996	AY561780
T3278grodg99 (D7)	Perro	1	Guerrero	1999	AY561789
T3299dfdg99 (D8)	Perro	1	México, DF	1999	AY561771
3281puedg00 (D8)	Perro	1	Puebla	2000	AY561781
3279puedg01 (D8)	Perro	1	Puebla	2001	AY561782
3302tlxdg01 (D8)	Perro	1	Tlaxcala	2001	AY561786
T3275gtoct01 (D8)	Gato	1	Guanajuato	2001	AY561769
T3313jaldg02 (D8)	Perro	1	Jalisco	2002	AY561768
4491mxgdg02 (D8)	Perro	1	Estado de México	2002	AY561783
4513puedg02 (D8)	Perro	1	Puebla	2002	AY561784
4519puedg02 (D8)	Perro	1	Puebla	2002	AY561785
3303tlxdg02 (D8)	Perro	1	Tlaxcala	2002	AY561787
T4815slpdg99 (D9)	Perro	1	San Luis Potosí	1999	AY561767
3251grodg00 (D9)	Perro	1	Guerrero	2000	AY561790
3285grodg01 (D9)	Perro	1	Guerrero	2001	AY561791
3287grodg01 (D9)	Perro	1	Guerrero	2001	AY561792
4476yucdg99 (D10)	Perro	1	Yucatán	1999	AY561794
4485yucdg01 (D10)	Perro	1	Yucatán	2001	AY561795
4481yucdg01 (D10)	Perro	1	Yucatán	2001	AY561796
4480yucpg02 (D10)	cerdo	1	Yucatán	2002	AY561797
4486chisdg02 (SI)	Perro	1	Chiapas	2002	AY561793
641sinsk01 (W1)	Zorrillo	1	Sinaloa	2001	AY561804
231sinsk01 (W1)	Zorrillo	1	Sinaloa	2001	AY561805
1535dgosk01 (W1)	Zorrillo	1	Durango	2001	AY561806
3280zacfx99 (W2)	Zorro gris	7	Zacatecas	1999	AY561798
3253sonfx01 (W2)	Zorro gris	7	Sonora	2001	AY561799
3282chihpm01 (W2)	Puma	7	Chihuahua	2001	AY561802
3264sinbct01 (W2)	Gato montés o lince	7	Sinaloa	2001	AY561803
4510sonbct02 (W2)	Gato montés o lince	7	Sonora	2002	AY561800
4498sonfx02 (W2)	Zorro gris	7	Sonora	2002	AY561801
T3304mxgdg02 (W2)	Perro	1	Estado de México	2002	AY561777
4475yucVenado9 (W7)	Venado	VA	Yucatán	1999	AY561818
4463yuctepz99 (W7)	Agutí	VA	Yucatán	1999	AY561819
4464yuctepz99 (W7)	Agutí	VA	Yucatán	1999	AY561820
4466yucuknW5 (W7)	Sin información	VA	Yucatán	Sin dato	AY561821
4471yucsk01 (W7)	Zorrillo	VA	Yucatán	2001	AY561822
3265bcssk01 (W9)	Zorrillo	10	Baja California Sur	2001	AY561807
3290bcssk02 (W9)	Zorrillo	10	Baja California Sur	2002	AY561808

Capítulo VII. Resultados

Tabla 7. Continuación.

No de identificación/ (No. de Linaje ^a)	Animal	AgV ^b	Estado	Año	Número de GenBank
3259bcsbv02 (W9)	Vaca	10	Baja California Sur	2002	AY561809
3291chihbv99 (W11)	Vaca	8	Chihuahua	1999	AY561810
3289jalct00 (W13)	Gato	8	Jalisco	2000	AY561813
3247jalsk01 (W13)	Zorrillo	8	Jalisco	2001	AY561811
3296jalsk01 (W13)	Zorrillo	8	Jalisco	2001	AY561812
3248zacsk01 (W13)	Zorrillo	8	Zacatecas	2001	AY561814
4489dgosk01 (W13)	Zorrillo	8	Durango	2001	AY561815
4502slpsk02 (W13)	Zorrillo	8	San Luis Potosí	2002	AY561816
4505slpsk02 (W13)	Zorrillo	8	San Luis Potosí	2002	AY561817

SI, segregados independientemente; las muestras no agrupadas con ningún linaje o sublinaje. **T**, Se cuenta con evidencia de importación o movimiento del animal involucrado en el caso de rabia, con base en el cuestionario epidemiológico, historia clínica o entrevista con el dueño del animal. **a** Entre paréntesis y negritas se anoto el linaje tal y como se observa en el árbol filogenético. **b** AgV. Variante antigénica (de sus siglas en inglés) identificada con el panel reducido de 8 anticuerpos monoclonales del CDC. **VA**, Variante antigénica atípica.

Tabla 8. Secuencias históricas del virus de la rabia representando los principales focos de rabia terrestre en México y los Estados Unidos.

No de identificación/ (No. de Linaje ^a)	Animal	AgV ^b	Estado	Año	Número de identificación en las referencias o en el GenBank ^c
835txhm76 (D1)	Humano	1	Texas	1976	1 Txushm835
834txhm79 (D1)	Humano	1	Texas	1979	1 Txushm834
2193txhm79 (D1)	Humano	1	Texas	1979	1 Txushm2193
2160txdg85 (D1)	Perro	1	Texas	1985	1, 2 Txusdg2160
2361txdg94 (D1)	Perro	1	Texas	1994	1 Txusdg2361
2587txcy94 (D1)	Coyote	1	Texas	1994	1 Txuscy2587
848ormichhm89 (D2)	Humano	1	Oregon	1989	1, 2 Orushm848
555dfdg78 (D3)	Perro	1	México DF	1978	1, 2 Mxmxgd555
3124puedg91 (D3)	Perro	1	Puebla	1991	1 Mxdg3124
3127tlxgt91 (D3)	Cabra	10	Tlaxcala	1991	1 Mxgt3127
3126puepg93 (D3)	Cerdo	1	Puebla	1993	1 Mxpg3126
3147qrodg95 (D3)	Perro	1	Queretaro	1995	1 Mxdg3147
3151Mxuk (D3)	Sin dato	1	Sin dato	S/dato	1 Mxuk3151
3138michdk91 (D4)	Burro	1	Michoacán	1991	1 Mxdk3138
2184camrhm93 (D4)	Humano	1	California	1993	1 Caushm2184
3142dffr90 (D6)	Hurón	1	México DF	1990	1 Mxfr3142
3121dfhm91 (D6)	Humano	1	México DF	1991	1 Mxhm3121
3134dfpg91 (D6)	Cerdo	1	México DF	1991	1 Mxpg3134
1278mxgd91 (D6)	Perro	1	México DF	1991	1, 2 Mxmxgd1278
1282mxgd91 (D6)	Perro	1	México DF	1991	1, 2 Mxmxgd1282
3143puebv94 (D7)	Ganado vacuno	1	Puebla	1994	1 Mxbv3143
3125oaxdg92 (D9)	Perro	1	Oaxaca	1992	1 Mxdg3125
726cahm61 (D11)	Humano	1	California	1961	1, 2 Caushm726
953cachihm79 (D11)	Humano	1	California	1979	1 Caushm953
947azsonhm81 (D11)	Humano	1	Arizona	1981	1, 2 Azushm947
1274sondg88 (D11)	Perro	1	Sonora	1988	1, 2 Mxsndg1274
672sndg88 (D11)	Perro	1	Sonora	1988	1, 2 Mxsndg672
671sndg88 (D11)	Perro	1	Sonora	1988	1, 2 Mxsndg671
673sndg88 (D11)	Perro	1	Sonora	1988	12 Mxsndg673
2520cacy90 (D11)	Coyote	1	California	1990	1 Causcy2520
1303orchihdg91 (D11)	Perro	1	Oregon	1991	1 2 Orusdg1303
3128dgdg91 (D11)	Perro	1	Durango	1991	1 Mxdg3128
3144chihbv94 (D11)	Ganado vacuno	1	Chihuahua	1994	1 Mxbv3144
2830txcy95 (D11)	Coyote	1	Oeste de Texas	1995	1 Txuscy2830
559mxgd78 (SI)	Perro	1	México DF	1978	1, 2 Mxmxgd559

Andrés Velasco Villa. Epidemiología molecular de la rabia en México

674cagroct87 (SI)	Gato	1	California	1987	1, 2 Causct674
3122michct90 (SI)	Gato	1	Michoacán	1990	1 Mxct3122
3123dfbv91 (SI)	Vaca	1	Michoacán	1991	1 Mxbv3123

Tabla 8. Continuación

No de identificación/ (No. de Linaje ^a)	Animal	AgV ^b	Estado	Año	Número de identificación en las referencias o en el GenBank ^c
398azfx79 (W2)	Zorro	7	Arizona	1979	1, 3 Azusfx398
186azfx86 (W2)	Zorro	7	Arizona	1986	1, 3 Azusfx186
3148chihbct90 (W2)	Gato montés o lince	7	Chihuahua	1990	1 Mxgm3148
3143puebv94 (D7)	Ganado vacuno	1	Puebla	1994	1 Mxbv3143
3125oaxdg92 (D9)	Perro	1	Oaxaca	1992	1 Mxdg3125
726cahm61 (D11)	Humano	1	California	1961	1, 2 Caushm726
953cachihhm79 (D11)	Humano	1	California	1979	1 Caushm953
947azsonhm81 (D11)	Humano	1	Arizona	1981	1, 2 Azushm947
1274sondg88 (D11)	Perro	1	Sonora	1988	1, 2 Mxsndg1274
672sndg88 (D11)	Perro	1	Sonora	1988	1, 2 Mxsndg672
671sndg88 (D11)	Perro	1	Sonora	1988	1, 2 Mxsndg671
673sndg88 (D11)	Perro	1	Sonora	1988	12 Mxsndg673
2520cacy90 (D11)	Coyote	1	California	1990	1 Causcy2520
1303orchihdg91 (D11)	Perro	1	Oregon	1991	1 2 Orusdg1303
3128dgdg91 (D11)	Perro	1	Durango	1991	1 Mxdg3128
3144chihbv94 (D11)	Ganado vacuno	1	Chihuahua	1994	1 Mxbv3144
2830txcy95 (D11)	Coyote	1	Oeste de Texas	1995	1 Txuscy2830
559mxdg78 (SI)	Perro	1	México DF	1978	1, 2 Mxmxdg559
674cagroct87 (SI)	Gato	1	California	1987	1, 2 Causct674
3122michct90 (SI)	Gato	1	Michoacán	1990	1 Mxct3122
3123dfbv91 (SI)	Vaca	1	Michoacán	1991	1 Mxbv3123
398azfx79 (W2)	Zorro	7	Arizona	1979	1, 3 Azusfx398
186azfx86 (W2)	Zorro	7	Arizona	1986	1, 3 Azusfx186
3148chihbct90 (W2)	Gato montés o lince	7	Chihuahua	1990	1 Mxgm3148
3140bsonbct94 (W2)	Gato montés o lince	7	Sonora	1994	1 Mxgm3140
294txfx83 (W3)	Zorro	1	Texas	1983	1, 2 Txusfx294
3700txfx97 (W3)	Zorro	1	Texas	1997	1 Txusfx3700
732cask87 (W4)	Zorrillo	1	California	1987	1, 3 Causk732
963arsk84 (W5)	Zorrillo	1	Arkansas	1984	1, 3 Arussk963
3789wisk98 (W5)	Zorrillo	1	Wisconsin	1998	1, 2 Wiussk3789
127cask74 (W6)	Zorrillo	1	California	1974	1, 3 Causk127
2521cask94 (W6)	Zorrillo	1	California	1994	1, 3 Causk2521
223Israjackal (W8)	Chacal	ND	Israel	1998	AF162817
210Israfx (W8)	Zorro	ND	Israel	1995	AF162827
310Israfx (W8)	Zorro	ND	Israel	1993	AF162832
3813ygfx (W8)	Zorro	ND	Yugoslavia	2000	AJ296195
3815ygfx (W8)	Zorro	ND	Yugoslavia	2000	AJ296194
3141bcssk90 (W9)	Zorrillo	10	Baja California sur	1990	1 Mxsk3141
3136bcssk92 (W9)	Zorrillo	10	Baja California Sur	1992	1 Mxsk3136
3145bcssk95 (W9)	Zorrillo	10	Baja California Sur	1995	1 Mxsk3145
1578canarctfx (W10)	Zorro ártico	ND	Canadá	1991	L20675
2756canarctfx (W10)	Zorro ártico	ND	Canadá	1993	L20676
964arsk84 (W11)	Zorrillo	8	Arkansas	1984	1, 3 Arussk964
3436kssk87 (W11)	Zorrillo	8	Kansas	1997	1 Ksussk3436
USskArizona (W11)	Zorrillo	8	Arizona	2001	AY170226
GAH1 (W12)	Mapache	ND	Georgia	1983	No publicada.
GAH2 (W12)	Mapache	ND	Georgia	1983	No publicada
FH45 (W12)	Mapache	ND	Florida	1987	No publicada .
FH48 (W12)	Mapache	ND	Florida	1987	No publicada.

Capítulo VII. Resultados

Tabla 8. Continuación.

No de identificación/ (No. de Linaje ^a)	Animal	AgV ^b	Estado	Año	Número de identificación en las referencias o Gen Bank ^c
3150dfbt95	Murciélago guanero (<i>Tadarida brasiliensis</i>)	9	México DF	1995	1 Mxtbbt3150
807Gatob76	Gato	9	California	1976	1 Caustbbt807
2075txtb84	Murciélago guanero (<i>Tadarida brasiliensis</i>)	9	Texas	1984	1 Txustbbt2075
3130chisbv93	Vaca	3	Chiapas	1993	1 Mxbv3130
3129chishr93	Caballo	3	Chiapas	1993	1 Mxhr3129
3131verbv95	Vaca	3	Veracruz	1995	1 Mxbv3131
3146verbv95	Vaca	11	Veracruz	1995	1 Mxbv3146
3137chisbv94	Vaca	11	Chiapas	1994	1 Mxbv3137
2320caefbt93	<i>Eptesicus fuscus</i>	ND	California	1993	1 Causefbt2320
EBL2	<i>Myotis dasycneme</i>	ND	Francia	1989	Grupo externo (Bourhy et 1993)al.
Duvenhage	Humano	ND	Sudáfrica	1986	Grupo externo (Bourhy et al.1993)

SI, segregados independientemente; las muestras no agrupadas con ningún linaje o sublinaje.

ND, variante genética que no ha sido determinada con el panel reducido de 8 anticuerpos monoclonales del CDC

1De Mattos et al., 1999. **2**Smith et al., 1995. **3**Orciari, 1995

a Linaje como se observa en el árbol filogenético

b AgV. Variante antigénica (por sus siglas en inglés) identificada con el panel reducido de anticuerpos monoclonales.

c contiene números de muestra como aparece en la referencia original del GenBank. En la misma columna, números sobrescritos en el lado izquierdo de cada número de muestra o número designado de GenBank indica la referencia original donde se puede encontrar información epidemiológica relevante.

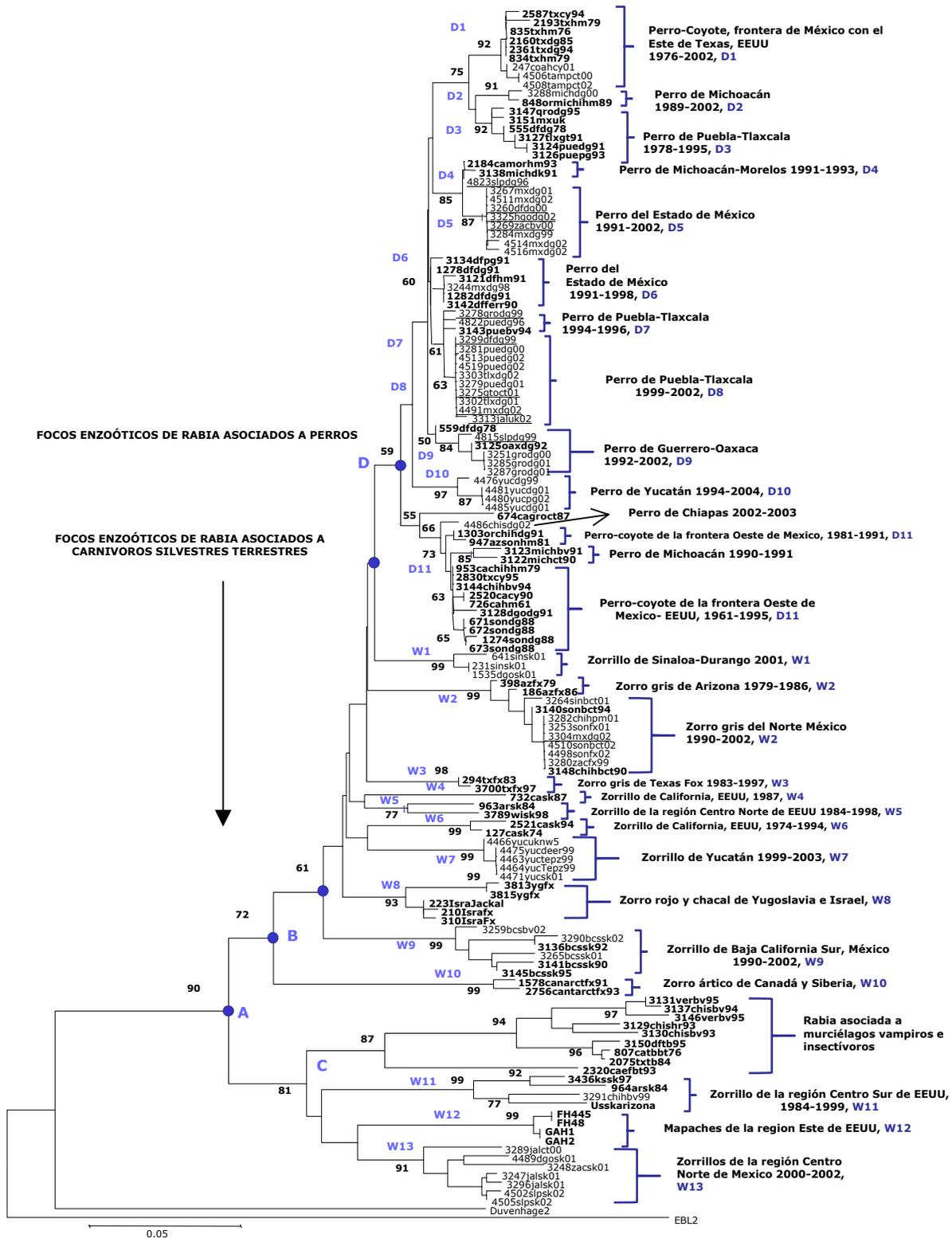


Figura 35. Árbol filogenético reconstruido por el método de Neighbor-Joining, muestra los diferentes focos enzoóticos de rabia asociados a perros y carnívoros silvestres terrestres en México y los EEUU.

Capítulo VII. Resultados

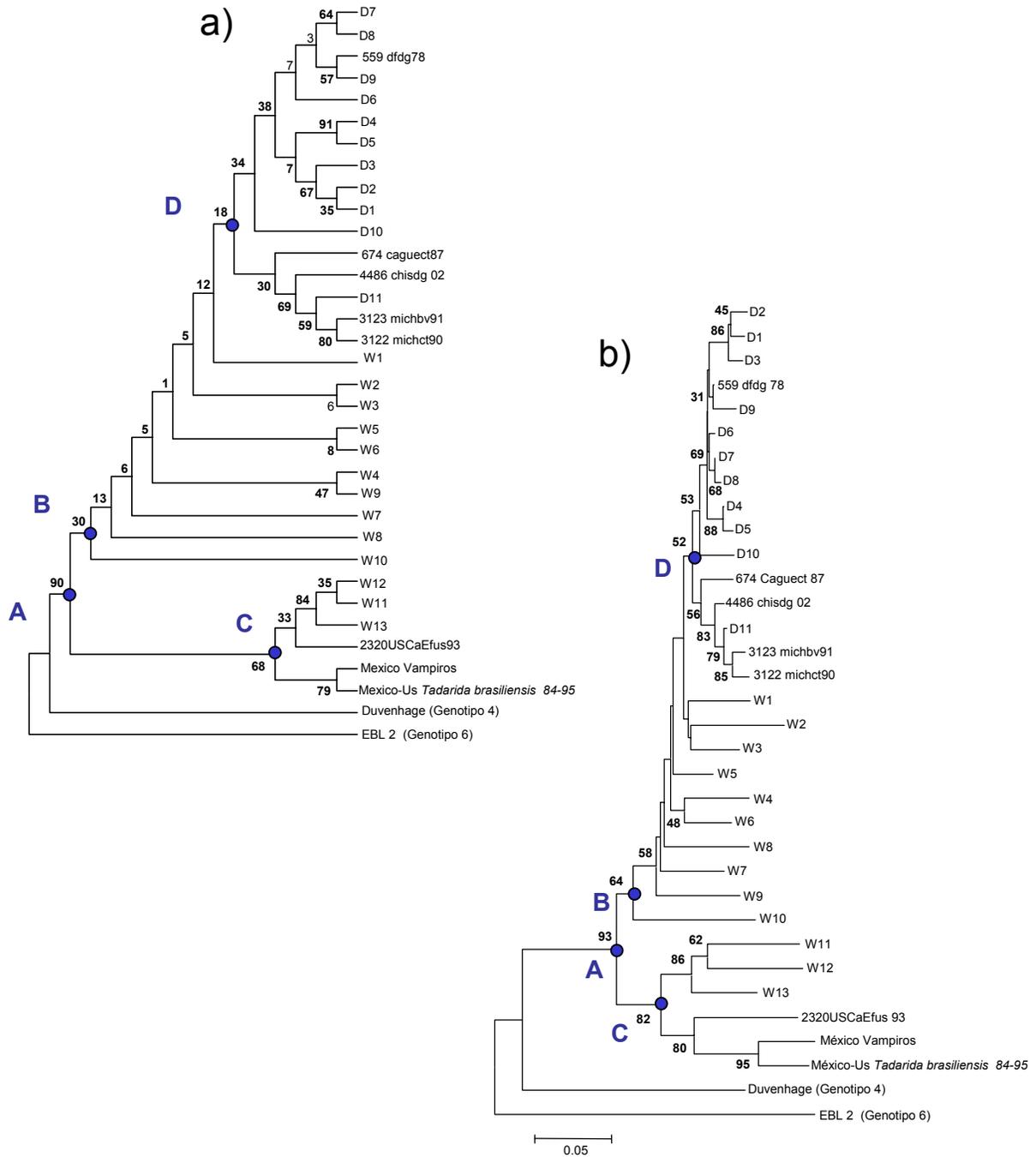


Figura 36. Árboles filogenéticos reconstruidos por un método a) cladístico (máxima probabilidad) y b) fenético (Neighbor-Joining) que muestran la relación entre los diferentes linajes de virus de la rabia asociados a diferentes especies de carnívoros terrestres en México y los EEUU.

Cada taxa esta representando la secuencia consenso del clado respectivo marcado en la figura 1 (D1-D11 y W1-W13), que a su vez representan diferentes focos enzoóticos de la enfermedad. Los taxa que segregaron de forma independiente en la figura 1, se incluyeron como tales en estos árboles filogenéticos.

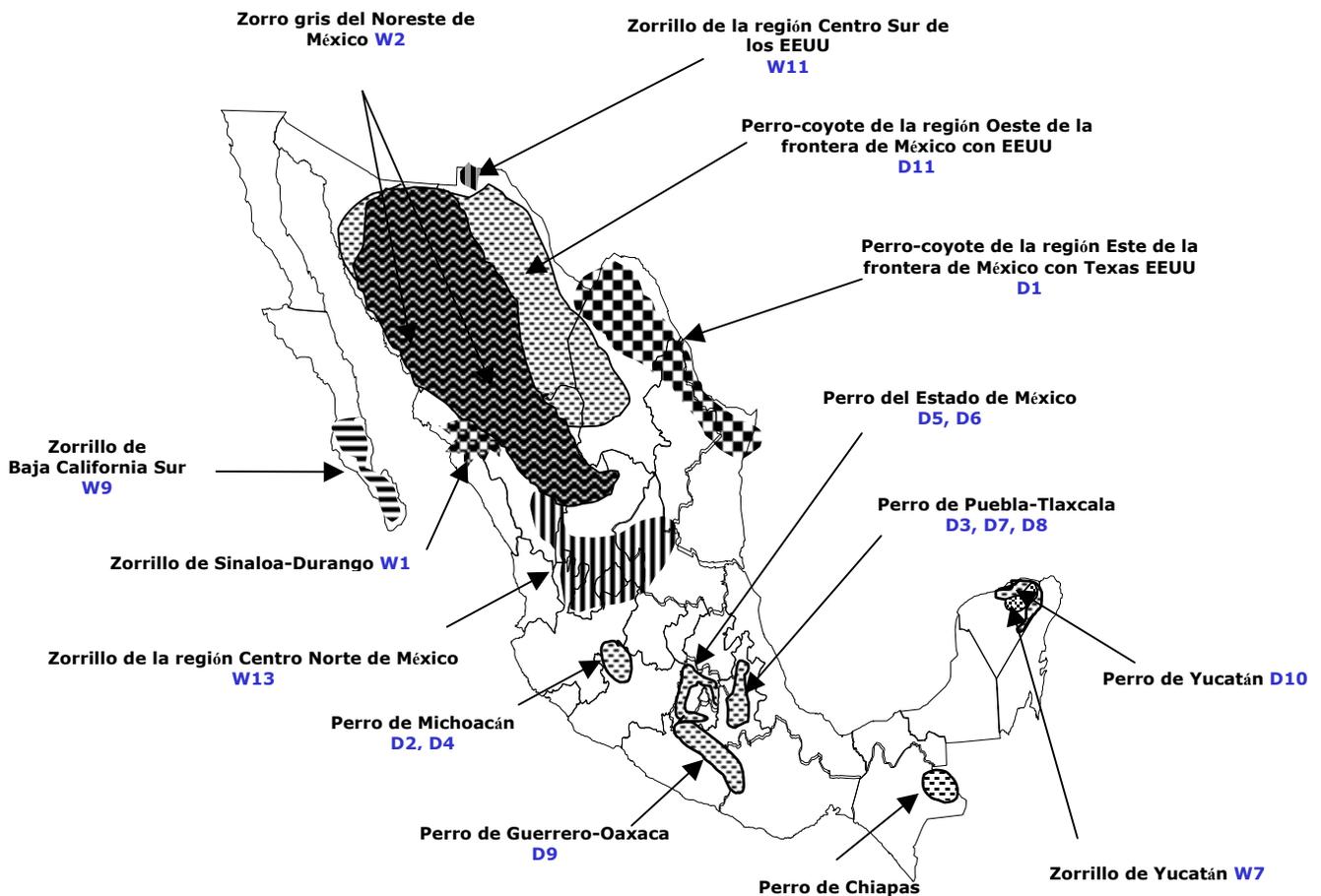


Figura 37. Distribución de los principales focos de rabia asociados a carnívoros terrestres en México. D1-D11 se refiere a los sublinajes del virus de la rabia asociados a perros domésticos y coyotes. W1-W13, representan los clados asociados a carnívoros terrestres silvestres. La nomenclatura de los linajes en el mapa es la misma mostrada en las figuras 35 y 36.

a. Rabia asociada a perros.

Se encontraron al menos seis focos principales de rabia asociada a perros en México, los cuales segregaron en diez sublinajes (D2-D11) que circularon durante el periodo 1961-2003 (figs. 35, 36, 37 y 39). Estos en su conjunto presentaron valores promedio de identidad de nucleótidos y amino ácidos de 96.7% y 99.8%, respectivamente (tabla 6, 9). Los seis

Capítulo VII. Resultados

focos fueron: un foco en Tlaxcala-Puebla que comprendió los sublinajes D3, D7, D8; un foco en Guerrero-Oaxaca que incluyó el sublinaje D9, y muestras individuales 559dfdg78 y 674cagroct87; un foco en el Estado de México que comprende los sublinajes D5y D6; un foco en Michoacán compuesto por el sublinaje D2 y muestras individuales 3122michct90 y 3123michbv91; un foco en Yucatán conformado por el sublinaje D10; y un foco en el noreste de la frontera México Norteamericana que abarcó el sublinaje D11, el cual comprendió muestras históricas de un foco de rabia enzoótica de perro, aparentemente extinto, que ocurrió en Durango, Sonora y Chihuahua y se extendió a California y Texas en los EEUU durante el periodo 1961-1995 (tabla 9; figs. 37, 39). Las conexiones filogenéticas entre los sublinajes; D7-D8; D9-559dfdg78; D4-D5; D3-D2-D1 y D11 con muestras individuales de Michoacán, Chiapas, Guerrero, pertenecientes a diferentes focos, sugiere cualquiera de dos eventos: diseminación reciente o histórica de los focos de la región centro hacia la frontera (fig. 36, 37, 39). También se observó evidencia de diseminación de rabia asociada a perros dentro de los sublinajes D3, D5, D7, D8 y D9, los cuales agruparon muestras obtenidas de otros estados mexicanos. Por ejemplo, se detectó movimiento de perros rabiosos, mediado por seres humanos, desde los focos enzoóticos de rabia de perro de Puebla y Tlaxcala (D7, D8 y D3) hacia los estados de Guerrero, Distrito Federal, Guanajuato, Jalisco y Estado de México. Similarmente, el foco enzoótico del Estado de México (D5) contiene casos recientes de rabia detectados en los estados de Hidalgo, Zacatecas y Distrito Federal (fig 35 y 39).

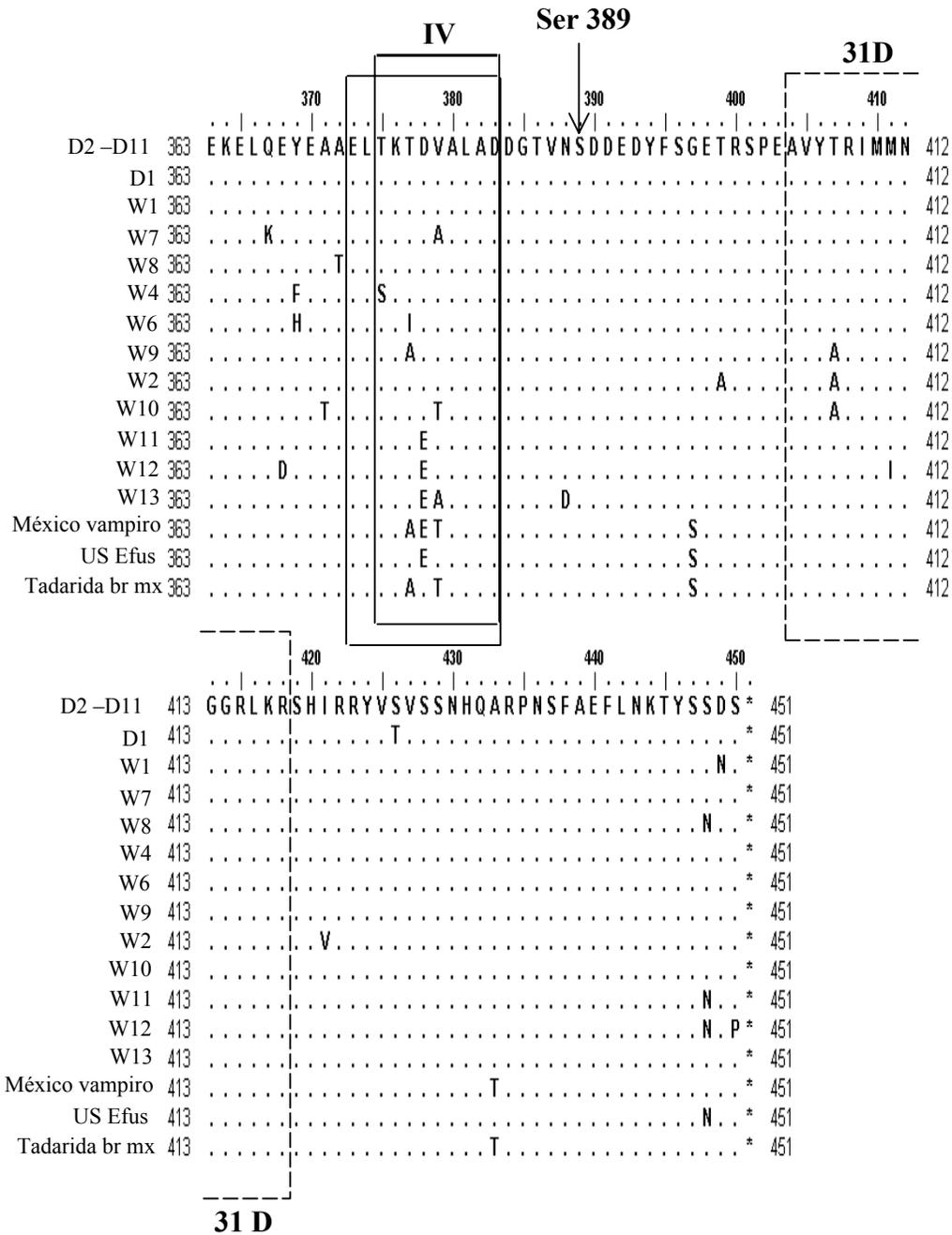


Figura 38. Patrones de variación en la secuencia de amino ácidos relacionados de forma específica a varios linajes y sublinajes del virus de la rabia asociados a diferentes especies de carnívoros terrestres en México y EEUU..

Al igual que el foco de Guerrero-Oaxaca (D9) presenta asociación con un caso histórico de San Luis Potosí (tabla 4, 9; Fig. 36, 37 y 39).

Capítulo VII. Resultados

Tabla 9. Elementos descriptivos y diversidad intralinaje e intrasublinaje de los grupos del virus de la rabia usados para obtener las secuencias consenso

Linaje (AgV)	Huésped reservorio	Distribución	Periodo	^a Identidad de nucleótidos	^b Ident de Aa	Sitio no consensado	^c Amino-ácido	^d Tipo de cambio
D1 (V1)	Coyote-perro	Este de la frontera de México con Texas EEUU	76-02	0.006 (99.4)	100	Consenso logrado	Consenso logrado	Silencioso
D2 (V1)	Perro	Michoacán	89-00	0.009 (99.1)	100	1186 C/T, 1258 C/T	A ₃₇₂ , S ₃₉₆	Silencioso
D3 (V1)	Perro	Puebla y Tlaxcala	78-95	0.009 (99.1)	100	1384 T/C	F ₄₃₈	Silencioso
D4 (V1)	Perro	Michoacán y Morelos	91-93	0.003 (99.7)	100	Consenso logrado	Consenso logrado	Silencioso
D5 (V1)	Perro	Estado de México	91-02	0.002 (99.8)	100	Consenso logrado	Consenso logrado	Silencioso
D6 (V1)	Perro	Estado de México	91-98	0.006 (99.4)	100	Consenso logrado	Consenso logrado	Silencioso
D7 (V1)	Perro	Puebla y Tlaxcala	94-99	0.008 (99.2)	100	Consenso logrado	Consenso logrado	Silencioso
D8 (V1)	Perro	Puebla y Tlaxcala	99-02	0.002 (99.8)	100	Consenso logrado	Consenso logrado	Silencioso
D9 (V1)	Perro	Guerrero y Oaxaca	92-01	0.006 (99.4)	100	Consenso logrado	Consenso logrado	Silencioso
D10 (V1)	Perro	Yucatán	99-02	0.006 (99.4)	100	Consenso logrado	Consenso logrado	Silencioso
D11 (V1)	Perro	Oeste de la frontera de México con EEUU	79-95	0.014 (98.6)	100	Consenso logrado	Consenso logrado	Sustitución no sinónima en una muestra Silencioso
W1 (V1)	Zorrillo	Sinaloa y Durango	01	0.011 (98.9)	100	Consenso logrado	Consenso logrado	Silencioso
W2 (V7)	Zorro gris	Sur de Arizona - Noroeste de México	79-02	0.006 (99.4)	100	1420 G/A	S ₄₅₀	Silencioso
W3 (V1)	Zorro	Texas	83-97	0.004 (99.6)	100	1309 A/G	G ₄₁₃	Silencioso
W5 (V1)	Zorrillo	Región Centro Norte de los EEUU	84-98	0.067 (93.3)	98.9	1165 A/G, 1183 G/A, 1186 C/T, 1213 A/G, 1219 T/C, 1243 C/T, 1264 A/G, 1267 T/C, 1300 A/G, 1357 T/A, 1408 C/T, 1420 A/G,	E ₃₆₅ , A ₃₇₁ , A ₃₇₂ , L ₃₈₁ , D ₃₈₃ , D ₃₉₁ , E ₃₉₈ , T ₃₉₉ , I/M ₄₁₀ , S ₄₂₉ , Y ₄₄₆ , S ₄₅₀ ,	Sustitución no sinónima en Aa 410
W6 (V1)	Zorrillo	California, EEUU	74-94	0.016 (98.4)	98.9	1170G/A, 1255 C/T, 1261 G/T, 1315 C/A	Q/R ₃₆₇ , F ₃₉₅ , G ₃₉₇ , R ₄₁₅	Sustitución no sinónima en Aa 367 Silencioso
W7 (ND)	Zorrillo	Yucatán	99-01	0.002 (99.8)	100	Consenso logrado	Consenso logrado	Silencioso
W8 (NT)	Zorro	Yugoslavia e Israel	93-00	0.024 (97.6)	98.9	Consenso logrado	Consenso logrado	Silencioso
W9 (V10)	Zorrillo	Baja California Sur	90-02	0.031 (96.9)	100	Consenso logrado	Consenso logrado	Silencioso
W10 (NT)	Zorro ártico	Canadá	91-93	0.016 (98.4)	100	1162 A/G, 1195G/A, 1237 G/A, 1369 T/C	K ₃₆₄ , T ₃₇₅ , S ₃₈₉ , A ₄₃₃	Silencioso
W11 (V8)	Zorrillo	Región Centro Sur de los EEUU	84-99	0.06 (94)	100	1210 C/A, 1222 T/C, 1246 A/G, 1255 C/T, 1264 G/A, 1276 G/A, 1363 C/T, 1399 C/T, 1402 A/G	A ₃₈₀ , D ₃₈₄ , E ₃₉₂ , F ₃₉₅ , E ₃₉₈ , P ₄₀₂ , H ₄₃₁ , N ₄₄₃ , K ₄₄₄	Silencioso
W12 (NT)	Mapaches	Costa Este de los EEUU	83-97	0.005 (99.5)	100	1180 A/G; 1375 C/T	E ₃₇₀ , P ₄₃₅ , F ₃₉₅	Silencioso
W13 (V8)	Zorrillos	Región Centro Norte de México	00-02	0.034 (96.6)	98.9	1255 T/C, 1420 T/G	S ₄₅₀	Silencioso

a Distancia "p" promedio e identidad de las secuencias de nucleótidos.

b Identidad promedio de las secuencias de amino ácidos (aa)

c Aminoácido codificado en los sitios donde no se logro consenso.

d Tipo de mutación observada en los sitios no consensados

Ident Aa, identidad promedio dentro la secuencia de aminoácidos dentro del clado

b. Extinción de sublinajes del virus de la rabia asociado a perros dentro de focos enzoóticos de larga duración

El foco enzoótico D11 que se extendió en los estados del norte de México (Sonora, Durango, Chihuahua) y Michoacán, dentro del periodo 1961-1995, y que estuvo relacionado con casos de rabia en perros y seres humanos en Texas y California, EEUU, ha sido considerado extinto porque en la región no habido reportes recientes en los que se halla detectado la circulación de virus de la rabia relacionados con dicho sublinaje (D11).

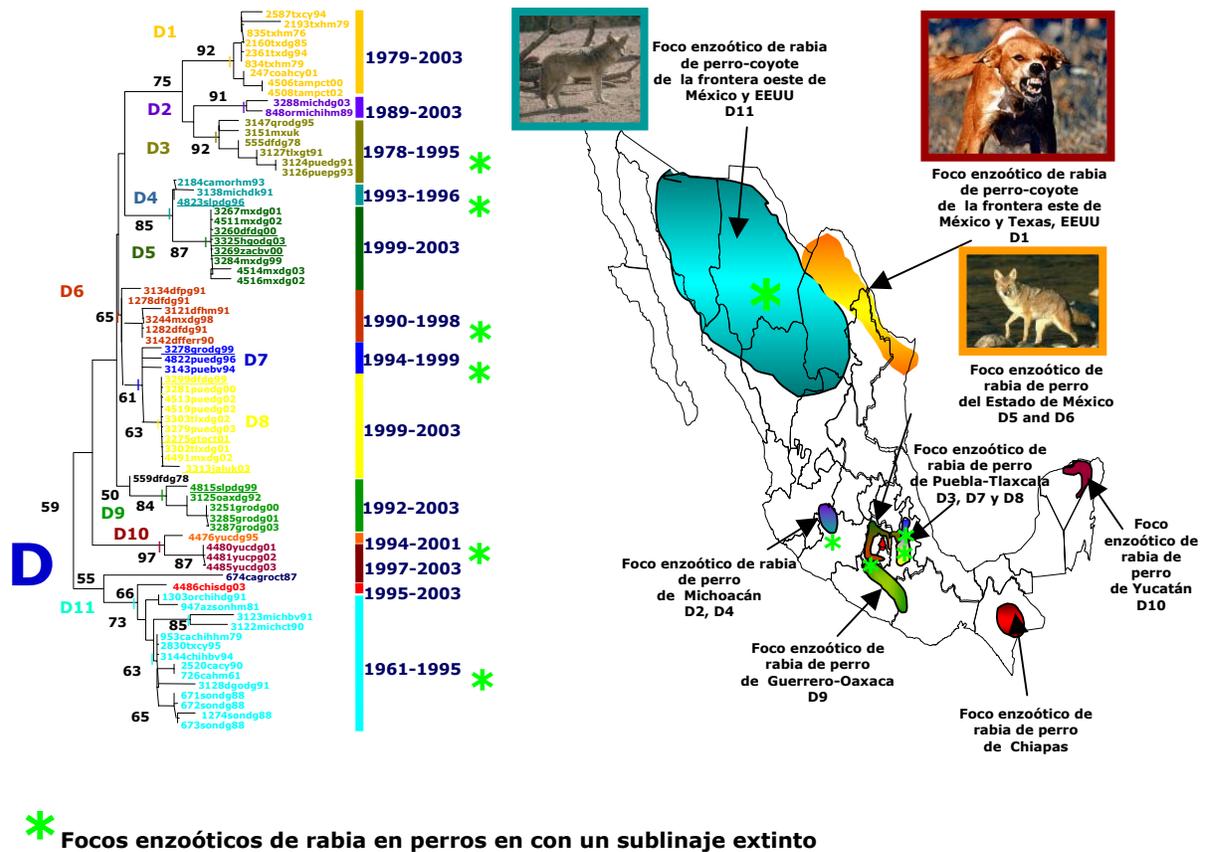


Figura 39. Árbol filogenético y distribución de los focos enzoóticos de rabia asociada a perros y coyotes en México. La figura muestra el periodo de circulación y distribución de los diferentes linajes encontrados en este estudio. Algunos linajes han dejado de circular durante la década de los 90's, atribuido principalmente a las acciones masivas de control y prevención de la rabia en perro.

Capítulo VII. Resultados

Procesos similares de extinción también se observaron en los focos de rabia canina detectados en estado de Yucatán, Puebla, Estado de México y Michoacán en donde ciertos linajes han dejado de ser detectados. Las acciones de control de la enfermedad en el reservorio específico (perro), pudieran estar contribuyendo de forma significativa a la desaparición de sublinajes con la consecuente disminución de la diversidad genética del virus de la rabia asociado a perros en México (figuras 37, 39, 40).

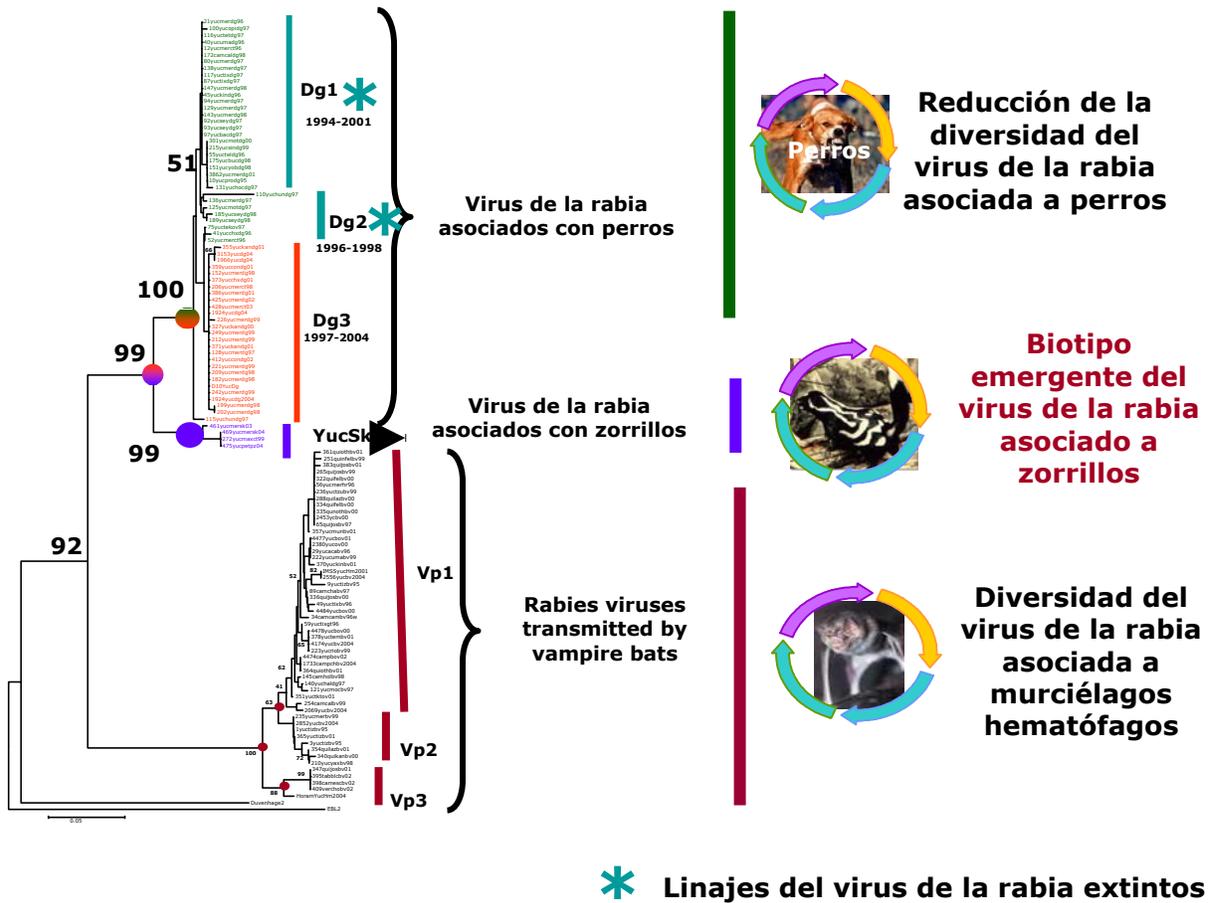


Figura 40. Árbol filogenético que demuestra la diversidad del virus de la rabia en el estado de Yucatán y su evolución en el tiempo. En el se observa la reducción de la diversidad genética, como consecuencia de la desaparición de ciertos linajes (Dg1 y Dg2), del virus de la rabia asociado a perros; la aparición de un linaje asociados a zorrillos manchados y la diversidad del virus de la rabia asociado a murciélagos hematófagos en la península.

El foco de rabia asociado a perros en el estado de Yucatán parece no tener conexiones filogenéticas con ninguna otra muestra individual o sublinaje del virus de la rabia asociado a perros u otras especies que se halla encontrado circulando en alguna otra parte de la república mexicana dentro del periodo abarcado por las muestras aquí analizadas. Sin embargo, al juzgar por la diversidad del virus asociado a perros en este estado (tres sublinajes dos extintos y uno vigente) es parsimonioso pensar que el sublinaje con el pudiera haber estado relacionado, que muy probablemente circuló en la región central del país, se extinguió hace tiempo y que por lo tanto dicha conexión de diseminación no pudo ser detectada (figs, 31, 36 y 39).

c. Rabia asociada a perros y coyotes.

Las muestras obtenidas de dos gatos y un coyote (*Canis latrans*) en los estados de la frontera, Coahuila y Tamaulipas, agruparon junto con varias muestras históricas pertenecientes a un foco enzoótico de rabia crónico (1976-1994) en coyotes y perros, distribuido en el sureste de Texas (Tablas 8 y 9; figs. 35, 36, 39, 41). Este sublinaje D1 mostró un cambio de aminoácido consenso (Ser 426 cambio a Thr 426), que no se detectó en ningún otro sublinaje relacionado con rabia enzoótica en perros D2-D11, y además parece estar fijado al menos desde 1961 (tabla 9, figura 37, 39, 41). Adicionalmente, D1 presentó una conexión filogenética con los sublinajes D2 y D3, los cuáles corresponden a focos de rabia localizados en Michoacán durante 1989-2002 y Puebla durante 1978-1995 (figs. 35y 36).

d. Rabia asociada a zorros grises

Las secuencias comprendidas dentro del linaje W2 tuvieron un promedio de identidad nucleotídica de 99.4%. Las cuales fueron obtenidas a partir de muestras de zorros grises, gatos silvestres y un perro durante 1990 a 2003 (tabla 9; fig. 35).

El grupo de secuencias fue asociado distintivamente al zorro gris (*Urocyon cinereoargenteus*), AgV 7 (tabla 3), con una distribución que abarcó los estados del noroeste mexicano, tales como Sonora, Chihuahua y Sinaloa, así como el estado de Zacatecas y se extiende hasta Arizona en los EEUU (tabla 3; fig. 37, 41). El linaje W2 segregó independientemente de aquellos grupos monofiléticos asociados a rabia de zorro en Texas (W3 variante del zorro de Texas, EEUU) y Canadá (W10 variante de zorro ártico), así como de muestras de Yugoslavia y de Israel, W8 (tabla 9; Figs. 35 y 36). Además, W2, W3, W8 y W10 presentaron al menos una diferencia en su secuencia de amino ácidos que permitió diferenciarlos entre ellos. Dicho amino ácido fue consenso dentro de las secuencias que conformaron cada grupo y además ha permanecido fijado dentro de todo el periodo comprendido por cada grupo (tabla 9, fig. 38). Dichos cambios han sido considerados por nuestro grupo como potenciales firmas moleculares que además están asociados con diferente distribución geográfica de las variantes (figura 41).

e. Rabia asociada a zorrillos.

Se lograron identificar por lo menos cuatro linaje asociados con rabia en zorrillo en México, los cuales presentaron valores de apoyo estadístico o "bootstrap" mayores de 90 (tabla 7; fig35). Su distribución comprende varios estados de la Republica Mexicana que abarcan diferentes regiones geográficas dentro del país; W1 abarca los estados de Sinaloa, Durango y Chihuahua; W7 Yucatán; W9 Baja California; W13 San Luis Potosí, Zacatecas, Durango y Jalisco; y W11 Chihuahua (figs. 37, 41). Las dos últimas fueron identificadas como AgV8 y presentaron un amino ácido en común, posición 378, Asp-Glu, con los grupos de virus asociados a mapaches, vampiros y *Eptesicus fuscus*, lo cual resultó consistente con carácter monofilético (figuras 35, 36 y 38). Los focos enzoóticos de rabia asociados a W11 y W13 a pesar de ser monofiléticos presentan

distribuciones geográficas muy distintas al igual que valores de distancia genética entre ellos mayores de 0.1 (tabla 6; figuras 35, 36 y 41). W11 presento una distribución que abarco parte de México en el norte del estado de Chihuahua (figs 37 y 41). Así mismo, estos dos linajes del virus de la rabia, constituyen el único grupo de virus asociados a reservorios terrestres que conforman un clado monofilético con los virus de la rabia asociados a murciélagos de América (figs 26, 27, 31, 35y 36).

Los linajes W1, y W9 se agruparon junto con virus de la rabia asociados a diferentes especies de cánidos, derivados a partir del nodo B (Figs. 35 y 36). Ellos fueron diferenciados antígenicamente como AgV 1 y 10 y tuvieron un promedio de diversidad nucleotídica de 98.9 y 96.9% (100% de la identidad del aminoácido), respectivamente (tabla 9). El grupo W9 presentó dos substituciones en los aminoácidos 377 y 407, compartiendo el último con los zorros grises y árticos, mientras que W1 tuvo un cambio en el aminoácido 448, similar a los linajes W11 y W12 (fig. 34).

En general los virus de la rabia asociados a zorrillos en diversas regiones de la Republica Mexicana presentaron valores de similitud que oscilaron entre el 80 y 91%, lo que los hace el grupo más divergente de virus de la rabia asociados a carnívoros terrestres en México (tabla 6).

f. Rabia asociada a zorrillos en Yucatán W7

Este linaje estuvo integrado por cinco muestras obtenidas de: un venado (*Odocoileus virginianus*), dos agutíes (*Aguti paca*) mantenidos en cautiverio y varios zorrillos manchados (*Spilogale putorius*) de Mérida, Yucatán (tabla 7; figs. 36 y 40). Este grupo segregó independientemente de los diferentes focos de rabia de perro de México, incluyendo el de Yucatán (nodo D) pero dentro del nodo B, asociado con rabia en carnívoros terrestres silvestres (Figs. 35 y 36. Los valores de similitud entre sus secuencias de nucleótidos y aminoácidos fueron de 99.8 y 100%,



Figura 41. Distribución de los principales focos enzoóticos de rabia asociados a carnívoros terrestres silvestres en México y en los EEUU. Cada foco fue designado con el código de letra y número empleado en los árboles filogenéticos de las figuras 1 y 2.

respectivamente. Se detectaron diferencias en su secuencia de aminoácidos con respecto a los demás linajes presentados en este estudio. Dichos cambios fueron consenso dentro del grupo y además han estado fijados por más de 5 años, Gln 367 cambio a Lys y en Val 379 cambio a Ala (Fig. 38). El cambio de aminoácido en la posición 379 también fue observado en el linaje W13 (Fig. 38). La similitud de su secuencia de nucleótidos osciló del 80 al 91%, con respecto a los otros virus asociados a zorrillos en México y los EEUU. Este grupo de aislamientos, además presentó un patrón antigénico característico mostrado en el apartado dos de esta sección de resultados.

CAPÍTULO VIII. DISCUSION

Primera Parte

En México se han encontrado diez de las once variantes antigénicas previamente detectadas para América Latina.

Las variantes antigénicas V1, V7, V8, V9, V10 y V11 fueron aisladas de las especies consideradas como los reservorios naturales-específicos de dichas variantes del virus de la rabia (Favi, *et al.*, 1999; DeMattos, *et al.*, 1999; Warner, *et al.*, 1999; DeMattos, *et al.*, 1996; Díaz, *et al.*, 1994). La diseminación de estas variantes a hospederos no reservorios, domésticos y silvestres, fue detectada en todos los casos. Sin embargo, las variantes asociadas al perro y a murciélagos hematófagos (vampiros) fueron encontradas con una alta frecuencia en seres humanos y animales domésticos (ganado de todas las especies, gatos y perros), reiterando la naturaleza sinantrópica del perro y descubriendo este proceso de asociación entre el humano y los murciélagos hematófagos.

De forma consistente, más de una variante antigénica fue detectada en especies catalogadas como hospederos no reservorios, inclusive, en aquellas que se obtuvieron en bajo número como cerdos, cabras y caballos. Ello, refleja la diseminación frecuente de la enfermedad a otras especies de mamíferos a partir de la circulación del virus en sus reservorios naturales específicos, además de que demuestra que cualquier variante del virus es capaz de causar la enfermedad en estas especies susceptibles tal y como se ha informado anteriormente (Smith, 1996; Smith, 1989; Sureau, 1988). La mayor disponibilidad de muestras de perros, ganado y humanos refleja la alta prevalencia de la enfermedad en estas especies por su contacto frecuente con los reservorios del virus y denota la prioridad que estas tienen para el programa nacional de control de rabia.

El monitoreo de la diversidad del virus de la rabia, mediante su

caracterización antigénica, a partir de hospederos no reservorios rabiosos de fácil acceso, contribuye a inferir los principales reservorios de la enfermedad, permite elucidar su distribución y ayuda a determinar áreas de riesgo. La comunicación adecuada de la información así generada, ha contribuido a dar instrucción a la comunidad médica de todos los niveles, con énfasis en el primer nivel de atención. Ello ha permitido llevar conocimiento a la población en general del riesgo que pueden representar otras especies, además del perro, como transmisores potenciales de la rabia (a través de instituciones de salud populares y medios masivos de comunicación). En cierta medida esto ha promovido que la gente acuda en la búsqueda de profilaxis antirrábica ante el riesgo de exposición al agente infeccioso, reduciendo el número de casos de rabia en seres humanos en el país.

La región centro del país registra la concentración mas alta de casos de rabia asociados a la variante antigénica V1 de perro, lo cual correlaciona con una alta densidad poblacional humana y canina. La presencia continua de la enfermedad en perros en la región, confirma su condición enzoótica crónica en esta especie a pesar de las campañas masivas de vacunación. No obstante, es importante señalar que el número de casos en perros y seres humanos debidos a la variante V1 se ha abatido de forma significativa en los últimos diez años, debido a acciones de control agresivas en las que se ha combinado vacunación masiva y control de la población canina. La presencia de la variante V1 en los estados del sur del país estaría relacionada: 1) al movimiento histórico o reciente de perros infectados, a partir de las regiones enzoóticas del centro del país; 2) a la presencia de focos enzoóticos crónicos de rabia en perro que no se han detectado, porque la vigilancia de la enfermedad es escasa en la región. Sin embargo, la presencia de la variante V1 en los estados del norte del país podría tener otra explicación, ya que la enfermedad en el perro (debida a la variante específica del perro, biotipo perro) se ha considerado

eliminada desde 1995. Lo cual es consistente con la detección la variante V1 en animales silvestres principalmente. De esta manera, la circulación de la variante V1 en esta región podría estar relacionada a su mantenimiento enzoótico por especies silvestres como el coyote, zorros grises o zorrillos y su presencia en perros y otras especies domesticas podría explicarse por la transmisión de la enfermedad a través de estos reservorios silvestres (Rohde, *et al* 1997, Smith, 1996; Smith, *et al.*, 1992).

Esta hipótesis se apoya en trabajos previos sobre la rabia en los EEUU, donde se demuestra que la variante antigénica 1 esta asociada a linajes independientes del virus que a su vez están relacionados de manera específica a diferentes especies de animales silvestres como zorrillos en California y zorros en Texas. Estos virus V1, son filogenéticamente cercanos pero diferenciables de los virus que circulan en perros o coyotes en México (DeMattos, *et al.*, 1999), sugiriendo que se trata de focos enzoóticos de rabia ya establecidos en especies silvestres, en los que el perro ya no juega un papel importante en su mantenimiento y transmisión. En tanto, la circulación del virus V1 en poblaciones de coyotes, se ha explicado como un evento de diseminación reciente a partir del virus que circulaba en perro (basándose en que ambos virus son monofiléticos con un alto grado de identidad en su secuencia nucleotídica), en donde el virus se ha logrado adaptar al coyote de manera que estos lo pueden mantener de forma enzoótica independiente al perro (DeMattos, *et al.*, 1999; Smith, 1996; Smith, *et al*, 1992,).

La variante antigénica 8 se encontró distribuida ampliamente a lo largo de la región centro-norte del país asociada principalmente a zorrillos moteados de la subespecie *Spilogale putorius leucoparia* mientras que la variante V10 se halló circunscrita a la región sur del estado de Baja California Sur asociada a una diferente subespecie de zorrillos moteados *Spilogale putorius lucasana*. Se observó la transmisión de ambas variantes

Capítulo VIII. Discusión

a hospederos no reservorios domésticos, sin embargo la variante V10 se encontró asociada a casos de rabia en seres humanos en Baja California Sur. Cuando los zorrillos moteados contraen la rabia se convierten de animales tímidos y evasivos en criaturas extremadamente agresivas atacando a cualquier animal que se interponga en su camino. Incluso, se ha informado que cambian su actividad nocturna por diurna irrumpiendo en casas a través de ventanas o puertas abiertas atacando a todo individuo que se encuentre en su paso (Aranda, *et al.*, 1999). Estos datos sugieren que la ausencia de la enfermedad transmitida por zorrillos a seres humanos, en la región centro-norte del país, podría estar relacionada a una mejor difusión de información al público sobre el riesgo que representan los zorrillos como transmisores de la rabia en esta región, a diferencia de lo observado en Baja California Sur donde se desconocía que el reservorio principal de la enfermedad era el zorrillo y no el perro. La incidencia de rabia en humanos transmitida por zorrillos ha disminuido de forma radical en el estado de Baja California Sur, desde hace cinco años. Es importante resaltar que nuestros datos sugieren que la rabia de zorrillos en México se mantiene por una especie diferente de zorrillo (*Spilogale putorius*) a la informada en los Estados Unidos de América la cual es *Mephitis mephitis* o zorrillo rayado. Hallazgos sutiles como estos, tienen repercusiones notables en el control y prevención de la enfermedad. La relación filogenética entre las variantes antigénicas V8 y V10 (DeMattos, *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1992) sugiere que ambos virus no están relacionados cercanamente habiendo divergido hace mucho tiempo, lo que apoya el hecho de que dos subespecies de zorrillos los han mantenido enzoóticos de forma independiente tal y como lo sugieren los resultados aquí obtenidos.

En esta etapa del trabajo se informó por primera vez del aislamiento de la variante antigénica V7 a partir de dos zorros grises (*Urocyon cinereoargenteus*) en México, el cual es considerado como el reservorio

natural de dicha variante en los Arizona, EEUU y que aparentemente también lo es en México. También se detectó la diseminación esporádica de esta variante a otras especies silvestres simpátricas al zorro gris, como lince (*Lynx rufus*) y coyotes (*Canis latrans*) a largo de la Sierra Madre Occidental, la cual podría funcionar como un puente natural para su diseminación entre los límites de los estados de Sonora, Chihuahua, Sinaloa y Zacatecas que es donde hasta ahora se ha detectado.

Con respecto a la rabia de quirópteros, la proporción relativa de los aislamientos relacionados con las variantes del virus asociadas a murciélagos hematófagos (V3, V5 y V11 y la V8) y su distribución encontrada en el presente estudio, se correlacionan con la densidad poblacional relativa y distribución natural de las tres especies de murciélagos hematófagos encontradas en México. Con la información que se dispone al momento no es claro si *Desmodus rotundus* es el principal reservorio de las cuatro variantes antigénicas aisladas, o si *Diphylla ecaudata* y *Diaemus youngi* pudieran también estar infectados de forma natural y sostener la transmisión del virus de forma intra-específica, manteniendo enzoótica alguna de estas tres variantes antigénicas de forma independiente. La hipótesis del papel de cualquiera de estas dos últimas especies como reservorios independientes de dos variantes antigénicas del virus de la rabia podría ser no admisible, si solo se consideraran los hábitos alimenticios de ambas especies (ya que son ornitófilos). Sin embargo, la carencia de información sobre el cambio de conducta que estas dos especies pudieran tener cuando se encuentran enfermas de rabia, en especial referente a sus hábitos alimentarios, da un sustento de viabilidad a dicha hipótesis. El hecho que la variante V5 solo se halla encontrado en un cerdo y un perro, probablemente indica que el reservorio natural de esta variante se pudiera encontrar en densidades poblacionales muy bajas, que mantenga la enfermedad intra-específicamente en tasas muy bajas y que tiene una distribución muy

restringida dentro del país, datos que concuerdan con la ecología descrita para *Diaemus youngi* (Hall, 1981; Medellín, *et al.*, 1997).

La rabia asociada a los murciélagos insectívoros coloniales de la especie *Tadarida brasiliensis mexicana* o murciélagos de cola libre mexicano o murciélago guanero, fue descrita por primera vez en 1953 (Smith, 1996; Baer, *et al.*, 1991; Constantine, 1971;). Recientemente en México, se ha informado un solo caso de rabia en un murciélago de cola libre mexicano (DeMattos *et al.*, 1999). En el presente estudio se diagnosticaron seis ejemplares identificados como *Tadarida brasiliensis mexicana* como positivos y sus respectivos aislamientos del virus de la rabia fueron caracterizados antigénicamente. En cinco de ellos se encontró la variante antigénica V9 y en uno de ellos la variante antigénica V4. Dado que esta especie tiene un comportamiento migratorio, la información provista por la caracterización antigénica no fue suficiente para establecer si la detección de la misma variante a lo largo de diferentes puntos, muy distantes dentro de la Republica Mexicana se debe al movimiento de una misma colonia y la diseminación consiguiente del virus que en ella se mantiene; o si estos casos de rabia son consecuencia de la diseminación de focos de rabia independientes mantenidos por diferentes colonias de murciélagos insectívoros en diferentes puntos de México o de EEUU. El hallazgo de la variante V4 en Puebla, la cual frecuentemente se detecta en América del Sur, representa una incógnita más que no podrá ser resuelta con la caracterización antigénica del virus.

La diversidad del virus de la rabia estimada mediante la variación del perfil antigénico en México superó la determinada previamente (Díaz, *et al.*, 1994), ya que se descubrieron al menos 6 patrones antigénicos nuevos asociados de forma consistente con una especie de zorrillo y los restantes 5 con al menos 3 especies diferentes de murciélagos. Además, un mismo patrón antigénico, como el de la V1, se encontró relacionado con diferentes focos enzoóticos de rabia en zorros, zorrillos y coyotes en el

norte del país. Ello indica la falta de resolución del panel de 8 anticuerpos monoclonales estandarizado para América Latina y sugiere la necesidad de un panel ampliado que permita distinguir dichas enzootias independientes. Hallazgos semejantes se han hecho en Chile, Brasil, Bolivia y Colombia en donde el problema se ha abordado mediante el análisis de las diferencias en la secuencias de nucleótidos de los diferentes aislamientos (Paez, *et al.*, 2005; Favi, *et al.*, 2003; Favoretto, *et al.*, 2002; De Mattos, *et al.*, 1999)

Segunda Parte

En contraste con la caracterización antigénica, el análisis de los últimos 264 nucleótidos que codifican para 88 aminoácidos de la nucleoproteína del virus de la rabia en su extremo C terminal, logró discernir una gran variación relativa dentro los aislamientos del virus de la rabia que circulan o circularon durante los últimos 30 años en México. Dicho análisis demostró que regiones importantes dentro de este fragmento del gen, tales como los epitopos reconocidos por las células B y Th y el sitio supuesto de fosforilación, en la posición Ser 389, se mantienen conservados dentro del genoma del virus de la rabia circulante en México (Ertl, *et al.*, 1991; Dietzschold, *et al.*, 1987).

Con los grupos de muestras y secuencias hasta ahora estudiados, muchas veces incompletos por no abarcar un marco representativo de la diversidad espacial, temporal y de reservorio del virus de la rabia, no se ha podido corroborar la presencia de selección positiva que podría explicar la especificidad de reservorio del virus de la rabia. Al contrario, lo único que se ha podido corroborar es la presencia de selección purificadora, la cual restringe la variación no neutral en todos los genes estructurales del virus para garantizar la conservación apropiada de su función durante el ciclo de replicación en hospederos reservorios y no reservorios.

En este trabajo se lograron encontrar patrones de variación de aminoácidos conservados a lo largo del tiempo asociados con linajes

específicos del virus, los que a su vez están relacionados estrechamente con diferentes especies de reservorios carnívoros terrestres de la enfermedad. Lo anterior sugiere la posible presencia de selección positiva (ejercida una serie compleja de factores que involucran la biología y ecología de los reservorios), la cual no se ha podido demostrar en trabajos anteriores por haberse incluido secuencias redundantes que en su mayoría representan la asociación de una variante del virus de la rabia con un mismo reservorio, obteniéndose como resultado final el enmascaramiento de dicha fuerza evolutiva (Hughes, *et al.*, 2005; Holmes, *et al.*, 2002; Badrane, *et al.*, 2001; Bourhy, *et al.*, 1999). Aunque el grado de identidad de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos depende de la región genómica precisa bajo estudio, el uso de regiones altamente informativas dentro de un mayor contexto de comparación (el cual incluye varios clados, asociados con varios supuestos reservorios de rabia hasta ahora detectados en la región) ha permitido no solo descubrir asociaciones con consistencia epidemiológica relevante (tales como agrupaciones especie-específica y linajes asociados con focos de rabia espacio-específicos) sino también, puede contribuir para tener cifras mas precisas de diversidad intragenotípica e intergenotípica (Johnson, *et al.*, 2002; Bourhy, *et al.*, 1999;). Por comparación, los valores de identidad de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos fueron mas bajas que aquellas propuestas para la clasificación genotípica (Kissi, *et al.*, 1995).

Estos resultados comprueban que la variación intragenotípica ha sido subestimada (y, en consecuencia, la diversidad del virus de la rabia), como se predijo en estudios anteriores (Bourhy, *et al.*, 1993). Esto no impide, que se exploren otras regiones altamente informativas dentro del genoma del virus de la rabia, con el fin de poder corroborar la consistencia y reproducibilidad de las inferencias epidemiológicas y evolutivas hechas. Lo que finalmente ayudaría a apoyar que las conclusiones a las que se llegó con un marcador determinado no están describiendo la historia de ese

marcador, sino la historia y evolución de la enfermedad en sus reservorios. (Nadin-Davis *et al.*, 2006, 2003, 2002, 2001, 1999; Holmes, *et al.*, 2002; Badrane, *et al.*, 2001; Kissi, *et al.*, 1995; Bourhy, *et al.*, 1993). Siempre y cuando la infraestructura y recursos tecnológicos no constituyan una limitante, es recomendable realizar el secuenciamiento nucleotídico de más de un gen completo bajo el escenario de que no se disponga de información previa que describa la posible variación de reservorio, espacial y temporal del virus de la rabia en una región o país.

La diversidad de virus de la rabia asociada a carnívoros terrestres en México rivaliza con la complejidad detectada en los Estados Unidos de América (Smith, *et al.*, 1992; 1995 y 1996). Tal variación no es inesperada, si se considera el tamaño y la biodiversidad de México, el cual es un país considerado una de las cinco megadiversidades biológicas de América por contener el 10% de la flora y la fauna del mundo (Fa, *et al.*, 1998).

Las relaciones filogenéticas de las muestras mexicanas y norteamericanas, aun cuando ellos solamente pertenecen al genotipo 1, son generalmente consistentes con las tendencias informadas anteriormente (Badrane, *et al.*, 2001; Holmes, *et al.*, 2002). En donde de forma consistente se nota la presencia de dos grandes grupos o clados, el de los virus de la rabia asociados al orden Chiroptera, el cual contiene diversos linajes asociados de forma específica a murciélagos de diferentes especies, pero que también agrupa linajes asociados con el virus de la rabia de zorrillos y mapaches, detectados en México y Estados Unidos de América y el grupo de los virus de la rabia asociados a diferentes especies de carnívoros terrestres, como el de canidos (perros, zorros y coyotes) y los virus relacionados con zorrillos. Esta información sugiere que la rabia en carnívoros terrestres en México pudo haber tenido dos orígenes uno autóctono y otro introducido. El autóctono infiriéndose por el origen filogenético de la rabia de zorrillo de la región centro-norte del país, en el

cual se observó una relación cercana con los virus de la rabia asociados a murciélagos, los cuales se han encontrado circulando exclusivamente en el continente Americano. El origen sugerido por la cercanía relativa, de los virus asociados a perros en México (que además forman un clado monofilético con los virus asociados a la misma especie en Europa, Asia central, medio oriente, y África) con los de zorrillos, zorros y coyotes, lo cual indica que estas enzootias, ahora establecidas en animales silvestres terrestres, tuvieron un ancestro cercano en la rabia introducida por perros importados del viejo mundo durante la colonización, con la subsiguiente dispersión y posterior adaptación a estas especies silvestres (Badrane, *et al.*, 2001; Smith, *et al.*, 1992).

Los casos de rabia de perro en México han disminuido dramáticamente en los últimos diez años como consecuencia de la intensificación de las campañas masivas de vacunación (Badrane, *et al.*, 2001; Smith, *et al.*, 1992). Sin embargo, se han encontrado seis focos activos de rabia de perro. Dos de ellos incluyeron casos de rabia humana, uno en Puebla durante 2000 y en el Estado de México durante 2001 (Secretaría de Salud, 2003). Dos caos adicionales de rabia humana se informaron recientemente en los estados de Oaxaca durante 2002 y en Chiapas durante el 2003 (Secretaría de Salud, 2004). Estos casos proveen evidencia de que los focos de rabia de perro persisten, pero que son imperceptibles por una presencia baja de casos en el reservorio natural o porque la vigilancia epidemiológica de la enfermedad en el perro no es la mas adecuada. Las relaciones filogenéticas observadas entre las muestras individuales y los sublinajes, sugieren tanto diseminación histórica como reciente de la rabia de perro. Estos incluyeron por lo menos seis focos de rabia en diferentes estados dentro de México y cercanos a la frontera con Estados Unidos de América. Los patrones de distribución y diseminación de la rabia canina coinciden con las principales rutas de migración y comerciales, así como con la densidad población humana de las principales ciudades dentro de

México y hacia los Estados Unidos de América (De Mattos, *et al.*, 1999; Durand, 2005; Smith, *et al.*, 1992). Se pudieron identificar patrones de diseminación de la rabia de perro tanto de corta como de larga distancia, sugiriendo dispersión por movimiento propio de estos animales o mediado por seres humanos en desplazamiento. Por ejemplo, los focos de rabia asociada a perros (D11) y coyotes (D1) a lo largo de la frontera de México con los EEUU, están vinculados con focos enzoóticos de larga duración distribuidos en la región centro-noroeste, centro y sureste del país. Esto sugiere que esta ocurriendo un movimiento de perros infectados que esta asociado a la migración de la fuerza de trabajo hacia los EEUU. D11 esta vinculado con focos enzoóticos de Chiapas y Michoacán, mientras que D1 esta relacionado con focos de rabia en Puebla-Tlaxcala (D3) y Michoacán (D2).

Los focos más importantes o de más larga duración estuvieron integrados por más de un sublinaje, los cuales no siempre formaron grupos monofiléticos, sugiriendo coexistencia ó coemergencia de diferentes virus asociados al mismo reservorio. Estos hallazgos tomados juntos, sugieren que las múltiples variantes genéticas virales pueden aparecer al azar (por deriva génica) en diferentes subpoblaciones de perro separadas por barreras geográficas (autopistas, montañas), siguiendo su dispersión a través de una subpoblación local de perro (infectada con una variante particular) y diseminada posteriormente, como se propuso para la rabia de zorro (Nadin-Davis, *et al.*, 1999). Así mismo, la presencia de más de un sublinaje del virus asociado, en este caso a perros en una región, pudiera denotar el carácter crónico de ese foco enzoótico. La no detección de ciertos sublinajes después de cierto periodo, como en los casos del foco de la región fronteriza del noroeste mexicano, la extinción de sublinajes del estado de México, Puebla-Tlaxcala, Yucatán, Michoacán, pueden denotar el progreso de las medidas de control y prevención de la enfermedad en este reservorio. Al juzgar por la persistencia de ciertos linajes dentro de estas

zonas y otras regiones fuera de estos, como los focos activos de Oaxaca-Guerrero, Chiapas y Michoacán, indican que se debe hacer un mayor esfuerzo, sobretodo para lograr un mejor control de la población canina sin dueño (que incluye un mejor entendimiento de su dinámica demográfica), mediante la expansión y mantenimiento de la vacunación canina masiva en lugares remotos o inaccesibles. El fenómeno de extinción de la rabia de perros ha sido descrito en Colombia, en donde se demostró la desaparición de un linaje de virus de la rabia asociado a perros (Hughes, *et al.*, 2004; Paez, *et al.*, 2003). Esto se logro mediante la vacunación masiva con altas coberturas (98 al 100%) aunado al control de la población canina, principalmente la callejera.

De acuerdo con la evidencia filogenética actual y tal como se sugirió previamente (Smith, 1996), la rabia de coyote parece ser un evento reciente de diseminación de la rabia de perro con posterior adaptación al coyote. Sin embargo a diferencia de cómo fue sugerido dicho foco enzoótico de rabia en coyote, parece no haber emergido en los inicios de la década de los 90's, ya que dicho virus ha estado circulando al menos unos 30 años (Smith *et al.*, 1992, 1995 y 1996). El movimiento recurrente de perros infectados a partir de la región central de México, donde predominan focos enzoóticos de larga duración, pudo haber sido la fuente más probable del virus que provocó la diseminación de la rabia al coyote, contrastado con el hecho de que el virus pudo haber provenido de un foco establecido en la frontera norte. La conexión filogenética, aunque con bajo soporte estadístico, de D1 con miembros del sublinaje de virus asociado a perros D3, el linaje más viejo con base en datos históricos (Secretaría de Salud, 2001), sugiere que la variante del virus de la rabia de coyote pudo haber emergido vía desplazamiento de perros infectados a larga distancia, mediado por humanos. Inusualmente, la variante del virus de la rabia del coyote no presentó ningún lazo directo con el sublinaje D11 (ahora extinto), que representó el foco enzoótico de perro más importante a lo

largo de la frontera México-EEUU y que estuvo en circulación en esa región durante más de 30 años (1961-1995). La ausencia de vínculo alguno de D1 con D11 y la conservación del aminoácido treonina en la posición 426 en los miembros de este linaje, durante más de 30 años, apoyan la hipótesis del surgimiento de la rabia de coyotes mucho antes de finales de la década de los 80's principios de los 90's, pudiendo haber sido su origen en los focos enzoóticos más antiguos, históricamente circunscritos al centro del país (Secretaria de Salud, 2001).

El potencial de adaptación del virus de coyote a perros domésticos, demostrado por el gran brote de rabia en perros surgido en el sureste de Texas, EEUU, indica que el virus mantenido enzoóticamente por coyotes puede retornar con cierta facilidad a perros domésticos no vacunados, representando un riesgo muy alto para la salud pública (Kuzmin, *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1995, 1996).

En este sentido las autoridades sanitarias deberían poner más énfasis para controlar la rabia canina y el desplazamiento de perros rabiosos de focos enzoóticos activos, como acciones para prevenir la diseminación futura de la infección con su posterior adaptación a coyotes y a otros canidos o mamíferos silvestres. Además, aunque las variantes del virus de la rabia de coyote no se han identificado en focos enzoóticos estables de perro en México, las autoridades sanitarias locales deben fortalecer la vigilancia de la rabia en fauna silvestre para evitar la reversión del proceso, por la cual la rabia de animales silvestres (canidos y mustélidos) regresaría a poblaciones crecientes de perros susceptibles por la suspensión de vacunación.

La presencia de la variante del virus rabia asociada al zorro gris en México había sido informada desde 1999, pero esta solo se había podido aislar del lince *Lynx rufus* (De Mattos *et al.*, 1999). Aquí informamos, por primera vez, de tres secuencias obtenidas de zorros grises en los estados de Sonora y de Zacatecas y de otras obtenidas de felinos silvestres (tales

como lince en Sonora, Sinaloa y del puma *Puma concolor* en Chihuahua), pertenecientes a este linaje específico. Las últimas muestras ya habían sido informadas previamente (Velasco-Villa *et al.*, 2002). Todas estas muestras que abarcaron el periodo de 1990 hasta 2002 se juntaron dentro de un grupo monofilético homogéneo, el cual contrastó drásticamente con la enorme diversidad observada en muestras relacionadas con perro (varios sublinajes). Estas observaciones sugieren que la duración o edad real de la enzootia y el periodo de estudio abarcado para cada linaje, podrían estar jugando un papel determinante en el grado de variación o diversidad de los virus de la rabia asociados a estas dos especies de canidos. Aunado a la posible variación introducida por la extensión geográfica abarcada por dicha variante y de una inclusión representativa, espacial y temporal, de los linajes analizados dentro del estudio.

La variación temporal de los diferentes sublinajes del virus de la rabia asociados a perros, coyotes y zorros podría también corroborarse en la historia documentada de la rabia, dado que la rabia ha sido informada como enzoótica en poblaciones de perros de México desde el inicio del siglo XVIII, lo que contrasta con la rabia de zorro gris que comenzó a ser notificada como enzoótica al inicio del siglo XX (Kuzmin, *et al.*, 2005; Johnson, H. 1971; Secretaría de Salud, 2001; Wilkinson, 2002).

El grado de variación encontrado en el virus de la rabia podría estar influenciado por las diferencias en la biología de ambas especies de canidos (Anderson, *et al.*, 1981). El comportamiento filogenético de este foco enzoótico sugiere que la rabia de zorro gris, por lo menos en México y en los 12 años estudiados, pudiera ser el producto de una dispersión reciente a partir de un foco primario. Esta inferencia se correlaciona no solamente con la ecología del zorro gris, sino particularmente con su capacidad de moverse sobre áreas grandes y explica parcialmente la actual distribución de casos de rabia (Fa, *et al.*, 1998). El linaje W2 también se encontró relacionado cercanamente con los focos enzoóticos de

rabia de zorro gris en Arizona, lo que sugiere una continuidad geográfica de la enzootia desde México hasta EEUU (Kuzmin, *et al.*, 2005; Krebs, *et al.*, 2005; Smith, *et al.*, 1995).

Los linajes W2 y W3, ambos asociados a zorros grises en Arizona y Texas, respectivamente, se han encontrado co-circulando en el extremo suroriental de Arizona, EEUU, pero el linaje W3, también llamado zorro de Texas, no se ha detectado en México. A pesar de su sobreposición geográfica y temporal, W2 y W3 no están relacionados filogenéticamente, lo cual apoya la idea que son focos enzoóticos de rabia de zorro con origen independiente, emergiendo en diferentes poblaciones o especies o subespecies de zorros (Smith, *et al.*, 1995; Smith, 1996).

La rabia asociada a zorrillos representó el grupo más diverso de virus de la rabia asociada a carnívoros silvestres en México. Los virus de la rabia asociados a zorrillos parecen presentar una estructura genética asociada a la distribución geográfica de sus diferentes focos enzoóticos, similarmente a como se observó para los virus de la rabia asociados a perros. Sin embargo, la diversidad genética en este grupo fue casi 10 puntos porcentuales mayores que la de los perros. Lo anterior se debe a que filogenéticamente la rabia de zorrillo en México parece presentar dos diferentes orígenes, uno común con la rabia canina, como en el caso de los linajes W1, W7 y W9, y el otro común con la rabia de murciélagos distribuida en Estados Unidos de América y en México, como en el caso de W11 y W13. El virus de la rabia asociado a mapaches en la costa este de los Estados Unidos y Canadá, W12, parece tener un origen común al de los zorrillos W11 y W13. Hasta ahora la hipótesis más parsimoniosa sobre su origen, parece sugerir a la rabia de murciélagos como la fuente de diseminación de donde posteriormente se adaptó a estas especies (Holmes, *et al.*, 2002; Badrane, *et al.*, 2001; Nadin-Davis, *et al.*, 2001). Así mismo, en este punto no es claro si la rabia de mapache emergió directamente de los murciélagos o si esta fue consecuencia de la

Capítulo VIII. Discusión

diseminación de la rabia de zorrillos circulando en la región centro sur de los EEUU y la región centro norte de México.

Cierta estructura geográfica fue observada dentro de los linajes W9 y W13, a pesar del bajo número de muestras analizadas. Estos resultados sugieren que las muestras del virus de la rabia están espacial y temporalmente estructuradas en las poblaciones del zorrillo, muy probablemente influenciadas por la biología de estas especies (Anderson, *et al.*, 1981). Además, los patrones filogenéticos observados para la rabia de zorrillo también sugieren la aparición al azar de nuevas variantes en diferentes subpoblaciones de zorrillos, según lo sugerido para la rabia del zorro en Canadá (Nadin-Davis, *et al.*, 2006, 1999, 1993). En México se ha informado y confirmado por laboratorio, rabia en seres humanos transmitida por zorrillos manchados, principalmente en el Estado de Baja California Sur, linaje W9, (Velasco-Villa, *et al.*, 2002). Aunque dichos eventos no han ocurrido en la región norcentral de México, el riesgo potencial se ha presentado en estudios anteriores (Aranda *et al.*, 1999). Una diferencia notable entre la rabia de zorrillo en los Estados Unidos de América y México fue el involucramiento de especie diferentes. México tiene como un reservorio importante a los zorrillos manchados, *Spilogale putorius*, mientras que el reservorio primario en los Estados Unidos de América es el *Mephitis mephitis* o zorrillo rayado, aunque las dos especies son simpátricas en ambos países.

Los zorrillos y mapaches son especies simpátricas en los EEUU, Canadá y en México. En los EEUU se ha documentado el contacto frecuente entre ambas especies con la transmisión interespecífica de la enfermedad (de mapaches a zorrillos en el este de los EEUU; y de zorrillos a mapaches en las regiones centro norte y centro sur de los EEUU), lo que pudiera resultar un riesgo para la diseminación de la rabia de mapache a los zorrillos y viceversa (Guerra, *et al.*, 2003). Los zorrillos manchados y mapaches (*Procyon lotor*) son simpátricos en todo el territorio mexicano, pero la

rabia de mapache no se ha informado hasta la fecha en este país.

La gran diversidad de la rabia en los zorrillos de América del Norte sugiere a este grupo de animales como el hospedero de la enfermedad más propenso a ser reservorio. En Norte América se han descrito más de 8 linajes diferentes de los virus de la rabia asociados a diferentes especies de estos mustélidos lo cual los convierte en un grupo clave en donde hay que enfocar medidas de control y prevención de la enfermedad a la brevedad.

Una muestra mexicana, la 329chihbv99, obtenida de una vaca en Ciudad Juárez, Chihuahua, estaba genéticamente relacionada con la variante de zorrillo de la región Centro Sur de los EEUU, específicamente con muestras de Flagstaff, Arizona. Este hallazgo sugiere que la distribución de la variante Centro Sur de zorrillo es mas amplia que la reportada previamente (Smith, *et al.*, 1996), y que también abarca parte del territorio mexicano.

El linaje W7 de Yucatán que se obtuvo a partir de dos roedores (*Aguti paca*), de un ciervo (*Odocoileus virginianus*) y de varios zorrillos (*Spilogale putorius*), agrupo dentro del clado de virus de la rabia asociados con diferentes focos enzoóticos de la enfermedad en carnívoros silvestres terrestres. Nuestros resultados sugieren que dicha variante se encuentra asociada a un foco enzoótico de rabia en zorrillos manchados de la especie *Spilogale putorius*. La reconstrucción filogenética de los diferentes focos enzoóticos de la enfermedad sugiere que el foco de rabia en zorrillos de Yucatán pudo haber provenido de un evento de diseminación de la rabia de perro que se ha encontrado circulando dentro del estado por mucho tiempo.

El descubrimiento de patrones de variación nucleotídica asociados de manera específica a diferentes especies de carnívoros silvestres y domésticos, la detección de eventos recurrentes de transmisión intraespecífica e interespecífica, patrones de dispersión de la enfermedad

asociada a la biología de sus hospederos definitivos y al comportamiento demográfico del hombre, la distribución geográfica de diferentes focos enzoóticos y su dinámica en el tiempo (detección de eventos de extinción de sublinajes del virus), fue posible por el uso de análisis moleculares pareados con datos públicos de vigilancia epidemiológica. Los datos hasta aquí obtenidos, sugieren una complejidad extraordinaria del virus de la rabia asociada con carnívoros terrestres, no descrita hasta ahora para México. Por otra parte, el uso de los últimos 88 aminoácidos de la región carboxilo terminal de la nucleoproteína, resultó un marcador molecular útil para realizar epidemiología molecular de la rabia. Debido a su alto patrón de variación neutral no estocástico asociado de manera específica a una especie de carnívoro, región geográfica o periodo.

En última instancia, la aparición y mantenimiento de los patrones de distribución de diferentes focos enzoóticos de la rabia depende en gran medida de la biología y ecología de sus hospederos respectivos combinado con la gran plétora de virus de la rabia que intentan expandir su nicho.

Tercera Parte

Durante los últimos seis años, tanto en México como en los Estados Unidos, la rabia en seres humanos transmitida por murciélagos ha incrementado en su frecuencia hasta el grado de ser reconocida como un problema emergente en todos aquellos países en donde el virus de la rabia transmitido por perro ha sido controlado o erradicado (Belotto, *et al.*, 2005; Messenger, *et al.*, 2003). Una de los rasgos más interesantes de los casos de rabia en seres humanos, asociados a la transmisión por murciélagos, es que las personas afectadas o los familiares de estos con muy poca frecuencia refieren algún antecedente de haber estado expuestos a algún animal sospechoso de haber tenido rabia, por lo que la fuente de exposición al virus en estos casos ha sido ignorada, desconocida

o desapercibida (Messenger *et al.*, 2003). El ejemplo mas reciente fueron los casos de rabia en varios seres humanos que ocurrieron durante el 2004 en Alabama, Oklahoma, Arkansas y Texas en Estados Unidos al haber sido transplantados con órganos (hígado, riñones y arterias) de un individuo que había muerto de hemorragia cerebral (Srinivasan, *et al.*, 2005). El virus aislado del donador y los individuos transplantados se logró tipificar molecularmente como una variante del virus asociada con murciélagos insectívoros de la especie *Tadarida brasiliensis mexicana*. Después de haber realizado la investigación epidemiológica se encontró que una colonia de murciélagos de esta especie habitaba el ático de la casa de este individuo, quien al manipular un murciélago que yacía en el suelo de su balcón, nunca se percató del riesgo de contraer rabia al haber sido mordido por este pequeño animal (CDC, 2004). De esta manera la determinación más probable del reservorio involucrado en un caso de rabia y la distribución geográfica de los límites de circulación de la enfermedad (por reservorio específico) son de crucial importancia para la prevención y control de la rabia en seres humanos y animales domésticos de interés económico en cualquier país o región (Smith, 2002; Warner, *et al.*, 1999; Smith, *et al.*, 1995; Rupprecht, *et al.*, 1987). La rabia asociada y transmitida por murciélagos vampiros de la especie *Desmodus rotundus* representa una amenaza reconocida para la salud publica de varios países de América Latina, sin embargo, muchas otras especies de murciélagos también podrían estar jugando un papel importante como reservorios inconspicuos del virus y la enfermedad y potencialmente podrían estar representando un riesgo adicional en la salud publica tal y como se ha corroborado en los Estados Unidos de América (Hughes, *et al.*, 2005; Messenger, *et al.*, 2003).

La información analizada dentro de esta sección tiene como propósito principal el de sustentar la circulación enzoótica de variantes del virus de

la rabia asociadas a diferentes especies de murciélagos en México y otros países de América, así como también, establecer las relaciones espacio temporales y evolutivas de estos ecotipos de la enfermedad en todo el continente, haciendo énfasis en la capacidad de dispersión del virus mediada por algunas especies de estos mamíferos voladores y sus inherentes consecuencias para la salud pública.

Los virus de la rabia que se obtuvieron de murciélagos, animales domésticos, ganado y seres humanos en México, se asociaron con un alto apoyo estadístico a grupos monofiléticos de variantes del virus de la rabia que actualmente se encuentran circulando de forma enzoótica en diferentes especies de murciélagos en otros países de América (Cisterna *et al.*, 2005; Smith, 2002; Yung *et al.*, 2002; Ito, *et al.*, 2001; Nadin-Davis, *et al.*, 2001; Rupprecht *et al.*, 1987). Estas asociaciones se establecieron mediante la comparación de la secuencia de nucleótidos que codifica para los últimos 88 aminoácidos de la nucleoproteína del virus de la rabia (Nadin-Davis, *et al.*, 2001; Bourhy, *et al.*, 1999; Warner, *et al.*, 1999; Smith, *et al.*, 1992). Las asociaciones espacio temporales, filogenéticas y evolutivas entre los virus de la rabia en América se observaron de manera gráfica mediante la construcción de árboles filogenéticos producidos por diferentes métodos (distancia, máxima probabilidad, máxima parsimonia y métodos Bayesianos). Las topologías de los árboles filogenéticos obtenidos en este estudio estuvieron en concordancia general con aquellas obtenidas por otros investigadores, en las que se usaron secuencias completas o parciales del gen que codifica para la nucleoproteína, así como los construidos con otros genes estructurales del virus, como los que codifican para la glicoproteína y fosfoproteína (Bernardi *et al.*, 2006; Nadin-Davis *et al.*, 2001, 2006 a, b, c; Holmes *et al.*, 2002; Kuzmin *et al.*, 2005; Badrane, *et al.*, 2001; Bourhy, *et al.*, 1999; Kissi *et al.*, 1999; Kissi *et al.*, 1995; Smith, *et al.*, 1992.). El hecho que las topologías de los árboles

filogenéticos describan de forma consistente las mismas relaciones generales entre las variantes del virus de la rabia, las especies específicas a las que se encuentran asociadas (reservorios carnívoros y/o quirópteros), las regiones geográficas donde circulan y su variación en el tiempo (independientemente del método y la región informativa del genoma usados para su construcción), sugieren que la unidad genómica o marcador molecular que ha registrado la evolución del virus y su compleja interacción con el medio (y en consecuencia cualesquiera que sean las fuerzas evolutivas que hallan actuado sobre él) se encuentra distribuida de forma homogénea y equivalente a lo largo de los genes estructurales de todo su genoma. Lo que a su vez sugiere que el virus de la rabia ha evolucionado como una unidad, en congruencia con la naturaleza de genoma de cadena sencilla y su ciclo de replicación (Webby *et al.*, 2004). Estos antecedentes validan el uso de la región altamente informativa que codifica para los últimos 88 aminoácidos de la nucleoproteína, empleados en este estudio como marcador molecular. Dicha región permitió diferenciar en forma consistente los virus de la rabia asociados de forma específica con diferentes especies de reservorios carnívoros terrestres y diferentes especies de quirópteros; contribuyó a definir en mayor detalle la estructura genética espacial o variantes geográficas de la variante del virus asociada a una misma especie; permitió inferir tendencias de diseminación de la enfermedad y ayudó a abordar de forma preliminar aspectos complejos de la evolución del virus de la rabia en sus diferentes reservorios (Badrane, *et al.*, 2001; Holmes, *et al.*, 2002; Smith, *et al.*, 1992).

Tanto su relación filogenética como su distribución geográfica y temporal superpuesta, sugieren que los grupos de los virus de la rabia asociados con murciélagos hematófagos en México, linajes Dr1-Dr7, pudieron haber emergido en diferentes subpoblaciones o colonias de vampiros como

consecuencia de la diseminación gradual de la enfermedad a partir de un foco primario de infección. El surgimiento de un nuevo linaje del virus de la rabia asociado al mismo reservorio (o variante geográfica), se podría haber generado por la diferenciación en el tiempo del "linaje colonizador" proveniente del foco o fuente primaria de la infección. Aunque los mecanismos de evolución ("especiación") del virus de la rabia no han sido demostrados, se piensa que pudieran estar actuando procesos similares a los descritos para explicar la diversidad genética en mamíferos a nivel de los focos de rabia (o subpoblaciones de virus). Entre estos, los que pudieran estar más relacionados con la estructura genética del virus de la rabia serían: aislamiento por distancia (barreras geográficas o mera distancia física); aislamiento por comportamiento (los individuos del nuevo foco tienden a permanecer en un mismo nicho); o deriva genética. Los mismos argumentos han sido utilizados para tratar de explicar la estructura genética en espacio y tiempo del virus de la rabia asociado a zorros a lo largo de la costa este del Canadá (Nadin-Davis *et al.*, 1999). Las grandes cadenas montañosas distribuidas a lo largo de todo el territorio Mexicano podrían estar jugando un papel importante en el aislamiento geográfico de los diferentes focos de rabia (identificados como diferentes linajes Dr1-Dr7) asociados a vampiros dentro del territorio mexicano. Este fenómeno es más notorio en aquellos linajes del virus de la rabia asociados a poblaciones de vampiros del este de México (Dr1-Dr5) con respecto a aquellos circulando en el oeste (Dr6-Dr7). Aquí, la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre Occidental parecen estar jugando un papel importante para circunscribir estas dos grandes poblaciones de murciélagos hematófagos promoviendo una divergencia genética y una clara partición geográfica de las poblaciones de virus asociadas a estas (Nadin-Davis *et al.*, 1993; Nadin-Davis *et al.*, 1999).

Por otro lado, la gran similitud en la secuencia nucleotídica, secuencia de aminoácidos y patrones antigénicos, entre ciertos linajes del virus de la rabia asociado a vampiros en el este de México y aquellos que se encuentran circulando actualmente en América del sur, sugiere que su distribución actual pudiera ser consecuencia de un proceso de diseminación gradual pero continua a lo largo de toda la costa este del continente, lo cual ha sido potenciado por el movimiento continuo y por la explosión demográfica masiva del ganado vacuno, el cual es la fuente principal de alimentación del murciélago hematófago.

De acuerdo con los dendrogramas y cladogramas presentados dentro de este estudio todos los linajes y variantes antigénicas del virus de la rabia asociadas a murciélagos hematófagos en el continente americano parecen tener un ancestro común. De estos la variante antigénica 3 (AgV3), representada por los linajes Dr3-Dr5 en México y varios otros linajes independientes en diferentes regiones de América del sur, es la que tiene la distribución más amplia en todo el continente. Esto sugiere que dicha variante es la que pudo haber dado origen a la rabia en murciélagos hematófagos en América y, consecuentemente, la que se ha diseminado por todo el continente y de la cual han derivado los diversos linajes y variantes antigénicas hasta ahora detectados. La aparición mas temprana de esta variante (AgV3), también se sustenta en el hecho de que la diversidad genética para esta es mayor que la observada para cualquier otra de las variantes hasta ahora detectadas en México y en América del sur (AgV11, AgV5, AgV8/PAA), las cuales a su vez también tienen una distribución geográfica muy restringida. Por lo tanto el corredor de diseminación más probable para la rabia de vampiros pudo haber sido la costa este del continente que comprende el Golfo de México, el Caribe, centro América hasta América del sur.

Capítulo VIII. Discusión

Aunque el origen y sentido de esta diseminación parecen no estar claros, el hecho de que la rabia de vampiros comparta un ancestro común muy antiguo con la rabia en *Tadarida brasiliensis brasiliensis* en América del sur, que actualmente se ha encontrado circulando en Colombia, Brasil, Argentina y Chile (De Mattos, et al., 2000, Favi, et al., 2002), sugiere que el punto de origen de la enfermedad en vampiros pudo haber sido esa parte del continente americano.

La rabia en murciélagos hematófagos en toda América resultó también tener un ancestro común, mas reciente, con la rabia de *Tadarida brasiliensis mexicana* que actualmente se encuentra distribuida desde el sur de Canadá, pasando por todo Estados Unidos hasta la región central de México (Guanajuato-Puebla), tal y como ya has sido sugerido anteriormente (Hughes, et al., 2005). Esta evidencia filogenética indica que la rabia en esta especie de murciélago insectívoro (*Tadarida brasiliensis mexicana*) pudo haber surgido de la transmisión ínter-específica de la enfermedad a partir de vampiros rabiosos, para posteriormente convertir a este murciélago insectívoro en un nuevo reservorio de la enfermedad, por medio de la adaptación del virus a esta nueva especie (Smith, 2002). Además estos dos clados de virus de la rabia asociados de forma específica a especies diferentes de murciélagos presentan la mayor similitud en sus secuencias de nucleótidos y aminoácidos al realizar una comparación con todos los clados o linajes asociados a otras especies. Existe información que sustenta que los vampiros son capaces de alimentarse de *Tadarida brasiliensis mexicana* cuando se encuentra en cautiverio (Greenhall, 1988), lo que sugiere que la transmisión interspecie de la enfermedad se pudiera haber dado en una región donde ambas especies son simpátricas, tal como el oeste mexicano. En este punto cabe señalar que aunque *Tadarida brasiliensis mexicana* tiene una distribución natural continua, desde el Sur de Canadá y hasta la

región central de México, pasando por todo Estados Unidos, los focos de rabia no abarcan toda la distribución natural de la especie.

La transmisión de la rabia de forma ínterespecífica entre vampiros y una especie de murciélagos frugívoros (*Artibeus jamaicensis*) se ha detectado e informado por primera vez en México mediante este estudio. Lo que ejemplifica que los murciélagos hematófagos pueden transmitir la enfermedad a especies simpátricas. Este fenómeno se ha reportado con mucha frecuencia en centros urbanos de Brasil (Ito, *et al.* 2003), donde *Artibeus lituratus* ha sido diagnosticado con bastante frecuencia positivo a rabia identificándose en él, el virus específico de *Desmodus rotundus* circulante en la región. La diseminación de la enfermedad de *Desmodus rotundus* a *Artibeus lituratus* fue detectada desde principios del siglo XX en América del sur (Haup y Rehaag, 1921). Otros autores relatan que los murciélagos hematófagos son capaces de alimentarse de otras especies de murciélagos que habitan las mismas cuevas que ellos, especialmente cuando las condiciones climatológicas no les permiten salir a alimentarse en días (Greenhall, 1988).

Con base en el patrón de variación nucleotídica y la similitud de sus secuencias de nucleótidos y aminoácidos, el virus de la rabia asociado a *Tadarida brasiliensis brasiliensis*, que circula en América del sur (TbSA), parece estar mas cercanamente relacionado con los virus de la rabia que se encuentran circulando en vampiros de todo el continente americano y a los virus relacionados con *Tadaradida brasiliensis mexicana* que circulan en América del norte (TbNA), que con los virus asociados específicamente a varias especies de murciélagos "coloniales no migratorios" y los relacionados con murciélagos "solitarios". Sin embargo, el hecho de que ambos virus asociados a *Tadaradida brasiliensis* en dos regiones diferentes del continente no compartan un ancestro común reciente sugiere que

Capítulo VIII. Discusión

ambas subespecies han mantenido la enfermedad enzoótica de forma independiente y que estas enzootias tuvieron orígenes espacial y temporalmente diferentes.

Estos hallazgos revocan a la reflexión sobre la biología de esta especie. Con una distribución amplia que comprende el norte, centro y sur de América, se conoce que *Tadarida brasiliensis* tiene hábitos migratorios en extremo complejos. Algunas poblaciones de esta especie viajan del extremo norte al extremo sur, dentro de los límites de su distribución natural, mientras que otras residen todo el año en el mismo lugar. Las poblaciones más grandes y más estudiadas de esta especie habitan en México y Texas, EEUU. Hay nueve subespecies descritas hasta el momento que ocupan diferentes territorios y que tienen diferentes rutas migratorias. La población total estimada en el norte de América hasta el momento oscila entre 95 hasta 105 millones de individuos, con un censo de 20 a 40 millones de individuos habitando solo la cueva de Bracken en Texas, EEUU.

El análisis filogenético del virus de la rabia asociado a esta especie, que comprende parte de este trabajo, parece reflejar claramente la biología de *Tadarida brasiliensis* reforzando la relación íntima hospedero-virus. El hecho de que los virus que circulan en América del norte (TbNA en *Tadarida brasiliensis mexicana*) sean diferentes a los de América del sur (TbSA en *Tadarida brasiliensis brasiliensis*) sugiere que las colonias que los mantienen enzoóticas, no tienen patrones de migración superpuestos dentro de los límites donde actualmente se han encontrado circulando a ambos virus, indicando, que estas subespecies normalmente no migran entre el norte y el sur de América, tal vez por restricciones geográficas impuestas por montañas de gran altitud o por simples patrones de comportamiento. Así mismo, los virus pertenecientes al grupo TbNA parecen estar estructurados en subgrupos o linajes independientes con

una distribución geográfica amplia, lo que sugiere que estos podrían estar asociados a diferentes poblaciones, colonias o subespecies (restringidas al norte de América) reflejando rutas de migración restringidas dentro de América del norte. Dichos grupos se asocian más a un año que a una región, lo que alternativamente podría sugerir rutas particulares de migración en diferentes años o procesos de extinción y re-introducción del virus a una colonia en particular.

La epizootiología de la rabia en *Tadarida brasiliensis* en toda América, contrasta con lo ya descrito dentro de este trabajo con respecto a la rabia de murciélagos hematófagos, la cual parece haberse diseminado de forma masiva y reciente a lo largo de todo el continente al juzgar por su carácter monofilético. Este hecho se corrobora por la manera en la que la rabia que afecta a vampiros ha sido referida desde mediados del siglo XX, como la epizootia emigrante que afecta vampiros y ganado en toda la América tropical y subtropical (Humphrey, 1971; Greenhall, 1988)

El caso de la rabia en el murciélago de pelo cenizo (*Lasiurus cinereus*), que a continuación se discutirá en detalle, sugiere que la distribución de la rabia que afecta a *Tadarida brasiliensis* en América podría estar vinculada a factores de comportamiento mas que a la presencia de barreras geográficas que pudieran limitar el movimiento de individuos de esta especie. El alto grado de similitud, más del 99% (Young, *et al.*, 2002) y el carácter monofilético de los virus aislados en *Lasiurus cinereus* desde Canadá-EEUU-México hasta Colombia-Argentina-Chile-Brasil sugieren que individuos de esta especie son capaces de moverse grandes distancias dentro del continente. Probablemente, las rutas de movimiento de esta especie y las razones por las cuales lo hace sean muy diferentes a las que provocan el movimiento de las poblaciones de murciélagos hematófagos en América.

Capítulo VIII. Discusión

De acuerdo con lo sugerido por los análisis filogenéticos, aquí realizados, la rabia en "murciélagos solitarios" (*Lasiurus cinereus*, *Lasiurus borealis*, *Lasionycteris noctivagans*) pudo haber sido un evento relativamente reciente dentro del cual el virus y la especie de murciélago que fungieron como el ancestro común transmitieron la enfermedad de manera interespecífica, con su muy posible posterior adaptación a las otras especies que conforman dicho grupo monofilético de virus de la rabia. La información con la que actualmente se dispone no ha permitido calibrar de forma adecuada un reloj molecular para poder determinar de manera aproximada cual de estas especies, denominadas como solitarias, pudo haber sido la responsable de haber diseminado la enfermedad inicialmente. Sin embargo, la creación de bases de datos con mayor representatividad espacial y temporal que además comprendan información sobre secuencias mas amplias del virus (varios genes estructurales completos) e información sobre la estructura genética de las poblaciones de murciélagos (basada en el análisis de marcadores genéticos con valor taxonómico y con significado biológico), su biología y evolución, podrán orientar de forma mas adecuada las inferencias que se puedan hacer sobre como, cuando y donde pudieron haber sucedido estos eventos.

Existe evidencia abundante sobre la transmisión interespecífica de la rabia en diversas especies simpáticas de murciélagos en todo el continente (Favoretto, *et al.*, 2001; Nadin-Davis, *et al.*, 2001; Smith, 2002; Ito, *et al.*, 2003), de modo que es posible que se de la transmisión interespecífica con posterior adaptación es posible. Sin embargo, aun no están caracterizados los procesos y factores cruciales que conducen a la adaptación del virus a otras especies y el tiempo que esto pudiera tardar una vez que las condiciones para que suceda la transmisión interespecífica se han dado. Entre los factores y procesos que se han tratado de vincular

con este fenómeno destacan cambios dentro del genoma del virus que pudieran suceder durante la interacción del virus con el hospedero, cambios en la capacidad de replicación del virus dentro del nuevo hospedero y cambios en la dinámica poblacional y ecológica de los potencialmente nuevos hospederos (Favoretto, *et al.*, 2001).

El alto grado de identidad en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de los virus asociados a *Lasiurus cinereus*, dentro de los límites geográficos tan amplios aquí mencionados (que comprende los límites de la distribución natural de la especie), sugiere que su evolución podría estar siendo modulada por efecto de selección purificadora. Hipótesis que no entra en controversia con la posibilidad de que el reservorio, *Lasiurus cinereus*, tenga un alto grado de movilidad a lo largo de todo el continente (Holmes, *et al.*, 2002; Hughes, *et al.*, 2005).

La distribución natural de *Lasiurus cinereus* en México (Medellín, *et al.*, 1997) abarca prácticamente todo el territorio nacional, con excepción de Yucatán. El movimiento de grandes distancias de cualquier agente infeccioso puede tener consecuencias directas sobre la salud pública. Por ello es necesario realizar estudios sobre la ecología (determinación nicho, hábitat, rutas de migración, grado de incursión del hombre dentro de sus habitats naturales) y biología (demografía, distribución, ciclo de vida) de esta especie en México y América, los cuales podrían contribuir a evaluar el riesgo real de esta especie como transmisor de la rabia a seres humanos. Dicho riesgo está latente en México, ya que dicho virus ha sido encontrado circulando en murciélagos en el estado de Guanajuato. Una variante muy similar, pero independiente, se ha encontrado circulando en Coahuila y Baja California Sur.

Los virus de la rabia asociados con *Lasionycteris noctivagans* y *Pipistrellus subflavus* que están relacionados con la mayor cantidad de casos de rabia

Capítulo VIII. Discusión

en seres humanos en los EEUU (Messenger *et al.*, 2003; Smith, 2002), no se han encontrado circulando en México hasta la fecha. Sin embargo, el hecho de que estas dos especies estén distribuidas de forma natural en México (Medellín, *et al.*, 1997), mantiene el riesgo latente de que la enfermedad se pueda diseminar a los murciélagos de esta especie en México y que esto, a su vez, incremente la posibilidad de infección al ser humano. Por ello es necesario implementar programas continuos de educación a la población sobre el riesgo que pueden representar algunas especies de murciélagos como transmisores de la enfermedad y como poder identificar un murciélago potencialmente enfermo, para poder mejorar los sistemas de vigilancia epidemiológica pasiva de la enfermedad en el país (Medellín, *et al.*, 1997; Smith, 2002).

A diferencia del clado monofilético integrado por los diversos linajes del virus de la rabia asociados a murciélagos solitarios, los clados o grupos de virus de la rabia asociados con murciélagos "coloniales no migratorios", tales como *Eptesicus fuscus*, *Myotis sp*, *Pipistrellus hesperus*, fueron polifiléticos, indicando una heterogeneidad amplia en estos grupos de virus. Los tres clados arriba mencionados, presentaron más de un linaje no monofilético, indicando una posible estructura geográfica en algunos de ellos, pero sugiriendo más fuertemente que sus orígenes pudieron haber sido independientes.

Circulando en la región central de México se encontraron dos virus de la rabia en murciélagos insectívoros cuya especie no pudo ser identificada (localmente no se disponía de personal con la experiencia para determinar la especie de murciélago y los cadáveres fueron descartados), presentaron un alto grado de similitud, en su secuencia de nucleótidos y aminoácidos, así como también, segregaron con alto valor de soporte estadístico con el virus aislados de *Histiotus montanus* en Chile y Argentina, Brasil y

Colombia. Dicho hallazgo fue en extremo interesante, ya que esta especie aparentemente no se distribuye de forma natural en México ni en América del norte. Sin embargo se sabe muy poco acerca de la biología de esta especie, la descripción y distribución marginal de algunas especies dentro de este género datan de mediados del siglo XIX y principios del siglo XX. Pudiera existir la posibilidad de que esta especie sea migratoria al igual que *Lasiurus cinereus* y que entonces pudiera tener una distribución mas amplia que solo América del sur y estar diseminando al virus también en los países de América del norte (<http://www.funet.fi/pub/sci/bio/life/mammalia/chiroptera/vespertilionidae/histiotus/>).

Alternativamente, podría existir la posibilidad de que alguna especie migratoria que pudiera estar moviéndose de sur a norte sea el conducto por el cual este virus se este diseminando. Por otro lado, la identificación errónea de la especie asociada a esta variante del virus de la rabia en Chile y Argentina pudo haber sucedido en estos países, de manera que tal vez una especie migratoria que tenga distribución natural desde México hasta Chile-Argentina sea la que esta asociada de forma especifica con este virus.

La diversidad del virus de la rabia asociada con murciélagos (RVAB) en América fue muy similar a la diversidad del virus de la rabia asociada a carnívoros terrestres (RVTC) en América del norte, con base en el análisis de las secuencias parciales y completas del gen que codifican para la nucleoproteína (Kuzmin, *et al.*, 2005, Velasco-Villa, *et al.*, 2005). Dicho hallazgo es sorprendente si se considera que la diversidad de los quirópteros (Rupprecht, *et al.*, 1987) en América es mucho mayor que la de los carnívoros terrestres. Sin embargo, estos resultados pudieran estar reflejando que el virus de la rabia solo ha alcanzado adaptarse a un número muy pequeño de especies de murciélagos en procesos de

Capítulo VIII. Discusión

diseminación interespecífica relativamente recientes, con posterior adaptación del virus a partir de un reservorio ancestral de la rabia asociada a quirópteros, de forma análoga a como lo refleja la epizootiología de la enfermedad en carnívoros terrestres (Badrane, *et al.*, 2001; Holmes, *et al.*, 2002).

Recientemente, varios investigadores han informado de un alto nivel de conservación en la secuencias de aminoácidos en clados monofiléticos del virus de la rabia asociados específicamente a diferentes especies, consideradas como reservorios putativos de la rabia en los ordenes Chiroptera y Carnívora. Esto sugiere que la evolución del virus de la rabia, dentro de su reservorio específico, esta altamente restringida y que este se encuentra evolucionando bajo un modelo de selección purificadora (Holmes, *et al.*, 2002; Kissi, *et al.*, 1999).

Dentro de este estudio se encontraron patrones similares de evolución dentro de todos los linajes asociados de forma específica a *Desmodus rotundus*, *Tadarida brasiliensis mexicana*, *Tadarida brasiliensis brasiliensis*, *Lasiurus cinereus*, *Histiotus montanus*, *Myotis sp*, etcétera. Sin embargo, cada uno de estos grupos presentó una firma molecular específica conservada en el tiempo dentro de su secuencia de aminoácidos, la que los distingue del virus asociado a una especie de murciélago diferente, tal y como se ha documentado para los virus de la rabia asociados a carnívoros terrestres (Velasco-Villa, *et al.*, 2005). Hasta la fecha no se ha podido probar que los procesos de selección positiva estén involucrados en la evolución y adaptación del virus de la rabia dentro de sus reservorios específicos. Los datos obtenidos en este estudio sugieren que se deben realizar análisis similares usando grupos de datos más representativos que reflejen realmente la diversidad del virus en asociación con sus reservorios específicos. La falta de representatividad en los grupos de datos analizados

por otros investigadores (Holmes, *et al.*, 2002; Kissi, *et al.*, 1999) podría radicar en desviaciones provocadas por la forma en la actualmente se realizan los muestreos y la vigilancia de la circulación del virus de la rabia en todo el mundo (vigilancia pasiva), la cual puede no estar reflejando las tendencias naturales de la enfermedad.

Con este trabajo se visualiza la necesidad de llevar a cabo estudios integrales de la enfermedad que comprendan nuevos métodos de vigilancia epidemiológica acoplados al estudio de la filogeografía y ecología de los reservorios putativos de la enfermedad hasta ahora descritos, lo cual nos permitirá entender de mejor manera la epizootiología, diversidad y evolución del virus de la rabia. Tales investigaciones contribuirán a focalizar de forma estratégica las medidas de control y prevención de la enfermedad por reservorio específico a nivel regional (Belotto, *et al.*, 2005; Humphrey, 1971).

Este tipo de estudios también deberán de contribuir para hacer intervenciones más precisas en el control y prevención de la enfermedad en diferentes especies de murciélagos comprobadas como reservorios de la enfermedad, con el fin de disminuir el impacto negativo en las poblaciones de murciélagos benéficas que pudiera repercutir en un desequilibrio ecológico de dimensiones catastróficas o a la extinción irracional de varias especies.

Este tipo de trabajo también debiera ayudar a la elaboración de programas educativos para la población, con la intención de notificar, de manera responsable y clara, del riesgo que ciertas especies de murciélagos representan en la transmisión de la rabia, ya que la ignorancia, ha sido la principal responsable de que los murciélagos sean la causa principal de muerte por rabia en seres humanos en los EEUU (Messenger, *et al.*, 2003; Smith, 2002).

CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES

1. Las especies que con mayor frecuencia se encontraron infectadas con el virus de la rabia fueron los bovinos, los perros y los humanos. Ello refleja la cercanía de estas especies con el ser humano a la vez que sugiere el carácter pasivo que ha tenido la vigilancia epidemiológica de la enfermedad en México. La incorporación al estudio de animales silvestres rabiosos y la ampliación (espacial y temporal) del muestreo de animales domésticos rabiosos contribuyó a disminuir el sesgo inherente al muestreo pasivo.

2. El sistema de monitoreo de la rabia en animales domésticos, acoplado a la tipificación molecular del virus, permite estimar el riesgo para el ser humano mediante la inferencia de los posibles reservorios naturales de esta zoonosis y la determinación de la distribución de los focos activos de la enfermedad.

3. En México se detectaron diez de las once variantes antigénicas del virus de la rabia previamente descritas para América Latina, mas seis patrones antigénicos atípicos asociados a diferentes especies de carnívoros terrestres y murciélagos. Las variantes antigénicas V1, V7, V8, V9, V10, V11 y al menos tres de las asociadas con patrones antigénicos atípicos fueron aisladas de las especies consideradas como sus reservorios naturales y, por lo tanto, específicos.

4. No existe un mejor marcador genético para realizar epidemiología molecular de la rabia, pues las secuencias nucleotídicas de cualquiera de sus genes estructurales completos (nucleoproteína, fosfoproteína y glicoproteína) o regiones altamente informativas dentro de estos, son útiles para reconstruir la historia epizootiológica de la enfermedad en un

lugar, región o en todo el planeta. La representatividad y lo completo de la historia radica en que el grupo de muestras o secuencias usado abarque la diversidad espacial, temporal y de reservorio del virus de la rabia.

5. Siempre y cuando se use el mismo grupo de muestras o un grupo de muestras equivalente, que incluya la misma variación espacial, temporal y de reservorios del virus, la reconstrucción filogenética de la historia epizootiológica de la rabia será siempre la misma, sin importar el marcador genético o el método para la construcción del árbol filogenético.

6. Para los propósitos del presente trabajo el mejor marcador genético lo constituyó la región del extremo carboxilo terminal de la nucleoproteína, del la cual se usaron únicamente los últimos 264 nucleótidos que codifican para 88 aminoácidos. Con este marcador fue posible reproducir las mismas historias epizootiológicas de la enfermedad que las obtenidas con secuencias de genes completos por lo que las inferencias realizadas con este tienen la misma validez y representatividad.

7. El marcador genético utilizado en el presente estudio resultó fácil de amplificar con tasas altas de eficiencia aun en muestras almacenadas en condiciones inestables, sin necesidad de realizar pases de amplificación de la carga viral en ratón o en cultivo celular. Esto abarató los costos de tipificación molecular del virus de la rabia. Así mismo, el procesamiento computacional (que comprende tiempo y capacidad de computo) para reconstruir los árboles filogenéticos también se redujo de forma significativa al usar secuencias cortas y empleando el método fenético de Neighbor Joining.

8. La variante antigénica V1 se encontró predominantemente en la región centro del país con al menos seis focos activos distribuidos dentro de los

Capítulo IX. Conclusiones

estados de Puebla-Tlaxcala (D3, D7, D8), Estado de México (D5 y D8), Yucatán (D10), Oaxaca Guerrero (D9), Chiapas y Michoacán (D2 y D4), donde el perro funge como principal reservorio. En el norte del país también se observó la presencia de dicha variante en donde esta asociada a especies silvestres como coyotes, zorrillos y zorros.

9. Durante al menos los últimos 10 años, se ha detectado la extinción gradual de varios sublinajes (D3, D4, D6, D7, D10₁, D10₂ y D11) del virus de la rabia asociados a focos enzoóticos de la rabia en perros en todo país. Ello se podría atribuirse en gran medida a la intensificación de las campañas masivas de vacunación antirrábica canina.

10. El foco enzoótico de rabia en coyotes, distribuido en la región este de la frontera de México con los EEUU, es filogenéticamente muy cercano al de perros. Sin embargo, un cambio de aminoácido conservado durante más de 30 años en este sublinaje lo distingue de los de perro (serina por treonina en la posición 426).

11. Los focos de rabia asociada a perros (D11) y coyotes (D1) a lo largo de la frontera de México con los EEUU (D1 y D11), están vinculados con focos enzoóticos crónicos de rabia en perros distribuidos en la región centro-noroeste, centro y sureste del país. Lo que sugiere que esta ocurriendo el movimiento de perros infectados probablemente vinculado a la migración de la fuerza de trabajo hacia los EEUU. D11 esta vinculado con focos enzoóticos de Chiapas y Michoacán, mientras que D1 esta relacionado con focos de rabia en Puebla-Tlaxcala y Michoacán.

12. Se detectaron tres focos de rabia asociados a carnívoros terrestres (zorros grises, zorrillos y coyotes) que tienen una distribución continua a ambos lados de la frontera de México con los EEUU.

13. La rabia asociada a zorrillos en México se encontró principalmente relacionada con la especie *Spilogale putorius* y no con *Mephitis mephitis* como se ha informado en los Estados Unidos y Canadá. Así mismo, la diversidad del virus de la rabia encontrada en esta especie fue la más amplia notificada para un reservorio terrestre de la enfermedad en México.

14. La rabia de zorrillos en México tiene un doble origen. Uno relacionado con cánidos terrestres (W1, W7 y W9) y otro relacionado con quirópteros (W11 y W13). El único foco de rabia asociado a animales silvestres terrestres en el estado de Yucatán está relacionado con zorrillos manchados *Spilogale putorius*.

15. Los cinco focos de rabia asociados con zorrillos en México tienen patrones de variación genética y antigénica estables y específicos dentro de cada región.

16. La rabia asociada a zorros grises se detectó por primera vez en sus reservorios naturales en México (*Urocyon cinereoargenteus*). El virus de la rabia aislado de esta especie ha divergido antigénica y genéticamente de las variantes de perro. Su diversidad genética a lo largo de su amplia distribución (noroeste de México y suroeste de los EEUU) está muy restringida y sugiere movimiento de distancias muy largas de zorros grises infectados entre los dos países.

17. Al menos existen tres variantes antigénicas (V3, V5 y V11 y la V8/VAT) y siete variantes genéticas (Dr1-Dr7) del virus de la rabia asociadas con murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) en México. Estos virus se han detectado principalmente en ganado bovino, el cual se sugiere como especie centinela para evaluar el riesgo de que la enfermedad alcance al hombre.

Capítulo IX. Conclusiones

18. La variante antigénica V3 presento la distribución más amplia dentro de México y toda América a diferencia de las variantes antigénicas V11 y V8/VAT que se circunscribieron exclusivamente a México.

19. La variante antigénica V3 es monofilética en todo el continente americano por lo que es el ancestro más probable de la rabia asociada a murciélagos hematófagos en América.

20. El virus de la rabia asociado a murciélagos hematófagos en América es monofilético con la rabia de murciélagos guaneros de América del Sur (*Tadarida brasiliensis brasiliensis*), lo que sugiere que la enfermedad en esta especie se pudo haber originado en esta región del continente.

21. El virus de la rabia asociado a murciélagos guaneros de América del Norte (*Tadarida brasiliensis mexicana*) es monofilético solo a dos linajes (Dr6-Dr7) del virus asociado a *Desmodus rotundus* sugiriendo que este pudo ser producto de la diseminación de la enfermedad a partir de murciélagos hematófagos.

22. La mayoría de los casos de rabia en seres humanos asociados a murciélagos en México estuvieron vinculados con *Desmodus rotundus* y solo uno se encontró relacionado con murciélagos insectívoros de la especie *Tadarida brasiliensis mexicana*.

23. En México se pueden encontrar variantes del virus de la rabia asociadas a especies que no tienen distribución natural aparente en el país, como los virus que se encontraron asociados a *Histiotus montanus*.

24. Al igual que las variantes del virus asociadas a mamíferos terrestres, las variantes asociadas a los murciélagos *Desmodus rotundus*, *Tadarida*

brasiliensis mexicana e *Histiotus sp* se pueden encontrar infectando especies domesticas como gatos y perros. Esto representa un riesgo latente de que *Histiotus sp* pueda generar casos humanos de rabia.

25. Las variantes del virus de la rabia asociadas a murciélagos también se pueden llegar a diseminar a otras especies de murciélagos, como el caso del virus asociado a *Desmodus rotundus* que se encontró en un murciélago *Artibeus jamaicensis* rabioso.

26. A pesar que *Tadarida brasiliensis* es conocido por su carácter migratorio, los virus de la rabia asociados de forma especifica a sus subespecies *Tadarida brasiliensis mexicana* y *Tadarida brasiliensis brasiliensis* no tienen una conexión filogenética cercana que sugiera que esta especie es capaz de desplazarse grandes distancias dentro de América, como se detectó para *Lasiurus cinereus*.

27. En México se encuentran circulando virus de la rabia asociados a murciélagos insectívoros migratorios de la especie *Lasiurus cinereus* y *Lasiurus sp*, los cuales son monofiléticos en todo el continente y con un nivel de identidad mayor al 99%. Ello demuestra el potencial que tiene esta especie de desplazarse grandes distancias a diferencia de los virus asociados a *Tadarida brasiliensis mexicana*, *Tadarida brasiliensis brasiliensis* y *Desmodus rotundus* que presentan un patrón de diseminación restringido o gradual.

28. Un aislamiento del virus de la rabia aislado de un murciélago en el estado de San Luis Potosí segregó de manera independiente, lo que sugiere que podría ser una variante que se encuentra circulando en una especie de murciélago reclusa o que de forma esporádica llega a tener contacto con el hombre.

29. Cinco de seis variantes antigénicas atípicas estuvieron asociadas a murciélagos, lo que demuestra lo poco que se ha estudiado de la diversidad del virus de la rabia asociado a murciélagos en México.

30. El virus asociado a *Tadarida brasiliensis mexicana* presentó estructura temporal lo que sugiere posibles procesos de extinción y re-introducción del virus o alternativamente rutas diferentes de migración por año.

31. La diversidad de virus de la rabia asociados con carnívoros terrestres en México refleja la megadiversidad biológica de flora y fauna presente en México

32. La diversidad del virus de la rabia es muy semejante en las especies que funcionan como reservorios dentro de los órdenes Carnívora y Chiroptera del continente Americano.

33. Es importante recalcar que la vigilancia epidemiológica de los murciélagos, por medio de muestreos amplios, debe llevarse a cabo de manera académica y multidisciplinaria para evitar disminuir las poblaciones de estas especies indiscriminadamente.

34. Finalmente, la educación para la salud es la mejor estrategia para fortalecer la vigilancia de la rabia asociada a murciélagos, de tal manera que cuando una persona encuentre un animal enfermo o muerto lo lleve a un laboratorio especializado, teniendo cuidado de no ser mordido, para que sean analizados en busca de rabia. Este tipo de medidas reducirá el impacto negativo a la ecología de los quirópteros.

CAPÍTULO X. ESTUDIOS POSTERIORES

A pesar de los grandes esfuerzos que se han hecho en México por controlar y eliminar la rabia canina y su transmisión al hombre, esta sigue siendo un problema de salud pública. De acuerdo con cifras informadas por el CENAVECE, la SSA ha gastado de 40 a 60 millones de pesos al año, los últimos seis años, en la prevención de la enfermedad en el ser humano y en el combate de la rabia en perros.

La epidemiología ha sido una de las herramientas más importante que la ciencia médica ha usado para la determinación de la etiología y rastreo de enfermedades que afectan al hombre. En sus inicios, la epidemiología aplicada al conocimiento de la rabia en México había prescindido del laboratorio para realizar acciones de prevención, control y evaluaciones del riesgo de contraer la enfermedad, basándose exclusivamente en datos clínicos para confirmación de casos y la generación de estadísticas descriptivas que permitirían descifrar tendencias en las fuentes de origen y diseminación de la enfermedad. La aplicación de la biología molecular en los laboratorios de diagnóstico y su vinculación con otras disciplinas, como la biología evolutiva, han permitido el desarrollo de una disciplina emergente que básicamente se dedica al seguimiento espacial y temporal de la evolución de los organismos patógenos en un entorno altamente cambiante.

En este trabajo se demostró la diversidad del virus de la rabia, su dinámica evolutiva espacial y temporal así como la amplia variedad de especies que se encuentran estrechamente asociadas a su mantenimiento y diseminación.

Inherente a esta diversidad existe el riesgo potencial de la emergencia o re-emergencia de reservorios y con ello la posibilidad de que el humano este expuesto a fuentes de infección desconocidas (emergentes) e

inesperadas (re-emergentes). Por ello estudios como este deben continuarse de forma permanente, reforzando y mejorando la vigilancia epizootiológica y epidemiológica de la enfermedad bajo la implementación y fortalecimiento de las siguientes estrategias.

- 1) La detección pasiva de la enfermedad ha demostrado ser efectiva en una población instruida y homogéneamente distribuida dentro del territorio de una nación. Mejorar la detección en México exige una colaboración interdisciplinaria entre comunicadores, científicos y responsables de la salud pública para que se elabore y trasmita información a la población sobre que animales pueden transmitir la rabia.
- 2) Vincular a la población con centros y unidades de salud locales para que de una forma segura se envíen al laboratorio para su diagnóstico muestras de animales sospechosos.
- 3) Promover la participación de mastozoólogos, especialistas en la determinación taxonómica de murciélagos y carnívoros, en las unidades de recolección de muestras para la determinación de la especie de los animales que son sospechosos de tener rabia. Alternativamente, en laboratorios de referencia, se podría implementar la determinación de especie mediante el uso de técnicas moleculares.
- 4) El entendimiento de la biología y ecología de los reservorios del virus de la rabia es fundamental para comprender la evolución del virus y la diseminación espacial y temporal de la enfermedad. Por ello es necesario hacer trabajos en colaboración estrecha con genetistas de poblaciones, evolucionistas moleculares a fin de poder estudiar simultáneamente al virus y sus hospederos reservorios.

CAPÍTULO XI. LITERATURA CITADA

Anderson, R.M., H.C. Jackson, R.M May, A.M. Smith. 1981. Population dynamics of fox rabies in Europe. *Nature*. 289:765–771.

Aranda, M., L. López de Buen. 1999. Rabies in skunks from México. *J. Wildl. Dis.* 35:574–577.

Badrane, H., N. Tordo. 2001. Host switching in *Lyssavirus* history from the chiroptera to the carnivora orders. *J. Virol.* 75:8096–8104.

Baer, G. M., J. S. Smith. 1991. Rabies in nonhematophagous bats. p.342–363. *In* G. M. Baer (ed.), *The natural history of rabies*, 2nd ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Barik, S., E. W., Rud, D., Luke, A. K., Banerjee and C. Y., Kang. 1990. Nucleotide sequence analysis of the L gene of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype): Identification of conserved domains in L proteins of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Virology*. 175:332–337.

Belotto, A., L. F. Leanes, M. C. Schneider, H. Tamayo, E. Correa. 2005. Overview of rabies in the Americas. *Virus. Res.* 111:5–12.

Benmansour, A., M. Brahim, C. Tuffereau, P. Coulon, F. Lafay, A. Flamand. 1992. Rapid sequence evolution of street rabies glycoprotein is related to the highly heterogeneous nature of the viral population. *Virology*. 187:33–45.

Bernardi, F., S. A. Nadin-Davis, A. I. Wandeler, J. Armstrong, A. A. Gomes, F. S. Lima, F. R. Nogueira, F. H. Ito. 2005. Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir. *J. Gen. Virol.* 86:3153–3162.

Blancou, J. 1988. Ecology and epidemiology of fox rabies. *Rev. Infect. Dis.* 10:S606–S609.

Bourhy, H., J. A. Cowley, F. Larrous, E. C., Holmes, P. G. Walker. 2005. Phylogenetic relationships among rhabdoviruses inferred using the L polymerase gene. *J Gen Virol.* 86:2849–2858.

Capítulo XI. Literatura citada

Bourhy, H., B. Kissi, L. Audry, M. Smreczak, M. Sadkowska-Todys, K. Kulonen, N. Tordo, J. F. Zmudzinski, E. C. Holmes. 1999. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *J. Gen. Virol.* 80:2545–2557.

Bourhy, H., B. Kissi, M. Lafon, D. Sacramento, N. Tordo. 1992. Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe. *J. Clin. Microbiol.* 30:2419-2426.

Bourhy, H., B., Kissi B., and N., Tordo. 1993. Molecular diversity of *Lyssavirus* genus. *Virology.* 194:70–81.

Buchholz, C. J., C. Retzler, H. E. Omán, and W. J. Neubert. 1994. The carboxy-terminal domain of Sendai virus nucleocapsid protein is involved in complex formation between phosphoprotein and nucleocapsid-like particles. *Virology.* 204:770-776.

Capone, J. and H. P. Ghosh. 1984. Association of the nucleocapsid protein N of vesicular stomatitis virus with phospholipid vesicles containing the matrix protein. *M. Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62:153-158.

Carini, A. 1911. Sur une grande épizootie de rage. *Ann. Inst. Pasteur (Paris).* 25:843-846.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Investigation of rabies infections in organ donor and transplant recipients--Alabama, Arkansas, Oklahoma, and Texas. 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 53:586-589.

Chenik, M.; K., Chebli; Y., Gaudin, and D., Blondel. 1994. *In vivo* interaction of rabies virus phosphoprotein (P) and nucleoprotein (N), existence of two N binding sites on P protein. *J. Gen. Virol.* 75:2889-2896.

Chenik, M; M., Schell; K. K., Conzelmann, and D., Blondel. 1998. Mapping the interacting domain between rabies virus polymerase and phosphoprotein. *J. Virol.* 72:1925-1930.

Childs J. E. 2002. Epidemiology. *In*: Jackson, A.C., Wunner, W.H. (Eds.), Rabies. Academic Press, San Diego, pp. 113–162.

Cisterna, D., R. Bonaventura, S. Caillou, O. Pozo, M. L. Andreau, L. D. Fontana, C. Echegoyen, C. C. De Mattos, C. A. De Mattos, S. Russo, L. Novaro, D. Elberger, M. C. Freire. 2005. Antigenic and molecular characterization of rabies virus in Argentina. *Virus Res.* 109:139-147.

Cleaveland S, M., Kaare, P., Tiringa, T., Mlengeya, J., Barrat. 2003. A dog rabies vaccination campaign in rural Africa: impact on the incidence of dog rabies and human dog-bite injuries. *Vaccine*. 16:1965-1973.

Constantine, D. J. 1971. Bat rabies: current knowledge and future research, p. 253–265. In Y. Nagano and F. M. Davenport (ed.), *Rabies. Proceedings of Working Conference on Rabies sponsored by Japan-United States Cooperative Medical Science Program*. University of Tokyo Press, Tokyo, Japan.

Conzelmann, K. K., J. H., Cox; L.G Schneider, H. J., Thiel. 1990. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology*. 175:485–499.

Craven, R. C., R. N., Harty, J., Paragas, P., Palase, and J. W., Wills. 1999. Late domain function identified in the vesicular stomatitis virus M protein by use of rhabdovirus-retrovirus chimeras. *J. Virol*. 73:3359-3365.

Crawford-Miksza, L. K., D. A. Wadford, D. P. Schnurr. 1999. Molecular epidemiology of enzootic rabies in California. *J. Clin. Virol*. 14:207-219.

David, D., G. J., Hughes, B. A., Yakobson, I., Davidson, H., Un, O., Aylan, I. V., Kuzmin, C. E., Rupprecht. 2007. Identification of novel canine rabies virus clades in the Middle East and North Africa. *J Gen Virol*. 88: 967-980.

David, D., C. E., Rupprecht, J., Smith, I., Samina, Perl S, Y., Shram. 1999. Human rabies in Israel. *Emerg Infect Dis*. 5:306-308.

David D, Yakobson B, Smith JS, Stram Y. 2000. Molecular epidemiology of rabies virus isolates from Israel and other middle and Near-Eastern countries. *J Clin Microbiol*. 38:755-762.

Delarue, M., O., Poch, N., Tordo, D., Moras, and P. Argos. 1990. An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng*. 3:461-467.

De Mattos, C. C., C. A. De Mattos, E. Loza-Rubio, A. Aguilar-Setién, L. A. Orciani, J. S. Smith. 1999. Molecular characterization of rabies virus isolates from Mexico: implications for transmission dynamics and human risk. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 61:587–597.

De Mattos, C. A., C. C. De Mattos, J. S. Smith, E. T. Miller, S. Papo, A. Utrera, and B. I. Osburn. 1996. Genetic characterization of rabies field isolates from Venezuela. *J. Clin. Microbiol*. 34:1553–1558.

Capítulo XI. Literatura citada

De Mattos, C.A., M. Favi, V. Yung, C. Pavletic C. C. de Mattos. 2000. Bat rabies in urban centers in Chile. *J Wildl Dis.* 36:231-240.

Díaz, A. M., S. Papo, A. Rodríguez, J. S. Smith. 1994. Antigenic analysis of rabies-virus isolates from Latin American and the Caribbean. *J. Vet. Med. Ser. B* 41:153-160.

Dietzschold, B., Lafon, M., Wang, H., Otvos Jr., L., Celis, E., Wunner, W.H., Koprowski, H., 1987. Localization and immunological characterization of antigenic domains of the rabies virus internal N and NS proteins. *Virus Res.* 8:103-125.

Domingo, E., J. J. Holland. 1994. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses:161-184. *In: The Evolutionary Biology of Viruses.* Morse, S. S. (Ed). Raven Press. New York.

Durand, J. Nuevas regiones de origen y destino de la migración mexicana. The center for migration and development. Princeton University. 2005. Working paper No. 05-02m.

East ML, H., Hofer, J. H., Cox, U., Wulle, H., Wiik, C., Pitra. 2001. Regular exposure to rabies virus and lack of symptomatic disease in Serengeti spotted hyenas. *Proc Natl Acad Sci.* 98:15026-15031.

Ertl, H. C. J., B., Dietzschold, M. Gore, L. Otvos, J. K., Larson, W. H. Wunner and H. Koprowski. 1989. Induction of rabies virus-specific T-helper cells by synthetic peptides that carry dominant T-helper cell epitopes of the viral ribonucleoproteína. *J. Virol.* 63:2885-2892.

Ertl, H., B. Dietzschold, L. Otvos. 1991. T helper cell epitope of rabies virus nucleoprotein defined by tri- and tetrapeptides. *Eur. J. Immunol.* 21:1-10.

Fa, J.E., M.L. Morales. 1998. Patrones de Diversidad de Mamíferos en México. *In: Ramamoorthy, T.P., Bye, R., Lot, A., Fa, J. (Eds.), Diversidad Biológica de México: Orígenes y Distribución.* Instituto de Biología. Universidad Autónoma de México, pp. 315-352.

Favi, M., C. A. De Mattos, V. Yung, E. Chala, L. R. López C. C. De Mattos. 2002. First case of human rabies in Chile caused by an insectivorous bat virus variant. *Emerg Infect Dis.* 8:79-81.

Favi, M., A. Nina, V. Yung, J. Fernandez. 2003. Characterization of rabies virus isolates in Bolivia. *Virus Res.* 97(2):135-140.

Favi, M., V. Yung, C. Pavletic, E. Ramirez, C. C. De Mattos, C. A. De Mattos. 1999. Role of insectivorous bats in the transmission of rabies in Chile. *Arch. Med. Vet.* 31:157-165.

Favoretto, S. R., M. L. Carrieri, E. M. Cunha, E. A. Aguiar, L. H. Silva, M. M. Sodre, M. C. Souza, I. Kotait. 2002. Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 44(2):91-95.

Favoretto, S. R., C. C. De Mattos, N. B. Morais, F. A. Alves Araujo, C. A. De Mattos. 2001. Rabies in marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceara, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 7:1062-1065.

Felsenstein, J. 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Zoology.* 27:401-410.

Felsenstein, J. 1981. A likelihood approach to character weighting and what it tells us about parsimony and compatibility. *Biological Journal of the Linnean Society.* 16:183-196.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39:783-791.

Finke, S., K. K., Cozelmann. 2003. Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly. *J. Virol.* 77:12074-12082.

Finke, S., K. K., Conzelmann. 2005. Replication strategies of rabies virus. *Virus Research.* 111:120-131.

Flamand, A., and J. F., Delagneau. 1978. Transcriptional mapping of rabies virus in vivo. *J. Virol.* 28(29):518-523.

Franka, R., D. G. Constantine, I. Kuzmin, A. Velasco-Villa, S. A. Reeder, D. Streicker, L. A. Orciari, A. G. Wong, J. D. Blanton, C.E. Rupprecht. 2006. A new phylogenetic lineage of rabies virus associated with western pipistrelle bats (*Pipistrellus hesperus*). *J. Gen Virol.* 87:2309-2321.

Fu, Z. F., W. H., Wunner, and B., Dietzscholds. 1994. Immunoprotection by rabies virus nucleoprotein:207-218. *In:*Rupprecht, C. E., B. Dietzscholds and H. Koprowski (Eds.). *Lyssaviruses.* Springer, Berlin, Germany.

Capítulo XI. Literatura citada

Gaudin, Y. Folding of rabies virus glycoprotein:epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones. 1997. *J Virol.* 71:3742-3750.

Gaudin, Y. Rabies virus-induced membrane fusion pathway. 2000. *J Cell Biol.* 150:601-12.

Gaudin, Y., H. Raux, A. Flamand; R. W. Ruigrok. 1996. Identification of amino acids controlling the low-pH-induced conformational change of rabies virus glycoprotein. *J Virol.* 70:7371-7378.

Gaudin, Y., C, Tuffereau, Durrer P, Brunner J, Flamand A, Ruigrok R. 1999. Rabies virus-induced membrane fusion. *Mol Membr Biol.* 16:21-31.

Gigant, B., F. Iseni, Y. Gaudin, M., Knossow, D. Blondel. 2000. Neither phosphorylation nor the amino-terminal part of rabies virus phosphoprotein is required for its oligomerization. *J. Gen. Virol.* 81:1757-1761.

Gould, A., A. Hyatt, R. Lunt, J. Kattenbelt, S. Hengstberger, S. Blacksell. 1998. Characterization of a novel lyssavirus isolated from Pteroid bats in Australia. *Virus Res.* 54:165-187.

Goto, H., N. Minamoto, H. Ito, N. Ito, M. Sugiyama, T. Kinjo, A. Kaway. 2000. Mapping of epitopes and structural analysis of antigenetic sites in the nucleoprotein of rabies virus. *J. Gen. Virol.* 81:119-127.

Greenhall, A. M. 1988. Feeding behavior, p.111-131. In Greenhall A., and U. Schidt (ed), *Natural history of vampire bats*. Boca Raton, Ann arbor Boston. CRC Press.

Guerra, M. A., A. T. Curns, C. E. Rupprecht, C.A. Hanlon, J. W. Krebs, J. E., Childs. 2003. Skunk and raccoon rabies in the eastern United States:temporal and spatial analysis. *Emerg. Infect. Dis.* 9:1143-1150.

Guyatt, K. J., J. Twin, P. Davis, E. C. Holmes, G. A., Smith, I. L. Smith, J. S., Mackenzie, P. L., Young. 2003. A molecular epidemiological study of Australian bat lyssavirus. *J Gen Virol.* 84:485-496.

Hall, E. R. 1981. *Mammals of North America*, p. 173-176, 240-247, and 1013-1018. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

Harty, R. N., J. Paragas, M. Sudol, P. Palese. 1999. A proline-rich motif within the matrix protein of vesicular stomatitis virus and rabies virus interacts with WW domains of cellular proteins: Implications for viral budding. *J. Virol.* 73:2921-2929.

Haup, H., H. Rehaag. 1921. Durch fledermäuse verbreitete seuchenhafte tollwut unter viehbeständen in Santa Catharina (Süd-Brasilien). *Z infektionskrankh. Haustiere.* 22:76-78; 104-127.

Holmes, C.E., H.C. Woelk, R. Kassis, H. Bourhy. 2002. Genetic constraints and adaptive evolution of rabies virus in nature. *Virology.* 292:247-257.

Holloway, P. B., and J. F., Obejeski. 1980. Rabies virus-induced RNA synthesis in BHK-21 cells. *J. Gen. Virol.* 49:181-195.

Hughes, G. J., L. A. Orciari, C. E. Rupprecht. 2005. Evolutionary timescale of rabies virus adaptation to North American bats inferred from the substitution rate of the nucleoprotein gene. *J. Gen. Virol.* 86:1467-1474.

Hughes, G. J., A. Paez, J. Boshell, C. E. Rupprecht. 2004. A phylogenetic reconstruction of the epidemiological history of canine rabies virus variants in Colombia. *Infect Genet Evol.* 4:45-51.

Humphrey, G. L. 1971. Field control of animal rabies, p.277-342. In: Rabies. Proceedings of working conference on rabies sponsored by Japan-United States cooperative medical science program. Nagano Y., F. M. Davenport (eds). Tokyo. University of Tokyo Press.

Hummeler, K., H. Koprowski, T. J. Wiktor. 1967. Structure and development of rabies virus in tissue culture. *J. Virol.* 1:152-170.

Iseni, F., F. Baudin, D. Blondel, R. W. H., Ruigrok. 2000. Structure of the RNA inside the vesicular stomatitis virus nucleocapsid. *RNA.* 6:270-281.

Ito, M., Y. T. Arai, T. Itou, T. Sakai, F. H. Ito, T. Takasaki, I. Kurane. 2001. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. *Virology.* 284:214-222.

Capítulo XI. Literatura citada

- Ito, M., T. Itou, Y. Shoji, T. Sakai, F. H. Ito, Y. T. Arai, T. Takasaki, I. Kurane. 2003. Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Gen. Virol.* 26:317-330.
- Ito, N., M. Sugiyama, K. Oraveerakul, P. Piyaviriyakul, B. Lumlertdacha, Y. T Arai, Y. Tamura, Y. Mori, N. Minamoto. 1999. Molecular epidemiology of rabies in Thailand. *Microbiol Immunol.* 43:551-559.
- Iverson, L. E., J. K. Rose. 1981. Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis virus transcription. *Cell.* 23:447-484.
- Iwasaki, Y., T. J., Wiktor, H., Koprowski. 1973. Early events of rabies virus replication in tissue cultures: An electron microscopic study. *Lab. Invest.* 28:142-148.
- Jackson, A. C., H. Park. 1999. Experimental rabies virus infection of p75 neurotrophin receptor -deficient mice. *Acta Neuropathol.* 98:641-644.
- Jayakar, H. R., K. G. Murti, M. A. Whitt. 2000. Mutations in the PPPY motif of vesicular stomatitis virus matrix protein reduce virus budding by inhibiting a late step in virion release. *J. Virol.* 74:9818-9827.
- Johnson, H.N., 1971. General epizootiology of rabies. In: Y. Nagano, F. M. Davenport. (Eds.), Rabies. Proceedings of Working Conference on Rabies Sponsored by Japan-United States Cooperative Medical Science, Program, University of Tokyo Press, pp. 237-251.
- Johnson N., L. M., McElhinney, Y. H., Ali, I. K., Saeed, A. R., Fooks. 2004a. Molecular epidemiology of canid rabies in Sudan: evidence for a common origin of rabies with Ethiopia. *Virus Res.* 104:201-205.
- Johnson N., M., Letshwenyo, E. K., Baipoledi, G., Thobokwe, A. R., Fooks. 2004b. Molecular epidemiology of rabies in Botswana: a comparison between antibody typing and nucleotide sequence phylogeny. *Vet Microbiol.* 101:31-38.
- Johnson, N., M. L. McElhinney, J. Smith, P. Lowings, R. A. Fooks. 2002. Phylogenetic comparison of the genus *Lyssavirus* using distal coding sequences of the glycoprotein and nucleoprotein genes. *Arch. Virol.* 147:2111-2123.

Kawai, A., H. Toriumi, T. S. Tochikura, T. Takahashi, Y. Honda, and K., Morimoto. 1999. Nucleocapsid formation and or subsequent conformational change of rabies virus nucleoprotein (N) is a prerequisite step for acquiring the phosphatase-sensitive epitope of monoclonal antibody 5-2-26. *Virology*. 263:395-407.

Kietdumrongwong, P., T. Hemachudha. Pneumomediastinum as initial presentation of paralytic rabies:a case report. 2005. *BMC Infect Dis*. 5:92.

Kissi, B., H. Badrane, L. Audry, A. Lavenu, N. Tordo, M. Brahimi, H. Bourhy. 1999. Dynamics of rabies virus quasispecies during serial passages in heterologous hosts. *J. Gen. Virol*. 80:2041-2050.

Kissi, B., N. Tordo, H. Bourhy. 1995. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. *Virology*. 209:526-537.

Kouznetzoff, A., M. Buckle, N. Tordo. 1998. Identification of a region of the rabies virus N protein involved in direct binding to the Viral RNA. *J. Gen. Virol*. 79:1005-1013.

Krebs, J.W., J. T. Wheeling, J.E. Childs. 2002. Rabies surveillance in the United States during. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 223:1736-1748.

Krebs, J. W., E.J. Mandel, D. L. Swerdlow, C. E. Rupprecht. 2005. Rabies surveillance in the United States during 2004. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 223:1736-1748.

Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jackobsen, M. Nei. 2001.MEGA 2:molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*. 17:1244-1245.

Kuzmin, I. V., A. D. Botvinkin, L. M. McElhinney, J. S. Smith, L. A. Orciari, G. J. Hughes, A. R. Fooks, C. E. Rupprecht. 2004. Molecular Epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. *J. Wildlife Dis*. 40:617-631.

Kuzmin, I. V., G. J. Hughes, A. D. Botvinkin, L. A. Orciari, C. E., Rupprecht. 2005. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition. *Virus Res*. 111:28-43.

Kuzmin I. V., L. A. Orciari, Y. T. Ari, J. S. Smith, C. A. Hanlon, Y. Kameoka, C. E. Rupprecht. 2003. Bat Lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia:phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. *Virus Res*. 97:65-79

Capítulo XI. Literatura citada

Kuzmin, I.V., G. J., Hughes, C. E., Rupprecht. 2006. Phylogenetic relationships of seven previously unclassified viruses within the Rhabdoviridae using partial nucleoprotein gene sequences. *J. Gen Virol.* 87:2323-2331.

Lentz, T. L., T. G. Burrage, A. L. Smith, J. Crick, G. H. Tignor.1982. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science.* 215:182-184.

Loza-Rubio, E., A. Aguilar-Setién, C. Bahloul, B. Brochier, P. P Pastoret, N. Tordo. 1999. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in Mexico. *Arch. Med. Res.* 30:144-149.

Lyles, D. S., M. McKenzie, J. W. Parce. 1992. Subunit interactions of vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein stabilized by binding to viral matrix protein. *J. Virol.* 66:349-358.

Mansfield, K. L., L. M., McElhinney, O., Hubschle, F., Mettler, C., Sabeta, L. H., Nel, A. R., Fooks. 2006. A molecular epidemiological study of rabies epizootics in kudu (*Tragelaphus strepsiceros*) in Namibia. *BMC Vet Res.* 2:2

Masters, P., A. K. Banerjee. 1988. Complex formation with vesicular stomatitis phosphoprotein NS prevents binding of nucleocapsid protein N to nonspecific RNA. *J. Virol.* 62:2658-2664.

Matsumoto, S.1962. Electron microscopy of nerve cells infected with street rabies virus. *Virology.* 17:198-202.

Matsumoto, S., K., Miyamoto. 1966. Electron-microscopic studies on rabies virus multiplication and the nature of the Negri body. *Symp. Ser. Immunobiol. Stand.* 1:45-54.

Medellín R., A., H. T. Arita, O. Sánchez. 1997. Identificación de los murciélagos de México. Clave de campo, 1st ed. Asociación Mexicana de Mastozoología, A.C., Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México.

Mebatsion, T., J. H. Cox, J. W. Frost. 1992. Isolation and characterization of 115 street rabies virus isolates from Ethiopia by using monoclonal antibodies:identification of 2 isolates as Mokola and Lagos bat viruses. *J. Inf. Dis.* 166:972-977.

Mebatsion, T., M. König, K. Conzelmann. 1996. Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. *Cell.* 84:941-951.

Mebatsion, T., F. Weiland, and K. Cozelmann. 1999. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J. Virol.* 73:242-250.

Mellon, M. G., S. U. Emerson. 1978. Rebinding of transcriptase components (L and NS proteins) to the nucleocapsid template of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 27:560-567.

Messenger, SL, J. S. Smith, L. A. Orciari, P. A. Yager, C. E. Rupprecht. 2003. Emerging pattern of rabies deaths and increasing viral infectivity. *Emerg. Infect. Dis.* 9:151-154.

Messenger, S. L., J. S., Smith, C. E., Rupprecht. 2002. Emerging epidemiology of bat-associated cryptic cases of rabies in humans in the United States. *Clin Infect Dis.* 35:738-47.

Minamoto, H., H. Tanaka, M. Hishida, H. Goto, H. Ito, S. Naruse, K. Yamamoto, M. Sugiyama, M. Sugiyama, T. Kinjo, K. Mannem, K. Mifune. 1994. Linear and conformation-dependent antigenic sites on nucleoprotein of rabies virus. *Microbiol Immunol.* 38:449-455.

Murphy, F. A., S. P. Bauer, A. K. Harrison, W. C. Winn Jr. 1973. Comparative pathogenesis of rabies and rabies-like viruses: Viral infection and transit from inoculation site to the central nervous system. *Lab. Invest.* 28:361-376.

Nadin-Davis, S. A., M. Abdel-Malik, J. Armstrong, A. I. Wandeler. 2002. Lyssavirus P gene characterisation provides insights into the phylogeny of the genus and identifies structural similarities and diversity within the encoded phosphoprotein. *Virology.* 298:286-305.

Nadin-Davis, S. A., G. A. Casey, A. I. Wandeler. 1993. Identification of regional variants of the rabies virus within the Canadian province of Ontario. *J. Gen. Virol.* 74:829-837.

Nadin-Davis, S. A., W. Huang, J. Armstrong, G. A. Casey, C. Bahloul, N. Tordo, A. I. Wandeler. 2001. Antigenic and genetic divergence of rabies viruses from bat species indigenous to Canada. *Virus Res.* 74:139-156.

Nadin-Davis, S. A., E. Loza-Rubio. 2006. The molecular epidemiology of rabies associated with chiropteran hosts in Mexico. *Virus Res.* 117:215-26.

Capítulo XI. Literatura citada

Nadin-Davis, S. A., F. Muldoon, A. I. Wandeler. 2006b. Persistence of genetic variants of the arctic fox strain of Rabies virus in southern Ontario. *Can. J. Vet. Res.* 70:11-9.

Nadin-Davis, S. A., F. Muldoon, A. I. Wandeler. 2006c. A molecular epidemiological analysis of the incursion of the raccoon strain of rabies virus into Canada. *Epidemiol Infect.* 134:534-47.

Nadin-Davis, S. A., M. I. Sampath, G. A. Casey, R. R. Tinline, A. I. Wandeler. 1999. Phylogeographic patterns exhibited by Ontario rabies virus variants. *Epidemiol. Infect.* 123:325-336.

Nadin-Davis, S. A., S. Simani, J. Armstrong, A. Fayaz, A. I. Wandeler. 2003. Molecular and antigenic characterization of rabies viruses from Iran identifies variants with distinct epidemiological origins. *Epidemiol. Infect.* 131:777-790.

Nadin-Davis, S. A., M. Sheen, M. Abdel-Malik, L. Elmgren, J. Armstrong, A. I., Wandeler. 2000. A panel of monoclonal antibodies targeting the rabies virus phosphoprotein identifies a highly variable epitope of value for sensitive strain discrimination. *J. Clin. Microbiol.* 38:1397-1403.

Nel, L. H., C. T., Sabeta, B., Von Teichman, J. B., Jaftha, C. E., Rupprecht, J., Bingham. 2005. Mongoose rabies in southern Africa: a re-evaluation based on molecular epidemiology. *Virus Res.* 109:165-173.

Niezgoda M., C. A., Hanlon, C. E., Rupprecht. 2002. Animal Rabies. In: Jackson, A.C., Wunner, W.H. (Eds.), Rabies. Academic Press, San Diego, pp. 163-207.

Paez, A., C. Nunez, C. Garcia, J. Boshell. 2003. Molecular epidemiology of rabies epizootics in Colombia: evidence for human and dog rabies associated with bats. *J. Gen. Virol.* 84:795-802.

Paez, A., C. Saad, C. Nunez, and J. Boshell. 2005. Molecular epidemiology of rabies in northern Colombia 1994-2003. Evidence for human and fox rabies associated with dogs. *Epidemiol Infect.* 133:529-536.

Park Y. J., M. K., Shin, H. M., Kwon. 2005. Genetic characterization of rabies virus isolates in Korea. *Virus Genes.* 30:341-347.

Perrin, P., D. Portnoi, P., Sureau. 1982. Etude de l'adsorption et de la penetration du virus rabique: Interactions avec les cellules BHK21 et des membranes artificielles. *Ann. Virol (Inst Pasteur).* 133E:403-422.

Poch, O., B. M. Blumberg, L. Bougueleret, N. Tordo. 1990. Sequence comparison of five polymerases (L. proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: Theoretical assignment of functional domains. *J. Gen. Virol.* 71:1153-1162.

Poch, O., I. Sauvaget, M. Delarue, N. Tordo. 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* 8:3867-3874.

Reagan, K. J., W. H., Wunner. 1985. Rabies virus interaction with various cell lines is independent of the acetylcholine receptor. *Arch. Virol.* 84:277-282.

Rohde, R. E., S. U. Neill, K. A. Clark, J. S. Smith. 1997. Molecular epidemiology of rabies epizootics in Texas. *Clin. Diagn. Virol.* 8:209-217.

Rupprecht, C.E., B. Dietzschold, W. Wunner, H. Kropowsky. 1991. Antigenic relationships of lyssaviruses, p 69-96. In G. M. Baer (ed.), *The natural history of rabies*, 2nd ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Rupprecht, C.E., L.T. Glickman, P.A. Spencer, T. J. Wiktor. 1987. Epidemiology of rabies virus variants. Differentiation using monoclonal antibodies and discriminant analysis. *Am. J. Epidemiol.* 126:298-309.

Rupprecht C. E., C. A. Hanlon, J. Blanton, J. Manangan, P. Morrill, S. Murphy, M. Niezgoda, L. A. Orciari, C. L. Schumacher, B. Dietzschold. 2005. Oral vaccination of dogs with recombinant rabies virus vaccines. *Virus Res.* 111:101-105.

Sabeta, C. T., J., Bingham, L. H Nel., 2003. Molecular epidemiology of canid rabies in Zimbabwe and South Africa. *Virus Res.* 91:203-211.

Sacramento, D., H. Badrane, H. Bourhy, N Tordo. 1992. Molecular epidemiology of rabies virus in France: comparison with vaccine strains. *J. Gen. Virol.* 73:1149-1158.

Saitou, N., M. Nei. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.

Secretaría de Salud, 2001. Programa de acción: Rabia. México DF. Secretaría de Salud, pp. 13-33s.

Secretaría de Salud, SSA, 2003. Dirección general de epidemiología. Anuarios de morbilidad, <http://www.epi.org.mx/infoepi/index.htm>.

Capítulo XI. Literatura citada

Secretaría de Salud. SSA, 2004. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Epidemiología sistema único de información, vol. 53, p. 3.

Serra-Cobo J, Amengual B, Abellan C, Bourhy H. 2002. European bat lyssavirus infection in Spanish bat populations. *Emerg Infect Dis.* 8:413-420.

Slate D, C. E. Rupprecht, J. A. Rooney, D. Donovan, D. H. Lein, R. B. Chipman. 2005. Status of oral rabies vaccination in wild carnivores in the United States. *Virus Res.* 111:68-76.

Smith, J. S. 1989. Rabies virus epitopic variation: Use in ecologic studies. *Adv. Virus Res.* 36:215-253.

Smith, J.S. 1996. New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis and prevention of the disease in United States. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:166-176.

Smith, J. S. 2002. Molecular epidemiology, p. 79-111. In Jackson A. C., and W. H. Wunner (ed). Rabies. Academic Press.

Smith, J.S., L.A. Orciari, P.A. Yager. 1995. Molecular epidemiology of rabies in the United States. *Semin. Virol.* 6:387-400.

Smith, J.S., L. A. Orciari, P. A. Yager, D. H. Seidel, C. K. Warner. 1992. Epidemiologic and historical relationships among 87 rabies virus samples as determined by limited sequence analysis. *J. Infect. Dis.* 166:296-307.

Smith, J. S., Seidel, H. D. 1993. Rabies: A new look at an old disease. *Prog. Med. Virol.* 40:82-106.

Sneath P. H., R. R. Sokal. 1962. Numerical taxonomy. *Nature.* 193:855-860.

Srinivasan, A., E. C. Burton, M. J. Kuehnert, C. E. Rupprecht, W. L. Sutker, T. G. Ksiazek, C. D. Paddock, J. Guarner, W. J. Shieh, C. Goldsmith, C. A. Hanlon, J. Zoretic, B. Fischbach, M. Niezgoda, W. H. El-Feky, L. Orciari, E. Q. Sanchez, A. Likos, G. B. Klintmalm, D. Cardo, J. LeDuc, M. E. Chamberland, D. B. Jernigan, S. R. Zaki. 2005. Rabies in Transplant Recipients Investigation Team. Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med.* 352:1103-1111.

Steele J. H., P. J. Fernandez. 1992. History of rabies and global aspects. p. 1-24. In G. M. Baer (ed.), *The natural history of rabies*, 2nd ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Sudol, M. 1996. Structure and function of the WW domain. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 65:113-132.

Superti, F., M. Derer, H. Tsiang. 1984a. Mechanism of rabies virus entry into CER cells. *J. Gen. Virol.* 65:781-789.

Superti, F., L. Seganti, H. Tsiang, N. Orsi. 1984b. Role of phospholipids in rabdovirus attachment to CER cells. *Arch. Virol.* 81:321-328.

Sureau, P. 1988. History of rabies: advances in research towards rabies prevention during the last 30 years. *Rev. Infect. Dis.* 10:S581-S584.

Testa, D., P. K. Chanda, A. K. Banerjee. 1980. Unique mode of transcription *in vitro* by vesicular stomatitis virus. *Cell.* 21:267-275.

Tibayrenc, M. 2005. Bridging the gap between molecular epidemiologists and evolutionists. *Trends Microbiol.* 12:575-580.

Tordo, N., O. Poch, A. Ermine, G. Keith, F. Rougeon 1986. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergénica region a remnant gene? *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 83:3914-3918.

Tordo N., H. Badrane, H. Bourhy, D. Sacramento. 1993. Molecular epidemiology of Lyssaviruses: focus on the glycoprotein and pseudogenes. *Onderstepport J. Vet. Res.* 60:315-323.

Trimarchi C. V., J. S., Smith. 2002. Diagnostic Evaluation, p. 308-344. In Jackson A. C., and W. H. Wunner (ed). *Rabies*. Academic Press.

Tsiang, H., S. De la Porte, D. J. Ambroise, M. Derer, J. Koenig. 1986. Infection of cultured rat myotubes and neurons from the spiral cord rabies virus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 45:28-42.

Tsiang, H., P. E. Ceccaldi, E. Lycke. 1991. Rabies virus infection and transport in human sensory dorsal root ganglio neurons. *J. Gen. Virol.* 72:1191-1194.

Tuffereau, C., J. Beneguan, D. Blondel, G. Kieffer, A. Flamand. 1998. Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J.* 17:7250-7259.

Capítulo XI. Literatura citada

Velasco-Villa, A., M. Gómez-Sierra, G. Hernández-Rodríguez, V. Juárez-Islas, A. Meléndez-Félix, F. Vargas-Pino, O. Velázquez-Monroy, A. Flisser. 2002. Antigenic diversity and distribution of rabies virus in México. *J. Clin. Microbiol.* 40:951–958.

Velasco-Villa, A., L. A Orciari, V. Souza, V. Juárez-Islas, M. Gomez-Sierra, A. Castillo, A. Flisser, C. E. Rupprecht. 2005. Molecular epizootiology of rabies associated with terrestrial carnivores in Mexico. *Virus Res.* 111:13-27.

Velázquez-Monroy, O., F. Vargas-Pino, V. Gutiérrez-Cedillo, L. Lecuona-Olivares. 2003. Advances in canine rabies control in Mexico. In: The XIV international conference "Rabies in the Americas". Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania, USA, p. 78.

Warner, C. K., S. R. Zaki, W. J. Shieh, S. G. Whitfield, J. S. Smith, L. A. Orciani, J. H. Shaddock, M. Niezgodá, C. W. Wright, C. S. Goldsmith, D. W. Sanderlin, P. A. Yager, C. E. Rupprecht. 1999. Laboratory investigation of human deaths from vampire bat rabies in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60:502–507.

Webby, R., E. Hoffmann, R. Webster. 2004. Molecular constraints to interspecies transmission of viral pathogens. *Nat Med.* 10:S77-S81.

Wilkinson, L. 2002. History. In: Jackson, A.C., Wunner, W.H. (Eds.), Rabies. Academic Press, San Diego, pp. 1–22.

Wunner, W. H. 1991. The chemical composition and molecular structure of rabies viruses:31-67 In: *The Natural History of Rabies*. Baer, G. M. (ed). CRC Press, Boca Raton, FL.

Wunner, W. H. 2002. Rabies virus. In: Jackson, A.C., Wunner, W.H. (Eds.), Rabies. Academic Press, San Diego, pp. 23–77.

Yakobson BA, R., King, S., Amir, N., Devers, N., Sheichat, D., Rutenberg, Z., Mildenberg, D., David. 2006. Rabies vaccination programme for red foxes (*Vulpes vulpes*) and golden jackals (*Canis aureus*) in Israel (1999-2004). *Dev Biol (Basel)*. 125:133-140.

Yang, J., D. C. Hooper, W. H. Wunner, H. Koprowski, B. Dietzschold and Z. F., Fu. 1998. The specificity of rabies virus RNA encapsidation by nucleoprotein. *Virology*. 242:107-117.

Yung, V., M. Favi, J. Fernandez. 2002. Genetic and antigenic typing of rabies virus in Chile. *Arch. Virol.* 147:2197-2205.

APÉNDICE I. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO.

Las medidas de bioseguridad, deben seguirse obligatoriamente, en virtud del riesgo de infección durante la manipulación del animal o de las muestras tomadas. Incluso, se deben extremar precauciones cuando se intenta aislar el virus por inoculación en animales de experimentación o en cultivos celulares, ya que durante el desempeño de estas metodologías, existe el riesgo de la generación de aerosoles. Así mismo, no debe omitirse el peligro de infección con objetos punzo-cortantes que contienen material biológico potencialmente infeccioso, ni por salpicaduras en las mucosas ocular u oral, o en la piel con lesiones. Además, se debe considerar que las muestras procesadas durante la rutina pueden contener agentes patógenos igual o más peligrosos que el virus de la rabia. Por lo tanto se debe:

- 1.** Trabajar en un laboratorio exclusivo para el diagnóstico de rabia con instalaciones equipamiento con nivel de bioseguridad 2.
- 2.** Usar batas de manga larga, guantes de látex gruesos o dobles pares, careta y cubrebocas.
- 3.** Descontaminar las mesas antes, durante y al final de la jornada, con una combinación de por lo menos dos de las siguientes soluciones: detergente al 1%, yodo al 7%, alcohol al 70%, sales cuaternarias de amonio diluidas 1:250 o benzal.
- 4.** No usar cristalería, materiales de plástico e instrumental que se encuentre rayado o roto.
- 5.** Sumergir durante 12 horas en alguna de las soluciones citadas en el punto 3 y esterilizar en autoclave a 15 libras/pulg² durante 30 minutos todo el material reutilizable empleado para la manipulación o procesamiento de tejidos.
- 6.** Descontaminar el suelo por lo menos una vez al día.
- 7.** Desechar tejidos y material contaminado dentro de bolsas amarillas

Apéndice I. Medidas de bioseguridad en el laboratorio

etiquetadas con el símbolo de peligro biológico infeccioso, que de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana ECOL-087 se deben de incinerar no después de 48 horas de almacenamiento.

8. Colocar en bolsas del mismo tipo pero de color rojo, guantes, cubrebocas y gasas previamente desinfectados.

9. Al medir el volumen de cualquier solución con una pipeta, nunca succionar con la boca.

10. Dentro del laboratorio queda estrictamente prohibido fumar, aplicarse cosméticos, beber, usar objetos personales como teléfonos celulares, conservar o consumir alimentos y usar zapatos con punta descubierta o guaraches.

11. Lavarse las manos y quitarse la bata al salir del laboratorio.

12. La preparación de suspensión viral para prueba biológica, la infección de cultivos celulares y el manejo de cultivos celulares infectados, debe realizarse en un gabinete de bioseguridad nivel II o en su defecto dentro de una cabina o cubículo con mechero tipo Fisher. En las condiciones anteriores se debe trabajar dentro de los límites de esterilidad de la flama del mechero. Este lugar debe estar libre de corrientes de aire, por lo menos durante la jornada de trabajo.

13. Cualquier herida causada por un accidente de laboratorio deberá ser lavada suavemente con agua y jabón, evitando traumatizar los tejidos. Aplicar alguno de los desinfectantes antes mencionados excepto benzal. Si el accidente involucró algún material u objeto contaminado con tejido potencialmente infectado, inmediatamente aplicar uno o dos refuerzos de la vacuna antirrábica para humanos en un esquema de 0 y 3 días. El número de dosis dependerá de la gravedad de la lesión. Cualquier duda puede consultarse con los encargados del Programa Nacional de Zoonosis a los teléfonos 52-16-64-52 y 53, en el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades Infecciosas o en la Norma Oficial Mexicana 011-SSA2-1993. Debe considerarse que la aplicación de

gamma globulina esta contraindicada en las personas que han recibido tratamiento *pre o post-exposición*, ya que bajo éstas circunstancias puede retardarse e incluso inhibirse la producción de novo de anticuerpos

14. La vacunación antirrábica preventiva o pre-exposición debe ser obligatoria para todo el personal de laboratorio y periódicamente hay que valorar el título de anticuerpos neutralizantes.

15. De acuerdo con las recomendaciones para la inmunización profiláctica *pre-exposición*, propuestas en el sexto informe de expertos en rabia de la OMS en 1973, la protección se logrará con la aplicación de tres inyecciones de vacuna antirrábica a intervalos de 7 días: 0, 7 y 21 o 28 días (según el fabricante); la determinación de anticuerpos se hará después de 3 semanas. Si el nivel de anticuerpos es menor de 0.5 UI/mL se aplicará un refuerzo y los anticuerpos nuevamente se determinarán después de 3 semanas. El título de anticuerpos 0.5 UI/mL, no indica inmunidad o protección, solo demuestra que el individuo montó una respuesta inmune. Por lo tanto en caso de que se presente algún accidente en donde halla sospecha o franca exposición al virus de la rabia, se deberá considerar la aplicación del tratamiento post-exposición completo o solamente unos refuerzos, de uno a tres, dependiendo del grado de exposición.

Según la OMS, la determinación de anticuerpos debe hacerse cada 6 meses aún cuando las vacunas de cultivo celular inducen protección que puede durar de 1 a 3 años. El riesgo y la variabilidad del estado inmune de cada persona hacen necesario la determinación de anticuerpos continuamente.

APÉNDICE II. TOMA, PREPARACIÓN Y ENVÍO DE MUESTRAS.

Toma de muestras

Es importante hacer énfasis que la muestra idónea para realizar el diagnóstico de rabia y otras pruebas moleculares es una sección del sistema nervioso central, obtenida exclusivamente en sus regiones anatómicas en orden de importancia **médula espinal** (particularmente en la zona adyacente al cerebelo), **cerebelo** y asta de Ammón. Ello garantiza una sensibilidad y especificidad de la prueba cercana al 100%.

Muestras postmortem de seres humanos

El diagnóstico de laboratorio debe practicarse en cualquier caso de encefalitis, ya que durante la etapa inicial de la rabia, no hay síntomas ni signos patognomónicos que permitan diferenciarla con certeza. Beauregard 1965, Meslin 1996. Aún en estadios avanzados de la enfermedad cuando los signos más sugestivos llegan a aparecer (cambios de conducta, excitación psicomotriz, hidrofobia y aerofobia), el diagnóstico diferencial es imprescindible para confirmar o descartar ésta zoonosis y para realizar estudios posteriores de epidemiología molecular. Es importante señalar que la administración indiscriminada de sedantes y analgésicos puede enmascarar los signos patognomónicos de la enfermedad (aerofobia e hidrofobia), lo que apoya el hecho de realizar diagnóstico en cualquier caso de encefalitis. En caso de existir motivos religiosos o de otra índole que no permitan la necropsia de un ser humano, la muestra debe tomarse con un socavador por punción retrorbital ó por el orificio occipital, tomando cerebelo y encéfalo. La muestra de tejido podrá conservarse en una solución de glicerol al 50% preparada con solución salina fisiológica o agua desionizada estéril (Baer, 1991, Kaplan, 1976.). En este tipo de muestra se buscarán antígenos del virus rábico por IFD, se aislará y propagará el virus por prueba biológica. También se pueden

realizar pruebas especiales como RT-PCR para búsqueda de RNA viral y estudios de epidemiología molecular. Meslin, 1996. Se debe evitar la conservación de las muestras en formaldehído o formalina ya que esta sustancia interfiere con el diagnóstico por la técnica de IFD y complica la realización de cualquier otro estudio molecular. En caso de que por accidente se llegue a sumergir la muestra en formaldehído se deberá proceder a su fijación completa en este compuesto (la exposición prolongada a formaldehído esta contraindicada) y transferirla a una solución de etanol absoluto o al 75% en donde deberá permanecer hasta ser usada para su estudio. En este último caso se podrá realizar el diagnóstico y caracterización antigénica por medio de inmunohistoquímica. En algunos casos también es posible realizar IFD pero con tratamiento previo de la muestra con enzimas como proteinasa K.

Obtención de muestras de animales sospechosos

Considerando que las muestras de animales con sospecha clínica de encefalitis son prácticamente la única manera de confirmar o descartar la zoonosis en un paciente que ha tenido contacto con ellos, se vuelve necesario que el profesional responsable del caso, tome en cuenta las siguientes recomendaciones (Baer 1991, Meslin 1996):

- 1.** Cuando el animal se encuentre vivo, mantenerlo en observación al menos 10 días, bien alimentado y sin estímulos negativos, llevando diariamente un registro clínico.
- 2.** Cuando el animal ha fallecido, la necropsia se hará en el Centro Antirrábico y al laboratorio se enviarán en orden de importancia muestras de **médula**, de **cerebelo** y de asta de Ammón. Las muestras podrán conservarse en una solución de glicerol al 50% en solución salina fisiológica pero nunca en formaldehído ó formalina.

Las muestras putrefactas no deberán ser analizadas por el laboratorio ya que en caso de resultar negativas, en estas condiciones, no es posible descartar la presencia de la enfermedad.

3. Para la realización de la necropsia se debe usar cofia desechable, cubrebocas, bata quirúrgica, mandil y guantes de hule, botas antiderrapantes y careta. El instrumental debe considerar, cuchillo de disección o bisturí grande, sierra de arco con segueta de 30 cm, cincel ancho mediano, martillo, tijeras rectas y curvas, pinzas de disección (con y sin dientes) y hacha de carnicero mediana. También se puede usar sierra eléctrica para cráneotomía.

4. Para iniciar la necropsia en animales medianos (gatos, zorros, zorrillos, mapaches y perros medianos y chicos) y grandes (vacas, caballos, perros grandes), el cadáver debe ser lavado con abundante agua y jabón para eliminar las pulgas y otros ectoparásitos. Tampoco se recomienda el uso de insecticidas.

5. El animal se sujeta firmemente por la cabeza y con un bisturí grande o un cuchillo de disección se hace un corte a lo largo de la línea media del cráneo que atraviese la piel, fascias y músculos de los ojos hasta la base del cráneo; se separan los tejidos y se levantan hasta exponer el hueso.

6. Con la sierra se hacen dos cortes, desde el agujero occipital hasta los huesos frontales y luego cortes longitudinales con incisión transversal por la lámina del frontal. Por encima de los ojos se separa el hueso con un escoplo, se disecan las meninges y se extrae el encéfalo completo.

7. Se deben analizar todas las muestras obtenidas de animales silvestres tales como; coyotes, zorros, zorrillos, mapaches y murciélagos únicamente si se colectaron bajo las siguientes condiciones: 1) animales que estuvieron relacionados con agresiones a seres humanos u a otros animales domésticos, 2) animales que fueron hallados moribundos (murciélagos insectívoros, coyotes, zorros, zorrillos), cerca de asentamientos humanos o en el campo 3) animales que fueron recién

atropellados en carreteras (coyotes, zorros, zorrillos y mapaches), 4) animales que fueron capturados durante acciones de control de focos rábicos (murciélagos hematófagos o insectívoros), animales colectados durante proyectos de investigación avalados y autorizados en conjunto por instituciones y organizaciones calificadas (SEMARNAT, SAGARPA, SSA, OPS, CDC).

La colecta indiscriminada de estos animales se debe evitar y aprovechar los especímenes colectados por grupos de mastozoólogos que colectan para tener colecciones o para realizar estudios sobre ecología y biología de estas especies.

8. Es muy importante que antes de extraer el encéfalo de éstos animales silvestres, los cadáveres se conserven en congelación a -80°C o en nitrógeno líquido, o en el peor de los casos a -20°C , hasta que un experto determine la especie. Si no se cuenta con especialistas para este propósito a nivel local, enviar el espécimen completo en congelación a una institución de referencia nacional o internacional. Solamente después de haber determinado la especie del animal, se procederá a extraer el encéfalo en las condiciones descritas de los puntos I al VII.

9. La extracción de encéfalos de animales pequeños como: murciélagos y ratones se realizara con tijeras de punta aguda pequeñas y pinzas pequeñas de disección. Se insertan las puntas de la tijeras en las orbitas de los ojos y presionando hacia arriba se realiza un corte profundo para separar el hueso que une a la nariz con la parte frontal del cráneo. Se continúa el corte con las mismas tijeras a lo largo de los huesos parietales hasta llegar a la región occipital para luego separar los huesos de la parte superior con las puntas de las tijeras ayudándose con las pinzas. El cerebro se podrá extraer completo, penetrando con las puntas de las tijeras, al mismo tiempo que se hacen movimiento de cortes pequeños, desde la parte frontal por debajo del nervio óptico hasta la base del cerebelo.

Moviendo lentamente las tijeras hacia arriba, se retira el encéfalo y se deposita en un críotubo con tapón de rosca externa de 2mL.

Aquí podrá almacenarse a -80°C o en nitrógeno líquido hasta su uso.

III. Preparación y envío de las muestras al laboratorio

Si las muestras van a transportarse de inmediato al laboratorio de diagnóstico y se calcula se recibirán antes de 48 h, estas se deben colocar en una doble bolsa de polietileno grueso con cierre hermético o en un frasco de plástico de boca ancha con tapa de rosca y se envían en una hielera con hielo seco y refrigerantes. Si se calcula que las muestras tardarán más de 48 h en llegar al laboratorio, se envían congeladas dentro de un frasco de plástico con tapa de rosca o en su defecto pueden conservarse durante más tiempo sumergidas en glicerina al 50%, preparada con solución salina fisiológica. Las muestras, congeladas o en solución de glicerol al 50%, se pueden guardar a -20°C , pero se conservaran por mayor tiempo a -80°C (Meslin 1996).

El envase que contiene la muestra se coloca dentro de una caja de poliuretano con refrigerantes, rellenar el espacio dentro de la caja con papel, o cualquier otro material disponible que amortigüe los impactos que puedan ocurrir durante su traslado.

Para envíos internacionales se deben de usar los contenedores de bioseguridad que son aproximadamente de 800 a 1000 mL de volumen. Se seleccionara exclusivamente medula espinal o cerebelo en un volumen suficiente para llenar dos críotubos de 2mL por cada una de las muestras, las que se etiquetaran con el número de muestra y se empacaran dentro del contenedor de bioseguridad. El contenedor tendrá espacio suficiente para albergar unos 200 tubos, equivalente a 100 muestras. Este envase se empaca en su caja, la cual a su vez ira en otra caja mas grande recubierta de unicel (caja aislante).

En el espacio que queda entre la caja aislante grande y la caja del contenedor se rellenara con refrigerantes y hielo seco suficiente para mantener las muestras congeladas durante al menos una semana.

Fuera del paquete, ya sellado, se coloca a la vista y correctamente, el nombre del remitente (Membrete, dirección, teléfono y fax), el del destinatario y la leyenda

MATERIAL INFECCIOSO DE FÁCIL DESCOMPOSICIÓN

ENTREGAR DE INMEDIATO AL DESTINATARIO

EL LOGO DE RISGO BIOLÓGICO DEBE ESTAR IMPRESO EN COLOR ROJO Y VISIBLE EN EL EXTERIOR DE LA CAJA

La caja deberá traer pegado por fuera un sobre que contenga una lista con la información mínima siguiente: número de muestra, especie denominada con su nombre científico o nombre común (nombre de fuente primaria de obtención no importa si la muestra fue pasada posteriormente en ratón), localidad y Estado donde el animal fue colectado y año de colecta. En el sobre se deberán incluir los permisos de importación y exportación respectivos formatos de declaración de material biológico infeccioso y declaración de contenido de hielo seco en el paquete.

El envío aéreo o por mensajería exprés son las vías que se recomiendan para el traslado rápido de las muestras. Se recomienda que las muestras sean enviadas al inicio de la semana (lunes o martes) para que lleguen al laboratorio antes del fin de semana.

APÉNDICE III: TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO Y ESTUDIO MOLECULAR DEL VIRUS DE LA RABIA.

A. Diagnóstico de rabia por la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD)

La inmunofluorescencia directa (IFD) es la técnica estándar para el diagnóstico de rabia, ya que es fácil de ejecutar, interpretar y tiene una sensibilidad y especificidad mayor al 99% cuando se ejecuta en condiciones óptimas. La técnica se basa en la detección de proteínas o antígenos virales en improntas de tejido infectado, mediante el uso de anticuerpos policlonales o mezclas de anticuerpos monoclonales conjugados a fluoresceína. La reacción antígeno anticuerpo sólo se hará evidente si las improntas positivas a las que se les adicionó el conjugado, se observan en un microscopio con luz ultravioleta. Dicho antígeno se observa como conglomerados (producto de la acumulación de proteínas del virus) de color verde manzana fluorescente, los cuales adquieren diferentes formas y tamaños con ubicación intracelular o extracelular.

Equipo

Autoclave, balanza analítica, bancos, campana de bioseguridad, estufa de cultivo a 37°C, mesas de acero inoxidable, microscopio de epifluorescencia, refrigerador con congelador, tarjas, ultracongelador.

Material

Abatelenguas de madera, bolsas de plástico de 20 x 10 cm y para basura 60 x 90 cm, cajas de tinción con canastilla, cámara húmeda, cubrebocas, cubreobjetos, charola de mayo, embudos, espátula, garrafón de cristal, gorros, guantes de látex grueso, jeringas desechables con aguja de 1 y 3 mL, lápiz diamante, lápiz marcador indeleble rojo o amarillo, matraces aforados de 100 y 200 mL, matraz Erlenmeyer de 250 mL, palillos planos, papel secante, picetas, pinzas de disección, pipetas desechables de 2, 5 y

10 mL, portaobjetos esmerilados desengrasados con una mezcla éter-alcohol metílico 1:2, probetas de 1,000 mL, propipeta o bulbos de hule, tabla para colocación de portaobjetos, tijeras rectas, viales de plástico con tapón de rosca de 2 mL.

Reactivos

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS), pH 7.6 para lavado de preparaciones

Pesar 0.157 g. de fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y 1.98 g de fosfato de sodio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) y 8.1 g de cloruro de sodio (NaCl), para tener el $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 1.5 mM, el $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a 14 mM y el NaCl al 0.85%; disolver los reactivos en 700 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.6 con NaOH o HCl concentrados según se requiera y aforar a un litro. Si sólo se dispone de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ entonces se pesarán 1.48 g para un litro y 5.92 para 4 litros.

Medio de glicerina para montaje, pH 8.4

Solución I: 0.879 g de KH_2PO_4 y 0.85g de NaCl. Aforar a 100 mL de agua bidestilada.

Solución II: 1.149 g de K_2HPO_4 y 0.85g de NaCl. Aforar a 100 mL de agua bidestilada.

Mezclar 1 mL de la solución I y 10 mL de la solución II. Entonces tomar 10 mL y colocarlos en un matraz aforado de 100 mL para ajustar el pH a 8.4. Aforar con glicerina neutra, agitar y dejar reposar 24 h antes de usarse.

Azul de Evans al 2% (colorante de contraste)

Pesar 2 g de azul de Evans, disolver y aforar a 100 mL con agua bidestilada.

Mantener ésta solución en frasco ámbar a temperatura ambiente.

Solución desinfectante de etanol al 70% en benzal.

Medir 700 mL de alcohol absoluto o 729.16 mL de etanol al 96%

Aforar a 1L con benzal comercial.

Solución de hipoclorito de sodio al 5%.

Medir 384.6 mL de hipoclorito de sodio al 13% y aforar a 1L con agua destilada y desionizada. Homogeneizar perfectamente.

Solución desinfectante de sales cuaternarias de amonio.

Se preparo una solución diluida 1:250 de un compuesto comercial concentrado llamado Lysol, el cual contiene una mezcla de cloruro de dodecil dimetil amina al 10.14%, cloruro de dimetil bencil amina 6.76%.

TESTIGOS DE ESPECIFICIDAD

Testigos de especificidad para los conjugados de origen policlonal

Como parte del proceso de producción y elaboración del conjugado antirrábico de origen policlonal cabe la posibilidad de que este contenga anticuerpos inespecíficos que reconozcan proteínas normales del SNC de ratones (libres de patógenos) y por reacción cruzada el de otras especies. Lo anterior provocaría que observáramos fluorescencia en muestras negativas, generando resultados falsos positivos. Este problema se soluciona fácilmente al adsorber el conjugado antirrábico en una suspensión de cerebro normal de ratón (CNR) justo antes de adicionarlo a las improntas del tejido a analizar. Lo que sucederá es que los anticuerpos inespecíficos (los que reconocen las proteínas de SNC), reaccionarán en el tubo donde se realiza la adsorción 1:5 con CNR, quedando libres exclusivamente los anticuerpos conjugados a la fluoresceína que reconocen a los antígenos del virus de la rabia. Esto se manifestará con la observación de fluorescencia verde manzana sobre la impronta de tejido nervioso teñido de color verde oscuro o rojo (por el azul de Evans) al adicionar la mezcla del conjugado (CNR-conjugado) sobre una impronta positiva. Solo se observara la impronta del tejido nervioso de un color verde oscuro o rojo si esta no contiene proteínas del virus de la rabia.

Por otro lado el propósito de adsorber el conjugado antirrábico con una suspensión de cerebro de ratón infectado con una cepa fija del virus de la

rabia CVS (Challenge Virus Strain), es el de comprobar su actividad y especificidad. En adelante para abreviar, nos referiremos como CVS a la suspensión de cerebro de ratón infectado con el virus CVS. Al hacer reaccionar al conjugado antirrábico con el CVS, están sucediendo dos cosas, que los anticuerpos conjugados a fluoresceína que reconocen antígenos del SNC se adsorban, pero también se adsorberán los anticuerpos conjugados a fluoresceína que reconozcan específicamente al virus de la rabia. Lo anterior provocará que al adicionar esta mezcla sobre las improntas positivas no observaremos fluorescencia (si el conjugado esta bien titulado), ya que los anticuerpos que reconocen al virus de la rabia ya están ligados al mismo desde el tubo donde se llevó a cabo la adsorción. Este testigo interno de especificidad dentro de la prueba, permite descartar con precisión todo tipo de fluorescencia que se deba a la unión inespecífica (o precipitación) del conjugado antirrábico. Las uniones inespecíficas se pueden presentar cuando el conjugado antirrábico unido al virus rábico reacciona, por su región Fc, con proteínas de excreción o de superficie de bacterias, levaduras u hongos (cápsulas, membrana externa, biofilm, etcétera). Testigos para determinar la actividad y especificidad del conjugado antirrábico.

Para la ejecución correcta y confiable de la IFD se requiere que en todo examen o serie de exámenes, se use el conjugado antirrábico previamente titulado y adsorbido por separado (1:5 dilución de adsorción arbitraria que se usa con mayor frecuencia) con una suspensión de cerebro normal de ratón (CNR) y con una suspensión de cerebro de ratón inoculado con la cepa CVS del virus de la rabia (CVS). Así mismo se deben correr paralelamente a las muestras problema, un testigo positivo y negativo.

La adsorción con CNR y CVS para cuando se usa el conjugado policlonal puede ser substituida por la fracción gamma de las globulinas extraída del suero normal de un animal de la misma especie en donde se desarrollo el

conjugado policlonal específico. Por ejemplo si el conjugado específico contra el virus de la rabia se desarrolló en cabra, el policlonal conjugado que funcionara como testigo deberá proceder de la fracción gamma de una cabra que jamás a estado en contacto con el virus rábico. Lo mismo si el conjugado policlonal específico se elaboró en conejo o caballos.

Testigos de especificidad para los conjugados de origen monoclonal

A diferencia de los conjugados de origen policlonal las nuevas formulaciones de conjugados antirrábicos contienen mezclas de dos o más anticuerpos monoclonales. En estos casos la probabilidad de que haya reconocimiento de epitopos no específicos del virus de la rabia es muy remota o nula. No obstante, también existe la posibilidad de que los anticuerpos que los componen, se unan de forma inespecífica, por su región Fc a proteínas o compuestos presentes en las muestras de encéfalo por contaminación con bacterias levaduras u hongos.

En este caso se debe de usar un anticuerpo o anticuerpos conjugados a fluoresceína que sean del mismo isotipo y concentración (en términos de cantidad de proteína total) presentes en el reactivo de diagnóstico.

Titulación del conjugado antirrábico

La titulación del conjugado antirrábico tiene como propósito principal evaluar la calidad, actividad y especificidad del biológico.

Esto se logra al encontrar la dilución máxima del conjugado en CNR, en la cual se puede detectar sin posibilidad de error cualquier forma en la que se encuentre el antígeno del virus de la rabia: cuerpos obloides (corpúsculos de Negri), polvo antigénico e hilos. Así mismo en dicha dilución el conjugado con CVS no debe detectar antígeno sobre la impronta positiva 4+, lo que significa que se ha igualado o equilibrado la cantidad de virus de la rabia (CVS) con la de anticuerpos que lo reconocen (conjugado antirrábico). Esta dilución se denomina óptima.

Como consecuencia de lo anterior este procedimiento permite optimizar el volumen del biológico rehidratado, ya que al diluirlo hasta su título se obtendrá mayor cantidad útil para realizar el diagnóstico.

Procedimiento

- 1.** Limpiar la mesa con una solución al 70% de etanol-benzal y colocar papel estroza.
- 2.** Marcar 7 portaobjetos con 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64 y 1:128 y desengrasarlos con una solución de éter - etílico 1:2
- 3.** Preparar el encéfalo de un roedor con positividad de 4+ o una muestra positiva 4+ determinada durante la rutina.
- 4.** Preparar abatelenguas para colocar los tejidos, papel absorbente para secar el exceso de tejido de las improntas, algodón para limpiar pinzas y tijeras de residuos de tejido y un vaso de precipitado con etanol al 70% preparado con benzal para desinfectar el material de disección.
- 5.** Hacer dos improntas de aproximadamente 1cm de diámetro en el portaobjetos rotulado con la dilución 1:2, hacer lo mismo hasta el marcado con 1:128.
- 6.** Colocar los portaobjetos en una rejilla y luego en una caja para tinción con acetona a -5° C ó -10° C por 10 minutos. Secar al aire.
- 7.** Circunscribir la impronta con un lápiz graso de color ó marcador de pintura permanente de color blanco y de secado rápido.
- 8.** Colocar dos serie de 7 tubos rotulados con 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64 y 1:128. Una serie se identificará como CVS y la otra como CNR.
- 9.** Agregar a cada tubo 0.1 mL de CVS ó CNR según la serie.
- 10.** Reconstituir el conjugado con el volumen de agua destilada estéril que indique el fabricante.
- 11.** Agregar al primer tubo de cada serie (marcado como 1:2) 0.1 mL de conjugado, homogeneizar y pasar al siguiente tubo (marcado como 1:4) 0.1 mL de esa dilución. Este proceso se repite hasta el tubo marcado como 1:128

Apéndice III. Técnicas para el diagnóstico y estudio molecular de la rabia

- 12.** Colocar una gota de la dilución 1:2 de CVS en una de las improntas y se hace lo mismo con la dilución 1:2 de CNR en la otra impronta. La gota debe cubrir toda la superficie de la impronta circunscrita con el marcador. Los pasos se repiten hasta la dilución 1:128
- 13.** Incubar las preparaciones a 37°C durante 30 minutos en una cámara húmeda.
- 14.** Colocar los portaobjetos en una rejilla y lavar rápidamente 10 veces con PBS pH7.6. Colocar nuevamente en una caja de tinción con PBS pH 7.6 limpio, lavar agitando manualmente durante 3 minutos.
- 15.** Lavar con agua destilada, agitando manualmente durante 3 minutos.
- 16.** Repetir los lavados con PBS y luego con agua destilada.
- 17.** Colocar las preparaciones en la caja de tinción con 4 a 6 gotas de azul de Evans al 2%. Dejar reposar durante 5 minutos.
- 18.** Tirar el agua con el colorante y colocar agua limpia. Enjuagar agitando durante 40 segundos. Secar al aire.
- 19.** Agregar una gota de glicerina de montaje de pH 8.4 sobre cada impronta y colocar un cubreobjetos.
- 20.** Leer en un microscopio de epifluorescencia a 400 aumentos (objetivo 40X), comenzando por la dilución 1:2 de las improntas con CVS; si se observa exceso de fluoresceína en el tejido se procede a observar la siguiente dilución.
- 21.** La dilución óptima del biológico es aquella donde se observa una fluorescencia específica 4+, polvo antigénico e hilos a una intensidad de 4+, en la impronta donde se colocó la mezcla de conjugado-CNR. Mientras que en la correspondiente con CVS no se debe observar fluorescencia específica ni inespecífica, lo que significa que se ha alcanzado el equilibrio entre la cantidad de antígeno y anticuerpo. En dilución se debe observar el 100% de los campos verde oscuros o rojos. El color de fondo dependerá de la cantidad del colorante contraste y el tiempo al que se hayan expuesto las preparaciones. Entre mayor cantidad y tiempo el tejido se

pondrá rojo.

22. Una vez que se determino la dilución óptima, el conjugado debe almacenarse a una dilución denominada de trabajo. Esta se calcula dividiendo la dilución óptima entre la dilución de adsorción, la cual arbitrariamente es de 1:5 (con CVS y CNR por separado).

23. Cálculos:

Ejemplo 1. Determinar la dilución de trabajo, sí la dilución óptima observada fuese 1:16.

Entonces:

Dilución de trabajo = dilución óptima/ dilución de adsorción = 1:16 / 1:5=1:3.2.

Esto significa que el volumen restante de conjugado reconstituido, se debe diluir 1:3.2. Este conjugado a la dilución de trabajo, se almacena en alícuotas que se determinan según la cantidad diaria de muestras trabajadas. La temperatura de almacenamiento es de -20°C a -70°C.

En el momento que se vaya a realizar el diagnóstico se descongelan dos tubos (o la cantidad de tubos que se vayan a utilizar, debe ser siempre un número par) y se realiza la dilución de adsorción (1:5) con CNR y CVS respectivamente.

Observe que hasta este momento el conjugado alcanzará la dilución óptima, determinada durante la titulación.

Comprobación:

Conjugado almacenado 1:3.2 que se diluye nuevamente 1:5 (adsorción) con CNR y CVS.

Entonces la dilución final del conjugado será = (1:3.2) (1:5) = 1:16, la cual es la dilución óptima.

Ejemplo 2. Calcular la dilución de trabajo sí la dilución óptima determinada fuese 1:64.

Dilución de trabajo = dilución óptima / dilución de adsorción = 1:64 / 1:5= 1:12.8

Apéndice III. Técnicas para el diagnóstico y estudio molecular de la rabia

Esto significa que el volumen restante de conjugado reconstituido se debe diluir a razón de 1:12.8. Este conjugado rendiría mucho más que el citado en el ejemplo anterior, lo cual significa que es de mejor calidad. Este conjugado ya diluido a la dilución de trabajo, se almacena en alícuotas a -20°C a -70°C.

En el momento en que se vaya a realizar el diagnóstico se descongelan dos tubos y se realiza la dilución de adsorción (1:5) con CNR y CVS respectivamente. Note que hasta entonces el conjugado alcanzará la dilución óptima determinada durante la titulación.

Comprobación: Conjugado almacenado 1:12.8 que se diluye nuevamente 1:5 (adsorción) con CNR y CVS.

Entonces: Dilución final del conjugado será $(1:12.8) (1:5) = 1:64$.

La siguiente tabla presenta la cantidad de agua que habría que adicionarle al volumen restante de conjugado después de haber realizado la técnica de titulación (volumen restante = 0.1 para diluir con CNR + 0.1 para diluir con CVS, entonces $1 - 0.2 = 0.8\text{mL}$), para alcanzar la dilución de trabajo calculada, considerando la dilución óptima y la dilución de adsorción (1:5).

Tabla 16. Resumen de cálculos para diluir el conjugado.

Dilución óptima	Dilución de trabajo	*Volumen de agua	**Volumen final
1:8	1:1.6	0.5 mL	1.3 mL
1:16	1:3.2	1.8 mL	2.6 mL
1:32	1:6.4	4.3 mL	5.1 mL
1:64	1:12.8	9.4 mL	10.2 mL
1:128	1:25.6	19.7 mL	20.5 mL
1:256	1:51.2	40.2 mL	41 mL
1:512	1:102.4	81.1 mL	81.9 mL
1:1024	1:204.8	163 mL	163.8 mL

*Volumen de agua que hay que adicionarle a los 0.8 mL de conjugado una vez que se realizó el procedimiento de titulación y se calculo la dilución de trabajo.

**Volumen final de conjugado a la dilución de trabajo que habrá que separar en alícuotas.

Tabla 17. Para realizar la dilución de adsorción 1:5, según la alícuota del conjugado almacenado a la dilución de trabajo.

Alícuota de conjugado a la dilución de trabajo	*Volumen de CNR ó CVS	**Volumen final a la dilución óptima
0.4 mL	1.6 mL	2 mL
0.2 mL	0.8 mL	1 mL
0.1 mL	0.4 mL	0.5 mL
0.05 mL	0.2 mL	0.25 mL
0.025 mL	0.1 mL	0.125 mL
0.0125 mL	0.05 mL	0.0625 mL

*Volumen de CNR o CVS que habría que adicionar a la alícuota de conjugado, para llevar al cano la adsorción 1:5.

**Volumen final de conjugado a la dilución óptima.

Notas:

a) El conjugado debe ser titulado cada vez que se hidrate o reconstituya un vial nuevo, sin importar que este pertenezca al mismo lote del que se titulo anteriormente.

b) El conjugado debe almacenarse exclusivamente en alícuotas congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. En estas condiciones ya debe estar a la dilución de trabajo en agua bidestilada estéril. Esto permitirá una buena conservación del biológico.

c) Una vez adsorbido, el conjugado (que ya esta en la dilución óptima) se debe almacenar en refrigeración. La congelación no esta recomendada ya que esto podría provocar la desnaturalización y precipitación del conjugado.

d) Para eliminar precipitados de fluoresceína del conjugado previamente titulado:

1. Pesar 100 mg de tejido en polvo (hígado, cerebro, etc.) por cada mL de conjugado y colocarlo en un tubo de centrífuga para adicionarle 5 mL de PBS.

2. Centrifugar a 5,000 r.p.m. durante 10 min y decantar el sobrenadante.

3. Adicionar el conjugado y resuspender el polvo.
4. Dejar la mezcla una hora en el refrigerador, agitando suavemente cada 15 min.
5. Centrifugar 10 min. a 5,000 r.p.m. y separar el conjugado en fracciones de 0.1.
6. Las fracciones se guardan en el congelador a -20°C, tapadas con papel aluminio para evitar el paso de la luz.

El conjugado de origen monoclonal se titula de la misma forma pero como eluyente se usara exclusivamente agua destilada estéril o solución de PBS.

Procedimiento de la Inmunofluorescencia Directa (IFD)

1. Limpiar la mesa con una solución de etanol al 70% preparada con benzal y colocar un papel estroza sobre la superficie de trabajo.
2. Etiquetar las muestras y marcar dos portaobjetos y dos viales (uno para el INDRE y otro para el laboratorio) por espécimen a analizar. Sí las muestras son humanas, etiquetar tres viales uno para prueba biológica (INDRE o laboratorio), otro para aislar y propagar el virus y poder realizar su caracterización con anticuerpos monoclonales (INDRE) y un tercero para el banco de muestras del laboratorio.
3. Preparar un vaso de precipitado de 50 mL con etanol al 70% en benzal. Esto para desinfectar tijeras y pinzas entre cada muestra. De preferencia se deberán usar un juego de pinzas y tijeras por muestra procesada.
4. En caso de que no se disponga de tal cantidad de material, preparar algodón para limpiar las tijeras y pinzas de los residuos de encéfalo de la muestra anterior. Cuidar que el algodón se deseche en la bolsa amarilla.
5. Preparar abatelenguas y cortar papel estroza, para colocar los cortes de tejido y quitar el exceso de tejido de las improntas respectivamente.
6. Sacar el encéfalo del recipiente e identificar las regiones anatómicas importantes medula, cerebelo y asta de Ammón.

- 7.** Hacer un corte profundo a lo largo de la primera circunvolución. Separar la corteza e identificar el asta de Ammón hacia la base. Esta región del encéfalo se observa de color blanco nacarado y al hacer un corte transversal sobre esta se descubre un centro rosado o rojo.
- 8.** Colocar el corte de canto en un abatelenguas. Así mismo realizar cortes transversales de medula y del cerebelo seleccionar porciones de la región central.
- 9.** Limpiar las pinzas y tijeras de disección con algodón entre muestra y muestra, introducirlas a la solución etanol al 70% preparado con benzal y flamear al mechero. Esperar hasta la extinción del fuego, enfriar y procesar la siguiente muestra. Tener precaución de no humedecer las tijeras y pinzas hasta el mango, porque se podrían incendiar los guantes y provocar quemaduras severas.
- 10.** Hacer una impresión del canto interno del tejido (de aproximadamente 0.5 cm de diámetro) de cada región anatómica seleccionada (en orden de importancia médula, cerebelo y asta de Ammón). Repetir en el extremo opuesto de donde se marcó el portaobjetos una impronta del asta de Ammón; de esta manera se tendrán cuatro impresiones por muestra. Desechar el abatelenguas con el tejido restante, en la bolsa amarilla.
- 11.** Quitar el exceso de tejido con un pedazo de papel estraza, presionando la impronta y dejar secar al aire. El papel se desecha en la bolsa amarilla.
- 12.** Llevar a cabo los pasos del VI al XII para preparar el testigo positivo. Este debe tener una cantidad de antígeno de 4+ por campo. Si el testigo positivo se prepara a partir de la inoculación intracerebral de ratones, entonces sólo se hacen tres improntas. A dos se les agregará la mezcla de conjugado con cerebro normal de ratón (CNR) y a la restante, opuesta a la marca, la mezcla de CVS con conjugado.
- 13.** Colocar los portaobjetos en una rejilla y luego en una caja de tinción con acetona a -5°C ó -20°C durante 10 minutos.

Apéndice III. Técnicas para el diagnóstico y estudio molecular de la rabia

- 14.** Adsorber el conjugado a una dilución 1:5 con CVS y CNR por separado, mientras transcurre la fijación. En esta etapa el conjugado debe estar previamente titulado y diluido a dilución de trabajo y almacenado en alícuotas dependiendo la carga de trabajo del laboratorio.
- 15.** Sacar los portaobjetos de la caja de tinción y dejar secar al aire.
- 16.** Circunscribir la impronta con un lápiz graso de color ó de tinta indeleble para delimitar el área de la impronta.
- 17..** Agregar a las tres primeras improntas que están cercanas al rótulo, una gota de la mezcla de CNR-conjugado de manera que cubra todo el tejido. Así mismo colocar una gota de la mezcla de conjugado-CVS a la impronta de asta de Ammón que se encuentra en el extremo opuesto a la etiqueta o rótulo del portaobjetos.
- 18.** Colocar los portaobjetos en una cámara húmeda e incubar 30 minutos a 37°C.
- 19.** Colocar los portaobjetos en una rejilla y lavar en PBS pH 7.6, agitando manualmente por 20 segundos (eliminación del exceso de conjugado).
- 20.** Repetir el paso anterior cambiando el PBS pero enjuagar agitando manualmente la canastilla dentro de la caja de tinción durante 1 a 5 minutos, dependiendo de la cantidad de muestras procesadas.
- 21.** Repetir el paso anterior colocando agua destilada.
- 22.** Repetir los dos pasos anteriores nuevamente.
- 23.** Colocar las preparaciones en una caja de tinción con 4 a 6 gotas de azul de Evans al 2%. El azul de Evans se puede usar hasta a una concentración final del 0.02% dependiendo la intensidad de la coloración de contraste que se quiera. Reposar las preparaciones en esta solución durante 5 minutos.
- 24.** Descartar el agua con el colorante y añadir agua limpia, enjuagar agitando durante 40 segundos.
- 25.** Secar las preparaciones al aire y agregar una gota de glicerina de montaje pH 8.4 sobre cada impronta.

26. Colocar un cubreobjetos largo (50 x 24 mm) para cubrir todas las improntas.

27. Leer en un microscopio de epifluorescencia en el objetivo 40X, revisando primero el testigo positivo. En las improntas donde se agregó la mezcla de conjugado más CNR, se debe de observar fluorescencia específica 4+ y en las improntas donde se colocó la mezcla de CVS-conjugado se debe observar nada. En el testigo negativo se debe observar únicamente un fondo verde oscuro o rojo (esto depende de la cantidad de colorante de contraste usado).

Al observar los testigos positivo y negativo de la manera anterior, indica que la actividad del conjugado se encuentra en condiciones óptimas.

28. Revisar las muestras problema observando primero la impronta con la mezcla de CVS-conjugado (nunca se debe observar fluorescencia específica) y por último las improntas donde se colocó la mezcla CNR-conjugado.

29. Después de la lectura colocar los portaobjetos en el recipiente de desechos punzocortantes. El papel estraza se desecha en la bolsa amarilla.

30. Desinfectar la mesa con la solución de etanol al 70% preparada con benzal.

31. Interpretar los resultados. Empezar a leer las preparaciones tal como se mencionó en el punto XXVIII. Una muestra es positiva cuando en una o en todas las improntas donde se colocó la mezcla conjugado-CNR, se observan cuerpos obloides de un color verde manzana fluorescente (en su contorno son más brillantes que en el centro), hilos o polvo antigénico. Se pueden observar todas las estructuras anteriores al mismo tiempo o solo alguna de estas en cualquier cantidad con una fluorescencia verde manzana. En la impronta de la misma muestra donde se colocó la mezcla de CVS-conjugado, no se debe observar fluorescencia específica. Generalmente esta impronta se debe ver de un color verde oscuro homogéneo o rojo.

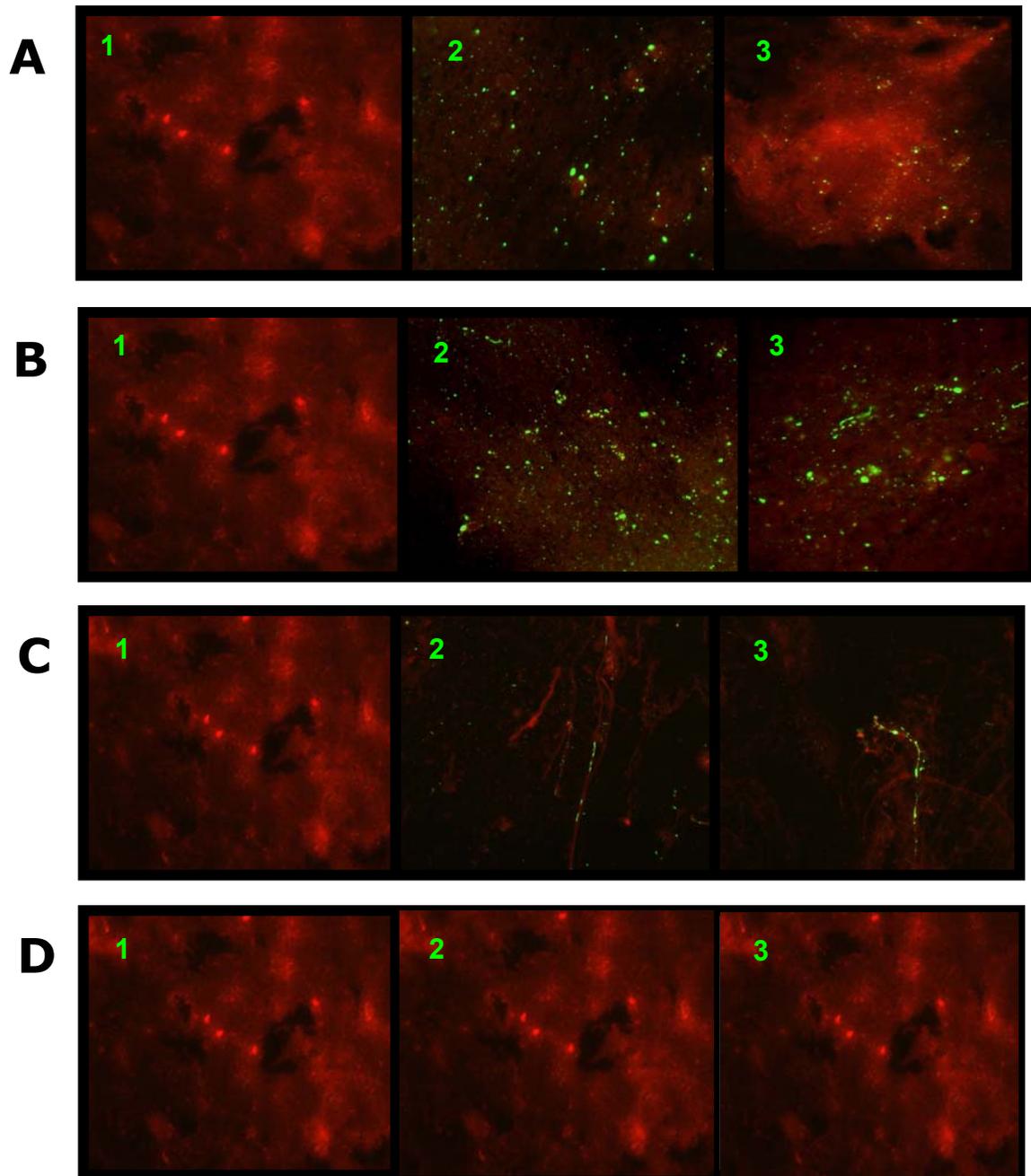


Figura 49. Inmunofluorescencia directa en impresiones de diferentes regiones anatómicas del SNC. **A** Muestra positiva de zorro trabajada con conjugado de origen policlonal, Chemicon. **B**. Misma muestra positiva de zorro trabajada con conjugado de origen monoclonal Centocore, en ella se observa diferencias en la intensidad de reacción o antígeno detectado. **C**. Muestra positiva de un perro infectado con variante de murciélago, se observa la distribución del antígeno en forma de hilos. **D**. Muestra de un zorrillo negativa. **1** Control de especificidad, IgG anti cabra conjugada a fluoresceína en la impronta de medula correspondiente a esa muestra. **2** Impronta de medula espinal. **3**. Impronta de cerebelo.

Problemas específicos y su interpretación.

a) Cuando se observa fluorescencia (trabajando con un conjugado bien titulado) tanto en las improntas donde se agregó la mezcla conjugado-CVS, como en las que se agregó conjugado-CNR, la muestra se sospecha como negativa. Esta interpretación se apoya si el testigo positivo se observa tal como se describe en el punto XVII.

b) Si se llegasen a observar las estructuras descritas para una muestra positiva, tanto en las improntas donde se agregó la mezcla conjugado-CVS, como en las que se agregó conjugado-CNR, entonces se sospecha de una muestra positiva. Pero seguramente se está usando un conjugado mal titulado. Esta interpretación se apoya si nuestro testigo positivo se observa igual que el problema. En este caso debe repetirse la titulación del conjugado y el diagnóstico.

c) En la práctica diaria se puede llegar a enfrentar con el caso en que todo se observa tal y como se describió en el punto b, sin embargo si su testigo positivo procesado bajo las mismas condiciones se observa tal y como se menciona en el punto XVII, entonces la muestra se confirma negativa y lo que está observando es fluorescencia inespecífica.

d) Cuando se observan estructuras puntiformes pequeñas (objetivo 40X) con un contorno redondo definido y una fluorescencia intensa color verde manzana uniforme con un patrón regular, tanto en las improntas con la mezcla conjugado-CVS como en las que tienen la mezcla conjugado-CNR, es posible que la muestra este contaminada con bacterias, principalmente *Staphylococcus aureus*. Esta bacteria puede llegar a producir una proteína que tiene afinidad por la región Fc de cualquier anticuerpo (proteína A de *Staphylococcus aureus*), por lo que el conjugado se pega a estas en toda su superficie definiendo claramente el contorno de éstas. Por esa razón se observa fluorescencia inespecífica.

e) Se pueden llegar a observar otros tipos de fluorescencia que son producto de la acumulación de compuestos que autofluorescen (al ser

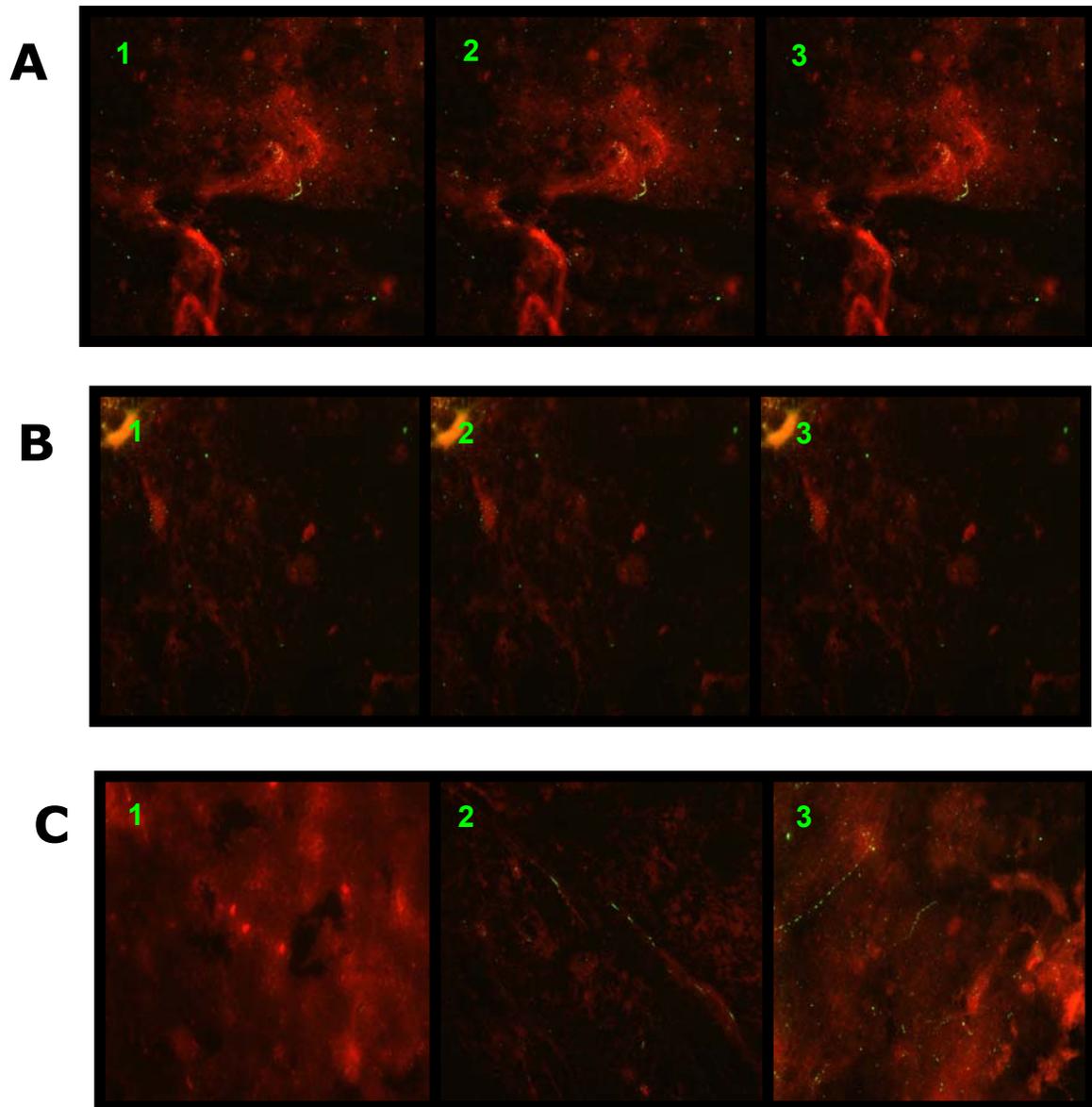


Figura 50. Muestras negativas con fluorescencia inespecífica **A** y **B**; **C** muestra positiva 1+. **A.** Muestra negativa de un bovino en la que se observa fluorescencia aun en el control de especificidad al usar un conjugado policlonal, Chemicon. Formas con bordes regulares muy bien delineados y de tamaño uniforme distribuidas homogéneamente en toda la impronta. **B.** Muestra negativa de un murciélago con fluorescencia inespecífica en todas las improntas incluyendo el control de especificidad al usar un conjugado de origen monoclonal, Centocore. Formas redondeadas de tamaño uniforme homogéneamente distribuidas en toda la impronta. **C.** Muestra positiva 1+ de un gato. **1** Control de especificidad, IgG anti cabra conjugada a fluoresceína en la impronta de medula correspondiente a esa muestra. **2** Impronta de medula espinal. **3.** Impronta de cerebelo.

excitados por la UV) en el SNC de los animales que se examinan, por ejemplo: en animales con moquillo se observan inclusiones amorfas y abundantes de color amarillo, la acumulación de insecticidas neurotrópicos

se observa como cristales de coloración que varía de tonos rojos a amarillos.

B. Aislamiento y propagación del virus de la rabia en ratones lactantes o prueba biológica (PB)

La prueba biológica tiene como principio reproducir los postulados de Koch. Esto extrapolado a la práctica del diagnóstico de rabia implica, 1) aislar al virus rábico, mediante la preparación de una suspensión de tejido sospechoso de estar infectado 2) reproducir la enfermedad inoculando dicha suspensión intracerebralmente en ratones lactantes (animales muy susceptibles), 3) corroborar la presencia (por IFD) del virus en el encéfalo de animales con signos y síntomas.

Ésta prueba se aplica en todas las muestras de seres humanos donde se refiere encefalitis y hayan existido antecedentes de posible infección por virus rábico. Otro aspecto importante ligado a lo anterior que se debe considerar para realizar ésta prueba, es que la muestra analizada por IFD haya sido negativa. La condición anterior sugiere que la cantidad de virus rábico presente en este tipo de muestras pudiera estar por debajo de los límites inferiores de detección de la prueba. Así mismo también se recomienda cuando se disponga de cantidad mínima de muestra, principalmente en el caso de muestras de murciélagos o en otras condiciones. Por lo que al inocular una suspensión de estas muestras en el encéfalo de los ratones lactantes, se incrementará la cantidad de virus que originalmente estaba presente (por la replicación del virus dentro de las neuronas del ratón), pudiéndose detectar así mediante la IFD además que se dispondrá de material suficiente para realizar otros estudios.

El procedimiento de la técnica involucra la inoculación por vía intracerebral de ratones albinos, suizos de 3 días de edad. A los 28 días en promedio (aunque puede ser hasta los 40) se debe observar parálisis; pelo erizado y encorvamiento. Hasta entonces, los ratones se sacrifican y se realiza la

IFD en el encéfalo.

Actualmente, el aislamiento viral a partir de cultivos de células del neuroblastoma murino es una buena alternativa para realizar la prueba biológica, ya que estas células son más susceptibles a la infección y el resultado se puede obtener hasta en 48 horas. Kaplan 1976, Meslin 1996.

Diluyente para suspensiones virales: 40 mL de suero normal de caballo estéril, inactivado a 56⁰C durante 30 min.; 2 mL de penicilina (100,000 UI/mL); 8 mL de estreptomycin (50 mg/mL); 150 mL de PBS pH 7.6, estéril; 3 g de albúmina sérica bovina; 100 µL de penicilina (100,000 UI/mL) y 100 mL de agua bidestilada estéril.

Preparación de la muestra:

- 1.** Tomar un fragmento de tejido (encéfalo ó biopsia) de 0.5 g de peso y se coloca en un tubo con 2.5 mL del diluyente para suspensiones virales y se mezcla bien.
- 2.** Centrifugar la suspensión a 2,500 rpm durante 15 min a 5⁰C.
- 3.** Separar el sobrenadante y usar para la inoculación de los ratones lactantes de tres días. El volumen restante se guarda a -70⁰C en un vial bien sellado e identificado con una etiqueta que contenga el número de registro de la muestra, la fecha de preparación de la suspensión y la naturaleza del tejido usado (encéfalo ó biopsia).

Técnica para sujetar al ratón.

El procedimiento requiere de habilidad manual que se obtiene con la práctica.

- 1.** Tomar el ratón del extremo distal de la cola con los dedos índice y pulgar de la mano izquierda (cuando el operador es diestro).
- 2.** Tomar al ratón por la base de la cola con la articulación de la primera y la segunda falanges del dedo anular o meñique. Lo anterior se realiza cuando el ratón cuelga con la cabeza hacia abajo, permitiéndosele sujetarse a algún objeto firme, en ese momento se jala ligeramente en sentido opuesto.

3. Sujetar el extremo distal de la cola con los dedos índice y pulgar, prensar con firmeza el cuello a la altura de las orejas con lo que el ratón quedará fijo.

Llenado de las jeringas

1. Cargar una jeringa de tuberculina de 1 mL, con el inóculo preparado.

2. Colocar la jeringa dentro de un tubo de ensayo que contenga algodón en el fondo, insertar la jeringa en el cuerpo del algodón.

3. Poner la jeringa insertada en el tubo con la aguja penetrando el algodón. Sacar las burbujas de aire que estén atrapadas con golpes muy suaves y empujando el émbolo con el dedo índice sobre el cuerpo de la jeringa.

Inoculación del ratón

1. Tomar el ratón como se describió en la técnica de sujeción, con la mano derecha sostener la jeringa manteniendo la punta hacia arriba.

2. Inocular en el punto medio de la línea imaginaria que va del ojo a la oreja del ratón.

3. Introducir la aguja en ángulo recto, dirigiéndola hacia la base del cráneo del animal. Insertar aproximadamente tres cuartas partes de la aguja, e inyectar 0.03 mL de suspensión.

4. Inocular 6 ratones por muestra. Si la camada tiene menos de seis ratones se repite la inoculación, en otra. Si una vez inoculada la camada con más de seis miembros, se mueren dos o tres antes de los siete días, la muestra se deberá inocular nuevamente.

5. Separar la aguja de la jeringa y depositarla en el contenedor de punzocortantes.

6. Mantener en observación los ratones durante 21 días como mínimo; aquellos que mueren dentro de las primeras 24-48 horas se consideran fuera de la prueba, ya que éstos pudieron haber muerto por traumatismo.

7. Extraer la masa encefálica de los ratones que mueren después de 5 días

o 21 días si presentan los siguientes signos; tremores, incoordinación, pelo erizado, parálisis y postración. Hacer la prueba de IFD buscando la presencia de antígenos del virus.

Determinación semi-cuantitativa de antígeno viral por IFD, en las muestras que se propagaron en ratón lactante

- 1.** Limpiar la mesa con solución de etanol-benzal 70% y colocar papel de estraza
- 2.** Etiquetar las muestras, marcar portaobjetos (desengrasados con etanol-éter) y viales con los números correspondientes.
- 3.** Sacrificar con cloroformo los ratones con signos de rabia y extraer el encéfalo.
- 4.** Homogeneizar el encéfalo sobre un abatelenguas con las tijeras de disección.
- 5.** Hacer 2 improntas sobre el portaobjetos por muestra y con un pedazo de papel de estraza eliminar el exceso del tejido.
- 6.** Colocar los portaobjetos en una canastilla de tinción.
- 7.** Guardar las muestras en tubos marcados y rotulados.
- 8.** Efectuar la fijación de las muestras y meter los portaobjetos a una caja de Kopplin con acetona fría a -20°C durante 10 minutos.
- 9.** Sacar los portaobjetos de la canastilla y colocar sobre papel de estraza para que se sequen a temperatura ambiente.
- 10.** Circunscribir la impronta con un lápiz graso de color para delimitar el área
- 11.** Adsorber a razón de 1:5 el conjugado antirrábico con CNR y CVS.
- 12.** Agregar una gota del conjugado antirrábico mezclado con CVS sobre la impronta más lejana al número. Agregar una gota del conjugado mezclado con CNR a las otras improntas del portaobjetos.
- 13.** Colocar los portaobjetos en una cámara húmeda e incubar a 37°C durante 30 min.

- 14.** Colocar los portaobjetos en una rejilla de tinción, lavar enjuagando rápida y manualmente 10 veces en PBS pH 7.6 en una caja de Kopplin.
- 15.** Agitar las laminillas durante 10 min en otra caja de Kopplin con PBS pH 7.6 limpio, al termino transferir a otra caja de Kopplin con agua desionizada. Agitar por 10 minutos.
- 16.** Lavar con PBS pH 7.6 por 10 min y luego con agua desionizada por 5 min.
- 17.** Lavar por ultima vez con agua desionizada y agregar 2 gotas de azul de Evans al 2%. Agitar durante 5 minutos.
- 18.** Secar los portaobjetos a temperatura ambiente sobre papel estroza.
- 19.** Agregar una gota pequeña de glicerina de montaje pH 8.4 y colocar un cubreobjetos sobre cada la impronta.
- 20.** Encender el microscopio de epifluorescencia, y dejar que la lámpara se caliente durante 3 minutos, para empezar a leer las muestras.
- 21.** Leer con el objetivo 40X. Una muestra apropiada para realizar este estudio será aquella que presente una intensidad de fluorescencia de 3+ ó 4+, es decir entre el 90 y el 100% de los campos deben presentar gran intensidad de fluorescencia especifica con abundantes cuerpos de inclusión (cuerpos de Negri), polvo antigénico e hilos, al observar las improntas de conjugado adsorbido con CNR. En todas las improntas en las que se agregó la mezcla de conjugado con CVS, se debe observar un fondo verde oscuro o rojo sin fluorescencia específica o inespecífica.
- 22.** Leer cada unas de las muestras problema tanto CVS como CNR y colocar inmediatamente el resultado en su hoja de registro. Los portaobjetos se desechan en el recipiente de punzocortantes.
- 23.** Después de trabajar, recoger el papel estroza y desechar en la bolsa amarilla y la mesa se desinfecta con etanol-benzal al 70%.

C. Caracterización o tipificación antigénica del virus de la rabia con anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (AcMo) constituyen poblaciones homogéneas de anticuerpos que solamente reconocen un epítipo. Para los propósitos de caracterización antigénica del virus de la rabia, se han producido AcMo contra la glicoproteína G o contra la nucleocápside N (Wiktor and Koproski, 1978). Los AcMo que actualmente se utilizan en la caracterización antigénica de los aislamientos del virus rabia, están dirigidos contra la proteína (Rupprecht 1987, Nadin-Davis 2002).

Cuando estos AcMo se emplearon para analizar su reactividad contra los virus aislados de diferentes reservorios (perro, zorrillo, mapache, zorro, murciélago hematófago e insectívoro), se encontró que algunos reconocían todas las cepas virales, pero otros poseían una reactividad específica para un solo tipo de reservorio. De esta manera al usar un grupo o panel de anticuerpos se pueden determinar patrones de reacción también denominados patrones antigénicos, los cuales son específicos dependiendo el reservorio responsable de mantener al virus en un ecosistema, región o tiempo determinados. Estas asociaciones específicas se pudieron establecer al estudiar un gran número de muestras provenientes de diferentes especies de mamíferos a lo largo en todo el continente Americano y que abarcaron un periodo no menor a cinco años. Inicialmente éste panel estaba constituido por más de 100 anticuerpos del cual se han seleccionado diversos paneles como el de ocho anticuerpos que identifica 11 variantes antigénicas del virus de la rabia asociadas de manera específica a algunas especies de mamíferos en América Latina, tales como perros, zorros, zorrillos, murciélagos insectívoros y murciélagos hematófagos; o el de 20 AcMo que se usa actualmente en los EEUU. Este último panel además de identificar las 11 variantes que identifica el panel de 8 AcMo, arriba mencionado, también identifica variantes específicas

asociadas con mapaches y diferentes especies murciélagos no hematófagos. Esta técnica se usa exclusivamente para investigaciones epidemiológicas y no para diagnóstico. Su utilidad se hace evidente en casos de rabia en seres humanos donde la información es limitada, dudosa o inexistente. Actualmente se usa para confirmar la fuente de infección en cualquier caso de rabia en animales domésticos y silvestres. No obstante su uso está supeditado a la relevancia epidemiológica o epizootiológica de los casos a analizar y a veces puede llevar a conclusiones erróneas si no se dispone de suficiente información sobre la epidemiología o epizootiología de la enfermedad en la región o país en estudio. Baer 1991, Bourhy 1993, Meslin 1996, Rupprecht 1987, Díaz, 1994.

Materiales

Cámara húmeda; cubreobjetos; estufa a 37°C; micropipetas de 100 µL; microscopio de fluorescencia; portaobjetos de teflón con 4 pozos; puntas de pipeta de 50 µL; vasos de Kopplin.

Panel reducido de 8 AbMo (CDC de Atlanta, EU.)

C1: 62-3-1; C12: 62-62-4; C4: 62-15-2; C15: 62-97-3; C9: 62-52-1; C16: 62-143-2; C10: 62-52-2; C19: 62-146-3.

Reactivos

Acetona; agua destilada; amortiguador HEPES 0.2 mM, pH 7.5; anticuerpos contra gamma globulina de ratón marcados con isotiocianato de fluoresceína; azida de sodio; azul de Evans; cultivo de células de neuroblastoma de ratón; glicerina para montaje; medio MEM Dulbecco; PBS 0.01 M, pH 7.6; suero de bovino fetal inactivado a 56°C, 30 min; suspensión CVS (cerebro de ratón infectado con virus de la cepa CVS).

Procedimiento para titular lotes nuevos tanto de conjugado anti-ratón como de monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se titulan de forma individual y de manera semejante a como se titula el conjugado de origen monoclonal. Sin

embargo, existen algunas variaciones al procedimiento anterior porque la técnica de inmunofluorescencia en este caso se ejecuta de forma indirecta. El anticuerpo primario lo constituyen los 8 diferentes anticuerpos monoclonales y como anticuerpo secundario se usa un anticuerpo dirigido en contra de IgG total de ratón conjugado a fluoresceína (anti-ratón), el cual ha sido producido en cabra o carnero y también se titula.

1. Realizar diluciones decimales de cada uno de los monoclonales por separado usando solo 20 μL del monoclonal original y llevar a un volumen final de 200 μL con 180 μL de E-MEM 1X suplementado con 10% de suero fetal bovino, 25 mM de amortiguador Hepes y 1 mM de Azida sódica.. Llevar hasta la dilución 1:10000 usando un volumen de transferencia de 20 μL en 180 μL de eluyente.

2. El conjugado anti-IgG de ratón también se debe diluir de la misma manera pero a un volumen final de 1800 μL . Para ello en 4 tubos de 2 mL, colocar 1620 μL de eluyente (en E-MEM 1X suplementado con 10% de suero fetal bovino, 25 mM de amortiguador Hepes y 1 mM de Azida sódica.) y 180 μL del conjugado anti-ratón. Transferir 180 μL del homogenizado del primer tubo al segundo, homogenizar nuevamente y transferir 180 μL al tubo siguiente, repetir la operación hasta completar las cuatro diluciones.

3. Para cada monoclonal se preparan 16 improntas, de una muestra positiva 4+, en 4 porta objetos de teflón con 4 pozos cada uno. Los portaobjetos serán marcados con cada una de las diluciones del conjugado (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000). Así mismo cada impronta por portaobjeto será marcada con las diluciones (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000), las cuales corresponderán, en este caso, a las diluciones del anti-ratón. En resumen, en cada portaobjeto se probará una dilución del monoclonal con las cuatro diluciones del anti-ratón.

4. Fijar las improntas de tejido en acetona a -20°C durante 1 hora o toda la noche.

5. Colocar 45 μ L de la dilución 1:10 del primer monoclonal en cada una de las improntas del portaobjetos 1 marcado (1:10), hacer lo mismo para las otras 3 diluciones del mismo monoclonal. Proceder de manera semejante con los otros siete monoclonales. Incubar 30 minutos en una cámara húmeda y hacer los lavados tal y como se sugirió para la IFD. Adicionar 45 μ L de la dilución 1:10 del anti-ratón a la primera impronta de todos los portaobjetos que representan las diferentes diluciones de los monoclonales. En total se debió haber agregado el conjugado anti-ratón, dilución 1:10, a 32 improntas si se estuvieran procesando los 8 monoclonales al mismo tiempo. Tener cuidado de no derramar las respectivas diluciones al pozo consecutivo, de lo contrario se deberá repetir el ensayo.

6. Decantar el anti-ratón cuidadosamente sobre papel absorbente, teniendo cuidado de no derramar las respectivas diluciones al pozo consecutivo, de lo contrario se deberá repetir el ensayo. Lavar, para quitar exceso de anti-ratón o anti-ratón que no reacciona, con una piceta tratando de no contaminar el pozo adyacente con la solución de lavado del pozo que se está lavando.

7. Colocar glicerina de montaje en cada impronta previamente secada a temperatura ambiente y observar al microscopio de epifluorescencia usando el objeto 40X de planflorita.

La dilución de trabajo tanto del anti-ratón como del monoclonal será aquella en la que se observe la fluorescencia verde manzana típica y se puedan distinguir con nitidez las diferentes formas de distribución y agregación del antígeno, que van desde el polvo antigénico hasta los cuerpos ovoides o de Negri. La fluorescencia inespecífica debida al exceso de conjugado anti-ratón y de anticuerpo monoclonal debe estar ausente en la dilución de trabajo.

Titulación de los anticuerpos monoclonales usando un anti-ratón titulado

- 1.** Propagar en ratones lactantes una cepa positiva que mantenga sus características entre pase y pase al inocular en el ratón.
- 2.** Utilizar exclusivamente cerebros de ratones inoculados con virus de la rabia, o muestras originales en las que se observe una intensidad de fluorescencia específica de 4+, al haber realizado el diagnóstico o la determinación semicuantitativa de la cantidad relativa de antígeno en la muestra .
- 3.** Hacer dos improntas por portaobjeto con los cerebros del punto II. Considerar que en cada portaobjeto se probará un anticuerpo monoclonal, por lo que se necesitarán ocho de éstos. Solo se probarán las diluciones 1:100 y 1:1000.
- 4.** Dejar secar las improntas al aire durante 30 min.
- 5.** Fijar en acetona a -20°C durante 1 hora o toda la noche.
- 6.** El antígeno rábico en estas improntas debe encontrarse de un 90 a un 100% por campo en forma de inclusiones, polvo antigénico e hilos.
- 7.** Preparar 3 diluciones seriadas de cada AbMo (1:100, 1:1000, 1:10000) en E-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 25 mM de amortiguador Hepes y 1 mM de Azida sódica. Las diluciones anteriores son estables por un año a 4°C. Las diluciones 1:10 y 1:100 pueden durar aún más tiempo pero almacenadas a -20°C.
- 8.** Secar durante 10 minutos las preparaciones previamente fijadas en acetona.
- 9.** Agregar 15 µL de cada AbMo o el volumen suficiente hasta cubrir la superficie de las improntas respectivas sin derramar el biológico al siguiente pozo. Este es un paso crítico, sí los AbMo se mezclan, se obtendrán reacciones falsas-positivas.
- 10.** Colocar los portaobjetos en una cámara húmeda e incubar a 37°C por

30 min.

11. Lavar con una piceta de 250 mL con PBS 0.01 M, pH 7.6 debe hacerse con el cuidado máximo para evitar la transferencia de AbMo de un pozo a otro.

12. Sumergir los portaobjetos en PBS por 10 minutos y posteriormente en agua destilada por 10 minutos. Repetir esta operación dos veces.

13. Dejar secar al aire.

14. Agregar de 15 a 25 μ L del conjugado anti-IgG de ratón diluido 1:100 (Cappel o SIGMA) a cada pozo, incubar a 37°C por 30 min.

15. Repetir los lavados del punto 12.

16. Agregar 2 gotas de azul de Evans (colorante de contraste al 0.02%) y dejar secar.

17. Agregar una gota de glicerina a cada impronta, poner cubre objetos.

18. Leer a 400 aumentos (objetivo 40X), el antígeno se observa en forma de inclusiones (cuerpos obloides), polvo antigénico e hilos con una intensidad de 3+ ó 4+ (como en la IFD). Los anticuerpos proporcionados por el CDC generalmente tienen una dilución de trabajo 1:100, con el microscopio usado en el INDRE.

Procedimiento de la caracterización antigénica del virus de la rabia con AbMo

1. Preparar el volumen necesario de AbMo, a su respectiva dilución de trabajo, de acuerdo a la cantidad de muestras a procesar.

2. Rotular cada tubo claramente con la descripción de cada AbMo.

3. Hacer improntas en los portaobjetos de 8 pozos cubiertos de teflón, a partir de cerebro de ratón infectado con la muestra problema o con la muestra original si contiene una cantidad relativa de antígeno de 3 o 4+.

4. Secar las improntas al aire durante 10 min.

5. Fijar en acetona a -20°C durante 1 hora o toda la noche. Estos portaobjetos con las improntas ya fijadas, pueden ser mantenidos a -80°C

hasta por 6 meses.

6. Agregar 45 μ L de cada AbMo o el volumen suficiente hasta cubrir la superficie de las improntas respectivas sin derramar anticuerpo al siguiente pozo. Este es un paso crítico, si los monoclonales se llegan a mezclar podemos tener reacciones falsas positivas

7. Efectuar el primer lavado cuidadosamente para evitar la transferencia de AbMo de un pocito a otro, utilizando una piceta de 250 mL con PBS 0.01 M pH 7.6, lavándose cada pocito varias veces.

8. Sumergir los portaobjetos en un recipiente con PBS 0.01 M pH 7.6 durante 10 min, se repite la operación pero con agua destilada pH 7. Realizar éstos lavados dos veces más y dejar secar al aire.

9. Agregar 45 uL de conjugado en cada pozo. Se recomienda el conjugado Cappel's Catálogo No. 121-0081 o SIGMA a una dilución 1:100.

10. Incubar a 37°C por 30 min en cámara húmeda.

11. Hacer tres lavados de un minuto alternando PBS 0.01 M pH 7.6 y agua pH 7.

12 En el último lavado con agua colocar 3 gotas de azul de Evans al 2%, reposar durante 5 minutos y lavar nuevamente con agua durante 10 minutos. Dejar secar al aire.

13. Colocar una gotita de glicerina de montaje en cada impronta.

14. Leer en el Microscopio de Epifluorescencia en el objeto 40X o a 400 aumentos.

15. Repetir las lecturas débilmente positivas en donde se descarte contaminación por reacción con otro anticuerpo (por contaminación de pozo a pozo al momento de lavar o incubar), usando el panel de anticuerpos monoclonales sin diluir (1:10), en improntas por separado.

16. Interpretar los resultados

a). Reacción positiva

Se considera una reacción positiva cuando la intensidad de fluorescencia y la cantidad de antígeno observada es idéntica al testigo positivo (3+ ó

4+). Puede haber aislamientos de campo en los que se observen intensidades de fluorescencia hasta 1+, con algún o algunos de los anticuerpos monoclonales, los que se corroborarían como positivos si se vuelven a probar por separado con cada anticuerpo monoclonal. Paralelamente los mismos anticuerpos se vuelven hacer reaccionar con el testigo positivo (mezcla CVS/ERA/SAD/PAST) observando una intensidad de fluorescencia 4+.

Escribir en una tabla el patrón de reacción para cada muestra, es decir que anticuerpos reaccionaron de forma positiva y cuales de forma negativa. Comparar el patrón obtenido con los reportados en la tabla de "patrones de reacción más frecuentes de los anticuerpos monoclonales con los virus de la rabia asociados a reservorios de la enfermedad en América Latina". Corroborar la congruencia del reservorio inferido por esta metodología, con los antecedentes epidemiológicos o epizootiológicos de la región donde se detecto dicho caso. Si se detecta una incongruencia epidemiológica, en el sentido que la variante obtenida infiere un reservorio de la enfermedad no reportado en la región; que la variante obtenida a partir de un murciélago corresponde a la de un animal terrestre o que el patrón de reacción obtenido no coincide con ninguno de los reportados en la tabla, resérvese cualquier conclusión hasta después de haber realizado el análisis genético.

b). Reacción negativa

Cuando no se observa fluorescencia (fondo verde oscuro o rojo).

c) Testigo positivo:

Mezcla de cepas del virus de la rabia CVS/SAD/ERA/PAST, con la cual los 8 anticuerpos monoclonales dan reacción positiva 3+ ó 4+. Sino se dispone de las cepas fijas de laboratorio, entonces se deberá usar una combinación de muestras ya tipificadas que en su conjunto ayuden a corroborar que los monoclonales tienen actividad. Por ejemplo como controles se podrían usar una muestra variante antigénica 1 (AgV1) y otra variante antigénica 8 (AgV 8).

Tabla 18. Patrones de reacción más frecuentes de los anticuerpos monoclonales con los virus de la rabia asociados a reservorios de la enfermedad en América Latina

Clave del monoclonal	C1	C4	C9	C10	C12	C15	C18	C19	AgV
CVS/ERA/SAD/PAST Testigo de actividad.	+	+	+	+	+	+	+	+	TR
Perro/ mangosta	+	+	+	+	+	+	-	+	1
Perro	+	+	-	+	+	+	-	+	2
Vampiro	-	+	+	+	+	-	-	+	3
<i>Tadarida brasiliensis</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	4
Vampiro	-	+	v	+	+	v	-	v	5
<i>Lasiurus cinereus</i>	v	+	+	+	+	-	-	-	6
Zorro de Arizona	+	+	+	-	+	+	-	+	7
Zorrillo Centro/Norte	-	+	+	+	+	+	+	+	8
<i>Tadarida br. mex.</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	9
Baja SC zorrillo	+	+	+	+	-	+	-	+	10
Vampiro	-	+	+	+	-	-	-	+	11

TR. Testigo de reactividad; **V.** reacción variable

D. Amplificación específica del gen que codifica para la nucleoproteína del virus de la rabia por transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica molecular con la que se pueden obtener muchas copias de segmentos específicos del material genético de un organismo, virus, gen o fragmentos de DNA que pudieran estar presentes en una muestra de cualquier índole. Como por ejemplo, una muestra clínica (sangre, heces, tejido parenquimatoso), una muestra de suelo, una muestra ambiental, etcétera. Gran parte del éxito en la prueba radica en el buen diseño de los iniciadores (*primers*), los cuales pueden ser responsables de conferir sensibilidad, especificidad y un rendimiento óptimo en la producción del amplicón esperado.

Reactivos

Trizol (mezcla comercial de isotiocianato de guanidina, fenol); amortiguador de lisis (100 μ L de Tris-HCl 1M, pH 7.5; 300 μ L de NaCl 5M, 15 μ L de MgCl₂ 1M; 65 μ L de Nonidet P-40 concentrado y 9520 μ L de agua con dietil pirocarbonato DEPC al 0.1%); transcriptasa reversa del virus de mieloblastoma aviar de 1000 U (AMV); amortiguador de la transcriptasa reversa 5X (AMV); dNTP 10 mM, mezcla equimolar de dATP, dGTP, dCTP, dTTP; inhibidor de la RNAsas; iniciadores: 21g, 10g y 1066 (5 μ M y 20 μ M) y 304 (20 μ M); ditiotreitól (DTT); taq-polimerasa de 5000 unidades/mL; agarosa; amortiguador TBE 10X (Tris-base 118 g + ácido bórico 55 g + EDTA 200 mM 10 mL); azul de bromofenol solución al 0.4%, 1:1, en glicerol al 50%; marcador de peso molecular DNA del fago lambda cortado con Hind III y EcoR I o escalera de 100 pb de 100 a 2000.

Tabla 19. Iniciadores para amplificar el gen completo y regiones parciales de la nucleoproteína del virus de la rabia.

Nombre	Secuencia del iniciador	Cadena blanco	*Posición
21g	5' ATGTAACACCTCTACATTG 3'	Genoma de los lyssavirus RNA- (3'-5') o cadena antisentido dentro del cDNA (3'-5')	55-73
10g	5' CTACAATGGATGCCGAC 3'	Genoma de los lyssavirus RNA-(3'-5') o cadena antisentido dentro del cDNA (3'-5')	66-82
1066	5' GAGAGAAGATTCTTCAGGGA 3'	Genoma de los lyssavirus RNA-(3'-5') o cadena antisentido dentro del cDNA (3'-5').	1136-1155
&304	5' TTGACGAAGATCTTGCTCAT 3'	Cadena con sentido (5'-3') o positiva dentro del cDNA.	&1514-1533

*Posición en el genoma de SAD B19. Con número de referencia en el GenBank M31046.

&Para hacer el alineamiento del iniciador 304, con el genoma de SAD B19, primero se obtuvo su secuencia complementaria invertida ("reverse complement").

Materiales y equipo

Agitador vórtex; aplicadores estériles de madera; microcentrífuga refrigerada; micropipetas de volumen variable de 20 a 200 µL, 100 a 1000 µL; puntas con filtro para micropipetas; termociclador; transiluminador; criotubos de polipropileno de 2mL con tapón de rosca externa y empaque de seguridad, cámaras de electroforesis horizontal tipo minisubmarinas.

Extracción del RNA viral

1. Marcar con el número distintivo de cada muestra dos criotubos de polipropileno de 2mL con tapón de rosca externa y empaque de seguridad.

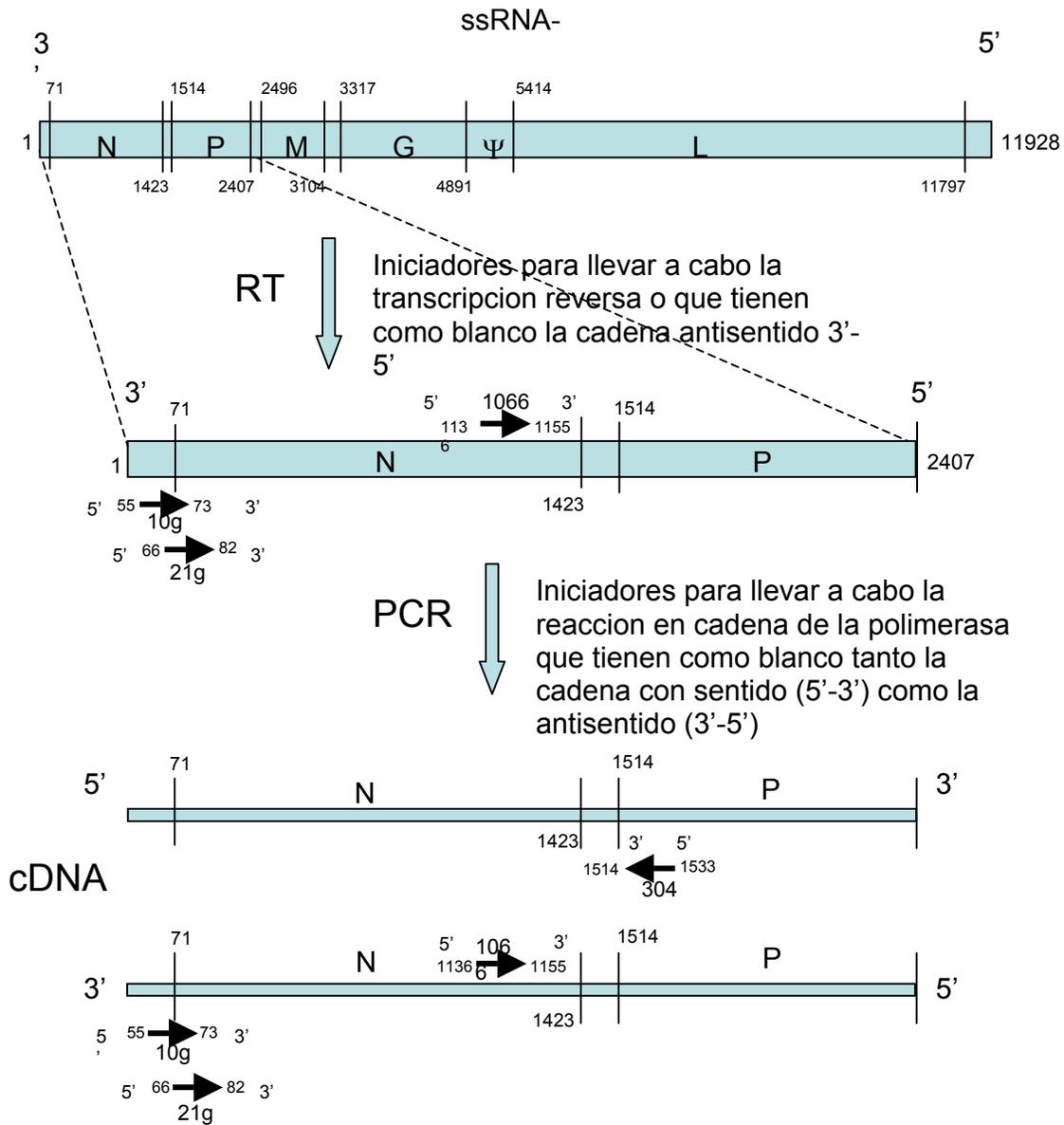


Figura 51. Posición de alineamiento de los iniciadores en el genoma del virus de la rabia.

2. En uno de los tubos que se marco para cada muestra, colocar suficiente cantidad de tejido hasta alcanzar un volumen total de entre 100 hasta 300 μ L.
3. Triturar el tejido con un aplicador de madera estéril, agregar 100 μ L del amortiguador de lisis y continuar homogeneizando con el aplicador de

madera.

4. Agregar 1 mL de trizol dejar reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos y homogeneizar vigorosamente en un agitar vórtex durante 45 segundos.

5. Agregar 200 µL de cloroformo y repetir la operación de homogeneizado en el vórtex durante un minuto e inmediatamente centrifugar a 12000 rpm en una centrifuga refrigerada a 4°C durante 10 minutos.

6. Mientras transcurre la centrifugación del punto anterior colocar de 500 a 700 µL de isopropanol grado biología molecular frío (-20°C) en el otro tubo que se marco con el mismo numero de muestra. Mantener los tubos con el isopropanol en el congelador hasta que haya terminado la centrifugación. Transferir la fase acuosa al criotubo con el isopropanol tratando de no tomar material de la interfase.

7. Agitar suavemente el tubo de forma manual para homogeneizar e incubar a temperatura ambiente durante 10 min y centrifugar a 12,000 r.p.m. durante 10 min a 4°C.

8. Decantar el sobrenadante cuidadosamente para no desprender el botón del fondo del tubo, añadir 1 mL de etanol al 75% para quitar el exceso de sales y centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

9. Descartar el etanol y secar las ultimas gotas invirtiendo el tubo cuidadosamente sobre una gasa estéril. El RNA se puede almacenar seco a -80 °C hasta usarse. También se puede rehidratar el RNA agregando de 50 a 100 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), se agita durante 1 minuto y se incuba 56 °C en un baño durante 10 minutos. El RNA disuelto se guarda a -80°C hasta usarse.

Transcripción reversa del RNA viral y obtención del cDNA del gen N

1. Añadir 1 µL del iniciador de trascripción reversa [10g (5mM) o 21g (5mM) o 1066 (10mM)] en un tubo cónico de polipropileno de 0.6 mL de capacidad.

2. Agregar 5 μL del RNA viral en estudio, llevar a 94°C en el termociclador durante 2 minutos y enfriar en hielo dejar reposar 5 minutos por lo menos.

3. Preparar la mezcla de la transcriptasa reversa de la siguiente manera: por cada muestra colocar 4.5 μL de amortiguador de la transcriptasa reversa 5X; 2.2 μL de mezcla dNTP's 10 mM; 0.4 μL de inhibidor de RNAsa; 7.3 μL de agua destilada con DEPC y 0.4 μL de transcriptasa reversa AMV 1000 U. Una vez transcurrida la desnaturalización colocar los tubos en hielo durante 5 minutos, agregar 14 μL de la mezcla anterior, homogenizar, centrifugar brevemente y colocar los tubos en un termociclador a 42°C durante 90 minutos.

Nota. El bloque del termociclador nunca debe estar por arriba de 42°C antes de colocar los tubos, ya que la enzima RT es termolábil y se inactivara inmediatamente si la temperatura esta por arriba de 60°C .

4. Preparar la mezcla de PCR colocando por cada 5.4 reacciones: 372.6 μL de agua grado biología molecular; 43.2 μL de Tris-HCl pH 8.3, 2.7 μL de Taq polimerasa (AmpliTaq, Applied Biosystems) 5U/ μL ; 5.4 μL de iniciador [10g (20 mM) o 21g (20 mM) o 1066 (40 mM)]; 6.75 μL de iniciador 304, 20 mM.

5. Agregar 80 μL de la mezcla de PCR a los tubos que contienen los 20 μL de la reacción de la transcriptasa reversa y mezclar en un vórtex a velocidad media, luego centrifugar por 10 segundos y colocar en el termociclador con el bloque precalentado a 94°C .

6. Programar el termociclador de la siguiente manera:

1 de inicio de 94°C X 1 minuto; ligado a 40 ciclos de: 94°C X 30 segundos, 37°C X 30 segundos, 72°C X 90 segundos. Estos tiene que estar inmediatamente ligados a 1 ciclo único de terminado de 72°C X 10 minutos que después llevara las muestras a enfriar a 4°C al infinito.

Electroforesis de los productos del RT-PCR

1. Mantener el producto de la reacción de PCR (cDNA) a 4°C , mientras se

Apéndice III. Técnicas para el diagnóstico y estudio molecular de la rabia

prepara un gel de agarosa al 1.2% en amortiguador TBE 1X.

2. Preparar la mezcla de corrimiento de la siguiente manera: 7 μ L de cDNA; 3 μ L de colorante de carga (azul de bromofenol en glicerol).

3. Colocar en el primer y último carriles el marcador de peso molecular con el colorante de corrimiento. Correr una electroforesis a 150 V durante 20 minutos. Observar en el transiluminador la posición del amplicón esperada.

Tabla 20. Tamaños de los amplicones esperados de acuerdo con el grupo de iniciadores que se usaron durante la RT-PCR

Juego de iniciadores usado	Tamaño del amplicón esperado
10g-304	1478 pb
21g-304	1467 pb
1066-304	397 pb

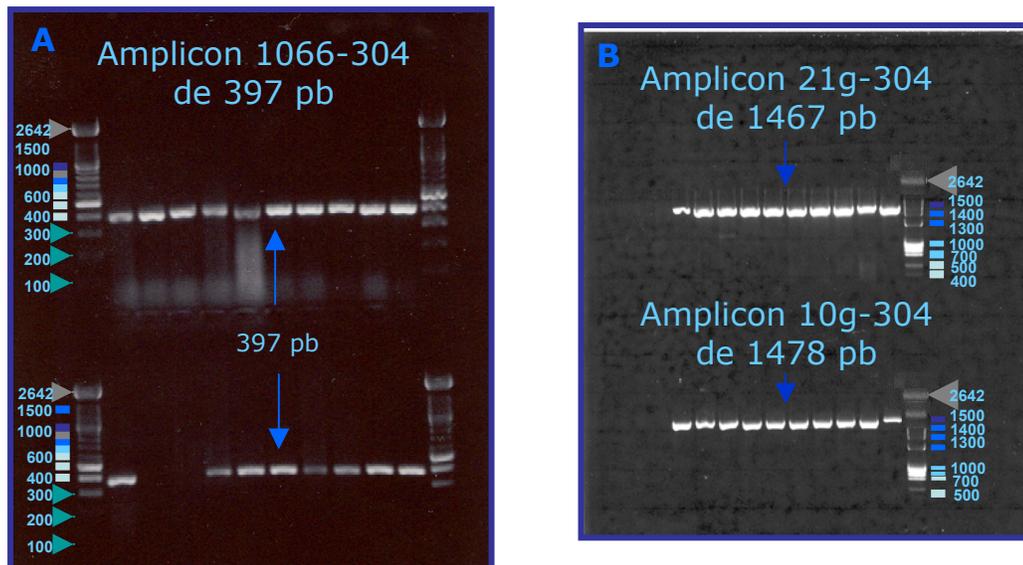


Figura 52. Geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio. **A.** Productos del RT-PCR de la región carboxilo terminal de la nucleoproteína del virus de la rabia. Últimos 264 nucleótidos que codifican 88 amino ácidos. A los flancos se encuentra el marcador de peso molecular que corresponde a una escalera de 100 Pb hasta 2642pb. Marca XIV, "Roche Lab diagnostics". **B.-** Productos del RT-PCR del gen completo que codifica para la nucleoproteína del virus de la rabia. En los carriles de arriba se encuentra el producto obtenido con los iniciadores 21g-304 y abajo el producto obtenido con los iniciadores 10g y 304. Del lado derecho se encuentra el marcador de peso molecular que corresponde a una escalera de 100 Pb hasta 2642pb. Marca XIV, "Roche Lab diagnostics".

E. Secuenciamiento nucleotídico de la región de la nucleoproteína que codifica para los últimos 88 aminoácidos.

Método de Sanger

Este método emplea dideoxinucléidos trifosfatados como terminadores al azar de la síntesis de novo de una cadena de DNA catalizada por una polimerasa de DNA. Los dideoxinucléidos trifosfatados (ddNTP's) son estructuralmente muy parecidos a los deoxinucléidos trifosfatados (dNTP's) excepción de que carecen del grupo -OH en la posición 3'. La modificación química anterior permite que sean agregados a la cadena naciente pero impide que un nuevo nucleótido sea adicionado después de ellos convirtiéndolos en terminadores de la polimerización. El resultado final es la obtención de fragmentos de DNA con diferencias de un nucleótido en su tamaño, los cuales pueden ser separados mediante una electroforesis en un gel de acrilamida.

El método original de Sanger empleaba ddNTP's radiactivos lo que obligaba a que las reacciones de secuenciación se realizaran en un tubo por separado para cada base nitrogenada (4 tubos uno por cada ddNTP terminador) por muestra. Después para que la secuencia de una sola muestra pudiera ser leída se requería correr en una electroforesis los productos de los 4 tubos y leer cada una de las bases por sus respectivos carriles de abajo hacia arriba. La modificación que finalmente permitió la automatización del método incorporó el uso de ddNTP's marcados con diferentes fluorocromos lo que permitió realizar la reacción de secuenciación en un solo tubo por muestra. Los fragmentos de DNA, de un nucleótido de diferencia en su tamaño, luego son separados en un gel de acrilamida en donde cada nucleótido es leído por un sensor que capta la radiación fluorescente específica de cada fluorocromo al ser excitado por un rayo láser (ver figuras abajo).

Purificación de los productos del RT-PCR

Este procedimiento tiene por objetivo eliminar los restos de iniciadores, dNTP's, enzimas y sales del proceso del RT-PCR que pudieran interferir con la el PCR de secuenciación.

Materiales

Tubos cónicos para microcentrífuga de 1.5 mL, tubos cónicos para microcentrífuga de 0.6 mL, pipetas graduadas de 10 mL, micropipetas de 100 a 1000 μ L, y de 20 a 200 μ L, unidad de vacío con múltiple entradas para jeringas de 5 mL.

Reactivos

Sistema de purificación para preparaciones de PCR, "Wizard", numero de catalogo 9FB017 marca PROMEGA, isopropanol 80% grado biología molecular

Procedimiento.

1. Etiquetar con el número de muestra las minicolumnas "Wizard" y dos series de tubos; una de tubos cónicos para microcentrífuga de 1.5 mL y la otra de tubos cónicos para microcentrifuga de 0.6 mL.
2. Ensamblar las minicolumnas marcadas con el número de muestra en la punta de la jeringa de 5 mL, insertando el extremo libre de la minicolumna en la unidad múltiple de vacío.
3. Agregar a los tubos donde se tiene el amplicon a purificar, 100 μ L de amortiguador directo de purificación de productos de PCR y transferir al tubo de 1.5 mL que ya contiene 1 mL de resina.
4. Agitar vigorosamente en el vortex tres veces en el transcurso de 1 minuto e inmediatamente transferir el contenido del tubo a la jeringa con la minicolumna que ya esta insertada en la unidad múltiple de vacío.
5. Abrir la llave de vacío para hacer pasar la mezcla a través de la minicolumna.

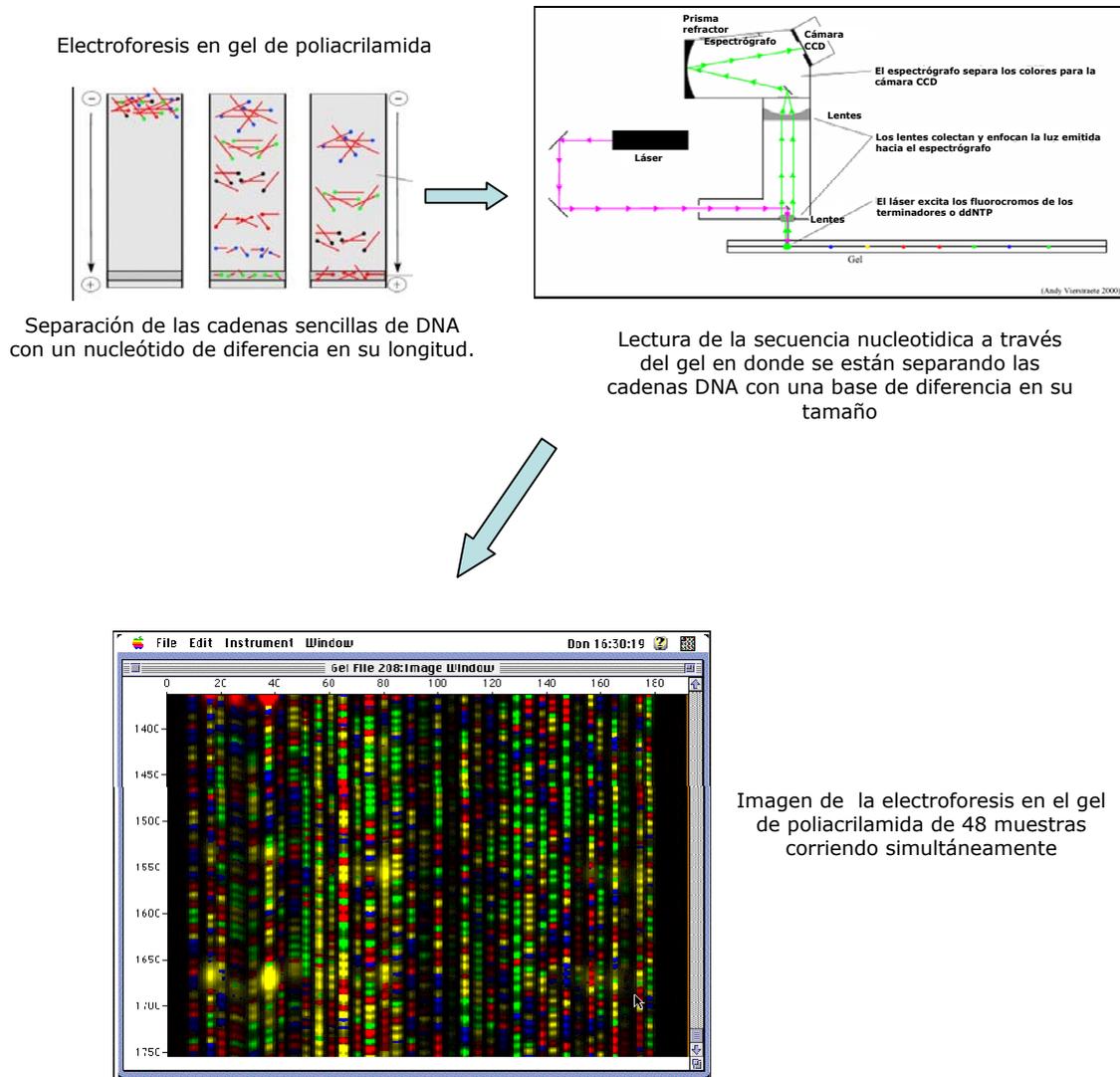


Figura 53. Secuenciación nucleotídica por el método de Sanger modificado, usando ddNTP marcados con diferentes fluorocromos

6. Una vez que paso toda la muestra agregar a la jeringa, sin cerrar la llave de vacío, 2mL de la solución de isopropanol al 80%. Permitir que fluya todo el isopropanol.
7. Retirar la jeringa con la minicolumna de la unida de múltiple de vacío. Desensamblar la minicolumna y colocarla en la boca de un tubo cónico de 1.5 mL sin tapa.
8. Centrifugar durante 3 minutos a 12000 rpm y descartar el tubo de 1.5

mL con el exceso de isopropanol, transfiriendo la minicolumna a un tubo nuevo de 1.5mL sin tapa.

9. Agregar 50 μ L de agua libre de DNAsas y RNAsas, precalentada a 56°C, dentro de la minicolumna y centrifugar nuevamente a 12000 durante 1 minuto.

10. Transferir el contenido del tubo a un tubo nuevo de 0.6 mL. Este amplicon purificado puede ser almacenado a -20°C hasta que vaya ser usado o se puede concentrar a la mitad de su volumen (25 μ L) en una centrifuga de vacío para posteriormente ser almacenado a -20 hasta ser usado.

PCR para secuenciamiento nucleotidico

Material y equipo

Tubos cónicos para microcentrífuga de 0.6 mL, micropipetas 1 a 10 μ L y de 2 a 20 μ L, microcentrífuga, agitador tipo vortex y termociclador.

Reactivos

Equipo completo "Big dye reagent" (Applied Biosystems) que incluya buffer 5X, soluciones madre de iniciadores (los mismos que se usaron en el RT-PCR), agua grado biología molecular libre de DNAsas y RNAsas.

Procedimiento

1. Etiquetar 2 series de tubos cónicos para microcentrífuga de 0.6 mL, por muestra (una serie por iniciador) y agregar en el fondo del tubo 5 μ L de amplicon purificado y concentrado. La reacción de secuenciación se realizara en ambos sentidos por cada muestra, por lo que se emplearan los iniciadores que se usaron durante la RT-PCR.

2. Preparar los iniciadores 1066 y 304 a una concentración de 3.5 y 1.8 μ M respectivamente, usando las soluciones madre 1066(40 μ M) y 304 (20 μ M). El volumen que se prepare deberá ser suficiente para usar 2 μ L por muestra. Para preparar 25 μ L, agregar a un tubo limpio 2 μ L de iniciador y 23 μ L de agua libre de DNAsas y RNAsas.

3. Agregar 2 μL de iniciador diluido (3.5 y 1.8 μM), 8 μL de mezcla "big dye", 4 μL de solución amortiguadora para la reacción de secuenciación "big dye buffer" y 6 μL de cDNA de cada muestra.

4. Homogeneizar en el agitador tipo vortex y centrifugar brevemente para llevar la mezcla al fondo del tubo.

5. Precalentar el termociclador a 94°C y colocar los tubos bajo el siguiente programa:

94°C durante 1 minuto; ligado a 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C durante 5 segundos y 60°C durante 4 minutos; ligado a 4°C al infinito.

Nota: La mezcla "big dye" contiene; Taq polimerasa, dNTP's, ddNTP's marcados con diferentes fluorocromos (terminadores de la polimerización del DNA)

Purificación de los productos del PCR de secuenciación

Material y equipo

Tubos cónicos para microcentrífuga de 0.6 y 1.5 mL, micropipetas 100 a 1000 μL y de 2 a 20 μL , microcentrífuga, agitador tipo vortex y termociclador.

Reactivos.

Agua destilada estéril, equipo de columnas de separación "Centri-Sep" de "Princeton separations", el cual contiene columnas de separación y tubos colectores sin tapa y con tapa.

Procedimiento

1. Etiquetar columnas y una serie de tubos cónicos para microcentrífuga de 0.6 mL.

2. Hidratar las columnas agregando 750 μL de agua destilada y homogeneizar el gel separador en el agitador vortex hasta eliminar totalmente las burbujas de la matriz.

3. Mantener las columnas en hidratación durante al menos 30 minutos.

4. Quitar el tapón de arriba y de abajo a las columnas y colocarlas en el tubo colector sin tapa.

5. Centrifugar a 4000 rpm durante 3 minutos teniendo cuidado de orientar todos los tubos en la misma dirección dentro de la centrifuga.
6. Eliminar el tubo colector con el exceso de agua y colocar la columna dentro un tubo cónico para microcentrífuga nuevo de 1.5 mL.
7. Colocar cuidadosamente sobre la superficie del gel separador el producto de la reacción de secuenciación. Tener cuidado de no derramar muestra por los lados de la columna y de no romper la columna, ya que esta es muy frágil.
8. Colocar los tubos con la columna en la centrifuga y orientar la columna en la misma dirección en la que se realizó la primer centrifugada para eliminar el exceso de agua.
9. Recuperar el producto de la reacción de secuenciación en un tubo nuevo de 0.6 mL.
10. Poner a secar el producto purificado, de la reacción de secuencia, en una centrifuga de vacío.

Separación y lectura de la reacción de secuenciación.

Material y equipo

Instrumento de separación y lectura modelo ABI prism 377 de Applied Biosystems, este modelo usa como matriz de separación un gel vertical de acrilamida; jeringa hipodérmica de 20 mL sin aguja; agitador tipo vortex; agitador magnético con platina caliente; micropipetas; termociclador; vaso de precipitados de 250 mL; pipetas de 10 y 50 mL, unidad de filtración de 250 mL, para vacío, con filtro de 35 μm ; probeta de 100 mL, parafilm, puntas para micropipeta, papel absorbente ultradelgado de alta pureza de bajo nivel de desprendimiento de fibras (fabricante), vidrios o placas de 50 cm para el secuenciador ABI prism 377, separadores y peines de 36 y 48 pozos, pinzas para papel.

Reactivos

Urea grado electroforesis, persulfato de amonio grado electroforesis, TEMED (N,N,N,N'-tetrametilenetilendiamina), colorante de carga (Applied Biosystems), solución amortiguadora de trizma base, ácido bórico y EDTA (TBE 10X, grado electroforesis SIGMA), solución de acrilamida y bisacrilamida pre-hecha (Long Ranger gel solution, Cambrex, No. cat. 50615), agua destilada grado electroforesis.

Procedimiento

1. Agregar en un vaso de precipitados de 250 mL 10.8 mL de la solución de acrilamida y bisacrilamida, 10 ml de TBE 10X, 50 mL de agua destilada.
2. Homogenizar la solución de acrilamida en un agitador magnético con platina caliente a una temperatura de 60°C.
3. Filtrar la solución de acrilamida en una unidad de filtración para vacío y mantener desgasificando durante una hora. Durante este proceso, la tapa unidad de filtración, se debe sellar con parafilm.
4. Lavar minuciosamente con abundante agua tibia las placas o vidrios del secuenciador ABI prism 377.
5. Frotar con papel absorbente ultradelgado la superficie interna de ambos vidrios o placas con abundante isopropanol, grado reactivo analítico.
6. Colocar los separadores de 2 mm y superponer ambos vidrios o placas con sus caras internas hacia adentro y presionar los bordes con pinzas pisa papel.
7. Colocar las placas ensambladas sobre una esponja plana (de 2cm de grueso y del largo de las placas) con una almohada de papel absorbente para formar un declive de 15° en el extremo donde se vaciara la solución de archilamida. Esto permitirá el movimiento descendente de la solución de archilamida y facilitara el llenado del espacio entre las placas antes de que la archilamida polimerice.
8. Agregar a los 100 mL de la solución de archilamida, filtrada y desgasificada, 0.5 mL de persulfato de amonio (APS) al 10% y 75 µL de

Apéndice III. Técnicas para el diagnóstico y estudio molecular de la rabia

TEMED. Homogenizar rápidamente con movimientos rotatorios y vaciar poco a poco en el espacio entre las placas de vidrio. Golpear los vidrios detrás del frente de corrimiento de la solución de acrilamida para acelerar el movimiento descendente de la solución y evitar la formación de burbujas.

9. Colocar el peine, por su lado ciego, una vez que la solución de acrilamida halla empezado a salir por el extremo opuesto de donde se estaba vaciando y después de haber verificado que no se formaron burbujas a largo de lo que va a ser la matriz del gel. Presionar el peine contra los vidrios usando pinzas pisa papel.

10. Esperar hasta que la acrilamida polimerice, para ello verificar el sobrante que quedo en la unidad de filtración. El proceso de polimerización no debe tardar mas de 60 minutos, lo contrario indicara que dicha solución no fue preparada correctamente o el APS o el TEMED ya no sirven.

11. Lavar las placas de vidrio, con la matriz de acrilamida perfectamente polimerizada, con abundante agua tibia. Secar con papel absorbente ultradelgado teniendo cuidado de no dejar fibras de papel en la base de las placas (región donde el instrumento hace la lectura mediante un barrido con rayo láser).

12. Colocar las placas de vidrio, con el gel, dentro del marco del instrumento ABI 377, llevándolo a su posición dentro del aparato.

13. Encender el instrumento y esperar hasta que la luz verde deje de parpadear. Encender la computadora y activar el software del instrumento 377.

14. Ir al menú de archivo "file" y activar dentro del submenu nuevo "new", la función de "sequence run" que inmediatamente despliega un interfase (una pantalla) de controles.

15. Activar la función de "plate check", la cual nos permitirá observar que tan limpia quedo la región de lectura o la región de barrido del láser. En esta etapa se abrirá de forma automática una ventana que muestra una

gráfica con cuatro líneas de diferente color, con forma de parábola invertida hacia el eje de las "X", la cual muestra la lectura basal de los sensores específicos para cada fluorocromo (con el cual están marcados los cuatro diferentes terminadores de la reacción de polimerización del DNA ddNTP's). Esta lectura basal no debe de rebasar el límite preestablecido por el instrumento, el cual esta indicado por una línea punteada paralela al eje de las "X". En caso de observar picos que sobrepasen este límite quiere decir que las placas de vidrio tienen una impureza externa (fibra de papel o partícula de polvo), que el gel polimerizo irregularmente o que algún censor del aparato esta fallando. El primer caso se solucionaría lavando nuevamente las placas para eliminar la partícula de polvo o fibra, el segundo caso se resuelve haciendo nuevamente el gel y el tercer caso requeriría de la ayuda técnica del fabricante del instrumento.

16. Colocar el peine con los dientes en dirección de la superficie del gel de archilamida. Los dientes del peine deben penetrar de 0.5 a 1 mm de la superficie del gel, para evitar que la muestra se difunda a los carriles vecinos.

17. Colocar la platina caliente sobre las placas de vidrio previamente montadas y colocar las bandejas, inferior y superior, de la solución amortiguadora de electroforesis (TBE 1X).

18. Activar la función de "pre-run" en la ventana de controles y dejar que la electroforesis proceda durante al menos 30 minutos.

19. Agregar a cada producto purificado, deshidratado o secado, 1 μ L de colorante de carga y 5 de formamida grado biología molecular. Calentar durante 2 minutos a 94°C en un termociclador y transferir inmediatamente a una cuba de hielo (proceso de desnaturalización).

20. Poner en pausa el instrumento activando la función de "pause" en la ventana de controles. Eliminar las burbujas de aire de los pozos usando la jeringa hipodérmica de 20mL.

Apéndice III. Técnicas para el diagnóstico y estudio molecular de la rabia

21. Cargar las muestras en todos los pozos con números nones (1, 3, 5, etcétera) y activar la función de "pre-run" durante 10 minutos. Esto iniciará la electroforesis y permitirá que la primera serie de muestras empiecen a correr dentro de la matriz de separación (gel de acrilamida). El desfaseamiento en el corrimiento electroforetico entre la primera serie de muestras y la segunda permitirá rastrear su trayectoria de corrimiento, de forma manual, con mayor facilidad a fin de que el instrumento lea y procese la información de la secuencia de forma correcta.

22. Cargar la segunda serie de muestras, seleccionar en la ventana de controles el número de carriles que están numerados en el peine, seleccionar el tiempo total de la electroforesis (7 horas para fragmentos hasta de 700 bases), activar la hoja con los números de las muestras, colocar la tapa de la solución de electroforesis de la bandeja superior y finalmente activar la función de corrimiento "run".

23. Ir al menú principal y dentro de "control manual" activar el submenú "status". Este último desplegará una ventana que mostrará de forma gráfica el tiempo transcurrido de la electroforesis, temperatura del gel, voltaje y corriente.

24. Verificar que la gráfica de sensores esté en el nivel adecuado. Si esta estuviera por arriba del valor permitido ir al menú de control manual y compensar los valores el valor de "CCD-GAIN" de 2 a 1. Esta acción deberá compensar la sensibilidad de los sensores y llevará la gráfica dentro del intervalo permitido.

25. Seleccionar dentro del menú principal "Gel" y activar la función de ajustar el contraste del gel, lo cual permitirá observar las secuencias en sus respectivos carriles.

26. Proceder a hacer el rastreo manual de cada carril activando la función de rastrear carriles. Nótese que todos los carriles con números nones deberán tener su frente de corrimiento ligeramente por delante que el de los carriles pares. Esto deberá facilitar su rastreo. Una vez que se alinee la

marca de lectura con su respectivo carril activar la función de extraer información. Este último paso creara un archivo con todas las secuencias de las muestras que se corrieron. El instrumento proveerá la secuencia de cada muestra en dos archivos diferentes; uno que muestra el histograma de la electroforesis señalando los picos que corresponden a las diferentes bases nitrogenadas y otro archivo con la secuencia en un archivo de solo texto.

Edición de las secuencias y su análisis

Para validar las secuencias analizadas se usaron diferentes estrategias.

1.- Eliminación de ambigüedades. Cuando el amplicon que se como molde en la reacción de secuncia estaba representando

1.- Comprobación de que la secuencia obtenida pertenece al gen n del virus de la rabia. Se realizó búsqueda de grupo de homólogos con más de 90% de similitud usando el programa BLAST del NCBI. De esta manera las secuencias homólogas a la secuencia investigada debían ser secuencias del gen que codifica para la proteína N del virus de la rabia. Gran parte de esas secuencias homólogas se usaron después como información de contexto.

2.- Se comprobó que la secuencia obtenida estuviera dentro de los límites esperados de acuerdo a los sitios de alineación de los iniciadores usados para la secuenciación en ambos sentidos (posiciones 1533-1514, 304 y 1136-1155, 1066). Para ello se uso como referencia el genoma completo de la cepa fija de laboratorio SAD B19, numero de GenBank M31046, con el cual se alinee cada una de las secuencias obtenidas usando el programa BLAST en su modalidad para alineación de dos secuencias.

Por ejemplo, si la secuencia se obtuvo con el iniciador 304 en entonces al alinearla con el gen n de SAD B19 se esperaba que estas iniciaran alrededor del nucleótido 1500 y terminaran cerca del nucleótido 1130. Para el caso de la secuenciación en el sentido opuesto con el iniciador 1066, se esperaba el inicio de las secuencias alrededor de la base 1155

con terminación alrededor de la 1510.

3.- Para comprobar la calidad en cuanto a la reproducibilidad y fidelidad de las secuencias obtenidas (fragmento de 320 pares de bases del gen que codifica para nucleoproteína, posición 1157-1476 con respecto a SAD B19), la secuenciación se realizó en ambos sentidos en todas las muestras. Una vez obtenidas ambas secuencias se alinearon para comprobar identidad, usando la aplicación "Sequence utilities" del servidor "Search Launcher" de la Universidad de Baylor y programa BLAST en su modalidad para alineación de dos secuencias. En cada caso se revisó que las secuencias fueran idénticas al comparar los fragmentos en ambas direcciones.

4.- Además para cada secuencia nueva se analizó la congruencia de su ubicación dentro de un árbol filogenético, construido con secuencias del GenBank que en su conjunto representarán los grupos de reservorios previamente reportados en México y otras partes del mundo (información de contexto). De esta manera, si la ubicación de la secuencia nueva en el árbol filogenético no era lógica al considerar variante antigénica (cuando existiera), especie de donde fue aislada, antecedentes de agresión, antecedentes de importación, antecedentes de distribución de rabia en la región, lugar o país, entonces dicha secuencia se considero incongruente y se eligió como un candidato para repetir o indagar de forma a retrospectiva su verdadero origen.

Antigenic Diversity and Distribution of Rabies Virus in Mexico

Andrés Velasco-Villa,^{1*} Mauricio Gómez-Sierra,¹ Gustavo Hernández-Rodríguez,¹ Víctor Juárez-Islas,¹ Alejandra Meléndez-Félix,¹ Fernando Vargas-Pino,² Oscar Velázquez-Monroy,² and Ana Flisser^{1†}

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SSA, Carpio 470, Colonia Santo Tomás, 11340 Mexico City,¹ and Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica, SSA, San Luis Potosí 199, Colonia, Roma, 06700 Mexico City,² Mexico

Received 25 June 2001/Returned for modification 28 October 2001/Accepted 30 December 2001

Rabies remains a public health problem in the Americas because of the great diversity of wild reservoirs that maintain the virus in nature. Here we report the antigenic characterization of 254 rabies viruses isolated from 148 nonreservoir and 106 reservoir hosts collected in 27 states of Mexico. Nine out of 11 antigenic variants previously reported in the United States were detected in Mexico by using the limited panel of monoclonal antibodies donated by the Centers for Disease Control and Prevention. Some rabies virus variants were isolated from their natural reservoirs, which were also taxonomically identified. Terrestrial reservoirs included stray dogs with V1, *Urocyon cinereoargenteus* (gray foxes) with V7, and two subspecies of *Spilogale putorius* (spotted skunks) with different viral variants (V8 and V10). Aerial hosts included *Tadarida brasiliensis mexicana* and *Desmodus rotundus*, which harbored V9 and V4 and harbored V11, respectively. All variants, with the exception of V9, were isolated from nonreservoir hosts, while V3, V4, and V5 were not isolated from their natural reservoirs but only from livestock. Rabies virus antigenic typing allowed us to determine rabies reservoirs and their distribution in Mexico, data which will probably improve prevention and control of the illness in humans and in the reservoir hosts.

Rabies virus belongs to the *Rhabdoviridae* family and is the prototype member of the *Lyssavirus* genus. The latter comprises six genotypes and the Australian strains that have not yet been formally classified (3, 6, 16). Genotype 1 or classical rabies virus is the most widely distributed throughout the world and has the greatest epidemiological importance because of its association with a higher number of rabies cases than those for the other genotypes (31). This genotype has been the only one detected in the Americas so far (29, 30). All mammals infected with rabies virus develop encephalomyelitis, but only reservoir hosts are naturally able to maintain the virus (31). Epizootiological data for rabies and the molecular typing of the virus have shown that there are several reservoirs for genotype 1 whose variants remain in nature by independent cycles (15, 26, 31, 33). Within every cycle, a different reservoir plays a central role in the specific maintenance of each viral variant, whereby there are enzootic cycles of rabies in dogs, called urban rabies, and in wild species such as raccoons, skunks, foxes, vampire bats, insectivorous bats, and fruit bats (1, 14, 16, 23, 25, 27, 29). Rabies is disseminated by intraspecific but also by interspecific transmission (rabid reservoir to any other mammal); however, the latter is not a successful way to maintain rabies enzootically (26, 29). Disease spread can also occur by migration or translocation of reservoir populations infected with rabies virus (26, 29). The occurrence of the illness in any ecosystem strictly depends upon the coexistence of reservoir species and their specific rabies virus variants. Rabies-free areas can be both

natural (because the virus has never been there) and human-made (by vaccination) despite the natural presence of reservoir species (26, 31).

In spite of the continuous development of rabies vaccine since 1884, the illness remains a public health concern in both developed and developing countries, due to the great diversity of rabies reservoirs, which has made prevention and control quite complex (6, 29, 31, 33). While autochthonous dog rabies has been eradicated in developed and some developing countries, the health problem continues with respect to bat trans-

TABLE 1. Rabies variants isolated in Mexico from nonreservoir and reservoir hosts

Host type and species	No. of samples analyzed	Viral variant(s)	% Variants (respectively)
Nonreservoir			
Human	40	V1, V10, V3, V8, V11	80, 8, 6, 3, 3
Cow	85	V11, V1, V3, V8, V10	70, 16, 7, 5, 2
Cat	7	V8, V1	57, 43
Pig	5	V1, V5, V8	60, 20, 20
Horse	4	V1, V3, V8	25, 50, 25
Bobcat	2	V7, V10	50, 50
Goat	2	V1, V11	50, 50
Sheep	2	V3, V11	50, 50
Donkey	1	V1	100
Reservoir			
Dog	79	V1, V5	99, 1
Skunk	15	V8, V10, V1	60, 33, 7
Fox	3	V7, V1	67, 33
Coyote	2	V1, V7	50, 50
Insectivorous bat	6	V9, V4	83, 17
Hematophagous bat	1	V11	100
Total	254		

* Corresponding author. Mailing address: Laboratorio de Rabia, Departamento de Virología, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SSA, Carpio 470, Colonia, Santo Tomás, 11340 Mexico City, Mexico. Phone: (525) 3414880, ext. 259. Fax: (525) 3411432. E-mail: avelasco@mail.ssa.gob.mx or avelasco_villa@yahoo.com.

† Present address: Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad Universitaria, San Ángel, 04510 Mexico City, Mexico.



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Virus Research 111 (2005) 13–27

Virus
Research

www.elsevier.com/locate/virusres

Molecular epizootiology of rabies associated with terrestrial carnivores in Mexico

Andrés Velasco-Villa^{a,b,*}, Lillian A. Orciari^a, Valeria Souza^c, Víctor Juárez-Islas^b,
Mauricio Gomez-Sierra^b, Amanda Castillo^c, Ana Flisser^d, Charles E. Rupprecht^a

^a *Viral and Rickettsial Zoonosis Branch, Division of Viral and Rickettsial Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road, Mailstop G33, Atlanta, GA 30333, USA*

^b *Laboratorio de Rabia, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SSA Carpio 470, Colonia Santo Tomás, 11340 México, DF, México*

^c *Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, AP 70-275, UNAM, 04510 México, DF, México*

^d *Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, 04510 México, DF, México*

Abstract

Epizootiological patterns of rabies are described, using antigenic and genetic analysis of samples obtained from infected domestic and wild mammals in 20 Mexican states during 1976–2002. Two independent origins are suggested for rabies in Mexican carnivores. One group shares ancestry with canine rabies, while the other group appears to share a common origin with bat rabies in North America. More than 12 sublineages were found in rabid dog populations, suggesting at least six major spatio-temporal foci. Coyote rabies was found as independent enzootic foci that probably emerged via spillover from dog rabies, translocated from major foci in the southcentral and western regions of Mexico. One focus of gray fox rabies was widely distributed in northwestern Mexico, overlapping with a focus in the same species in the southwestern United States. A skunk rabies focus distributed in the northcentral Mexican states appears to share a common origin with bat rabies foci in North America, and is a close relative of southcentral skunk and raccoon rabies in the United States. Two other skunk foci share a common ancestor with canine rabies and were distributed in northwest Mexico and Yucatan.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Epizootiology; Rabies; Terrestrial carnivores

1. Introduction

Rabies has been recorded since the first human civilizations, with the dog as the main transmitter (Wilkinson, 2002). In developed countries, traditional descriptive approaches have been applied to infer patterns of disease transmission to humans (Krebs et al., 2003). This approach has been reinforced by the process of rabies virus typing at the antigenic and genetic level (Bourhy

et al., 1993; Rupprecht et al., 1987; Smith et al., 1992). The detection and analysis of subtle differences within the rabies virus proteins and genes have permitted the identification of viral variants specifically maintained by different animals, such as dogs, foxes, raccoons, skunks, and bats. The combined use of those latter approaches, together with an efficient surveillance system for disease detection in animal populations, have allowed detailed descriptions of the distributions of major rabies foci, as well as the likely hosts responsible for maintenance (Bourhy et al., 1999; Nadin-Davis et al., 1999; Smith et al., 1995). Data provided by such molecular approaches have permitted insights to virus-reservoir relationships, patterns of transmission and dissemination, as well as viral evolution (Badrane and Tordo, 2001; Bourhy et al., 1993, 1999; Holmes et al., 2002; Nadin-Davis et al., 1999;

* Corresponding author at: Rabies Unit, Viral and Rickettsial Zoonoses Branch, Division of Viral and Rickettsial Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Mailstop G33, Atlanta, GA 30333, USA.
Tel.: +1 404 639 1055; fax: +1 404 639 1564.

E-mail address: aiv0@cdc.gov (A. Velasco-Villa).

Molecular Diversity of Rabies Viruses Associated with Bats in Mexico and Other Countries of the Americas

Andrés Velasco-Villa,^{1,2*} Lillian A. Orciari,¹ Víctor Juárez-Islas,² Mauricio Gómez-Sierra,²
Irma Padilla-Medina,² Ana Flisser,³ Valeria Souza,⁴ Amanda Castillo,⁴ Richard Franka,¹
Maribel Escalante-Mañe,⁵ Isaias Sauri-González,⁵ and Charles E. Rupprecht¹

Viral and Rickettsial Zoonoses Branch, Division of Viral and Rickettsial Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Rd., Mail Stop G33, Atlanta, Georgia 30333¹; Laboratorio de Rabia, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SSA, 11340 México, D.F., México²; Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, 04510 México, D.F., México³; Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, AP 70-275, UNAM, 04510 México, D.F., México⁴; and Laboratorio Central Regional de Mérida, Km 4.5 antigua carretera Mérida-Motul, colonia Díaz Ordaz, 97130, Yucatán, México⁵

Received 15 November 2005/Returned for modification 15 February 2006/Accepted 10 March 2006

Bat rabies and its transmission to humans and other species in Mexico were investigated. Eighty-nine samples obtained from rabid livestock, cats, dogs, and humans in Mexico were studied by antigenic typing and partial sequence analysis. Samples were further compared with enzootic rabies associated with different species of bats in the Americas. Patterns of nucleotide variation allowed the definition of at least 20 monophyletic clusters associated with 9 or more different bat species. Several lineages associated with distinctive antigenic patterns were found in rabies viruses related to rabies in vampire bats in Mexico. Vampire bat rabies virus lineages associated with antigenic variant 3 are widely spread from Mexico to South America, suggesting these lineages as the most likely ancestors of vampire bat rabies and the ones that have been moved by vampire bat populations throughout the Americas. Rabies viruses related to *Lasiurus cinereus*, *Histiotus montanus*, and some other not yet identified species of the genus *Lasiurus* were found circulating in Mexico. Long-range dissemination patterns of rabies are not necessarily associated with migratory bat species, as in the case of rabies in *Desmodus rotundus* and *Histiotus montanus*. Human rabies was associated with vampire bat transmission in most cases, and in one case, rabies transmission from free-tailed bats was inferred. The occurrence of rabies spillover from bats to domestic animals was also demonstrated. Genetic typing of rabies viruses allowed us to distinguish trends of disease dissemination and to address, in a preliminary fashion, aspects of the complex evolution of rabies viruses in different host-reservoir species.

Antigenic and genetic variants of rabies virus are associated with different species of terrestrial carnivores and bats in the Americas (27, 32, 33). However, not all taxa in these two mammalian orders play an equivalent role in maintaining enzootic disease within geographically discrete areas (32, 33). Within each area, a spillover of rabies virus into other mammalian species may occur, especially during epizootics (11).

Approximately 3,600 human rabies cases were reported in Mexico between 1939 and 2003, and more than 90% of these were associated with virus transmission by dogs (2, 28). Efforts to control dog rabies dramatically diminished the number of human rabies cases, from an average of 70 cases per year during the period 1939 to 1989 to a total of 320 cases during the interval 1990 to 2003 (28–30). Introduction of viral antigenic characterization methods for reservoir inference have revealed that more than 30% of the total reported cases of human rabies in the last 7 years have been associated with bats (2, 35). Little is known about the epizootiology of the disease

associated with bats in Mexico; active and passive surveillance on bat populations does not exist in the country, and molecular typing of positive specimens obtained from domestic animals is not performed routinely. Thus, the objective of this study was to use a molecular epidemiology approach (7, 19, 25, 32) to (i) infer which bat taxa are involved in the maintenance and transmission to nonreservoir mammals (including humans), (ii) update the geographic distribution of the disease associated with such reservoirs in order to predict potential areas at risk for human infection, (iii) determine geographic trends of disease dissemination due to possible movement of infected bat populations, and (iv) establish possible patterns of interspecies transmission.

(This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the D. Sc. degree for Andrés Velasco-Villa at Doctorado en Ciencias Biomedicas, Universidad Nacional Autónoma de México.)

MATERIALS AND METHODS

Samples and sequences. In the present study, 293 rabies virus sequences, including outgroups represented by European bat *Lyssavirus* 2 and Duvenhage, were analyzed. The analysis included 89 samples obtained from livestock, cats, and humans over a 12-year period (1991 to 2002) from 18 Mexican states (Table 1). These 89 samples were chosen on the basis of antigenic variant identification to obtain the greatest potential representation of rabies viruses transmitted by

* Corresponding author. Mailing address: Rabies Unit, Viral and Rickettsial Zoonoses Branch, Division of Viral and Rickettsial Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Rd., NE, Mail Stop G33, Atlanta, GA 30333. Phone: (404) 639-1055. Fax: (404) 639-1564. E-mail: dly3@cdc.gov.