

**ESTUDIO DE LA  
VARIABILIDAD MOLECULAR DEL VIRUS  
DE LA RABIA EN MEXICO**

**ELIZABETH LOZA RUBIO**

*Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria  
INIFAP. Carretera México Toluca km 15.5  
Col. Palo Alto. CP 05110. México D.F.  
email: manban@data.net.mx*

**ALVARO AGUILAR SETIÉN**

*Unidad de Inmunología Medica Centro  
Medico Nacional Siglo XXI  
Cuauhtémoc 330, Col. Doctores.  
México D.F. Apto. Postal 70-23 email:  
aguilas@data.net.mx*

I.	Introducción .....	52
II.	Taxonomía .....	55
III.	Propiedades fisicoquímicas .....	57
	1. La glicoproteína (proteína G) .....	57
	2. Proteína matriz (M2) .....	58
	3. La nucleocápside .....	58
	4. La fosfoproteína (M1) .....	58
	5. La proteína L (transcriptasa) .....	59
IV.	Variación antigénica y molecular .....	60
V.	Tipificación de virus rábico mediante el análisis del polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLP), y secuenciación .....	67

1. Colección de las muestras .....	67
2. Extracción de RN A .....	67
3. Síntesis de DNA complementario y amplificación por PCR .....	68
4. Detección de amplicones .....	68
5. Método para el análisis de los amplicones mediante RFLP .....	68
6. Secuenciación .....	68
VI. Caracterización antigénica y molecular del virus de la rabia en México .....	69
VII. Conclusiones .....	71
Referencias .....	77

Algunos resultados que se presentan en este capítulo fueron acreedores al premio a la investigación biomédica "Jorge Rosenkranz" 1997, en el área de Epidemiología otorgado por el grupo Roche-Syntex.

## I. Introducción

Si bien la rabia no ha sido de las mayores epidemias que ha sufrido el género humano (1), si es una de las enfermedades mas antiguas y recurrentes que se recuerdan, ya que su conocimiento se remonta aproximadamente al siglo 23 A.C. (1,2,3,4).

Desde 1885, cuando Pasteur introdujo la vacunación contra la rabia, se han seguido presentando infinidad de casos de este padecimiento tanto en humanos como en otras especies domésticas y silvestres (1). Se trata de una enfermedad infecciosa, transmisible, de curso agudo y mortal, única por su capacidad para afectar a todos los mamíferos, ampliamente distribuida en el mundo, con una letalidad de 100%, clasificada como zoonosis y en cuya transmisión interviene casi siempre la agresión de

un animal enfermo (5). La enfermedad se inicia a partir del momento en el que el vector del virus rábico inocula por mordida al hospedero susceptible y los mecanismos de defensa inespecíficos no son capaces de interceptar y anular al virus, continuando de esta manera su evolución hasta producir la muerte. Una vez infectado el tejido subyacente, el virus rábico sufre una primera replicación en el sitio de la herida, durante las primeras horas, posteriormente avanza por los nervios periféricos hasta alcanzar el Sistema Nervioso Central y de ahí se disemina por vía nerviosa a los demás órganos, llegando a las glándulas salivales (6).

Desde el punto de vista epidemiológico hay dos formas de presentación de rabia, la urbana que se propaga sobre todo entre los perros, y la silvestre que se asienta en diferentes especies vectores de la enfermedad dependiendo de la zona geográfica involucrada. De esta manera encontramos a los zorros rojos como únicos vectores en Europa Occidental; a los zorros plateados, zorrillos, mapaches y coyotes en América del Norte; las mangostas en algunas islas del Caribe; los chacales en África del Norte etc. (6, 7).

En los países industrializados la rabia de tipo urbano transmitida al humano por perros está prácticamente eliminada, predominando la rabia de tipo silvestre (7). Por otro lado, en las regiones tropicales de América Latina el vector silvestre es el murciélago hematófago que plantea problemas importantes. Los vampiros mueren a consecuencia de la rabia aunque la pueden transmitir por períodos largos de tiempo sin que se observen manifestaciones clínicas (6). Como estos quirópteros se alimentan exclusivamente de sangre se han multiplicado en las regiones tropicales donde hay cría de ganado vacuno, en quienes encuentran su alimento con facilidad, causando graves pérdidas económicas (6, 8). En México la plaga de este murciélago se extiende a lo largo de la Costa Occidental desde Sonora hasta Chiapas, y en la Oriental desde el Sur de Tamaulipas hasta Quintana Roo (9, 10).

La rabia canina es importante aún en muchos países en vías de desarrollo del mundo, donde los perros infectados representan la mayoría de los casos humanos que ocurren cada año (5). La diseminación natural de la rabia canina depende en gran medida de la tradición en la relación hombre-perro. Se sabe que el perro se convierte fácilmente en vagabundo debido a factores socioeconómicos y a la irresponsabilidad de sus dueños. Los perros callejeros juegan un papel muy importante en la propagación de la enfermedad ya que encuentran condiciones ideales en las áreas urbanas, principalmente las marginales, debido a que su estructura y densidad se ve favorecida por el correlativo incremento de los asentamientos humanos (7,11,12).

Cabe aclarar que los verdaderos vectores de la rabia, son aquellas especies mencionadas que la pueden transmitir de manera activa por sus hábitos de morder, como los perros y otros predadores (zorros, mangostas, murciélagos hematófagos, etc). Sin embargo, existen una gran variedad de especies susceptibles que constituyen un fondo de saco epidemiológico, pues si bien estas son víctimas de la rabia, es poco frecuente que la transmitan en forma activa a su vez a otros animales de la misma o diferente especie. Tal es el caso de los rumiantes, equinos domésticos y del ser humano.

Como sucede en otros países en varias regiones de la República Mexicana es difícil saber si un bovino o un ser humano ha sido contagiado por un perro o por un murciélago hematófago, pues estas regiones son compartidas por perros y vampiros con rabia y en ocasiones, también por otros vectores como los mapaches, zorrillos y coyotes. Las estrategias del control de la enfermedad en esas regiones dependerán del vector involucrado.

Antes del advenimiento de los anticuerpos monoclonales en la década de los ochentas, era difícil poder distinguir entre sí a diferentes aislamientos del virus de la rabia. Los anticuerpos monoclonales

permitieron por su parte desmontar en forma categórica el antiguo mito de la unidad antigénica del virus de la rabia, encontrándose variaciones entre diferentes aislamientos y cepas vacunales. Sin embargo, el análisis del genoma de estos virus ha sido hoy por hoy la herramienta más poderosa para su clasificación taxonómica y para la realización de una epidemiología molecular.

El análisis del genoma de diferentes aislados del virus de la rabia ha permitido actualmente encontrar marcadores para identificar al virus proveniente de distintos vectores y virus proveniente de zonas geográficas divergentes. Estos avances han permitido en varias partes del mundo un conocimiento más detallado sobre la epidemiología de la enfermedad y las cepas involucradas en los diferentes brotes, más aún, el análisis del genoma de estos agentes nos permite saber por comparación, que tan adecuada es la utilización de una vacuna determinada para proteger contra el virus involucrado en un brote. En este trabajo se describen los nuevos conocimientos generados en el estudio del genoma del virus de la rabia para la identificación de diversos aislamientos y algunos hallazgos de los primeros estudios hechos en México.

## II. Taxonomía

La familia *Rhabdoviridae* (incluidos en el orden de los Mononegavirales) al igual que las familias *Paramixoviridae* y *Flavoviridae* son familias que agrupan a virus ARN no segmentado, de cadena simple y polaridad negativa.

Los rhabdovirus de los mamíferos se dividen en base a sus diferencias antigénicas y bioquímicas en tres géneros: 1) Vesiculovirus, con el virus de la estomatitis vesicular como prototipo, 2) Lyssavirus, con el virus de la rabia como prototipo, y 3) Ephemerovirus que tiene como prototipo al de la fiebre efímera de los bovinos en Australia (13).

Con base en su reactividad a anticuerpos monoclonales, los *Lyssavirus* se han subdividido en cuatro serotipos, que son:

Serotipo 1.

Rabia clásica. Incluye la mayor parte de los virus hallados en el campo y de las cepas de laboratorio de los distintos países.

Serotipo 2.

Lagos. Aislado por primera vez de una mezcla de encéfalos de murciélagos de la República Centroafricana.

Serotipo 3.

Mokola. Aislado por primera vez en musaraña de Nigeria, posteriormente en el hombre, animales salvajes y domésticos de países africanos.

Serotipo 4.

Duvenhage. Aislada por primera vez en un hombre de Sudáfrica, después en murciélagos de la misma región y Europa Central (14, 15, 16, 17).

A esta clasificación se han agregado otros virus recientemente reportados:

EBL 1, *Lyssavirus* de murciélago europeo tipo 1 que se han aislado de humano y murciélagos insectívoros *Epseticus* y *Pipistrellus*. EBL 2, *Lyssavirus* de murciélago europeo tipo 2 aislado de humano y murciélagos insectívoros *Myotis* (18).

Con base en estudios de secuenciación de los genes de la nucleocápside (19), actualmente se puede emplear la terminología de genotipos, o bien sero-genotipos para clasificar a los diferentes *Lyssavirus*.

Cabe mencionar que a la fecha, en el continente Americano, solo se ha encontrado el sero-genotipo 1 o sea la rabia clásica.

### III. Propiedades fisicoquímicas

Como se ha mencionado, el genoma del virus de la rabia es un ARN con polaridad negativa, de cadena simple, no segmentado, que contiene aproximadamente 12,000 ribonucleótidos (4.6 X 10 Daltons). El genoma se transcribe de la extremidad 3' ala extremidad 5' en un ARN corto <líder> y en 5 ARN mensajeros que codifican sucesivamente para las proteínas N, M1, M2, G y L (2, 20), las cuales se describen a continuación siguiendo un criterio estructural:

#### 1. La glicoproteína (proteína G)

Se encuentra localizada en la envoltura viral, es la única que sobresale de la membrana viral, es el mas importante antígeno responsable de la inducción de anticuerpos virus neutralizantes que confieren inmunidad contra una infección letal del virus de la rabia (21), asimismo de la estimulación de las células T, y se cree que la neuropatogenicidad del virus rábico se basa en que esta glicoproteína se liga al receptor celular de acetilcolina (22).

La proteína G tiene cinco sitios antigénicos en la superficie expuesta, y se acomoda en forma de trímeros en el virión maduro. La secuencia que codifica para esta proteína ha sido el primer gene del virus de la rabia que ha sido codificado, la secuencia de nucleótidos ha sido determinada para tres diferentes cepas: la cepa ERA, CVS Y PV (21, 23); se determinó un polipéptido de 505 aminoácidos de largo, que contiene dos segmentos típicos hidrofóbicos, el primero, una secuencia de 19 aminoácidos en su parte inicial y un segundo segmento de 22 aminoácidos de largo que se localiza en la parte carboxiterminal. Posee de 65 a 80 Kd en cantidad de 1600 moléculas por virión (22, 23).

## 2. *Proteína matriz (M2)*

La proteína M2 originalmente descrita como de membrana, en realidad se encuentra por la cara interna de la membrana, y actúa como puente de unión entre la parte de las espículas de la glicoproteína que pasa la membrana, y la nucleocápside constituida por las otras proteínas virales y el ácido nucleico. Tiene un peso molecular de 22 a 25 Kd Y en cantidad de 1650 unidades por virión (23, 24).

## 3. *La nucleocápside (N)*

Es un polipéptido de 450 aminoácidos de largo, helicoidal y constituida por una serie de tetrámeros con dos moléculas de proteína M1 y dos de proteína N que se ensartan en el ácido nucleico como perlas de un collar.

Los sitios combinatorios para monoclonales presentes en el virus en su nucleocápside, se reparten en tres para la proteína N, y uno para cada proteína M1 Y M2. Posee de 40 a 45 Kd y en cantidad de 1750 moléculas por virión y la M1 de 35 a 40 Kd con 900 moléculas por virión (15).

## 4. *La fosfoproteína (M1)*

La proteína M1 en rabia corresponde a la proteína asociada a la nucleoproteína del virus de la estomatitis vesicular. La nomenclatura M corresponde a la matriz o posición membranal, se ha sugerido como alternativa el término NS que implica no estructural, pero esto es poco preciso; quizá P por fosfoproteína (phosphoprotein) podría ser un nombre más aceptable, aunque la nucleoproteína también es fosforilada. Aún no es clara la relación entre el estado de fosforilación de la proteína M1 y su papel en la transcripción o replicación (23). Tiene de 35 a 45 Kd con 900 moléculas por virión (21, 24).



### 5. La proteína L (*transcriptasa*)

La pequeña cantidad de proteína L que contiene el virión, se encuentra combinada con unas moléculas de M1 para formar la polimerasa viral y no contribuye a la antigenicidad viral de manera significativa, sin embargo, la cantidad de proteína L que contiene el virión, se relaciona con la patogenicidad; mientras mayor número de copias contiene, más patógeno es el virus (15, 25). Asimismo es la responsable de muchas propiedades enzimáticas, implicadas en la transcripción y replicación de los virus, tales como la poliadenilación y la captura del RNA mensajero (23). Tiene un peso molecular de 190 Kd constituye la proteína menor en el virión con 17 a 150 moléculas por virión. Contiene de 15 a 25% de lípidos como parte constitutiva del virión, pero dado que los lípidos son derivados de la célula huésped sin modificación, es la célula la que dicta la composición de los mismos. Contiene además 3% de carbohidratos, los cuales se encuentran tanto en las glicoproteínas, como en el ácido nucleico.

Las propiedades fisicoquímicas del virión son: peso molecular 1000 millones de daltones, velocidad de sedimentación 1000 S, densidad en CsCl de 1.19 a 1.20 g/ml y en sacarosa de 1.17 a 1.19. La infectividad viral es estable a pH entre 5 a 10 e inestable a pH 3. Se inactiva rápidamente a 56° C, con la luz ultravioleta, rayos X, éter, cloroformo, detergentes, así como con hipoclorito de sodio.

Las dimensiones del virus son de 80 nm de diámetro por 150 nm de largo con las glicoproteínas G sobresaliendo de la envoltura. Las partículas defectuosas representan la delección derivada de virus con genoma completo, poseen varios tamaños de RNA y son de menor longitud que la normal, debido a que contienen menor cantidad de ácido nucleico que los virus infecciosos. Son comúnmente obtenidas por pases seriados y son propensas más a interferencia homotípica que a heterotípica (15).

La nucleocápside viral se encuentra inmediatamente por debajo de la membrana, es helicoidal, y deja un agujero axial en el centro de la partícula, que la recorre más o menos hasta la mitad. Una revisión más extensa acerca de la estructura del virus de la rabia se encuentra en Montañó & Mata, 1996 (24).

#### IV. Variación antigénica y molecular

Durante la evolución, las secuencias genómicas del virus de la rabia se han visto sometidas a diversas presiones de selección relacionadas todas ellas, con la subsistencia de su papel respectivo en el ciclo de replicación viral. De esta manera, el gene que codifica para la nucleoproteína (N) (antígeno interno) es muy estable, mientras que aquel que codifica para la glicoproteína «G» (antígeno externo); que está en contacto directo con el medio exterior y se ve sometido a las presiones del sistema inmune del huésped, es muy variable. Por otro lado, el genoma de los *Lyssavirus* tiene la característica de poseer una región de un tamaño considerable (situada entre los genes G y L), que no codifica ninguna proteína y que podría corresponder a un gene remanente que durante la evolución de estos microorganismos, ha perdido funcionalidad (región llamada del pseudogen  $\Psi$ , que correspondería al gen HN de los paramixovirus que codifica para la hemaglutinina). Esta región del genoma, que no se traduce, resulta ser muy variable probablemente en razón a su inutilidad actual (23).

A partir de los años noventa, se ha desarrollado una metodología de transcripción inversa (ARN-ADN), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de la región amplificada, con la finalidad de estudiar el grado de variación del genoma en diferentes aislamientos virus de la rabia. De esta manera, se han seleccionado varios pares de iniciadores (cebadores) específicos, que permiten analizar las diferentes secciones del genoma viral. Es así que para poder comparar aislamientos muy divergentes como

los que corresponderían a sero-genotipos distintos (vg. Rabia clásica, Mokola, Lagos etc.) es preferible utilizar los iniciadores dirigidos contra las secciones que son muy conservadas en el genoma (gene que codifica para la proteína N); mientras que al contrario, si se trata de identificar aislamientos muy próximos entre sí (vg. pertenecientes al Serotipo 1, rabia clásica en diferentes vectores o zonas geográficas), es preferible utilizar los iniciadores dirigidos contra las secciones del genoma que son muy variables (región del pseudogen  $\Psi$ ).

De hecho, se han utilizado paneles de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la nucleocápside (26), para diferenciar entre el virus de la rabia propiamente dicho (sero-genotipo 1) y los otros virus relacionados (Sero-genotipos 2,3,4,5 y 6), y paneles dirigidos contra la glicoproteína para distinguir entre diferentes aislados del sero-genotipo 1 (17, 27).

La noción de las diferencias antigénicas entre cepas de virus de rabia puede ser de particular importancia en la profilaxis de la rabia. La mayoría de las vacunas usadas en humanos para la protección después de la exposición se deriva del virus originalmente aislado y adaptado a cerebros de conejos por Pasteur en 1882. Se asume que esta etapa ha tenido protección cruzada con cepas de campo de rabia en diferentes áreas geográficas para proteger individuos expuestos. Desafortunadamente, el tratamiento antirrábico postexposición no es 100% efectivo. Diversas fallas se han atribuido a baja potencia de la vacuna o tratamiento inoportuno, ocasionalmente, sin embargo las fallas han ocurrido aún cuando la vacuna tenga buena potencia y el tratamiento sea oportuno (28).

Al contrario de los estudios antigénicos, las técnicas de biología molecular son poderosas herramientas para diversos estudios sobre el virus rábico (29). El genoma de la cepa PV se ha clonado y secuenciado completamente (30) y el virus Mokola, que de acuerdo a estudios con anticuerpos monoclonales representa el sero-genotipo más

distinto antigénicamente a rabia, se ha clonado completamente y secuenciado parcialmente (23). La comparación de ambas secuencias ayuda a determinar la base de la antigenicidad particular de estos dos virus y demuestran relaciones significativas entre virus RNA negativos no segmentados (31,32).

Por lo que respecta a la nucleocápside, un gene que codifica para ella fue insertada dentro del genoma de un baculovirus (*Spodoptera frugiperda*). Este producto recombinante posee propiedades nativas de la NC, ya que se ha probado como reactivo en pruebas de inmunoprecipitación e inmunofluorescencia; la expresión en el sistema baculovirus es un sistema seguro, conveniente y barato (33).

Por razones ya mencionadas, la proteína G es una de las más estudiadas con este tipo de técnicas moleculares, por ejemplo, se han sintetizado liposomas a los que se les ha recubierto con glicoproteínas purificadas, que han demostrado proteger ratones contra una infección letal de rabia (34). Por otra parte, el gene que codifica para la proteína G ha sido clonado e insertado en el sistema baculovirus, y esto ha demostrado que este producto conserva las cualidades nativas de la glicoproteína y su aplicación confirió protección a animales de laboratorio induciendo altos títulos de anticuerpos neutralizantes, esto podría permitir una vacuna de subunidades a bajo costo (35). Asimismo se ha determinado la secuencia de aminoácidos de la proteína G, para construir un péptido sintético capaz de inducir anticuerpos neutralizantes (36).

Algunas mutantes de cepas fijas de virus rábico (ERA y CVS), ambas con una sustitución en el aminoácido 333 de la glicoproteína resultan avirulentas para ratones adultos, esto es cuando la arginina es reemplazada por glutamina, glicina, isoleucina, así como metionina, cisteína o serina; por lo tanto la presencia de un aminoácido cargado positivamente, ya sea arginina o lisina en la posición 333 de la glicoproteína es necesario para la virulencia (37).

Una comparación de todas las secuencias realizadas, revela que las cepas fijas de rabia están altamente relacionadas, mostrando entre 90 y 98% de aminoácidos idénticos. La proteína más variable es la G, aún así la mayoría de los aminoácidos mutados están localizados en la zona hidrofóbica, en los segmentos transmembranales o en el dominio citoplásmico hidrofílico y los cambios respecto a las características de cada región.

Es curioso observar que la cepa CVS es claramente distinta de las cepas PV y la ERA las cuales están muy cercanamente relacionadas, este factor se hace evidente por la combinación de las proteínas N, M1, M2 Y G, aunque la PV y el CVS se derivan del aislamiento realizado por Pasteur, mientras que la cepa ERA se aisló en los Estados Unidos, una posible explicación para esta diferencia entre ambas cepas es que el CVS varía de las otras dos por su particular adaptación a cerebro de ratón (22, 38).

Las regiones intergénicas se definen como las existentes entre la secuencia de alto 3' de un mensajero y la de inicio 5'. Como ya se mencionó, 108 genomas RNA negativos no segmentados pueden dividirse en dos diferentes grupos: uno con intergenes constantes tales como el virus de la estomatitis vesícula y el virus Sendai que exhiben el dinucleótido GA y el trinucleótido GAA respectivamente; y otros como los paramixovirus o el virus de la rabia, los cuales muestran regiones intergénicas variables (22, 32).

Los intergenes del virus rábico varían en extensión y composición de nucleótidos. La separación entre la región G y L tiene una extensión de 423 nucleótidos y es particularmente considerable.

La existencia de dos secuencias de sus extremos incrementa la posibilidad de un gene remanente. La presencia de un pseudogene G-L sugiere que el virus de la rabia representa un estado intermedio en la evolución de los Rhabdovirus, localizado entre el virus de la

estomatitis vesicular en el cual el intergene GL esta próximo al dinucleótido GA, y el virus de la necrosis hematopoyética el cual tiene una proteína NV en esa posición. Por la extensión, es interesante notar que la glicoproteína adicional (hemaglutinina) producida por la mayoría de los paramixovirus esta codificada en una región genómica equivalente al intergene G-L (23, 38).

La transcripción del ARN genómico produce secuencialmente, de la extremidad 3' a la extremidad 5' el ARN patrón y ARN mensajero monocistrónicos, cubiertos y poliadenilados que codifican las proteínas N, M1, M2, G y L. Esta transcripción disminuye de 3' a 5', de tal manera que el ARNm que codifica la proteína N es el más abundante en el encéfalo y los cultivos celulares infectados. Además la comparación de las secuencias nucleotídicas de un virus de serotipo I (PV) con aquellas de un serotipo 3 (Mokola) muestra claramente que la zona más conservada del genoma también se sitúa en el gene que codifica la proteína N. El ARNm N, debido a su gran cantidad y a su conservación relativa en el seno de los Lyssavirus, es en consecuencia uno de los principales objetivos de las técnicas de detección de ácidos nucleicos aplicados al diagnóstico. La clonación y la secuenciación previas de varios miembros del género Lyssavirus permiten ahora el desarrollo de estas técnicas. Estos métodos de diagnóstico actualmente están en evaluación y sin duda serán aplicados de manera rutinaria en un futuro próximo. La detección de los ácidos nucleicos virales puede ser:

- a) directa, por simple hibridación molecular con los ácidos nucleicos complementarios a la zona investigada, o
- b) indirecta después de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Técnicamente se depositan en un filtro los ácidos nucleicos amplificados o no extraídos de un tejido biológico sospechoso, y se hibridan a la sonda complementaria.

El sistema de revelación puede ser por autorradiografía, si la sonda se compone de nucleótidos radioactivos o de tipo enzimático (sonda fría). La obtención de una señal durante la etapa de revelación señala la presencia de ácidos nucleicos virales complementarios a la secuencia utilizada como sonda.

La calidad de la toma reviste de primordial importancia para la ejecución de las técnicas de detección de ácidos nucleicos. En efecto, algunas de estas técnicas y en particular PCR tienen una sensibilidad tal que la menor contaminación puede ser revelada (39). Por lo que se refiere a esta técnica el término reacción en cadena de la polimerasa se aplica al proceso bioquímico *in vitro*, mediante el cual las cadenas individuales de ADN blanco son duplicadas por la ADN polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 20 y 30) que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso.

En general, los componentes requeridos para el PCR son: ADN, iniciadores (oligonucleótidos) específicos que flanquean el gene o segmento que actúa como blanco para la amplificación, mezcla de desoxinucleótidos (dNTP's), solución amortiguadora de reacción, y ADN polimerasa (40, 41).

La PCR podría ser empleada como una herramienta fina para confirmar otras técnicas de referencia, ya que actualmente esta prueba requiere de al menos dos días, debido a que la hibridación se lleva a cabo durante toda la noche, posteriormente se realiza el revelado inmunoenzimático con sondas marcadas con digoxigenina. Varias formas de reducir el tiempo de ejecución se están investigando en diferentes laboratorios (41). Por lo que respecta a costo, la PCR se

encuentra en una posición competitiva, aunque esto mejoraría sí el precio de la Taq polimerasa llegase a bajar.

Un aspecto de suma importancia para la PCR, es el diagnóstico *ante mortem* durante ensayos clínicos, o bien durante la cuarentena de animales que han mordido o han sido agredidos, ya que en estos casos técnicas como fluorescencia o inhibición de focos fluorescentes ofrecen resultados poco consistentes (29, 42).

Además, se han realizado ya algunos trabajos en los diferentes continentes acerca de la variación molecular. En Sudáfrica se han determinado las relaciones filogenéticas entre los virus de rabia aislados de huéspedes canídeos (chacales, zorros y perros), factores geográficos también se tomaron en cuenta, para ello se utilizaron tres regiones del genoma, siendo éstos, el dominio citoplásmico del gene G, el pseudogene intergénico G-L y el dominio antigénico II del gene N. Se detectaron diferencias entre huéspedes vivérridos (mangostas) y los canídeos (43,44).

Estudios similares se llevaron a cabo además de las especies anteriores en zorros; el virus de las mangostas es filogenéticamente lejano de las cepas de rabia que contienen las vacunas que usan en Europa (45, 46, 47).

La rabia en Canadá persiste principalmente en dos especies: el zorro rojo y el zorrillo. Estudios previos realizados con anticuerpos monoclonales fallaron en identificar diferencias específicas entre huéspedes, pero ciertas observaciones sugieren la existencia de más de un tipo viral, por lo que estas muestras se volvieron a estudiar, y se confirmó que no hubo variación entre huéspedes en la posición N del genoma viral, sin embargo existieron diferencias consistentes del virus proveniente de diferentes regiones geográficas (48). Más tarde, realizaron el



estudio de un brote en la región de Ontario, y se demostró que dos de cuatro variantes que habían sido previamente identificadas en otra región, se presentaban ahora también en Ontario (49).

### **V. Tipificación de virus rábico, mediante el análisis del polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLP), y secuenciación**

El RFLP es un método muy moderno, en el que usando una batería de cuatro enzimas de restricción, es posible discernir entre los dos ciclos epidemiológicos de la rabia (50,51). Esta metodología se combina con la PCR, la cual se revela también como una herramienta muy fina, capaz de discriminar en el seno de las cepas de Lyssavirus, contrariamente a la aplicación diagnóstica expuesta anteriormente. También permiten completar estudios epidemiológicos ya desarrollados con anticuerpos monoclonales. Con este objeto se escoge amplificar la zona del pseudogen  $\Psi$  (29) que es una zona no codificante del genoma rábico altamente variable(31).

El protocolo general incluye a grandes rasgos, lo siguiente:

#### *1. Colección de las muestras*

Se obtiene un fragmento de encéfalo en un tubo de plástico, los cuales pueden almacenarse a  $-70^{\circ}$  C. En muchos laboratorios, el virus es pasado a cerebro de ratón o a cultivos celulares, los cuales también pueden ser empleados. Se ha demostrado que los resultados de las secuencias del fragmento amplificado no cambian, a menos que se le den más de 20 pases (42).

#### *2. Extracción de RNA*

El RNA se extrae usando el método de fenol-cloroformo (52). Después de precipitar y lavar, el RNA se suspende en agua pirolizada.

### *3. Síntesis de DNA complementario y amplificación por PCR*

El ADN complementario se produce mediante el empleo de la enzima transcriptasa reversa, con el propósito de hacer una cadena complementaria al ARN obtenido. Asimismo, la PCR se lleva a cabo para obtener múltiples copias de la región del pseudogen  $\Psi$ , que en este caso es el fragmento que se quiere amplificar (53).

### *4. Detección de amplicones*

Los productos amplificados pueden ser visualizados directamente en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE, que contenga bromuro de etidio, empleando luz ultravioleta (312 nm) (42).

### *5. Método para el análisis de los amplicones, mediante RFLP*

Para la tipificación de los virus, se toma cada uno de los fragmentos amplificados y se digieren con un panel de enzimas de restricción, dos que identifican la variante de murciélago hematófago o vampiro (ciclo aéreo) que son BsaW I y BsrG I (ambas enzimas señalan una sola mutación con respecto a la variante de perro). Las endonucleasas que identifican a esta última (ciclo terrestre) son, la BamH I Y la Stu I (que muestran una doble mutación con respecto a las variantes terrestres (54). Posteriormente se observan en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE; de este modo se discrimina entre ciclo aéreo y terrestres respectivamente, dependiendo el corte de cada una de las enzimas.

### *6. Secuenciación*

Se hacen reacciones cíclicas con taq polimerasa usando el Omnigene (Hybaid). Los productos de PCR se purifican mediante columnas de cromo, para posteriormente proceder a secuenciar por el método enzimático (54).

## **VI. Caracterización antigénica y molecular del virus de la rabia en México**

En el Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria del INIFAP se realizó un estudio de caracterización antigénica con un panel reducido de anticuerpos monoclonales antinucleocápside (que detecta diferencias entre sero/genotipos). Se analizaron alrededor de 120 aislamientos positivos a rabia mediante inmunofluorescencia directa determinándose que sólo circula el serotipo 1, a pesar de haber detectado ligeras diferencias en el patrón de reactividad de algunas de las muestras (55,56,57); sin embargo, con el uso de este panel no puede saberse el origen de la especie agresora.

Por otro lado, también se utiliza la tipificación del virus rábico empleando RFLP, ya que su uso de rutina provee indicios potenciales para el origen de las epizootias, puesto que la utilidad de un análisis molecular en investigaciones epidemiológicas depende de la capacidad y disponibilidad de un método efectivo para diferenciar entre variantes del virus.

Usando RFLP se han analizado varias muestras positivas a rabia por inmunofluorescencia directa, provenientes de diversas especies y regiones geográficas (Figura 1). En estos 60 aislamientos, se obtuvieron inesperadamente tres patrones de digestión (Cuadro 1). El primer patrón lo presentaron las muestras que corresponden a la variante vampiro (virus de ciclo aéreo). El segundo patrón lo presentaron las muestras que pertenecieron a la variante perro (ciclo terrestre), y en forma inesperada, se detectó un tercer patrón en cinco muestras en donde ninguna enzima tuvo efecto y que correspondían a cuatro zorrillos y un bovino del Noroeste y Centro del país, a estas muestras se les denominó hipervariables (51).

Después de haber secuenciado al menos 192 nucleótidos del ectodominio de la proteína G, pudo obtenerse un árbol filogenético

mediante el programa TREETOOL (Figura 2) (58). En este árbol se observa lo siguiente: con respecto al ciclo terrestre (variante perro) se aprecia que existen 2 subvariantes: México I que esta diseminada en todo el territorio mexicano, en varias áreas como en los estados de Durango, Chihuahua (muestras 36-39), y Puebla (muestra 51); parece ser que se ha diseminado ocasionalmente a coyotes, lo cual puede representar localmente un vector para la transmisión de la enfermedad para animales domésticos. La subvariante México II se restringe al Centro del país y Estado de México, sobreponiéndose a la México I. Además se ha demostrado la presencia de variantes en la fauna silvestre mexicana, que son: México III representada por zorros y lince de Chihuahua y Sonora. Estas variantes fueron reconocidas por la RFLP como ciclo terrestre. Sin embargo la variante IV encontrada en zorrillos y un bovino de Baja California Sur (muestras 40-43, 52) respectivamente; y la variante México V también presente en zorrillos del Centro del país (Aguascalientes) (muestra 55) fueron reconocidas como diferentes a las variantes tradicionales usando RFLP, obteniéndose el patrón llamado hipervariable. Cabe mencionar que las variantes de zorrillo que se presentan en México son genéticamente distintas a las que se presentan en Estados Unidos en esta misma especie; además se ha comprobado que presentan características antigénicas y biológicas diferentes a los ciclos epidemiológicos ya descritos en el país (terrestre y aéreo) (59).

Por lo que concierne al ciclo aéreo (variante vampiro) presenta una homogeneidad genética mucho más marcada que el ciclo terrestre, a excepción de una muestra de murciélago insectívoro *Tadarida brasiliensis* mexicana (muestra 59), la cual forma una rama aparte en el árbol filogenético, pero con RFLP no hubo ninguna diferencia en el patrón de digestión. Estadísticamente hay dos subvariantes una que está ampliamente diseminada, y otra que esta confinada a la región de Tejupilco, Estado de México (58). Asimismo

es de hacerse notar que la especie más afectada por el ciclo aéreo es la bovina, lo cual causa severas pérdidas económicas en la ganadería nacional (9), y la humana de la cual se ha convertido en la segunda especie agresora después del perro (60).

## VII. Conclusiones

Con los resultados obtenidos se hace patente que en México:

Además de los ciclos ya conocidos (terrestre y aéreo) se describen por primera vez otros ciclos epidemiológicos que no habían sido descritos previamente, como lo son:

En la variante perro (ciclo terrestre) existen dos subvariantes, México I diseminada en todo el territorio mexicano y México II, encontrada en el Centro del país y Estado de México. Así en este mismo ciclo, pero en la fauna silvestre se encontraron un ciclo que circula en los zorros y lince (México III), y dos ciclos en zorrillos, México IV y V, los cuales están presentes en el Noroeste y Centro del país respectivamente, y que se ha comprobado que afectan a animales domésticos y humanos. Dado que la variante zorrillo difiere casi un 20% en su genoma de los ciclos ya conocidos, sería recomendable realizar pruebas de protección cruzada con vacunas comerciales para saber el nivel de protección que estas ofrecen, pues cabe la posibilidad de fallas en la vacunación.

En la variante vampiro (ciclo aéreo) se presenta una homogeneidad más compacta en el genoma del virus de la rabia, con excepción de un murciélago insectívoro *T. brasiliensis*.

Es de hacerse notar la utilidad de la RFLP, la cual provee de una manera sencilla un método eficaz para diferenciar entre las variantes de perro, vampiro y zorrillo, lo cual es importante para llevar a cabo estudios de epidemiología molecular, sin demasiada, infraestructura.

### **Agradecimientos**

Los autores agradecen a los Dres. Noel Tordo y Chokri Bahloul del Instituto Pasteur, Pads Francia, por su generosidad al brindarnos sin restricciones todos sus conocimientos y técnicas sobre el estudio del genoma del virus de la rabia.

CUADRO 1  
 REPRESENTACIÓN DE LOS PATRONES  
 DE DIGESTIÓN OBTENIDOS MEDIANTE RFLP.

Muestra	Especie	Origen	Patrón de Digestión (RFLP)			
			BsaWI	BsrGI	BamHI	StuI
PV		Cepa vacunal	-	-	+	+
ERA		Cepa vacunal	-	-	+	+
CVS		Cepa vacunal	-	-	+	+
CASS	Vampiro	Cepa desafío	+	+	-	-
1	Bovino	Chiapas	+	+	-	-
2	Bovino	México DF	-	-	+	+
3	Bovino	Tlaxcala	-	-	+	+
4	Bovino	Oaxaca	+	+	-	-
5	Bovino	Michoacán	-	-	+	+
6	Bovino	Veracruz	+	+	-	-
7	Bovino	Oaxaca	+	+	-	-
8	Bovino	Yucatán	+	+	-	-
9	Bovino	Veracruz	+	+	-	-
10	Bovino	Veracruz	+	+	-	-
11	Ovino	Tlaxcala	-	-	+	+
12	Bovino	San Luis Potosí	+	+	-	-
13	Bovino	Tabasco	+	+	-	-
14	Bovino	Oaxaca	+	+	-	-
15	Vampiro	Edo. de Méx. - Tejupilco	+	+	-	-
16	Cabra	Tlaxcala	-	-	+	+
17	Porcino	México, DF	-	-	+	+
18	Perro	Edo. de Méx. - Tejupilco	+	+	-	-
19	Zorro	Sonora	-	-	+	+
20	Humano	México, DF	-	-	+	+
21	Humano	México, DF	-	-	+	+
22	Gato	Puebla	-	-	+	+
23	Perro	México, DF	-	-	+	+
24	Bovino	Puebla	-	-	+	+
25	Perro	Michoacán	-	-	+	+
26	Equino	Michoacán	-	-	+	+
27	Perro	México, DF	-	-	+	+
28	Perro	Durango	-	-	+	+
29	Gato	México, DF	-	-	+	+
30	Equino	Edo. De Méx.	-	-	+	+
31	Equino	Querétaro	-	-	+	+

Muestra	Especie	Origen	Patrón de Digestión (RFPL)			
			BsaWI	BsrGI	BamHI	StuI
32	Equino	Edo. De Méx.	-	-	+	+
33	Zorrillo	Baja Calif.Sur	-	-	-	-
35	Coyote	Puebla	-	-	+	+
36	Coyote	Chihuahua	-	-	+	+
37	Zorrillo	Baja Calif.Sur	-	-	-	-
38	Perro	México, DF	-	-	+	+
39	Gato	Tabasco	-	-	+	+
40	Zorrillo	Baja Calif.Sur	-	-	-	-
42	Bovino	Edo. de Méx.	-	-	+	+
41	Bovino	Edo. De Méx.	-	-	+	+
43	Bovino	Puebla	-	-	+	+
44	Bovino	Durango	-	-	+	+
45	Bovino	Chihuahua	-	-	+	+
46	Bovino	Puebla	-	-	+	+
47	Bovino	Chihuahua	-	-	+	+
48	Equino	Tlaxcala	-	-	+	+
49	Coyote	Chihuahua	-	-	+	+
50	Bovino	Veracruz	+	+	-	-
51	Equino	Puebla	-	-	+	+
52	Bovino	Baja Calif.Sur	-	-	-	-
53	Zorro	Sonora	-	-	+	+
54	Equino	México, DF	-	-	+	+
55	Zorrillo	Aguascalientes	-	-	-	-
56	Lince	Sonora	-	-	+	+
58	Vampiro	Edo.deMéx.- Tejupilco	+	+	-	-
59	Tadarida	Veracruz	+	+	-	-
60	Humano	Edo.deMéx.- Tejupilco	+	+	-	-

Muestra 34 no trabajada



W.

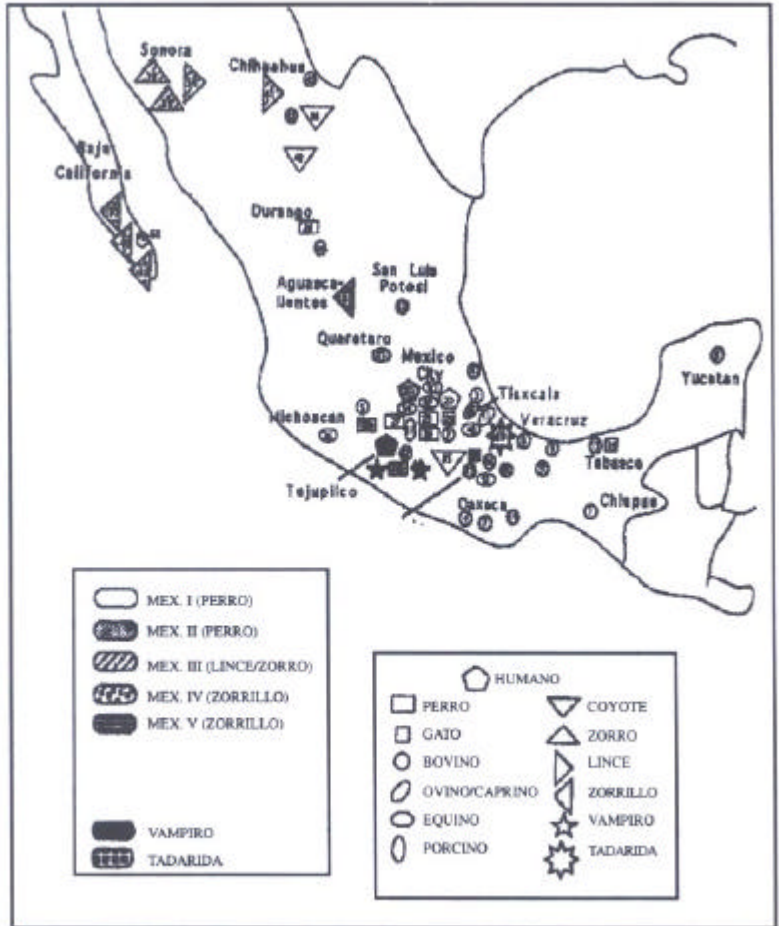


Fig. 1. Representación esquemática de la procedencia geográfica y de especies de las diferentes muestras positivas a rabia.

X.

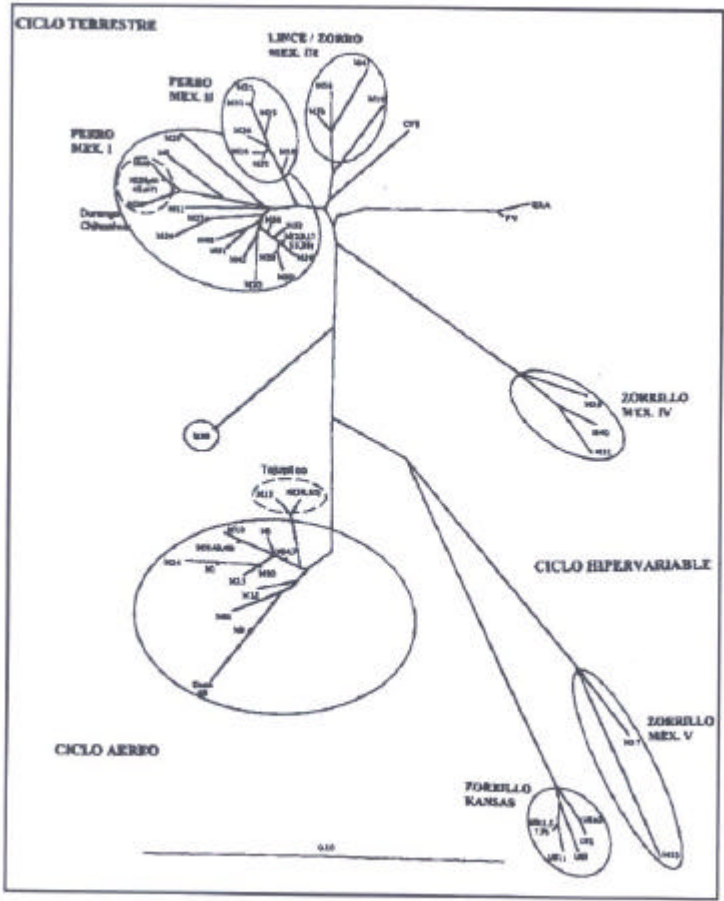


Fig.2. Árbol filogenético obtenido con el programa Treetool, después de la secuenciación, representando los ciclos epidemiológicos que existen en México.

**Referencias**

1. **Wilkinson, L.:** Understanding the nature of rabies: An historical perspective. In: Campbell JB, Charlton KM (eds). Rabies. Kluwer Ac. Publ. Boston. pp. 1-10, 1988.
2. **Baer, G.M.:** Rabia. La Prensa Medica Mexicana. México. pp.370, 1982.
3. **Cervantes, R.J.:** Importancia de la vacunoterapia en la prevención de la rabia. En Simposio. La atención medica de las personas involucradas en un incidente de rabia. OPS-IMSS-SSA. México. pp. 10-17, 1987.
4. **Rupprecht, C.E., Kieny, P.:** Development of a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. In: Campbell JB, Charlton KM (eds). Rabies. Kluwer Ac. Publ. Boston. pp. 335364, 1988.
5. **Fenner, F., Bachman, P.A., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Studdert, M.J., White, O.:** Veterinary Virology. Ac. Press Inc. London. pp.254, 1987.
6. **Ramírez, VM.:** Los mecanismos de exposición e infección rábica en el ciclo silvestre. En Simposio. La atención medica de las personas involucradas en un incidente de rabia. OPS-IMSS-SSA. México. pp.51-84, 1987.
7. **Vargas, G.R., Cárdenas, L.J.:** Epidemiología de la rabia : Situación actual en México. En: Moreno, Ch.R. (ed). Ciencia Veterinaria 7: 332-358, 1996.
8. **Flores, C.R.:** Rabia en humanos transmitida por murciélagos vampiros en países de América. Tec. Pecu. Mex. 29 (1): 25,

9. **Martínez-Burnes, J., López, A., Medellín, J., Hanes, D., Loza, E, Martinez, M.:** An outbreak of vampire bat-transmitted rabies in cattle in northeastern Mexico. *Can. Vet. J.* 38 :175, 1997.
10. **King, A., Crick, J.:** Rabies related viruses. In: Campbell JB, Charlton KM (eds). *Rabies*. Kluwer Ac. Publ. Boston. pp. 165174, 1988.
11. **Wandeler, A.I., Budde, A., Capt, S., Kappeler, A., Matter, H.:** Dog ecology and dogs rabies control. *Rev. Infect. Dis.* 10: S684-S688, 1988.
12. **World Health Organization.:** Guideliness for dog rabies control. WHO. Geneve, 1984.
13. **Walker, P.J., Wang, Y., Cowley, J.A., Mc Millan, S.M., Prehaud, J.N.:** Structural and antigenic analysis of the nucleoprotein of bovine ephemeral fever rhabdovirus. *J. Gen. Viral.* 75 :1889-1899, 1994.
14. **Tordo, N.:** Infections virales du systeme nerveaux central: syndromes cliniques aigus du SNC; Rhabdovirus; virus de la rage. In: Crainic R, Nicolas M (eds). *Cours de virologie*. Centre national d' enseignement á distance. Vanves. pp.317-333, 1992.
15. **Bishop, D.H.L., Smith, M.S.:** Rhabdovirus. In: Prosad DN, Dekker M (eds). *The molecular biology of animal viruses*. Marcel Dekker Inc. U.S.A. pp. 542,1977.
16. **Aguilar, S.A., Kretschmer, S.R.:** Anticuerpos monoclonales en enfermedades de origen viral. *Salud Publica Méx.* 27:251, 1985.

17. **Dietzschold, B., Rupprecht, C.E., Tollis, M., Lafon, M., Mattei, J., Wiktor, T.J., Koprowski, H.:** Antigenic diversity of the glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies related viruses: Implications for epidemiology and control rabies. *Rev. Infect. Dis.* 10: S785-S798, 1988.
18. **Montaño, H.J.A., Bourhy, H., Lafon, M.:** A reduced panel of antinucleocapsid monoclonal antibodies for bat rabies virus identification in Europe. *Res. Virol.* 141 :571, 1990.
19. **Bourhy, H., Kissi, B., Tordo, N.:** Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virology.* 194:70-81, 1993.
20. **Wagner, R.R., Rose, J.K.:** Rhabdoviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds), *Fields Virology*. 3aed, Raven Publishers, Philadelphia. pp.1121-1135, 1996.
21. **Crick, J.:** Rabies virus genome. In: Kuwert E, Mérieux C, Koprowski H, Bagel K (eds). *Rabies on the tropics*. Springer-Verlag. Germany. pp.13-21, 1988.
22. **Wiktor, T.J., Kieny, P., Lathe, R.:** New generation of rabies vaccine. Vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus. In: Kurstak E, Marusyk RG, Murphy FA, Van Regenmortel MHV (eds). *Applied Virology Research*. Plenum Publishing Co. U.S.A. pp.306, 1988.
23. **Tordo, N., Poch, O.:** Structure of rabies virus. In Campbell JB, Charlton KM (eds). *Rabies*. Kluwer Ac. Publ. Boston. pp.25-45, 1988.
24. **Montaño, H.J.A., Mata, V.A.E.:** Estructura antigénica y mecanismos de infección del virus de la rabia. En : Moreno, Ch.R. (ed). *Ciencia Veterinaria* 7: 68-91, 1996.

25. **Coulon, P., Rollin, P., Aubert, M.F.A., Flamand, A.:** Molecular basis of rabies virus virulence. I. Selection of avirulent mutants of the CVS strain with anti G monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 6:97,1982.
26. **Flamand, A., Wiktor, T.J., Koprowski, H.:** Use of hybrid om a monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies related virus proteins. I. The nucleocapsid protein. *J. Gen. Virol.* 48:97, 1980.
27. **Flamand, A., Wiktor, T.J., Koprowski, H.:** Use of hybrid om a monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies relate d virus proteins. II. The glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 48: 105, 1980.
28. **Wiktor, T.J., Koprowski, H.:** Antigenic variants of rabies virus. *J. Exp. Med.* 152:99, 1980.
29. **Sacramento, D., Bourhy, H., Tordo, N.:** PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Mol. Cell. Probes.* 5 (3): 229, 1991.
30. **Tordo, N., Bourhy, H., Sacramento, D.:** Rhabdoviruses: classification, structure, general mechanisms, molecular epidemiology. *Ann. Res. Vet.* 21 (4): 310, 1989.
31. **Bourhy, H., Sureau, P., Tordo, N.:** From rabies to rabies-related viruses. *Vet. Microbiol.* 23:115, 1990.
32. **Barik, S., Rud, E.W., Luk, D., Banerjee, A.K., Kang, C.Y.:** Nucleotid sequence analysis of the L gene of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype): Identification of conserved domains in L proteins of nonsegmented negative-strands RNA viruses. *Virology* 175 (1): 332,

33. **Reid-Sanden, F.L., Sumner, J.W., Smith, J.S., Fekadu, M., Shaddock, J.H., Bellini, W.J.:** Rabies diagnostic reagents prepared from a rabies N gene recombinant expressed in baculovirus. *J. Clin. Microbiol.* 28 (5): 858,
34. **Kawano, H., Mifune, K., Ohuchi, M., Mannen, K., Cho, S. Hiramatsu, K., Shichijo, A.:** Protection against rabies in mice by cytotoxic T cell clone recognizing the glycoprotein of rabies virus. *J. Gen. Viral.* 71 (2): 281,1990.
35. **Prehaud, C., Takehara, K., Flamand, A., Bishop, D.H.L.:** Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vectors. *Viral.* 173 (2): 390, 1989.
36. **Bunschoten, H.:** The immune response to rabies virus idiotypes and regulation. Thesis Master. Faculty of Veterinary Medicine. Netherland. pp.160, 1989.
37. **Thffereau, C., Leblois, H., Benejean, J., Coulon, P., Lafay, F., Flamand, A.:** Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. *Virology* 172 (1): 206, 1989.
38. **Wunner, W.H., Larson, J.K., Dietzschold, B., Smith, C.L.:** The molecular biology of rabies virus. *Rev. Infect. Dis.* 10: S771,
39. **Bourhy, H., Sureau, P.:** Methodes de laboratoire pour le diagnostic de la rage. Institut Pasteur, France. pp. 153, 1989.
40. **Barrera, S.H.A., Ortiz, P.R., Rojas, M.A., Resendez, P.D.:** Reacción en cadena de la polimerasa. Una nueva época dorada en la biología molecular. *Ciencia y Desarrollo.* Feb:50,1992.

41. **Lewin, B.:** Genes V. Oxford University Press, Oxford. pp. 633, 1995.
42. **Tordo, N., Bourhy, H., Sacramento, D.:** PCR technology for Lyssavirus diagnosis. In: Clewley, J.P. (ed). The polymerase chain reaction for human diagnosis. CRC press. London. pp. 125-145, 1995.
43. **Nel, L.H., Thomson, G.R., Teichman, B.F. von, Yon Teichman, B.F.:** Molecular epidemiology of rabies virus in South Africa. Onder. J. Vet. Res. 60 (4): 301, 1993.
44. **Teichman, B.F. von, Thomson, G.R., Meredith, C.D., Nel, L.H., Yon Teichman, B.F.:** Molecular epidemiology of rabies in South Africa: evidence for two distinct virus groups. J. Gen. Virol. 76 (1): 73, 1995.
45. **Sacramento, D., Badrane, H., Bourhy, H., Tordo, N.:** Molecular epidemiology of rabies in France: comparison with vaccine strains. J. Gen. Virol. 73:1149, 1992.
46. **Chomel, B.B.:** The modern epidemiological aspects of rabies in the world. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 16: 1, 1993.
47. **Kulonen, K., Boldina, I.:** Differentiation of two rabies strains in Estonia with reference to recent Finnish isolates. J. Wldl. 29 (2): 209, 1993.
48. **Nadine-Davis, S.A., Casey, G.A., Wandeler, A.:** Identification of regional variants of the rabies virus within the Canadian province of Ontario. J. Gen. Virol. 74 (5): 829, 1993.
49. **Nadine-Davis, S.A., Casey, G.A., Wandeler, A.I.:** A molecular epidemiological study of rabies virus in central Ontario and western Quebec. J. Gen. Virol. 75 (10): 2575, 1994.



50. **Badrane, H., Bahloul, C., Castignolles, N., Chambert, B., Gontier, C., Jacob, Y.:** Et vaccinologie des Lyssavirus. Annales del'Institute Pasteur.Actualités. 6:3, 1995.
51. **Loza-Rubio, E., Bahloul, C., Aguilar-Setién, A., Badrane, H., Tordo, N.:** RFLP, as an alert tool to identify new epidemiological cycles on terrestrial wildlife species in Mexico. International Rabies Meeting. Institut Pasteur, Paris, France. March, 1997.
52. **Smith, J.S., Fishbein, D.B., Rupprecht, C.E., Clark, K.:** Unexplained rabies in three immigrants of the United States. A virologic investigation. N. Engl. J. Med. 324:205, 1991.
53. **Tordo, N., Badrane, H.:** Molecular epidemiology of wild isolates of Lyssaviruses. Course of virology. Instituto Gulbenkian. Inst. Pasteur.pp.27, 1995.
54. **Bahloul, C.:** Immunisation génique : Immunogenicité de la glycoprotéin rabique et vaccines élargis auxLyssavirus. These de doctorat. Université Paris XI. Paris. pp. 153, 1997.
55. **Loza, R.E.:** Detección de variantes antigénicas del virus de la rabia provenientes de diversas regiones de México, identificadas por anticuerpos monoclonales. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp.42, 1992.
56. **Aguilar-Setién, A., Loza-Rubio, E., Ramos, R.L., León, C. Y., Espinosa, L.E:** Identification of an atypical rabies strain in Mexico. Arch. of Med. Res. 25 (1): 54, 1994.
57. **Loza-Rubio, E., Vargas, G.R., Hernández, B.E., Batalla, C.D., Aguilar-Setién, A.:** Evaluación en México de un panel reducido

de anticuerpos monoclonales, preconcebido para la tipificación de diferentes *Lyssavirus*. *Bol. de la Of. San it. Panam.* 119 (5): 391, 1995.

58. **Bahloul, C., Badrane, H., Sacramento, D., Morgeaux, S., Loza-Rubio, E., Brochier, B., Perrin, P., Gavilán-Salinas, A., Aguilar-Setién, A., Pastoret, P.P., Tordo, N.** Molecular epidemiology of rabies and cross protection studies in Latin America. (*Submitted*), 1997.
59. **Loza-Rubio, E., Ramos R.L., Espinosa, L.E.L., De Paz, V.O., Campos, L.Y., Aguilar-Setién, A.**: Studies on replixcation of PV, CASS-88 and skunk rabies strain in vitro (NB, BHK-21 cell) and in vivo (mice). The 8th Annual Rabies in the Americas Conference, *Queen's University*. Kingston, Canada, November, 1997.
60. **Garza, R.J.**: Prevention and control of rabies in Mexico: Current strategies. The 8<sup>th</sup> Annual Rabies in the Americas Conference, *Queen's University*. Kingston, Canada, November, 1997.