



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA**

**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN**



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE LA  
RABIA EN EL ESTADO DE MEXICO**

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA  
**Q.F.B. FERNANDO GUADALUPE BASTIDA GONZÁLEZ**

**Directores de Tesis:**

Dr. José Leopoldo Aguilar-Faisal

Dra. Paola Berenice Zárate-Segura

**Noviembre, 2011**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de     México     siendo las   10:00   horas del día   28   del mes de   Noviembre   del   2011   se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la           E.S.M           para examinar la tesis titulada:

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE LA RABIA EN EL ESTADO DE MÉXICO”**

Presentada por el alumno:

**Bastida**  
Apellido paterno

**González**  
Apellido materno

**Fernando Guadalupe**  
Nombre(s)

Con registro: 

A	1	0	0	9	3	4
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISIÓN REVISORA**

Directores de tesis

\_\_\_\_\_  
**Dra. Paola Berhice Zarate Segura**

\_\_\_\_\_  
**Dr. José Leopoldo Aguilar Faisal**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Ángel Millar García**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Eleazar Lara Padilla**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Rodrigo Balam Muñoz Soto**

**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Eleazar Lara Padilla**  
  
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA  
I.P.N.  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
DE INVESTIGACIÓN  
CONTROL ESCOLAR



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México el día 28 del mes noviembre del año 2011, el que suscribe Bastida González Fernando Guadalupe alumno del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud con número de registro A100934 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Paola Berenice Zarate Segura, Dr. José Leopoldo Aguilar Faisal y cede los derechos del trabajo intitulado “CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE LA RABIA EN EL ESTADO DE MÉXICO”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección mijomeil@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
Fernando Guadalupe Bastida González

Nombre y firma

## **Declaración de originalidad**

“Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.”

Fernando G. Bastida-González

Vo. Bo. del director o directores de tesis.

Dr. Leopoldo Aguilar-Faisal

Dra. Paola Berenice Zárate-Segura

## Comité Tutorial

Dr. Leopoldo Aguilar-Faisal (1) (CO-DIRECTOR)

Dra. Paola B. Zárate Segura (1, 2) (CO-DIRECTOR)

Dra. Evangelina Muñoz

Dr. Eleazar Lara Padilla

Dr. Angel Miliar

(1) Laboratorio Medicina de Conservación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Colonia de Santo Tomás, México.

(2) Departamento de Bioprocesos, Unidad Profesional Interdisciplinario de Biotecnología, Instituto Politecnico Nacional, Av Acueducto S/N La Laguna Ticomán.

El trabajo de esta tesis se realizó en los laboratorios del departamento de Medicina de Conservación (LMC) en la Escuela Superior de Medicina, en las instalaciones del Laboratorio Estatal de Salud Publica del Estado de México, en colaboración con la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, bajo la Co-dirección del **Dr. Leopoldo Aguilar-Faisal y Dra. Paola Berenice Zárate-Segura.**

Para el desarrollo de esta tesis de Maestría se tuvo el apoyo de beca PIFI y del proyecto SIP No 20110501, así como recursos propios de la Dra. Paola B. Zárate Segura.

## Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Generalidades del Virus de la rabia</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1 Estructura y clasificación</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2 Patogenia</b>	<b>5</b>
<b>1.1.3 Replicación del virus de la Rabia</b>	<b>5</b>
<b>1.1.4 Vías de Infección</b>	<b>9</b>
<b>1.1.5 Tipos de Rabia</b>	<b>9</b>
<b>1.1.5.1 Rabia furiosa</b>	<b>10</b>
<b>1.1.5.2 Rabia paralítica</b>	<b>11</b>
<b>1.1.6 Rabia en Animales</b>	<b>12</b>
<b>1.1.7 Tratamiento</b>	<b>17</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Antecedentes de la Rabia en México</b>	<b>19</b>
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>27</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>28</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>5.1 Objetivo General</b>	<b>29</b>
<b>5.2 Objetivos Específicos</b>	<b>29</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>30</b>
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>38</b>
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>45</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>53</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>54</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1. Representación esquemática del virus de la rabia</b>	<b>2</b>
<b>Figura 2. Genoma del virus de la Rabia</b>	<b>3</b>
<b>Figura 3. Ciclo de replicación del virus de la rabia</b>	<b>8</b>
<b>Figura 4. Fase clínica, duración promedio y toma de muestra</b>	<b>16</b>
<b>Figura 5. a) Muestra positiva a rabia por inmunofluorescencia</b>	<b>38</b>
<b>Figura 5. b) muestra negativa a rabia por inmunofluorescencia</b>	<b>38</b>
<b>Figura 6. A Alineamiento de secuencias del gen N del virus de la rabia e iniciador RABN1 con Mega 5.0</b>	<b>39</b>
<b>Figura 6. B. Diseño de Iniciadores con el programa Vector NTI a partir de las secuencias del gen N</b>	<b>39</b>
<b>Figura 7. Electroferograma de una clona</b>	<b>41</b>
<b>Figura 8. Análisis electroforético de los amplicones perro y murcielago externos e internos.</b>	<b>42</b>
<b>Figura 9. Análisis electroforético de los amplicones vampiro y zorrillo externos e internos.</b>	<b>42</b>
<b>Figura 10. Curvas melting de las variantes de acuerdo al hospedero.</b>	<b>43</b>
<b>Figura 11. Árbol taxonomico generado con el algoritmo neighbor-joining.</b>	<b>44</b>
<b>Figura 12. Variantes antigénicas reportadas del estado de Mexico y su distribución.</b>	<b>45</b>
<b>Figura 13. Árbol taxonomico generado con el algoritmo neighbor-joining.</b>	<b>58</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1: Genotipos del género Lyssavirus</b>	<b>5</b>
<b>Tabla 2: Tratamiento posexposición.</b>	<b>18</b>
<b>Tabla 3. Casos reportados de rabia en especies silvestres de 1996 al 2002.</b>	<b>23</b>
<b>Tabla 4(1). Variantes antigénicas identificadas en el país.</b>	<b>23</b>
<b>Tabla 5. Iniciadores para la detección de virus de la rabia en PCR punto final.</b>	<b>25</b>
<b>Tabla 6. Iniciadores para la detección de genotipos de RABV en PCR punto final.</b>	<b>26</b>
<b>Tabla 7. Iniciadores externos usados para la detección de las variantes del virus de la rabia.</b>	<b>41</b>
<b>Tabla 8. Iniciadores internos usados para la detección de las variantes del virus de la rabia</b>	<b>42</b>
<b>Tabla 9: Ensayos convencionales de PCR basados en análisis electroforético para la detección de lissavirus.</b>	<b>49</b>

## RESUMEN

El Virus de la rabia es el miembro más diseminado y epidemiológicamente importante del género lyssavirus y es el único taxón que sea documentado en el Continente Americano. Varias variantes específicas del virus de la rabia se han caracterizado de diferentes huéspedes mamíferos, como perros, zorros, coyotes, mapaches, mofetas, así como numerosas especies de murciélagos frugívoros, insectívoros y hematófagos. Hoy día, muchos de los estudios moleculares se han enfocado al gen N, estos estudios han permitido tener una idea mas clara sobre la relación virus- reservorio, los patrones de transmisión y difusión, así como la evolución viral. El objetivo de este estudio fue determinar las variantes genéticas de los virus de la rabia (RV) presentes en muestras del el Estado de México por reservorio. Se utilizaron muestras de cerebro positivas a rabia por inmunofluorescencia directa (IFD) y con una tipificación con anticuerpos monoclonales (MABS) previa (INDRE). La detección por hnRT-PCR y RT-PCR con Syber green se hicieron con el diseño de iniciadores propios del grupo de trabajo Para confirmar la detección de productos de PCR fueron secuenciados e identificados en BLAST de la base de datos NCBI. En la determinación de variantes antigénicas con anticuerpos monoclonales para muestras de perro se obtuvieron seis V1 Perro-mangosta, éste resultado concordó con el RT-PCR Y SYBR GREEN con los iniciadores de perro en un 100%, así como la muestra detectada en zorrillo con iniciadores de zorrillo. Por otra parte en las muestras de bovino en donde la detección por MABS fue V8 zorrillo, el host determinado por hnRT-PCR y sybr green fue positivo con los iniciadores de vampiro la muestra determinada como atípica y en la muestra no determinada por MABS se logró la detección por HnRT-PCR y sybr green dando positiva con los iniciadores murcielago. Demostrando así la especificidad de la detección de variantes del RV dependiendo del reservorio con la técnica propuesta en este estudio. Los resultados obtenidos de nRT-PCR y SYBR Green coincidió con un 100% contra IFD y el 80% con MABs.

## **ABSTRACT**

*Rabies virus* is the most widespread and epidemiologically important member of the genus and the only taxon documented in America. Several specific Rabies virus variants have been characterized from different mammalian hosts, such as dogs, foxes, coyotes, raccoons, skunks, and multiple species of frugivorous, insectivorous, and hematophagous bats. Nowadays, many molecular studies have been performed targeting of the N gene, this data have permitted insights to virus-reservoir relationships, patterns of transmission and dissemination, as well as viral evolution. Brain samples were using in this study tested positive by FAT and Monoclonal variants (INDRE) collected in Mexican State. hnRT-PCR and RT-PCR Syber green detection were done with own primer design in complete sequence of N gene rabies virus (genomic databases NCBI) concededly dog, skunk, non hemetophage bat and vampire bat as host. To confirm detection PCR products were sequenced and identificados in BLAST of the NCBI database. All of the brain samples from rabid animals, diagnosed as positive in the FAT test, signaled positive in the nRT-PCR and RT-PCR SYBR Green. To confirm the specificity of the both methods, they were carried out with the additional genotype 1 prototype laboratory strain CVS, used as a positive control. Real-time RT-PCR used primers of internal semi-nested end-point RT-PCR. In the characterization of the antigenic variants (AgV) with MABs in the dog sample, the dog primers identified the Variant dog (AgV1). This result matched with both the nRT-PCR and SYBR Green primers a 100%. Similarly, the skunk samples matched the same percentage with the skunk primers. On the other hand, in the bovine samples where the MABs detection identified the skunk Variant (AgV8), the determined host by nRT-PCR and SYBR Green diagnosed as positive with the vampire primers. The last two samples, the one determined as atypical and the one not determined with the MABs, the nRT-PCR and SYBR Green diagnosed as positive with the bat primers; proving thus the specificity of the RV variant detection depending on the host with he present study proposal. nRT-PCR and SYBR Green detection matched a 100% with the FAT and 80% with the MABs results.

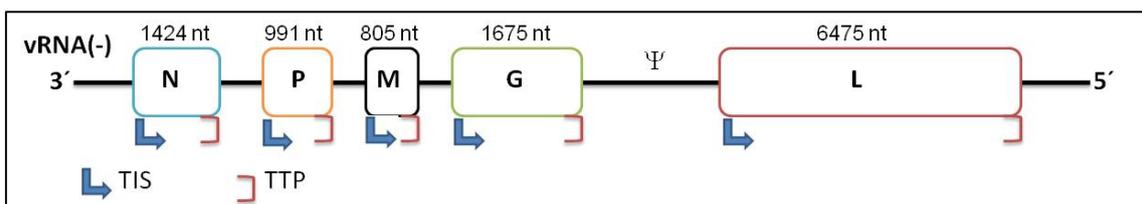
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades del Virus de la rabia

### 1.1.1 Estructura y clasificación

El virus de la rabia, es un microorganismo perteneciente a la familia Rhabdoviridae, al genero Lyssavirus del orden de los Mononegavirales, su tamaño es aproximadamente de 180 nm de longitud, 75 – 80 nm de diámetro y de 6 a 7 nm de longitud, asemejando la forma de una bala de fusil (2).

EL genoma del virus de la rabia consta de 11,932 nucleótidos en la cepa modelo del virus Pasteur (VP), tiene una región líder al inicio y una región terminal que se considera como parte final del genoma, la posición de los genes en el RNA de cadena negativa es N, P, M, G y L en sentido 3' a 5' y un pseudogene entre los genes G - L denominado  $\Psi$  (3), todos los genes codificantes tienen señal de inicio de transcripción (TIS) y de terminación de transcripción (TTP) con poliadenilación (Figura 1).

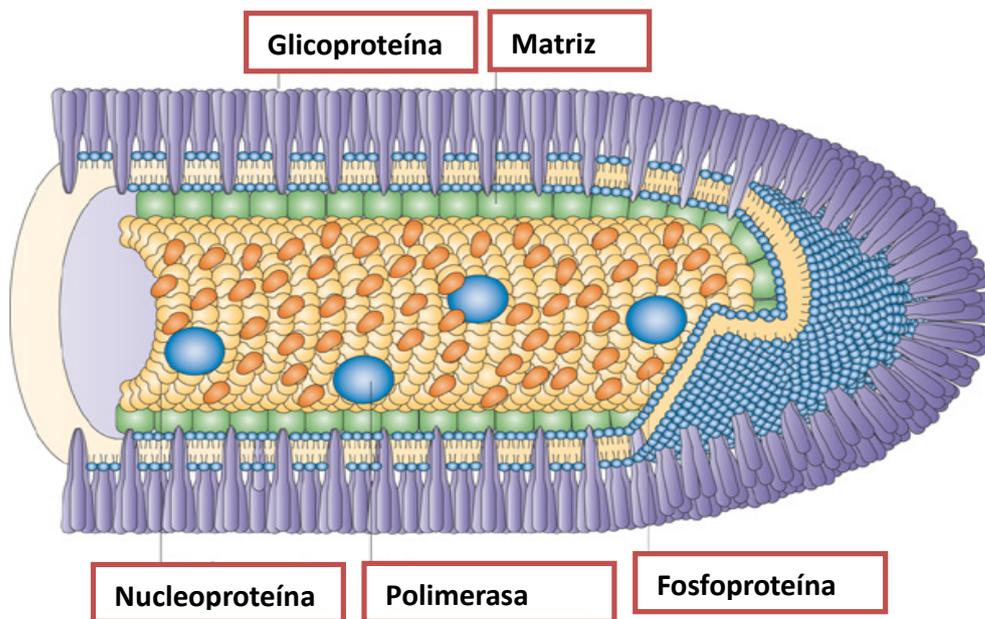


**Figura 1. Genoma del virus de la Rabia.** (Modificado de Aurelie et al. 2011).

Este virus está constituido por 5 tipos de proteínas representado en la Figura 2:

- RNA polimerasa o proteína L de 190 KDa
- Glicoproteína o proteína G de 65 a 80 KDa
- Nucleoproteína o proteína N de 58 a 62 KDa

- Fosfoproteína o proteína P de 35 a 40 KDa
  - Matrixproteína o proteína M de 22 a 25 KDa
- y un RNA no segmentado de cadena sencilla (4).



**Figura 2. Representación esquemática del virus de la rabia.** (Modificado de Matthias, 2010)

En la figura 2 se muestra la ribonucleoproteína interna (RNP), el núcleo está formado por el genoma RNA de cadena sencilla en sentido negativo encapsulado con la proteína de la nucleocápside (N), la polimerasa asociada al RNA del virión (L) y la fosfoproteína (P). El núcleo de RNP en asociación con la proteína matriz (M) se condensa en la típica forma de partículas bala que es característica de rabdovirus, sobre la bicapa lipídica (o membrana) la glicoproteína de superficie trimérica en forma de picos (G) se encuentra anclada de manera circundante a la estructura de RNP-M.

Los Lyssavirus, al igual que otros rabdovirus están constituidos principalmente de RNA (2-3%), proteínas (67-74%), lípidos (20-26%) y carbohidratos (3%) como componentes integrales de su estructura (5). El genoma de RNA viral es de cadena sencilla, no segmentado y de polaridad negativa (6), éste constituye la columna vertebral de la fuerza en espiral helicoidal del complejo RNP (RNA

además de proteína) central, que se extiende a lo largo del eje longitudinal de la partícula del virus en forma de bala. El RNA viral tiene un arreglo en espiral dentro del núcleo del complejo RNP (proteínas N, P y L), éstos se encuentran rodeados por las proteínas de la membrana viral, M y G, y una mezcla de los componentes de las lipoproteínas derivados de la membrana celular que forman la envoltura exterior o de la membrana "matriz" de la partícula del virus (7).

En la actualidad para el estudio de los lyssavirus la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce nueve genomas completos de cepas del genotipo 1: Virus Pasteur (VP), Street Alabama Dufferin (SAD)-B 19, RC-HL, Nishigahara, SRV9, Ni-CE, HEP-Flury, Virus de la Rabia de los Murciélagos de pelo plateado-18 (SHBRV-18) y RABV(8).

El virus de la rabia y los genotipos conocidos como "rabias relacionadas" con lyssavirus en general son virus altamente neurotrópicos en la infección de mamíferos (animales y humanos) y causan encefalomiелitis fatal, han sido aislados de tejidos cerebrales de animales postmortem aún en estado de descomposición (9), es resistente a la desecación y puede soportar ciclos repetidos de congelación y descongelación (2).

El virus de la rabia es el prototipo del género Lyssavirus del genotipo 1 (antes denominado serotipo 1), otros virus relacionados son: Los virus Lagos bat (LBV, el genotipo 2/serotipo 2), Mokola (MOKV, el genotipo 3/ serotipo 3), Duvenhage (DUVV, el genotipo 4/ serotipo 4), European bat lyssavirus tipo 1 (EBL-1, el genotipo 5), European bat lyssavirus tipo 2 (EBL-2, genotipo 6) y Australian bat

lyssavirus (ABLV, genotipo 7), Los lyssavirus recién aislados de murciélagos, como el Irkut (IRKV), West Caucasian Bat (WCBV) (10, 11) , Aravan (ARAV), Kjuhand bat (KHUV) y Shimoni bat (SHIBV), Esta variedad de virus refleja la diversidad genotípica que tiene el género Lyssavirus (Tabla 1), además presentan altos niveles de homología en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos en los genes G y N (12), (13, 14).

**Tabla 1: Genotipos del género Lyssavirus.**

Lyssavirus	Abreviatura	Filogrupo	Reservorio	Distribución Geográfica
Rabia virus (prototipo)	RABV	1	Perros, zorrillos y murciélagos	Cosmopolita excepto en Australia, Inglaterra, Irlanda, Nueva Zelanda, Japón, Antartida, Escandinava y Hawai
Aravan virus	ARAV	1	Murciélagos insectívoros	Eurasia
Australian bat lyssavirus	ABLV	1	Murciélagos insectívoros y frugívoros	Australia
Duvenhage virus	DUVV	1	Murciélagos insectívoros	Africa
European bat lyssavirus 1	EBLV-1	1	Murciélagos insectívoros	Europa
European bat lyssavirus 2	EBLV-2	1	Murciélagos insectívoros	Europa
Irkut virus	IRKV	1	Murciélagos insectívoros	Eurasia
Khujand virus	KHUV	1	Murciélagos insectívoros	Eurasia
Lagos bat virus	LBV	2	Murciélagos insectívoros	Africa
Mokola virus	MOKV	2	Murciélagos insectívoros	Africa
West Caucasian Bat virus	WCBV	2	Murciélagos insectívoros	Eurasia
Shimoni bat virus	SHIBV	2	Murciélagos insectívoros	Kenya

### **1.1.2 Patogenia**

Este virus utiliza a la proteína G para unirse a las células huésped e inicia las relaciones entre ambos al unirse a los receptores celulares. Se cree que esta proteína determina el tropismo y la patogenicidad del virus, además junto con la proteína M está implicada en la formación de la envoltura vírica y en la producción de viriones. La proteína G es también un blanco de los linfocitos T y de los anticuerpos neutralizantes del virus (15, 16). La proteína N funciona como superantígeno indica que contiene lugares de unión tanto para el receptor de los linfocitos T como para los antígenos de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (17). La proteína P interactúa con la proteína N evitando su autoagregación, y con el complejo proteína RNA-N, para facilitar el inicio de la transcripción y la elongación de la cadena por la RNA-polimerasa (proteína L)(18, 19). Además, estabiliza la proteína L y participa en la encapsulación del RNA. Entre las funciones de la proteína M se encuentran el ensamblaje del virus, participación en el mecanismo de exocitosis y en la regulación de los niveles de la transcripción. Por último, la proteína L dirige la transcripción y replicación del RNA viral (Figura 2) (3, 7, 20).

### **1.1.3 Replicación del virus de la Rabia**

El virus de la rabia se replica en el citoplasma de la célula (Figura 3), en presencia de la proteína L ó RNA polimerasa dependiente de RNA (función de transcriptasa

y replicasa) requiere de la maquinaria de traducción de proteínas y síntesis de nucleótidos, aminoácidos y lípidos de la célula (4, 19).

### **1.1.3.1 Ciclo de replicación**

El virus entra en la célula a través de pozos revestidos (viropexis) o por receptores de superficie celular **1**, mediado por la glicoproteína viral (G) la fusión con la membrana celular (endocitosis) **2**. Después de la internalización, una proteína celular de la membrana del endosoma bombea iones  $H^+$  desde el citosol hacia el interior del endosoma, la disminución consecuente del pH endosómico induce un cambio de conformación en la glicoproteína viral, conduciendo a la fusión de la envoltura viral con la bicapa lipídica endosómica y a la liberación de la nucleocapside helicoidal (NC) de la RNP en el citosol **3 y 4**. La RNA polimerasa viral utiliza ribonucleósido trifosfato en el citosol para replicar el RNA viral y sintetizar los mRNA virales. Los cinco genes estructurales (N, P, M, G y L) del RNA del genoma en la NC se transcriben en cinco cadenas de RNA mensajeros positivos monocistronicos y una cadena completa replicativa (antigenoma). El RNA sirve como plantilla para la replicación del genoma de la progenie (- cadena) de RNA **5 y 6**. Las proteínas (N, P, M y L) se sintetizan a partir de sus respectivos mRNA en los ribosomas a la membrana en el citoplasma y la G se sintetiza a partir del G-mRNA en los ribosomas unidos a la membrana (retículo endoplasmático rugoso) **7**. El carbohidrato se adiciona al dominio mayor plegado dentro de la luz del retículo endoplasmático es modificado a medida que la membrana la glicoproteína asociada pasan a través del aparato de Golgi (4, 21)**8**. Las vesículas con la

glicoproteína madura se fusionan con la membrana plasmática de la célula y depositan la glicoproteína viral sobre la superficie de la célula con el dominio mayor de unión al receptor por fuera de ella **9**. Mientrastanto otros mRNA virales son traducidos sobre ribosomas de la célula huésped a proteínas de la nucleocápside, proteínas de la matriz y RNA polimerasa **10** (4, 22). Algunos de los complejos moleculares NP producen cuerpos de inclusión citoplasmáticos (cuerpos de Negri), en vivo y algunos complejos de NP encapsidan la cadena de RNA viral. Después de la progenie del genoma de RNA es encapsulado por el complejo de proteínas NP y la proteína L se incorpora a la forma RNP progenie, las estructuras de la proteína M se une a la RNP y se condensa el RNP en la estructura de 'esqueleto' **11**. Las estructuras de esqueleto interactuar con las estructuras de proteínas G trimérica anclada en la membrana plasmática y se ensamblan para formar las partículas de virus que brotan de la membrana plasmática de la célula infectada hacia el espacio extracelular o intersticial adyacente **12 y 13** (3, 23).

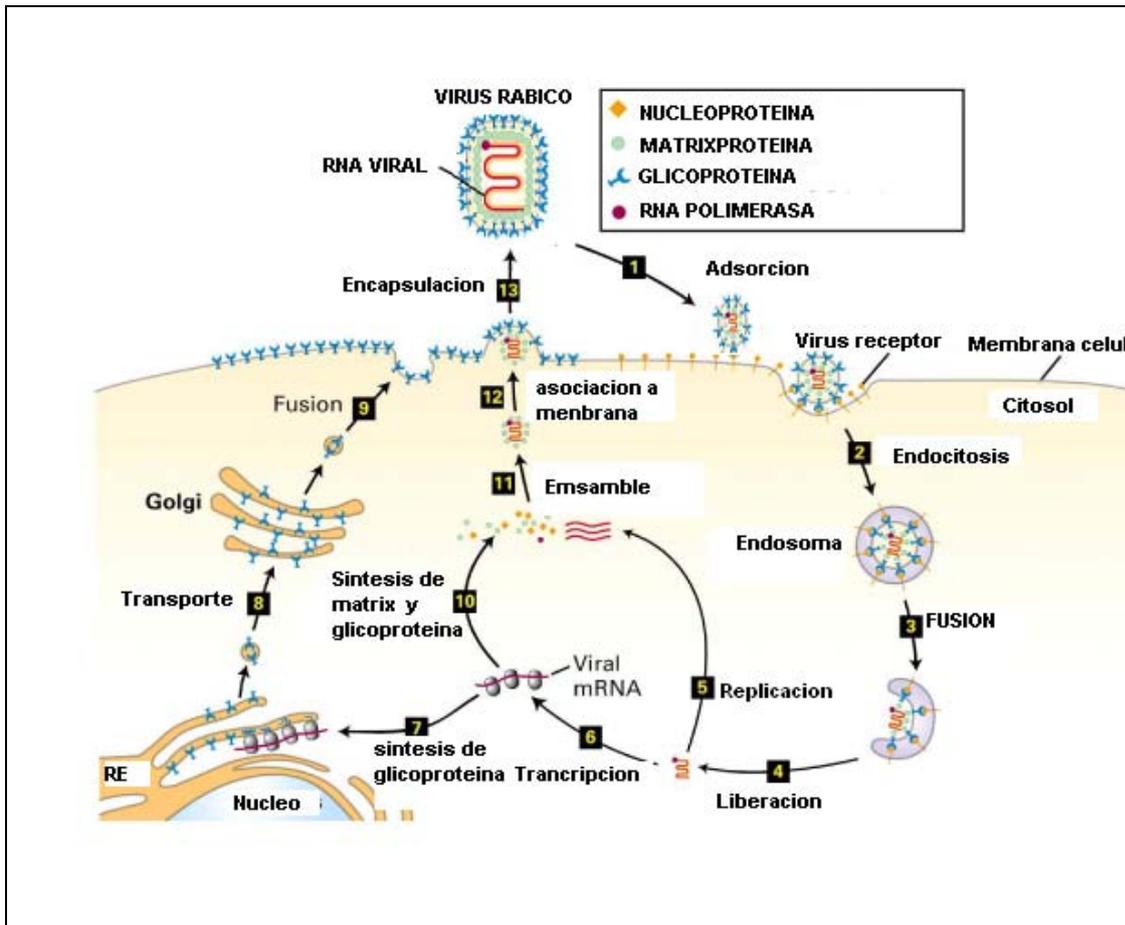


Figura 3. Ciclo de replicación del virus de la rabia

### 1.1.4 Vías de Infección

Las vías de infección que presenta el virus para especies susceptibles son por transmisión transcutánea, epidérmica, aérea y digestiva (24). Las vías transcutánea y aérea están altamente relacionadas con el mecanismo de transmisión que mantiene el ciclo enzoótico de la enfermedad. Se consideran vías accidentales la aérea y digestiva. La velocidad con la que se manifiestan los signos y síntomas de la rabia depende de las características biológicas de la cepa del virus que infecta como son: la concentración de receptores para el virus en las células nerviosas del músculo esquelético, la magnitud del inóculo, la invasión nerviosa en el sitio de entrada y la proximidad de la lesión al Sistema Nervioso Central (SNC)(25).

Cuando la vía de entrada del virus es transcutánea o epidérmica, éste se localiza en el sitio de inoculación durante un tiempo variable, durante ese tiempo puede suceder una primera replicación en las células nerviosas de la placa neuromuscular más cercanas a la herida, en general al inicio las células donde se multiplica el virus son parte de los nervios sensores y motores que inervan el sitio de la infección (26), una vez que el virus alcanza el SNC la infección es irreversible y por último la muerte del individuo (27).

### **1.1.5 Tipos de Rabia**

La rabia por su sintomatología se clasifica en furiosa y en paralítica. Aunque el agente etiológico es el mismo un animal rabioso puede desarrollar cualquiera de estas formas, L. Pasteur demostró que si la infección radica en el cerebro, el animal desarrolla rabia furiosa, y cuando radica en la medula ósea presenta la forma paralítica (28).

#### **1.1.5.1 Rabia furiosa**

La rabia furiosa pasa por tres fases clínicas: la prodrómica, la excitativa y la paralítica, algunas veces son muy precisas y otras muy vagas. Se le llama rabia furiosa cuando prevalece la fase excitativa(29).

#### **Fase prodrómica o melancólica**

Esta fase puede durar en promedio de 12 horas a 3 días. Los pródromos son un cambio de carácter y de conducta. Los perros en esta fase se tornan raros, caprichosos, nerviosos, irritables, miedosos, inquietos y cariñosos. Cuando el dueño nota algunos de estos comportamientos anormales en su perro es

recomendable aislar al perro para su observación de 15 días ya que la mascota puede estar desarrollando un cuadro de rabia(15, 29).

También se pueden observar alteraciones en sus hábitos de obediencia, afecto y apetito. En algunos casos caminan agitados de un lado a otro, se lamen constantemente y muerden o rascan violentamente el lugar donde fueron mordidos y pueden llegar hasta automutilaciones del rabo y las extremidades. La sed puede aumentar considerablemente pero no puede beber agua, por la parálisis de faringe. Se puede observar dificultad de defecación, de orinar y un aumento en el deseo sexual. Lame constantemente sus genitales, hay un ligero aumento de temperatura, dilatación pupilar y reflejo corneal lento (30).

#### **Fase excitativa o furiosa**

Esta fase dura de uno a siete días y disminuye la dificultad de diagnosticar. El perro tiende a morder personas, animales y objetos. Se vuelve mas irritable, inquieto y nervioso, deglute sustancias extrañas a su alimentación. Cambia su respiración, lo que causa que la saliva tenga un aspecto espumoso, también hay un cambio en el ladrido, tiende a huir, anda errante sin rumbo fijo y puede recorrer grandes distancias. La expresión de la cara refleja recelo ó miedo, la mirada es fija con dilatación pupilar. Al final de esta fase se presentan convulsiones e incoordinación muscular. El perro puede morir a causa de los ataques convulsivos, en caso de sobrevivir pasa a la fase paralítica (29, 31).

#### **Fase paralítica**

En esta fase dura de 5 a 10 días y se observa la parálisis de la mandíbula causada por la parálisis de los músculos de la masticación, evitando que el animal coma y

beba. Hay escurrimiento de la saliva. La parálisis también afecta al intestino, vejiga y cola. El abatimiento y la debilidad aumentan sin cesar muriendo el animal por parálisis cerebral y por agotamiento general. Los animales enflaquecen hasta quedarse en los huesos, se les eriza el pelo, emiten un ruido como si se estuvieran ahogando, lo cual puede confundir al dueño como si tuviera un hueso atorado en la garganta (25, 32, 33).

#### **1.1.5.2 Rabia paralítica**

La rabia paralítica también se le conoce como rabia muda. Esta se caracteriza por presentar una evolución mas rápida que la forma furiosa, el animal muere dentro de los 4 días de iniciar los síntomas, el periodo prodrómico es más rápido y predomina la forma paralítica. El animal presenta una parálisis de la mandíbula, esta se encuentra caída, con la boca abierta y la lengua colgando, aunque la mandíbula este paralizada y por tanto el animal esta imposibilitado a morder, pero con los dientes puede causar lesiones ya que en muchos casos mantienen la agresividad (33, 34).

#### **1.1.8 Rabia en Animales**

El virus de la rabia produce una encefalitis aguda en los animales y su final es letal. Todos los vertebrados de sangre caliente pueden contraer rabia y sus reservorios del virus son los carnívoros y los quirópteros. En los animales de sangre caliente el periodo de incubación depende de la cantidad de virus inoculado a través de mordeduras ó lameduras de superficies excoriadas, el sitio

de la mordedura o excoiación y el tratamiento dado a las heridas entre otros factores (28, 35).

La distribución geográfica de una población viral asociado a su hospedero esta determinada por la gama de la especie animal, así como los aspectos de la biología del hospedero que determina el grado de interacción entre los diferentes subpoblaciones del hospedero. La relación virus-hospedero por un largo tiempo aísla al virus de las demás poblaciones y esto lleva a tener un virus con marcadores distintivos que pueden ser utilizados para diferenciar de otras poblaciones del virus de la rabia(36).

Un evento de efecto colateral ocurre cuando el virus de la rabia se mantiene en un reservorio satisfactoriamente e infecta a otra especie animal la cual por sus características biológicas no favorece la propagación del virus interrumpiendo el ciclo de transmisión. Sin embargo puede ocurrir un evento donde inicie una nueva relación virus-hospedero en donde la propagación y la transmisión sean satisfactorias dentro de la nueva especie hospedera de manera que la nueva especie se convierte en un reservorio de la rabia. "salto de especie" por lo general se asocia con algún nivel de adaptación viral a su nuevo huésped lo que daría lugar a la aparición de una población viral distinta y por lo tanto un nuevo linaje(37).

Un linaje viral dado se asocia siempre a una especie animal en particular, conocido como el reservorio esto se debe a la eficiencia con que el virus se propaga por los individuos de esta especie animal y de la transmisión entre sus congéneres(37).

### **Rabia en perros**

El perro es considerado como la especie prototípica para la rabia y fue descrita desde la antigüedad. El perro puede manifestar cualquiera de las formas de rabia, aunque es más frecuente la rabia furiosa (38). El periodo de incubación generalmente es menor de 60 días puede variar de 7 días hasta 6 meses. En perros infectados experimentalmente los periodos de incubación han sido de 9 a 42 días(29).

### **Rabia en bovinos (Derriengue)**

La rabia bovina paralítica es conocida por los ganaderos en las áreas afectadas como: derriengue, mal de caderas o rabia paresiente.

La mayoría de los casos de rabia bovina se deben a que son mordidos por vampiros en el cuello, detrás de las orejas, la punta de la espaldilla, vulva y en la región cercana a la pezuña. El periodo de incubación va de 4 a 6 semanas. El bovino rabioso golpea el suelo con las pezuñas, la mirada es generalmente feroz, los ojos dan la sensación que van a salirse de las orbitas.

Las conjuntivas se encuentran muy enrojecidas, mugen sin cesar con alteración en la voz, bostezos constantes durante horas, arqueamiento del dorso y parálisis, por lo general enflaquecen y mueren a los 4 o 6 días(39).

### **Rabia en murciélagos**

Se considera que de las especies de murciélagos hematófagos, el de mayor importancia como transmisor es el *Desmodus rotundus*, sin embargo, se ha logrado aislar virus rábico de murciélago no hematófago.

El periodo de incubación es muy variable observando valores entre 9 y 171 días, se pueden presentar indistintamente la forma furiosa y paralítica(40).

En el periodo prodrómico que va de 12 a 24 horas el animal esta inquieto, se irrita fácilmente, presenta temblores musculosos, algunas veces apático y sin apetito, después pasa una fase de excitación y furia que dura aproximadamente 5 días, en el cual retorna a los hábitos normales. Se observan cambios de hábitos como es volar en horas diurnas, atacan a los humanos, presentan parálisis en las alas y/o patas, sobreviniendo la muerte(41).

El virus rábico se elimina durante un tiempo variable. Un murciélago puede ser portador del virus, en estado latente durante uno a dos años, por lo cual, la rabia en murciélagos es un problema independiente de los ciclos infecciosos de otros mamíferos (42).

### **Rabia humana**

La rabia humana es considerada como un accidente ya que el humano no es reservorio del virus rábico (43).

El humano es poco susceptible a la rabia, el riesgo de que se desarrolle rabia en una persona expuesta en un animal rabioso varia de acuerdo a muchos factores como son: lugar de la mordedura, entre mas cerca del SNC mayor es el riesgo de contraer la enfermedad, del inoculo y si el paciente recibe algún tratamiento después de la exposición, entre otros.

En el hombre se distinguen 5 periodos en la rabia clínica: incubación, pródromos, fase neurológica aguda, coma y muerte (44)

### **Periodo de Incubación**

Los periodos de incubación del virus rábico en el hombre varían según la distancia que exista entre el sitio de lesión y el SNC. La duración promedio es de 20 a 60 días y es más corto cuando el sitio de mordedura está en la cabeza o cuello. Durante este periodo la persona está bien por lo general, fuera de las molestias que ocasiona la lesión, aunque se han observado algunos síntomas inespecíficos tales como: malestar general y fiebre (45).

### **Pródromos**

Los síntomas característicos en este periodo son: fiebre, fatiga, cefalalgia, ansiedad, insomnio y depresión, en algunos casos se llegan a presentar escalofríos, náuseas, vómitos, diarrea y síntomas locales en el sitio de la lesión (44).

### **Fase Neurológica aguda**

En esta fase el paciente desarrolla signos de afección al SNC como son: hiperactividad, alucinaciones, desorientación, rigidez de la nuca y comportamiento desordenado. Esta fase dura de 2 a 10 días (46).

### **Coma y Muerte**

Esta fase puede durar horas y hasta meses. El paciente presenta paro respiratorio, seguido de coma y después expira. Durante la fase del coma llegan a desarrollarse varias complicaciones que causan la muerte al paciente. El diagnóstico de rabia antes de la muerte del paciente puede establecerse por la detección de material fluorescente (virus específico) en biopsia de piel, aislamiento viral en saliva o la presencia de anticuerpos en suero o LCR en los pacientes que no habían sido vacunados. Desafortunadamente, el uso de la vacuna antirrábica o

de inmunoglobulina específica no mejora el pronóstico una vez aparecidos los síntomas (Figura.4) (27, 47, 48).



LCR: líquido cefalorraquídeo.

BCC: biopsia de cuero cabelludo.

IC: impronta de córnea.

Figura 4. Fase clínica, duración promedio y toma de muestra. InDRE, 2005.

### 1.1.9 TRATAMIENTO

#### Vacunación preexposición

La vacunación preexposición está indicada en personas que están expuestas al virus rábico en el laboratorio o que tienen contacto con mamíferos, incluyendo murciélagos (OPS-OMS, 2001).

#### Vacunación Postexposición

La profilaxis postexposición correcta implica: limpieza cuidadosa de la herida, administración de gammaglobulina cuando esté indicada y vacunación.

La limpieza de la herida debe realizarse con agua abundante al menos durante 5 minutos como medida importante del tratamiento local. Además debe Desinfectarse la herida con alcohol al 70%. De acuerdo a los criterios de la OPS-OMS 2001 (Tabla 2) se administrará la vacuna y se aplicará inmunoglobulina antirrábica según el tipo de exposición (49).

**Tabla 2: Tratamiento postexposición.**

<b>C a t e g o r í a</b>	<b>Tipo de contacto con animal sospechoso de rabia, con rabia confirmada o no posible observación</b>	<b>Tratamiento Recomendado</b>
I No exposición	Tocar o alimentar animales Lameduras sobre piel intacta	Ninguno (si se tienen datos fiables sobre la circunstancias de la exposición)
II Exposición Menor	Mordisco de piel descubierta Arañazos o erosiones leves sin sangrado Lameduras sobre piel no intacta	1. Tratamiento inmediato y correcto de la herida 2. Vacunación inmediata - Suspender si el animal sigue sano después de 10 días de observación veterinaria - Suspender si las muestras analizadas del animal son negativas, en diagnóstico directo en Laboratorio de Referencia
III Exposición Grave	Contaminación de membrana mucosa con saliva (lamedura) mordeduras o arañazos transdérmicos sencillos o múltiples	1. Tratamiento inmediato y correcto de la herida 2. Vacunación inmediata (suspender igual que en la categoría II) 3. Inmunoglobulina antirrábica

Fuente: OPS-OMS, 2001.

## 2 ANTECEDENTES

La rabia es una de las enfermedades más antiguas de Europa y Asia en la actualidad hay rabia en más de 150 países y territorios aledaños. Cada año más de 55.000 personas mueren de rabia en todo el mundo de estos el 40% son menores de 15 años mordidos por animales presuntamente rabiosos (50, 51).

Los pocos casos de rabia humana originarios en Europa, ocurren sobre todo en los países del este donde la rabia canina es importante (menos de 10 casos por año), de manera excepcional, las personas infectadas en regiones donde la rabia es endémica (África, Asia) desarrollan la enfermedad en un país europeo(52, 53).

En Asia se tiene la mayor cantidad de casos de rabia en humanos y el principal reservorio de la rabia es el perro, el número estimado de muertos es del orden de 40.000 al año (cifra superior al número oficialmente declarado), lo que representa más del 95% de todos los casos mundiales. En países como China, Indonesia, Malasia y Tailandia han establecido programas nacionales de lucha contra la rabia lo que ha reducido el número de víctimas fatales de manera significativa (54).

En África, el perro continúa siendo el principal reservorio de rabia (alrededor del 90%). Más de 4.000 casos de rabia animal han sido diagnosticados, pero solo reflejan una parte de la situación de la rabia en África(OMS,2010).

En África el perro es el principal reservorio de rabia (alrededor del 90%), la detección de rabia en animales son más de 4.000 casos por año que reflejan

una parte de la situación de la rabia en África (OMS,2010), de 100 a 200 personas mueren de rabia cada año, en la mayoría de los casos, el diagnóstico es únicamente clínico. Sin embargo al igual que en Asia, hay una subestimación del número de casos de rabia(54).

En los Estados Unidos de América y Canadá, los casos de rabia humana son tras la exposición a murciélagos, zorros, mapaches, mofetas, chacales, mangostas y otros huéspedes carnívoros salvajes, en america latina los casos de rabia humana se han reducido en un 91% debido a los programas de vacunación y esterilización canina (54).

## **2.1 ANTECEDENTES DE LA RABIA EN MÉXICO.**

La rabia en México no fue introducida por los conquistadores, ya existía en su reservorio murciélago. Los mayas ya tenían deidificación del murciélago el cual llamaban Tzotz, (dios murciélago) a quien le atribuían la muerte de los hombres que por su conducta el dios murciélago castigaba con la hidrofobia y estaban destinados a morir de sed (55).

Las primeras descripciones de rabia datan del siglo XV, en el año 1514 Fernando de Ovieron en la Conquista del Darien, describe que muchos soldados murieron al ser mordidos por murciélagos y que los indios conocían la cura, la cual consistía en lavar la herida con agua caliente y colocar una brasa encendida para cauterizar la herida. En 1527 Molina Solís, relata que cuando las tropas de Francisco de Montejo conquistan la península de Yucatán, mientras dormían fueron atacados por una gran cantidad de murciélagos, no sólo a hombres sino también a las

bestias (56). Las primeras medidas de contención fueron en 1553 con la construcción de un Hospital General de los Indios en San Juan de Letran, el cual contaba con una sala especial para enfermos de hidrofobia, no obstante cerró sus puertas en 1882 y fue demolido en 1933 para ampliar el eje vial Lázaro Cárdenas.(55)

La primera epizootia de rabia en la Ciudad de México data de 1709 que inicia en los perros callejeros de la ciudad afectando al ganado y a humanos. El día 20 de enero de 1888 el Dr. Eduardo Liceaga recibe del propio L. Pasteur la vacuna antirrábica y México fue el primer país de Latinoamérica en contar con la vacuna, la cual estuvo a cargo del Dr. Cervera del Consejo de Salubridad (55).

La vacuna de cerebro de ratón lactante para uso humano se aplicó a partir de 1967, y se introdujo al sector salud el uso de la inmunoglobulina antirrábica humana en 1973; en otros estudios relevantes en mujeres embarazadas y con rabia se demostró que el virus de la rabia no se transmite por cordón umbilical por la ausencia de teratogenicidad durante la gestación (54).

Los primeros diagnósticos realizados fueron por inmunofluorescencia en 1960 en encéfalos (55) e impresión corneal para diagnóstico de rabia en humanos.

En la actualidad, se han abierto centros antirrábicos y de diagnóstico del virus de la rabia así como la creación de una norma Mexicana para el control y prevención de la rabia y en algunos centros de diagnóstico se están tipificando las variantes antigénicas del virus de la rabia con el fin de tener un mejor control epidemiológico (57).

En México la rabia humana se transmite principalmente por agresión de perro. Se presentaron 1713 casos de rabia humana en el país de 1970 a 1997, de los cuales 1395 fueron ocasionados por mordedura de perro (80.5%), 126 por agresión de quiróptero (7.27%) y 310 por otras especies (11.23%) (58). De acuerdo a la NOM - 011 - SSA -1993, se establece que la vacunación antirrábica es obligatoria para perros y gatos(59).

La rabia silvestre es un problema que requiere métodos de control especializados, el sistema nacional de vigilancia epidemiológica (SINAVE) reporta entre 1996-2002, 112 casos positivos de rabia, en la Tabla 3 se muestran especies afectadas(60).

**Tabla 3. Casos reportados de rabia en especies silvestres de 1996 al 2002.**

<b>Especie</b>	<b>casos reportados de rabia</b>	<b>%</b>
Agutí	2	1.8
Ardilla	1	0.9
Ciervo	4	3.6
Coatí	1	0.9
Coyote	2	1.8
Felinos salvajes	3	2.7
Mapache	7	6.2
Marsupial	4	3.6
Tejón	3	2.7
Quiróptero	52	46.4
Zorrillo	26	23.2
Zorro	7	6.2
<b>Total</b>	<b>112</b>	<b>100%</b>

Fuente: (Boletín de vigilancia epidemiológica de la rabia en las Américas., 2002)

Las variantes antigénicas identificadas en el país mediante anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína N de los virus de la rabia identificados en el país, son las que se muestran en la Tabla 4(57).

**Tabla 4. Variantes antigénicas identificadas en el país.**

Especie	Variante Antgénica (Vag)
animales domésticos	Vag – 1
felinos salvajes	Vag – 7
Quiróptero	Vag – 3, Vag - 4, Vag - 9, Vag – 11
Zorrillos	Vag – 8, Vag - 10
Zorros	Vag – 7

(Velasco-Villa, *et al.*, 2002)

La técnica de los anticuerpos monoclonales es una excelente herramienta para conocer las variantes que circulan en el país, además permite conocer el origen y diseminación de los focos y/o brotes rábicos (57).Se ha encontrado que se obtienen resultados similares al método de RT-PCR (61).

La rabia silvestre se encuentra fluctuante, por lo cual es importante contar con un buen sistema de vigilancia epidemiológica y para ello se cuentan con diversas técnicas estandarizadas y reconocidas por la WHO para el diagnostico de la rabia por ejemplo:

Las de diagnostico como la inmunofluorescencia directa (IFD), inoculación en ratón y el cultivo celular, el tiempo de resultados es de 2 horas , 4 y 28 días respectivamente (1) (62).

Existen algunos ensayos serológicos como la neutralización de focos fluorescentes y la inhibición de focos fluorescentes, los ensayos serológicos no son aptos como herramientas de diagnóstico de la rabia para los exámenes rutinarios ya que solo detectan la presencia de anticuerpos más no de la infección además de que la respuesta inmunológica es diferente en cada individuo(63).

Sin embargo existen otros métodos que caracterizan atributos antigénicos del virus que permiten identificar las variantes responsables de epizootias y casos de rabia tanto en humanos como animales de los cuales no se cuenta o se desconoce información(64).

Los anticuerpos monoclonales permiten realizar análisis antigénicos comparativos de las variantes del virus de la rabia, además ayudan para realizar estudios de prevalencia relativa, distribución y la transmisión de la rabia entre diferentes especies tanto salvajes como urbanas(57).

La caracterización de las variantes antigénicas del virus de la rabia ha sido útil para comprender la epidemiología de la rabia humana especialmente en casos donde no hay antecedentes de exposición, como puede ocurrir en lugares donde la rabia canina esta controlada(65).

Actualmente hay una serie de pruebas moleculares que se pueden utilizar para complementar pruebas convencionales de diagnóstico de la rabia con un alto rendimiento y en poco tiempo (63).

Para fines de diagnóstico, lo ideal sería que la PCR que pueda amplificar con éxito todos los miembros del género Lyssavirus; en consecuencia, las secuencias altamente conservadas a nivel de género que deben dirigirse los iniciadores son el

gen N Puesto que es una de las regiones más conservadas del genoma de los lyssavirus(66).

En la tabla 5 y 6 se presentan los iniciadores que se han utilizado para el diagnostico de rabia por lo que podemos observar que solo hay diseños para detectar rabia y sus genotipos mas no rabia y sus variantes genéticas de acuerdo a su reservorio(63).

**Tabla 5. Iniciadores para la detección de virus de la rabia en PCR punto final.**

PCR	Nombre	Direccion	Secuencia	Detalles	Posicion	Amplicon	Año
semianidado	20R	R	AGCTTGGCTGCATTCATGCC				2004
	21F	F	ATGTAACACCCTACAATG		55-73	210	
	23F	F	CAATATGAGTACAAGTACCCGGC			122	
anidado	RabN1	F	GCTCTAGAACACCTCTACAATGGATGCCGACAA	1ª vuelta	59-84	1477	1998
	RabN5	R	GGATTGAC(AG)AAGATCTTGCTCAT		1514-1536		
	RabNF	F	TTGT(AG)GA(TC)CAATATGAGTACAA	2ª vuelta	135-156	762	
	RabNR	R	CCGGCTCAAACATTCTTCTTA		876-896		
semianidado	P510	F	ATAGAGCAGATTTTCGAGACAGC		510-531		2002
	P942	R	CCCATATAACATCCAACAAAGTG	1ª vuelta	965-942	455	
	P784	R	CCTCAAAGTTCTTGGAAGA	2ª vuelta	805-784	295	
estandar	N1161	F	AAGAACTCAAGAATACGAGGC		1161-1182	418	2001
	N1579	R	TTCAGCCATCTCAAGATCGG		1579-1560		
estandar	113	F	GTAGGATGATATATGGG	solo RT			2002
	509	F	GAGAAAGAACTTCAAGA			377	
	304	R	GAGTCACTCGAATATGTC				
estandar		F	ACTGATGTAGAAGGGAATTG	gen N		533	2001
		R	GAACGGAAGTGGATGAAATA				
		F	TAATCCCAGAGATGCAAT	gen G		406	
		R	CCTCACAGTCTGGTCTCACC				
anidado	Primer1	F	GAAGCCTGAGATTATCGTGG	1ª vuelta	63-82	304	1999
	Primer2	R	CCCTTCTACATCAGTACG		349-367		
	Primer3	F	TGAGTACAAGTACCCTGC	2ª vuelta	90-107	139	
	Primer4	R	GGAACATACATCGTCAGG		229-211		
anidado	N1	F	TAGGGAGAAGGATCGTGGAGCACCATACTCTCA		611-632	179	2008
	N2	R	GATGCAAGGTCGCATATGAGTACCAGCCCTGAACAGTCTTCA		790-769		
estandar	N12	F	GTAACACCTCTACAATGG		57-74		1998
	N40	R	GCTTGATGATTGGAAGT		1368-1349		
anidado	N1	F	TTTGAGACTGCTCCTTTT				1997
	N4	R	GCTTGATGATTGGAAGT				
	JW4	F	AGAATGTTGAGCCACGGCA				
	JW5	R	TCAGGTGAAACCAGAAGTCC				

Modificado de: Fooks *et al* 2009

**Tabla 6. Iniciadores para la detección de genotipos de RABV en PCR punto final.**

Genotipo	PCR	Nombre	Direccion	Secuencia	Detalles	Posicion	Amplicon	Año
EBLV-1	semianidado	N1001fw		CAGAGTTGTGCACCCCATGAA		1061-1081	475	2008
		1066fw		GAGAGAAGATTCTTCAGGGA		1136-1155	400	
		304rv		TTGACAAGATCTTGCTCAT		1517-1536		
	anidado	N1161	F	AAGAGCTACAGGATTACGAGG	1ª vuelta	1161-1181	373	2004
		N1534	R	GACAAAGATCTTGCTCATGA		1534-1514		
EBLV-1nF		F	TTGGCAGATGATGGGACAGT	2ª vuelta	1211-1230	216		
EBLV-1nR		R	TCCCTTATCTAATCAGGGGA		1427-1408			
EBLV-2	anidado	EBLV-2F	F	TCATGGTCAATGGGGGAAAG	1ª vuelta	1226-1245	229	2004
		EBLV-2R	R	TTGGGATGGAGCAGGAAGAG		1455-1436		
		EBLV-2nF	F	CAAAAATCCCACATCAAAAG	2ª vuelta	1249-1269	180	
		EBLV-2nR	R	TCTTAGTTTTTTCTTTCCCC		1429-1409		
LBV	anidado	LagNF	F	GGGCAGATATGACGCAGAGA				2006
		LagNR	R	TTGACCGGGTTCAAACATC				
LBV,WCBV, MOKV	anidado	N1F	F	ATGGAATCWGAMAASATTGT	1ª vuelta	71-90	595	2008
		N550B	R	GTRCTCCARTTAGCRCACAT		647-666		
		N70F	F	GAYCAATATGARTATAARTA	2ª vuelta	140-159	439	
		N490B	R	TCCATYCTRTCTGCWACATT		560-579		
WCBV	anidado		F	AATATCCTGCCATTACAGATTA	1ª vuelta	165-177	606	2008
			R	TCATATGCAGTGACAACCTGTGC	1ª vuelta	750-771		
			F	ATGATGTGTGCTCCTATCTAGCA	2ª vuelta	273-295	394	
			R	GGTACTCCAATTGGCACACATC		646-667		
ABLV	semianidado	NP1087	F	GAGAAAGAG[A/C][G/T]CAAGA[A/C/T]TA		N-gene		1996
		NP1279	R	CAGAGACATATCT[G/C][G/T][G/T]ATGTG				
		NP1227	R	CTTCA[C/T][C/G][ACC[A/T][C/T][C/T]GTTTCATCAT)				
ARV	anidado	F	F	AGTATCCTGCCATTGGGAATCA	1ª vuelta	86-107	616	2006
		R	R	GACTGTTGTAAGTGCATATGAG		681-702		
		NF	F	ATGACGTCTGTTCTTATCTTGCT	2ª vuelta	203-225	376	
		NR	R	ATGTGTGCAAATTGGAGCAG		577-597		
KHUV	anidado	F	F	AATACCCGGCTATTGTGGATAG	1ª vuelta	86-107	615	2006
		R	R	GAACCTGTTGTGACCGCATATGA		680-701		
		NF	F	ATGATGTCTGTTCTTATTTGGCC	2ª vuelta	203-225	375	
		NR	R	AATGTGTGCTAAGTGGAGCACA		576-597		
IRKV	anidado	F	F	AATACCCCTGCCGATTGATGATAA	1ª vuelta	86-107	615	2006
		R	R	GAACAGTTGTGACTGCATATGA		680-701		
		NF	F	ATGATGTGTGCTTACTTGGCT	2ª vuelta	203-225	375	
		NR	R	AATGTGTGCAAATTGGAGCACA		576-597		
todos	estandar	N1	F	TTTGAGACTGCTCCTTTT		587-605	443	1991
		N2	R	CCCATATAGCATCCTAC		1029-1013		
universal lyssavirus	semianidado	JW12	F	ATGTAACACCYCTACAATG		55-73		1997
DUVV,RABV,LBV		JW6(DPL)	R	CAATTCCGCACACATTTTGTG	1ª vuelta	660-641	605	
EBLV-1 y 2		JW6(E)	R	CAGTTGGCACACATCTTGTG	1ª vuelta			
	MOKV	JW6(M)	R	CAGTTAGCCGCACATCTTATG	1ª vuelta			
DUVV,LBV,EBLV-2		JW10(DLE2)	R	GTCATCAAAGTGTGRTGCTC	2ª vuelta	636-617	581	
	MOKV,EBLV1	JW10(ME1)	R	GTCATCAATGTGRTGTTC	2ª vuelta			
RABV		JW10(P)	R	GTCATTAGAGTATGGTGTTC	2ª vuelta			
	anidado	D017	F	AGATCAATATGAGTAYAARTAYCC	2ª vuelta	139-163	497	2006
			F	AAGATGTGTGCCAACTGGAG	1ª vuelta			
	anidado	LISEBL1R	R	ATGTTTGAGCCAGGGCAAGA				2001
		LISEBL2F	F	TACTGCTTATGAGGATTGTTC	2ª vuelta			
		LISEBL2R	R	AAGAACTTCGAGGAAGAGATC				
		GRAB1F	F	AARATNGTRGARCAACAC	1ª vuelta	538-557	373	
	anidado	GRAB1R	R	GCRTTSGANGARTAAGGAGA		911-892		2006
GRAB2F		F	AARATGTGYGICAAAYTGGAG	2ª vuelta	574-593	259		
GRAB2R		R	TCYTGHCIGGCTCRAACAT		833-814			

Modificado de: Fooks et al 2009

### 3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Estado de México, 2006, se registró el último caso de rabia humana transmitido por perro y la tasa de agresión se ha mantenido desde hace 9 años en un promedio de 170 agredidos por cada 100,000 habitantes. Los casos de rabia en perro se han mantenido en un promedio de 20 casos por año. Gracias al esfuerzo de los sistemas de vigilancia epidemiológica la rabia urbana ha disminuido en un 98.3% de 1990 al 2003. Se ha encontrado que la rabia silvestre se encuentra fluctuante. El Estado de México cuenta con centros antirrábicos, epidemiólogos y un laboratorio para diagnóstico del virus de la rabia, pero esto no es suficiente ya que la técnica empleada (inmunofluorescencia directa) sólo proporciona datos de positivo o negativo a rabia lo cual ayuda a identificar un foco rábico pero no se sabe que reservorio está implicado, ya que en varias regiones se mezcla la fauna silvestre con la fauna urbana y no se sabe si se tiene rabia silvestre y/o rabia urbana o si tal vez la vacuna antirrábica administrada a perros y gatos no está funcionando adecuadamente, entre otros problemas. Lo que hace necesario conocer las variantes genéticas circulantes en el Estado de México para saber qué medidas tomar y fortalecer los sistemas de vigilancia epidemiológica. Por lo anterior decidimos abordar el siguiente problema:

¿Cuáles son las variantes genéticas de los virus de la rabia presentes en muestras de diferentes especies estudiadas en el Estado de México ?

## 4 JUSTIFICACIÓN

### Justificación Epidemiológica

La rabia es una enfermedad con una letalidad del 100% por lo que es un problema de salud pública, en México se cuenta con una norma oficial para el control y prevención de la rabia (NOM-011-SSA2-1993) donde se indica la definición operacional de caso y como actuar ante ello, al presentarse un caso positivo a rabia es de reporte inmediato a las autoridades sanitarias correspondientes(59).

Aún cuando la rabia es considerada una de las enfermedades más antiguas y devastadoras del mundo, la rabia sigue siendo un problema de salud pública grave que implica grandes pérdidas económicas (ganadería por derriengue, vacunación) y ha cobrado varias vidas humanas. En la República Mexicana de 1970 a 1999 se presentaron 1738 casos de rabia humana, el 88% de los casos fueron transmitidos por perros, el 8.6% por murciélago y el 10.5% por otras especies. Por lo anterior la detección adecuada reduce costos de cercos sanitarios y la propuesta de investigación para la detección del reservorio implicado daría mejores alternativas para el manejo y control de posibles brotes.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo General**

Determinar las variantes genéticas de los virus de la rabia (RABV1) presentes en muestras del el Estado de México por reservorio.

### **5.2 Objetivos Específicos**

- Determinar por Inmunofluorescencia directa el diagnóstico a muestras posibles a rabia.
- Establecer la detección diferencial al virus de rabia por RT-PCR.
- Identificar el reservorio de acuerdo a la variantes genéticas del virus de la rabia en del Estado de México en muestras positivas del Laboratorio Estatal de Salud Pública.

## **6 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Tipo de Estudio**

El presente estudio es: observacional, descriptivo.

### **Universo de trabajo**

Catorce muestras positivas a rabia por inmunofluorescencia directa (IFD) provenientes del Estado de México, las muestras son encéfalos de animales infectados (perro, bovino, quirópteros.) , de rabia.

### **Criterios de inclusión**

Todas las muestras positivas a rabia por IFD remitidas al LESP del Estado de México en 1996-2010.

Con una tipificación antigénica.

Que el instrumento de recolección tenga los datos correctos.

### **Criterios de exclusión**

Muestras no conservadas adecuadamente

### **Instrumento de investigación**

Se utiliza el formato del LESP código RAB-FOR-01 que se encuentra declarado en el manual de calidad del laboratorio de rabia según, los lineamientos de la norma ISO9001-2000, el cual está compuesto de 9 partes.

Parte 1: datos del solicitante.

En esta parte se recolectan los datos del solicitante: nombre, domicilio, municipio, localidad y jurisdicción sanitaria.

Parte 2: tipo y características del animal.

Se obtienen los datos del animal: especie, raza, sexo y edad.

Parte 3: identificación y estado vacunal del animal.

Datos de identificación del animal: color, estado vacunal, tipo de vacuna empleada y fecha de la última vacunación.

Parte 4: lesionados.

Datos de la persona agredida, si fue o no provocado el animal agresor, si existen lesionados, fecha de la lesión, sitio de lesión, edad y sexo del o los lesionados.

Parte 5: existió contacto con.

Se obtiene la cantidad de personas y animales con quien tuvo contacto el animal agresor.

Parte 6: enfermedad y muerte del animal.

Tiempo que duró la enfermedad, la causa de muerte del animal (sacrificado, enfermedad) y fecha de la muerte.

Parte 7: descripción clara y breve de los datos clínicos.

Se redacta una historia clínica clara y breve incluyendo quién la elabora.

Parte 8: resultado de laboratorio.

Se da el resultado de IFD y/o Prueba biológica, nombre de la persona que comunica el resultado, por que vía se emite, nombre de la persona que recibe el resultado, fecha y hora de entrega del resultado.

Parte 9: Observaciones.

De las cual se utilizaran los siguientes datos:

Fecha de envío de muestra

Lugar de procedencia (jurisdicción sanitaria)

Especie

Resultado de laboratorio por IFD

### **Límite de tiempo**

El presente estudio se realizara de enero del año 2010 a diciembre del 2011.

### **Métodología**

Se identificaron los encéfalos diagnosticados como positivos por IFD y se confirmo nuevamente por IFD su positividad (67). Se inocularon en ratón lactante para replicar y amplificar el virus para posteriormente realizar la RT-PCR con el panel de iniciadores para identificar las variantes genéticas y posteriormente se realizo la secuenciación nucleotídica.

#### **6.1 Prueba biológica**

La prueba biológica (PB) de inoculación en raton lactante (68) se realizo con 0.2 mL del sobrenadante del homogenizado de encéfalo (0.5 g) homogenizado en 2.5 mL de diluyente para suspensión viral, los especímenes se observaron hasta el 28° día posterior a la inoculación para presentar signos clínicos positivos siguiendo el protocolo establecido por el InDRE ([www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx)), así como la NOM-011-SSA2-1993 Para la Prevencion y Control de la Rabia, (1993).

## **6.2 Extracción de ácidos nucleídos**

Se realizó la extracción de Ácidos Nucleícos totales a partir de 0.2 g de encéfalo homogenizado con 200  $\mu$ L de amortiguador de lisis usando el MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche, USA) en el equipo automatizado MagNA Pure LC instrument (Roche, USA) siguiendo el protocolo de lisis externa de acuerdo a las instrucciones de la compañía para obtener un volumen final de 50 $\mu$ L de ácidos nucleícos totales.

## **6.3 Diseño de iniciadores para variantes de Rabia**

Para el diseño de iniciadores se utilizó el programa vector NTI versión 10.5, en el que se tomaron en cuenta parámetros como la formación de orquillas, contenido de GC, formación de homoduplex y heteroduplex, etc. Se diseñaron 16 iniciadores, 2 pares para cada hospedero (perro, murcielago, vampiro y zorrillo).

## **6.4 Detección de variantes por RT-PCR**

La detección de las variantes de rabia de acuerdo al reservorio se realizó con los iniciadores diseñados en este trabajo.

Cada reacción fue de un solo paso empleando el SuperScript™III Platinum® One-Step Quantitative Kit (Invitrogen, USA) de acuerdo con las instrucciones de fabricante, usando 5  $\mu$ L de RNA total (aprox. 50 ng) en un volumen total de 25  $\mu$ L de reacción (cada 25  $\mu$ L de reacción contuvo 12.5  $\mu$ L SSIII buffer, 1U de SSIII

RT/Taq enzima, 4.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM de cada iniciador y 50 ng de RNA total). Las condiciones para detectar las variantes fueron las siguientes: 20 min a 50°C, 2 min a 94°C; 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a T<sub>m</sub> 55°C específica para cada par de iniciadores, 30s a 68°C; 5 min a 72°C en termociclador C1000 (BIO-RAD, USA).

### **6.5 PCR anidado**

La mezcla de reacción de la PCR se realizó de la siguiente manera : 1 µL templado DNA, 5 µL 10X buffer, 1µL 25mM MgCl<sub>2</sub>, 1µL dNTPs (conteniendo 5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µL 10 mM iniciador sentido, 1 µL 10mM iniciador antisentido, 45 µL agua grado PCR, and 1U Taq polimerasa, para tener un volumen final of 50 µL. La PCR se llevo acabo a 94°C predesnaturalización 5 min y 35 ciclos con 95°C desnaturalización 30 s, alineamiento T<sub>m</sub> 55°C específica para cada par de iniciadores 30 s y 72°C extensión 30 s, finalmente 72°C extensión 10 min.

### **6.6 RT-PCR con SYBR GREEN**

La detección con Syber green se realizó usando LCFastStart RNA Master SYBR-Green I (Roche, Germany). La mezcla de reactivos fue de acuerdo a las instrucciones del fabricante , 20 µL volumen total por reacción incluyendo 50 ng de RNA total y 0.01µM de iniciadores. La amplificación se realizó en el termociclador LightCycler 2.0 (Roche, Germany) en tiempo real con las siguientes condiciones : un ciclo de 55°C por 30 min, seguido de una desnaturalización a 95°C for 30 s, 45 ciclos con una desnaturalización de 95°C por 10 s, alineamiento

a 58°C for 10 s, y la elongación a 72°C por 20s, La medición de la señal de fluorescencia se efectuó durante la fase de extensión en modo single a 530 nm. Al finalizar la amplificación se efectuó un análisis de las curvas de disociación del producto de amplificación aumentando la temperatura a razón de 0.1 °C/s desde 65 hasta 95 °C mientras se registra la señal de fluorescencia a 530 nm en modo continuo y una etapa de enfriamiento de 40°C por 30s.

### **6.7 Análisis Electroforético**

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.5 % en regulador Tris-Acido Acético-EDTA (TAE).

### **6.8 Clonación de los fragmentos amplificados por PCR en un vector TOPO**

Los productos de PCR se purificaron con QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, UK). Se clonaron los productos de PCR en pCR®2.1-TOPO (Invitrogen cat. K4560-1), con 2 µL de producto de PCR, 1 µL solución salina, 2 µL de agua destilada estéril y 1 µL del vector TOPO, y se dejaron las reacciones por 30 min a 37 °C.

### **6.9 Células competentes de *E. coli* TOP 10**

Las células de *E. coli* se sembraron en una placa de agar LB durante toda la noche, se tomó una colonia y se sembró en 50 mL de medio líquido LB y se dejó crecer hasta una densidad óptica de 0.4 a 600 nm, el medio de cultivo se pasó a

un tubo falcon de 50 mL, se dejó enfriar a 4°C por 10 min, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min a 4°C y se decantó el sobrenadante, se agregaron 5 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M previamente enfriado y se mezcló, se centrifugó de nuevo a 4000 rpm por 10 min. El sobrenadante se retiró y se adiciono 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M frío y se homogenizo, se hicieron alícuotas de 200 µL en 5 diferentes tubos tipo eppendorf de 1.5 mL (Sambrook and Russel, 2001).

### **6.10 Transformación de *E. coli* Top 10**

Una vez terminada la clonación se transformo *E. coli* con las células competentes. A cada alícuota de células competentes se le agregaron los 6 µL de la reacción de clonación y se agita ligeramente, se dejó enfriar por 30 min en hielo y se realizo un choque térmico a 42°C por 90 s, se colocó en hielo 3 min y se adicionaron 800 µL de medio líquido LB, se dejó incubando durante 45 min a 37°C para posteriormente espatular 150 µL en placas LB ampicilina dejándolas incubando a 37°C durante 16 h (Sambrook and Russel, 2001).

### **6.11 Extracción de plásmido de *E. coli* transformada**

Se selecciono una clona y se inoculo en 5 mL de medio LB ampicilina por 5 h, se sigue el método para la extracción de plásmido de acuerdo al protocolo del kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen cat. K2100-10).

### **6.12 Análisis de secuencias**

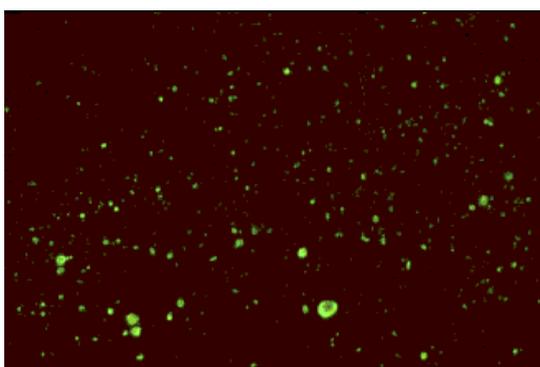
Los insertos contenidos en el plásmido TOPO-TA se secuenciaron en ABI Prism 377 DNA sequencer (Perkin–Elmer applied biosystems). Posteriormente las secuencias obtenidas de cada inserto se alinerán con el uso de Clustal X (Higgins et al., 1996). La identiifcación de las muestras se realizo con el uso de BLAST searches of the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>).

## 7 RESULTADOS

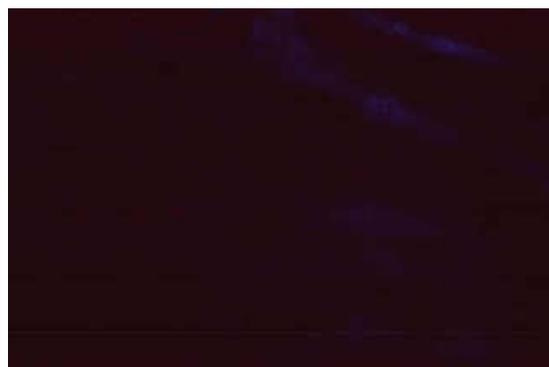
### 7.1 DIAGNÓSTICO POR INMUNOFLORESCENCIA

Para este trabajo 14 muestras diagnosticadas como positivas por el método por inmunofluorescencia en el LESP del Estado de México fueron seleccionadas y diagnosticadas por el mismo método, para confirmar el diagnóstico previo y que fuera consistente al momento de ser procesadas por el método alternativo propuesto en este trabajo. En la Figura 5 se muestra el patrón característico obtenido de muestra positiva y negativa al virus de la rabia por IFD directa.

a)



b)

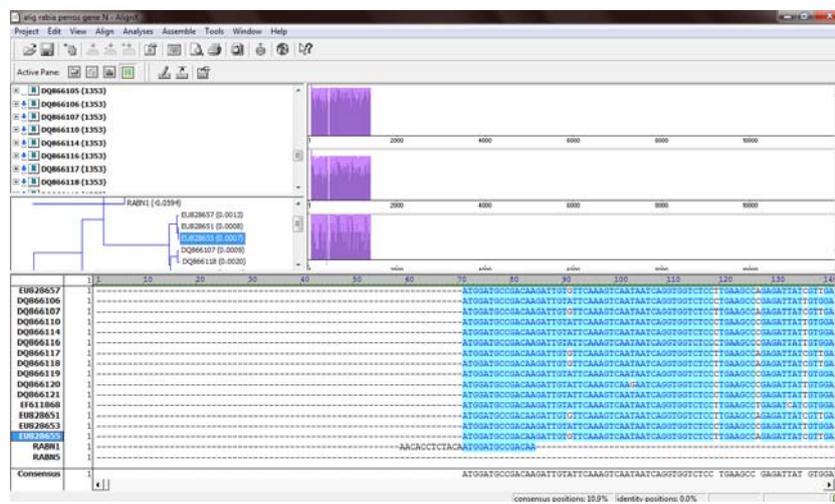


**Figura 5. a) Muestra positiva a rabia por inmunofluorescencia b) muestra negativa a rabia por inmunofluorescencia**

## 7.2 DISEÑO DE INICIADORES

Se realizaron alineamientos de secuencias completas del gen N del virus de la rabia obtenidas de base de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para diseñar los cuatro pares de iniciadores para cuatro variantes del virus de la rabia en regiones conservadas del gen N (Figura 6).

A



B

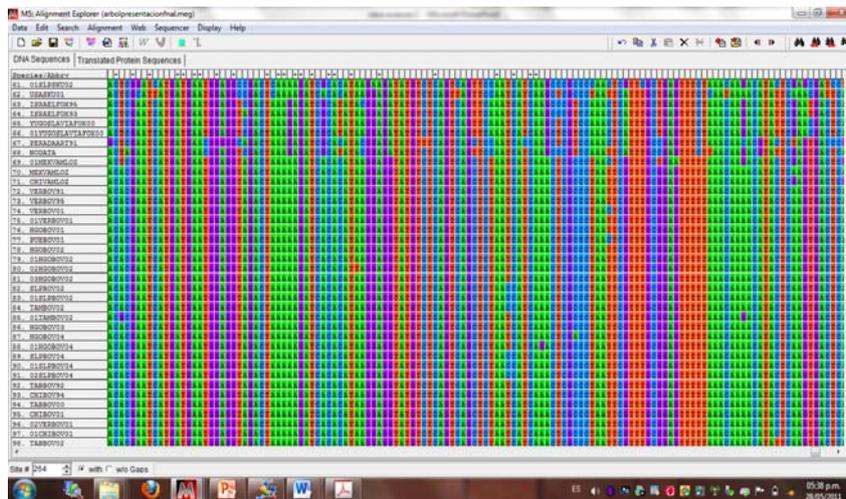


Figura 6. A Alineamiento de secuencias del gen N del virus de la rabia e iniciador RABN1 con Mega 5.0, B. Diseño de Iniciadores con el programa Vector NTI a partir de las secuencias del gen N.

Los iniciadores diseñados para este trabajo en secuencia de aminoácidos fueron 8 pares, cuatro para RT-PCR externo y cuatro para interno. El diseño de los iniciadores se hizo con la finalidad de tener un RT-PCR anidado para cada variante (Tabla 7 y 8).

**TABLA 7. Iniciadores externos usados para la detección de las variantes del virus de la rabia.**

Iniciador	Tm	SECUENCIA	Variante
Sentido VAMPIROF	55°C	FKVNNQV	Vampiro
Antisentido VAMPIRORC		RLLVLIPI	
Sentido PERROF	55°C	FKVNNQV	Perro
Antisentido PERRORC		NHQARPN	
Sentido MURCIELAGOF	55°C	FKVNNQV	Murcielago
Antisentido MURCIELAGORC		VPVYYFIS	
Sentido ZORRILOF	55°C	FKVNNQV	Zorrillo
Antisentido ZORRILLORC		ILSFFQVS	

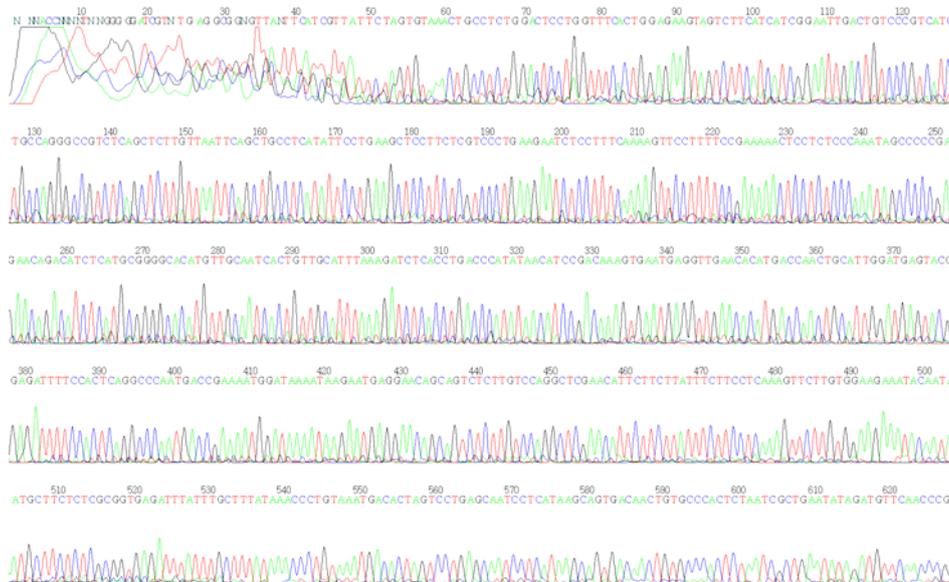
**TABLA 8. Iniciadores internos usados para la detección de las variantes del virus de la rabia.**

Iniciador	Tm	SECUENCIA	Variante
Sentido FBVFQ	55°C	HFANLK	Vampiro
Antisentido FBVRCQ		VSLVHS	
Sentido FBPFQ	55°C	CFHPYW	Perro
Antisentido PERRORC		IGYHAN	
Sentido FBMFQ	55°C	LSPVTI	Murcielago
Antisentido FBMRCQ		SKAFSN	
Sentido ZORRILOF	55°C	ASIWSD	Zorrillo
Antisentido FBZRCQ		HFANLK	

### 7.3 VALIDACIÓN DE INICIADORES

Para la validación de iniciadores se clonaron fragmentos amplificados por PCR en un vector TOPO-TA 2.1, se transformó *E. coli* y fueron extraídos por lisis alcalina (Sambrook, 2009). Posteriormente las secuencias obtenidas de electroferogramas (Figura 7) de cada inserto se alinaron con el uso de Clustal X (Higgins et al.,

1996). La identificación de las muestras se realizó con el uso de BLAST searches of the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>).



**Figura 7. Electroferograma de una clona**

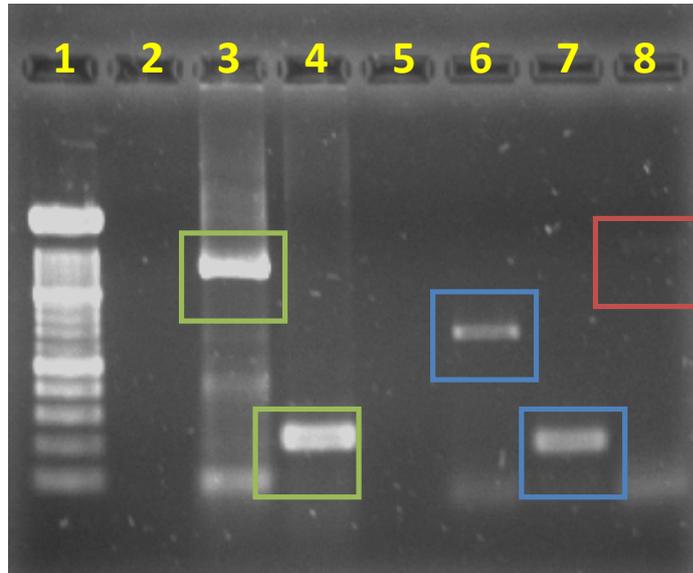
#### **7.4 ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE RT-PCR PARA VARIANTES**

Se utilizó gradiente de temperatura de +/- 5°C de acuerdo a cada T<sub>m</sub> de cada iniciador, se obtuvo la T<sub>m</sub> ideal para cada juego de iniciadores tanto externos como internos, una vez obtenida la T<sub>m</sub> ideal de cada iniciador se determinó la concentración de +Mg<sup>2</sup> ideal para cada iniciador.

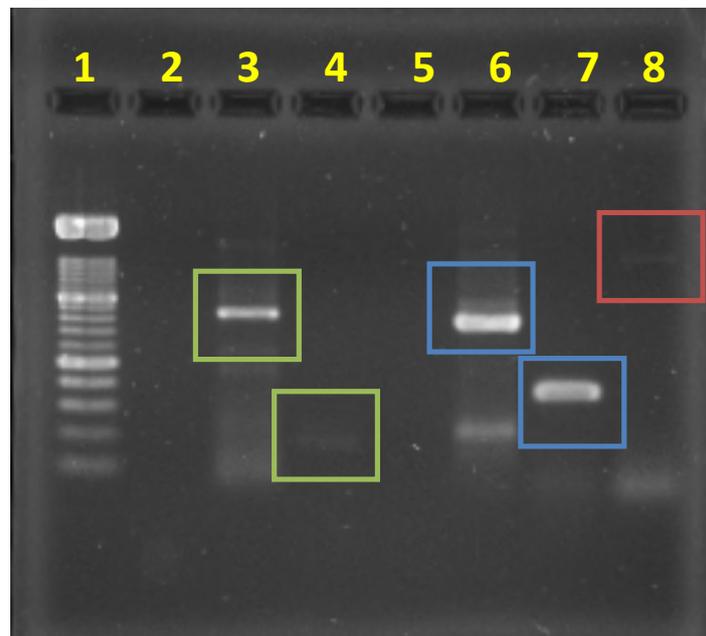
#### **7.5 RT-PCR Y PCR ANIDADO**

Se realizó RT-PCR y PCR anidado para cada variante del virus de la rabia obteniendo diferentes amplicones de acuerdo a cada diseño y variante (tabla 7 y 8). Para el análisis de perro y murcielago los amplicones largos fueron del orden de 1000 pb aproximadamente, en tanto que los amplicones de la hn-PCR fueron

de 200 pb (Figura 8). Para el análisis de zorrillo y vampiro los amplicones largos fueron del orden de 1000 pb aproximadamente, en tanto que los amplicones de la hn-PCR fueron de 300 pb (Figura9).



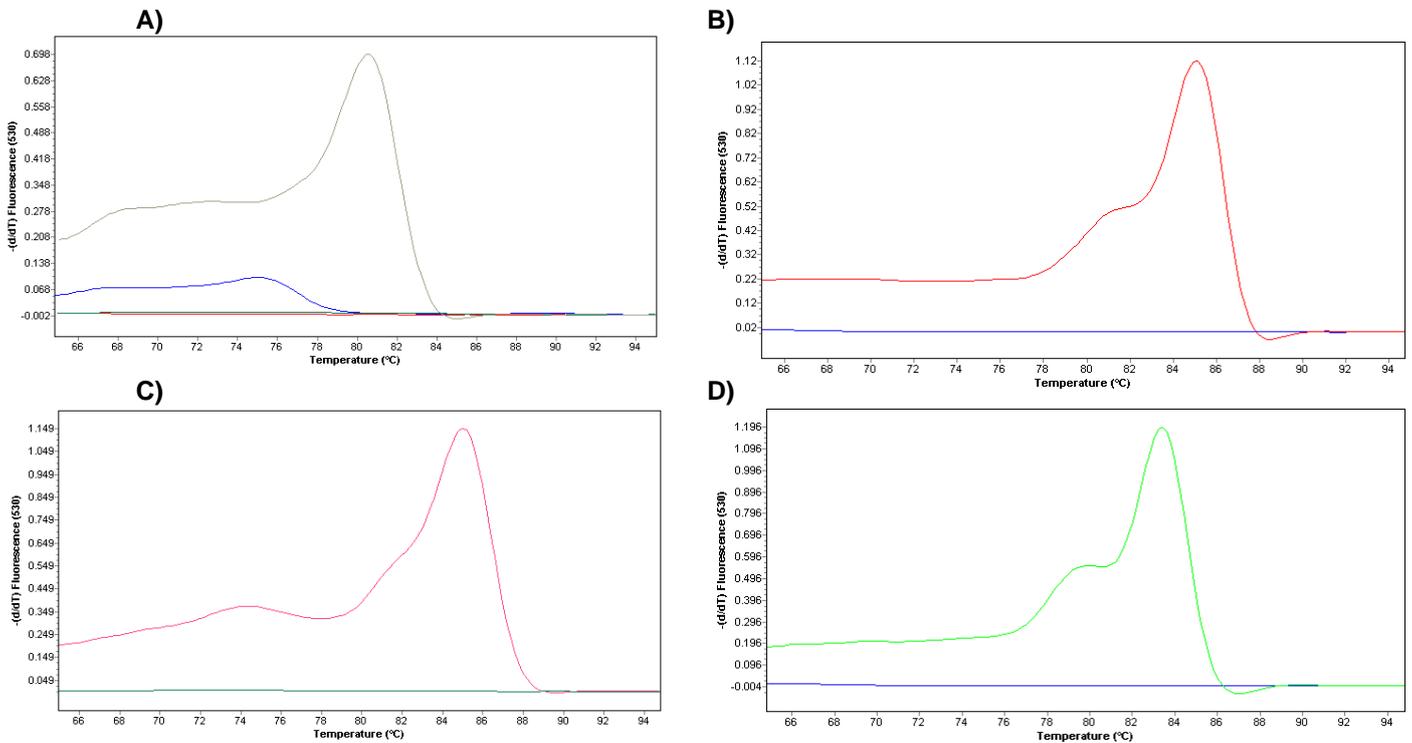
**Figura 8. Análisis electroforético de los amplicones perro y murcielago externos e internos. Carril 1. Marcador de peso molecular, pozo 2 y 5. Control negativo, pozo 3 y 6. Amplicones externos para perro y murcielago, pozo 4 y 7 amplicones internos para perro y murcielago. Carril 8. Control positivo.**



**Figura 9. Análisis electroforético de los amplicones vampiro y zorrillo externos e internos. Carril 1. Marcador de peso molecular, pozo 2 y 5. Control negativo, pozo 3 y 6. Amplicones externos para zorrillo y vampiro, pozo 4 y 7 amplicones internos para zorrillo y vampiro. Carril 8. Control positivo.**

### 7.6 Sybr Green RT-PCR

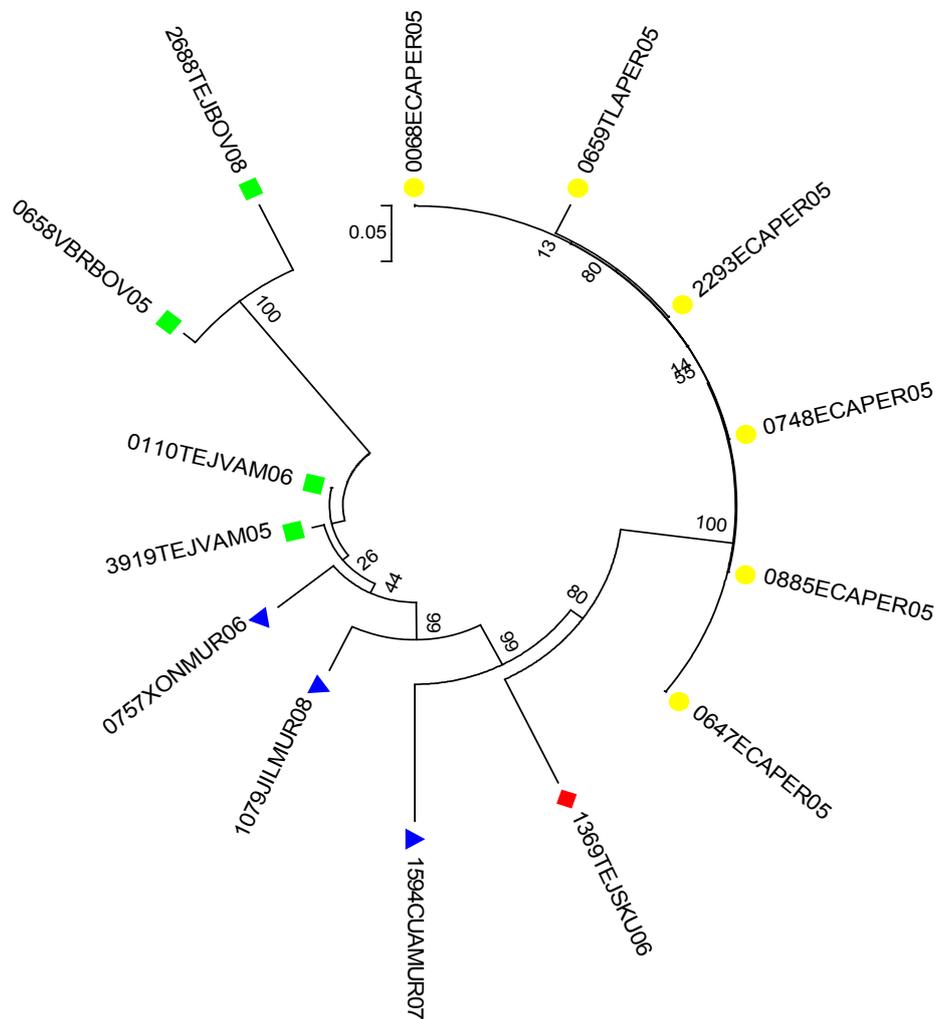
Se realizó RT-PCR utilizando el colorante Sybr Green para cada variante del virus de la rabia obteniendo diferentes temperaturas de disociación de acuerdo a cada diseño y variante (figura 10). Las temperaturas de disociación fueron: 83°C, 80°C, 85°C, 86°C para perro, murciélago, zorrillo y vampiro respectivamente.



**Figura 10. Curvas melting de las variantes de acuerdo al hospedero. Las temperaturas de disociación fueron: 83°C, 80°C, 85°C, 86°C respectivamente.**

## 7.7 Analisis taxonómico

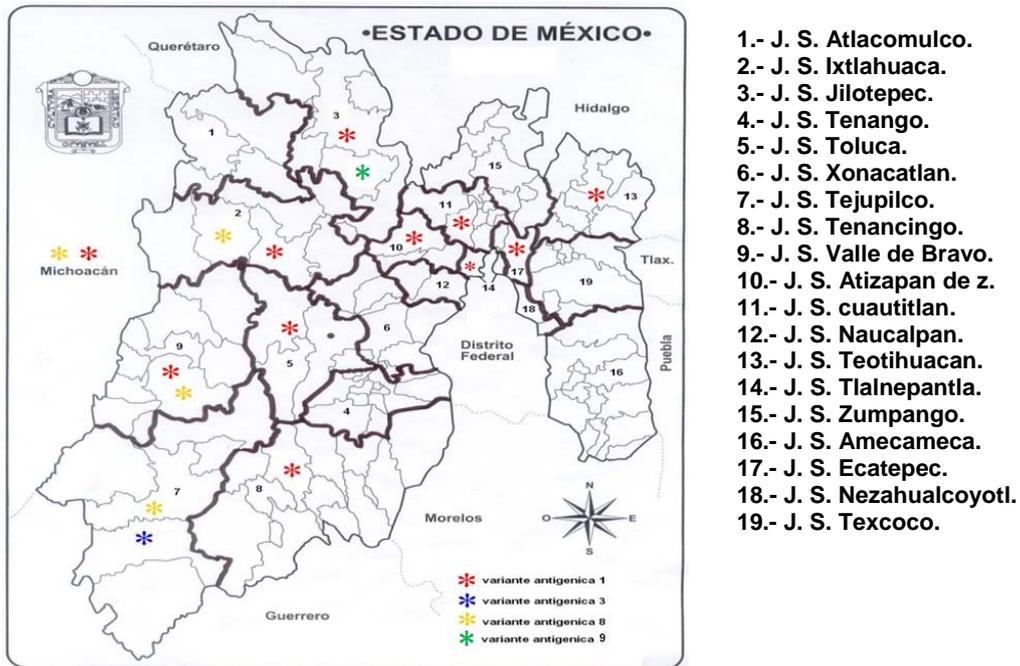
Se obtuvo un árbol taxonómico con el análisis bioinformático de las secuencias de los amplicones obtenidos apartir de las muestras en estudio. El árbol taxonómico obtenido con las 14 muestras con una secuencia de 1053pb con el algoritmo neighbor-joining con 1000 bootstraps (figura 11).



**FIGURA 11. Árbol taxonómico generado con el algoritmo neighbor-joining.** ● iniciador perro, ◆ iniciador zorrillo, ▲ iniciador murciélago, ■ iniciador vampiro.

## **8 DISCUSIÓN**

Para el diagnóstico del virus de la rabia, la prueba de inmunofluorescencia directa (IFD) es la gold standard (69), en esta prueba se usa un anticuerpo monoclonal conjugado con fluoresceína dirigido a la nucleoproteína N del virus de la rabia, ésta prueba se utilizó para redianosticar las 14 muestras seleccionadas y comprobar su viabilidad, la IFD detecta al genotipo 1 rabia pero no tiene la sensibilidad para detectar variantes antigénicas de acuerdo a su reservorio. Se han realizado estudios para determinar la existencia de distintas variantes asociadas con hospederos terrestres específicos (perros,zorrillos) y especies de quirópteros (murcielagos no hematofagos y murcielagos vampiros), las variantes antigénicas reportadas en el Estado de México son: Vag1, Vag3, Vag8 y Vag9 en sus respectivos reservorios(figura 12).



**Figura 12. Variantes antigénicas reportadas del estado de México y su distribución.**

Los iniciadores se diseñaron para detectar las 4 variantes reportadas en el Estado de México de acuerdo a su reservorio. Se ha utilizado el RT-PCR para el diagnóstico de rabia en general y para detectar los genotipos del virus, pero no para detectar variantes; para ello se utilizó un panel de 8 anticuerpos monoclonales que diferencian 11 variantes antigénicas del virus de la rabia(64).

La técnica de anticuerpos monoclonales consiste en una inmunofluorescencia indirecta; en algunos casos se han reportado patrones atípicos. Es decir, el panel de los 8 anticuerpos monoclonales no es capaz de discernir la variante antigénica del virus de la rabia(70).

Se ha utilizado el RT-PCR para el diagnóstico de rabia en general por su alta sensibilidad, más que la inoculación en ratón (MIT) y cultivo celular en Neuroblastoma de Ratón (RTCIT), éste diagnóstico se basa en la detección de

fragmento del virus altamente conservado, la mayoría de los estudios amplifican una región de la nucleoproteína N (15), debido a que codifica para una proteína implicada en mecanismos de regulación transcripcional y replicación del virus, además de desempeñar un factor importante en la adaptación en el hospedero, comparte un 80% de similitud del gen N y un 92% en aminoácidos de Nucleoproteína con los diferentes genotipos relacionados con Rabia (63).

La detección se ha realizado en RT-PCR por ser una herramienta sensible y de uso rutinario en el diagnóstico en particular en muestras descompuestas (71-73) o en muestras preservadas(74, 75). La RT-PCR semianidada y anidada aumentan la sensibilidad y se ha usado en muestras antemortem (saliva, LCF, ICC) y postmortem (tejido de cerebro) (Tabla 9).

**Tabla 9: Ensayos convencionales de PCR basados en análisis electroforético para la detección de lissavirus.**

Genotipo	PCR	Nombre del oligo	Sentido	Secuencia	Detalles		
Todos	standard	N1	F	TTT GAG ACT GCT CCT TTT			
		N2	R	CC CAT ATA GCA TCC TAC			
	heminested	JW12	F	ATGTAACACCYCTACAATG	universal lyssavirus primer		
		JW6 (DPL)	R	CAATTCGCACACATTTTGTG	1st round (DUVV, RABV, LBV)		
		JW6 (E)	R	CAGTTGGCACACATCTTGTG	1st round (EBLV-1 and 2)		
		JW6 (M)	R	CAGTTAGCGCACATCTTATG	1st round (MOKV)		
		JW10 (ME1)	R	GTCATCAATGTGTGRTGTTTC	2nd round (MOKV, EBLV1)		
		jw12 (DLE2)	R	GTCATCAAAGTGTGRTGCTC	2nd round (DUVV, LBV, EBLV-2)		
		JW10 (P)	R	GTCATTAGAGTATGGTGTTC	2nd round (RABV)		
		nested	D017	F	AGATCAATATGAGTAYAARTAYCC	2nd round forward primer instead of JW12, otherwise identical to Heaton et al.	
		nested		LISEBL1F	F	AAGATGTGTGCCAACTGGAG	1st round
				LISEBL1R	R	ATGTTTGAGCCAGGGCAAGA	
LISEBL2F	F			TACTGCTTATGAGGATTGTTTC	2nd round		
nested		LISEBL2R	R	AAGAACTTCGAGGAAGAGATC			
		GRAB1F	F	AARATNGTRGARCAACACAC	1st round		
		GRAB1R	R	GCRTTSGANGARTAAGGAGA			
		GRAB2F	F	AARATGTGYGCIYAAYTGGAG	2nd round		
		GRAB2R	R	TCYTGHCIGGCTCRAACAT			

Modificado de: Fooks et al 2009

Otros estudios en los que se ha usado RT-PCR anidada o semianidada son : (a) Un estudio realizado con hnRT-PCR para la detección del virus de la rabia, en el que usaron 60 muestras y seis aislamientos de los siete genotipos de la rabia y virus relacionados, éstos fueron evaluados con éxito por hnRT-PCR e hibridación Southern blot, se obtuvo de los 60 aislamientos, 93% (56 de 60) fueron positivas por PCR externa, mientras que todos los aislados fueron detectados por PCR heminested y la hibridación de Southern blot. La detección por IFD fue deficiente para detectar el antígeno viral en el tejido cerebral que se incubó a 37 ° C por más de 72 h, mientras que se logró detectar el virus por hnRT-PCR en el tejido cerebral que se incubó a 37 ° C durante 360 h(76). (b) En otro estudio realizado por RT-PCR anidado, diseñado para la detección del virus de la rabia en el murciélago europeo en muestras bucofaríngeas y en encéfalos, la técnica fue utilizada con éxito para la vigilancia del murciélago serotino (*Eptesicus serotinus*) involucrado en un caso de exposición humana, en las que 15 de las 71 muestras bucofaríngeas fueron positivas. La infección por Lyssavirus se detectó en 13 de las muestras bucofaríngeas, pero sólo en cinco cerebros de los 34 animales, esta técnica ofreció en esta investigación la posible proyección de la población de murciélagos silvestres para la infección por lyssavirus activa, la investigación con fines epidemiológicos, de acuerdo no sólo con las políticas de conservación, sino también de una manera más eficiente que las técnicas de detección clásicas que utilizan tejido cerebral (77). Todos los trabajos antes mencionados sustentan que

la hnRT-PCR y RT-PCR anidado son específicos y sensibles para la detección del virus de la rabia.

En este trabajo los iniciadores propuestos fueron para la detección por RT-PCR anidada de variantes a diferencia de los estudios realizados que son para detectar los genotipos del virus mas no para detectar variantes (Tabla 9). Se realizó una estandarización de los iniciadores dando una  $T_m$  homogénea de 55°C y se determinó que la reacción no es altamente dependiente de una concentración de cofactor con una concentración óptima de  $Mg^{2+}$  1.25mM.

Trabajos recientes se han enfocado en mejorar la tecnología de PCR al hacerla más sensible y rápida a la que llamaron PCR en tiempo Real, estas metodologías eliminan la necesidad de analizar los amplicones por análisis electroforético en geles de agarosa, además de la reducción de los resultados falsos positivos y evita la contaminación de amplicones en los laboratorios. Los amplicones producidos por PCR en tiempo real se detectan conforme se van generando debido a que se intercalando un fluorocromo (Sybr Green, Rox, Eva green) en la doble cadena de DNA; una de las químicas más empleadas es la del formato TaqMan que usan sondas marcadas, esta metodología fue descrita por Lee et al en 1993(78), cabe mencionar que ésta última es más costosa que el uso de un fluorocromo intercalado, por esa razón el uso de RT-PCR con Syber Green resulta atractivo para detección rutinaria a bajo costo en tiempo real. En estudios realizados para detección del virus de la rabia por SYBR green se ha detectado de manera exitosa en muestras de saliva en humanos antemortem (79), en muestras

de saliva y líquido cefalorraquídeo (LCR) de la sospecha de perros rabiosos en el momento de la cuarentena, 13 de los 15 perros (87%) fueron positivos para rabia. Dos perros con rabia furiosa dieron negativos a rabia por saliva. Se encontraron 4 positivos de 15 perros (27%) en LCR previamente positivos con saliva, en este estudio se evidenció que el virus puede estar ausente o presente en niveles muy bajos en ambos fluidos, además a pesar de la detección del virus de la rabia antemortem, en la toma de muestras para el diagnóstico ante-mortem definitivamente no se puede descartar la rabia(80). El uso de RT-PCR en tiempo real así como heminested RT-PCR en un estudio permitió la detección de virus de la rabia, 23 muestras positivas y nueve muestras negativas con el 100% de concordancia en ambos métodos en muestras de animales terrestres y los murciélagos amplificados en ratón (81).

Para las variantes vag1, vag3 y vag9 por RT-PCR en tiempo real se tuvo un 100% de concordancia con los iniciadores perro, vampiro y murcielago respectivamente por ambos métodos así como para la Vag8 aislada en su reservorio natural (Zorrillo). Para las Vag8 aisladas en bovinos se obtuvieron resultados positivos para los iniciadores vampiro tanto por punto final como por tiempo real, por lo cual se decidió secuenciar los amplicones para confirmar la detección del lyssavirus y obtener datos para el análisis bioinformático utilizando la herramienta blast y confirmar la variante vampiro para las dos muestras. En dos muestras atípicas por monoclonales y realizando la detección por los iniciadores se obtuvo un resultado positivo para el par de iniciadores murcielago tanto por punto final y tiempo real que se confirmó por secuenciación.

## **Análisis taxonómico**

El análisis de las secuencias de nucleótidos permite entender la transmisión del virus de la rabia de un hospedero a otro incluyendo humanos y animales domésticos(82-84).

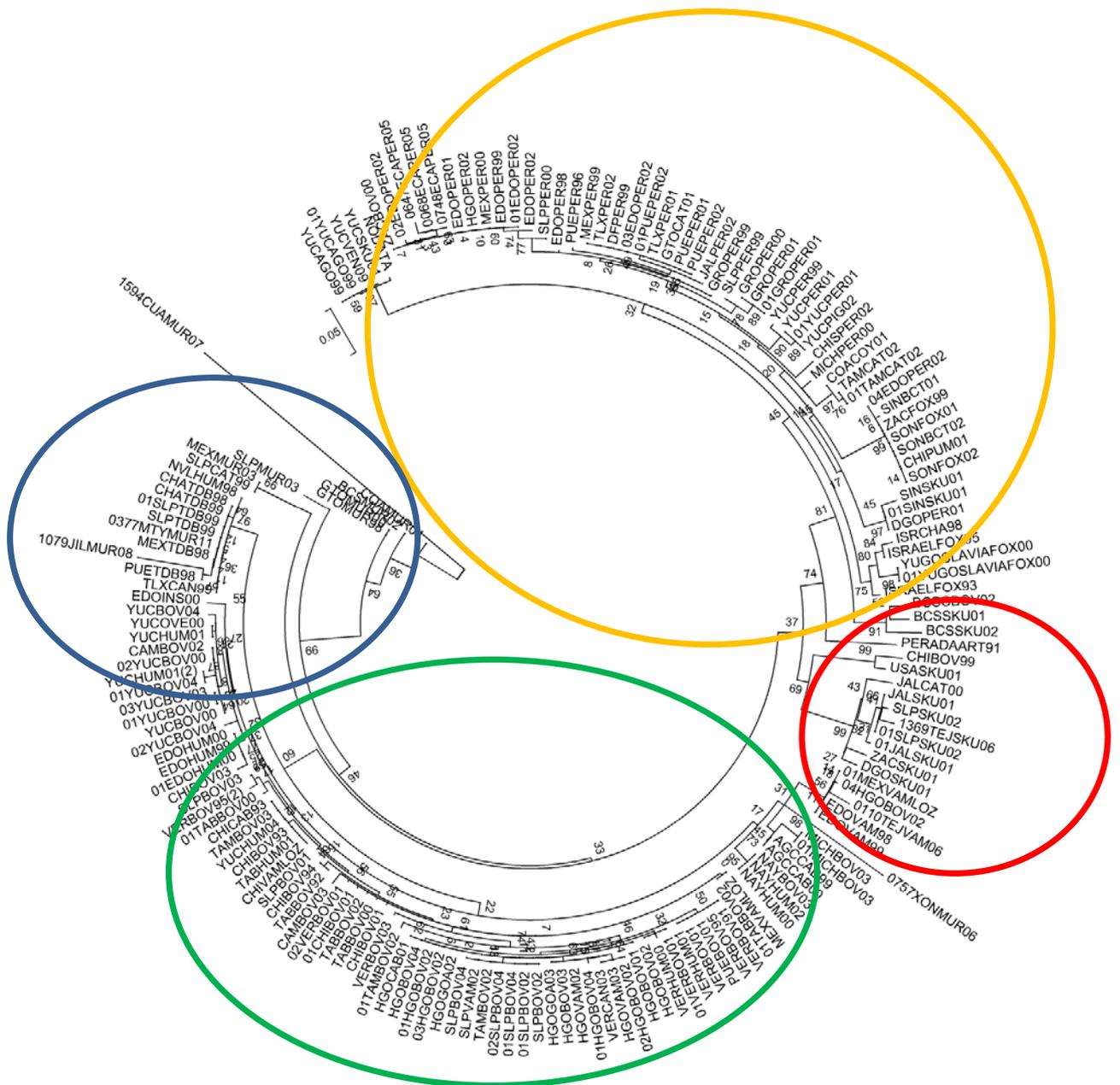
El análisis taxinómico basado en 1053 pb del gen N demostró que todos los virus investigados en las 14 muestras fueron del genotio 1 y de cuatro diferentes variantes de acuerdo al hospedero (zorrillo, murcielago, vampiro y perro) ( Figura 11).

Se usaron las secuencias obtenidas en este trabajo en un análisis taxonómico que incluye secuencias de la base de datos (NCBI) cuyo numero de acceso es:

DQ416036, DQ416037, DQ416038, DQ416039, DQ416040, DQ416041,  
DQ416042, DQ416043, DQ416044, DQ416045, DQ416046, DQ416047,  
DQ416048, DQ416049, DQ416050, DQ416051, DQ416052, DQ416053,  
DQ416054, DQ416055, DQ416056, DQ416057, DQ416058, DQ416059,  
DQ416060, DQ416061, DQ416062, DQ416063, DQ416064, DQ416065,  
DQ416066, DQ416067, DQ416068, DQ416069, DQ416070, DQ416071,  
DQ416072, DQ416073, DQ416074, DQ416075, DQ416076, DQ416077,  
DQ416078, DQ416079, DQ416080, DQ416081, DQ416082, DQ416083,  
DQ416084, DQ416085, DQ416086, DQ416087, DQ416088, DQ416089,  
DQ416090, DQ416091, DQ416092, DQ416093, DQ416094, DQ416095,  
DQ416096, DQ416097, DQ416098, DQ416099, DQ416100, DQ416101,  
DQ416102, DQ416103, DQ416104, DQ416105, DQ416106, DQ416107,

DQ416108, DQ416109, DQ416110, DQ416111, DQ416112, DQ416113,  
DQ416114, DQ416115, DQ416116, DQ416117, DQ416118, DQ416119,  
DQ416120, DQ416121, DQ416122, DQ416123, DQ416124, AY854587,  
AY854595, AY8774335, AY561764, AY561762, AY561763, AY561770,  
AY561766, AY561765, AY561774, AY561772, AY561775, AY561778,  
AY561779, AY561776, AY561788, AY561773, AY561780, AY561789,  
AY561771, AY561781, AY561782, AY561786, AY561769, AY561768,  
AY561783, AY561784, AY561785, AY561787, AY561767, AY561790,  
AY561791, AY561792, AY561794, AY561795, AY561796, AY561797,  
AY561793, AY561804, AY561805, AY561806, AY561798, AY561799,  
AY561802, AY561803, AY561800, AY561801, AY561777, AY561818,  
AY561819, AY561820, AY561821, AY561822, AY561807, AY561808,  
AY561809, AY561810, AY561813, AY561811, AY561812, AY561814,  
AY561815, AY561816, AY561817.

El análisis taxonómico dio como resultado el agrupamiento de las secuencias consistentes en el genotipo 1 y agrupadas en 4 grupos de acuerdo con el diseño de iniciadores para detectar las variantes Perro, Zorrillo, Murcielago y Vampiro respectivamente (figura13).



**FIGURA 14.** Árbol taxonómico generado con el algoritmo neighbor-joining. ○ iniciador perro, ○ iniciador zorrillo, ○ iniciador murcielago, ○ iniciador vampiro.

## 9 CONCLUSIONES

- La detección del virus de Rabia en las muestras seleccionadas fue adecuado por Inmunofluorescencia directa.
- El diseño de de iniciadores para detección de variantes del virus de la Rabia (RABV1) concordó de acuerdo al reservorio.
- Con la detección propuesta por hnRT-PCR y RT-PCR Syber Green se logró Identificar el reservorio de acuerdo a la variantes genéticas del virus de la rabia en muestras positivas del Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de México.
- La detección diferencial al virus de rabia concordó al 100% por hnRT-PCR RT-PCR Sybr Green.
- Las variantes genéticas de los virus de la rabia (RABV1) fueron Variante perro, Variante vampiro, Variante zorrilo y Variante murcielago en muestras del Estado de México.

## REFERENCIAS

1. Dean DJ, Ableseth MK. Laboratory techniques in rabies: the fluorescent antibody test. *Monogr Ser World Health Organ.* 1973(23):73-84.
2. Rupprecht CE, Stohr, K. and Meredith, C. . *Viral and Prion Diseases.* In: Williams ES, editor. *Infectious diseases of wild mammals.* Ames, Iowa.: Iowa State University Press, Inc.,; 2001 p. 3-36.
3. Wunner WH. Rabies virus 23-68. In: Jackson AC, editor. *Rabies. SECOND EDITION* ed. San Diego, USA: Academic Press, Inc; 2007.
4. Tordo N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: Meslin FX, Koprowski, H, editor. *Laboratory techniques in rabies.* Geneva: WHO; 1996. p. 28-52.
5. Guichard P, Krell T, Chevalier M, Vaysse C, Adam O, Ronzon F, et al. Three dimensional morphology of rabies virus studied by cryo-electron tomography. *J Struct Biol.* 2011 Oct;176(1):32-40.
6. Marston DA, McElhinney LM, Johnson N, Muller T, Conzelmann KK, Tordo N, et al. Comparative analysis of the full genome sequence of European bat lyssavirus type 1 and type 2 with other lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G-L 3' non-translated region. *J Gen Virol.* 2007 Apr;88(Pt 4):1302-14.
7. Albertini AA, Schoehn G, Weissenhorn W, Ruigrok RW. Structural aspects of rabies virus replication. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Jan;65(2):282-94.
8. Schneider LG. Rabies virus vaccines. *Dev Biol Stand.* 1995;84:49-54.
9. Nadin-Davis SA, Loza-Rubio E. The molecular epidemiology of rabies associated with chiropteran hosts in Mexico. *Virus Res.* 2006 May;117(2):215-26.
10. Kuzmin IV, Botvinkin AD, McElhinney LM, Smith JS, Orciari LA, Hughes GJ, et al. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. *J Wildl Dis.* 2004 Oct;40(4):617-31.
11. Botvinkin AD, Kuzmin IV, McElhinney LM, Johnson N, Fooks AR. The diversity of rabies virus in Russia demonstrated by anti-nucleocapsid monoclonal

- antibody application and limited gene sequencing. *Dev Biol (Basel)*. 2006;125:79-90.
12. Hanlon CA, Kuzmin IV, Blanton JD, Weldon WC, Manangan JS, Rupprecht CE. Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. *Virus Res*. 2005 Jul;111(1):44-54.
  13. McElhinney LM, Marston DA, Stankov S, Tu C, Black C, Johnson N, et al. Molecular epidemiology of lyssaviruses in Eurasia. *Dev Biol (Basel)*. 2008;131:125-31.
  14. Kuzmin IV, Mayer AE, Niezgodna M, Markotter W, Agwanda B, Breiman RF, et al. Shimoni bat virus, a new representative of the Lyssavirus genus. *Virus Res*. 2010 May;149(2):197-210.
  15. Hooper DC, Roy A, Barkhouse DA, Li J, Kean RB. Rabies virus clearance from the central nervous system. *Adv Virus Res*. 2011;79:55-71.
  16. Hooper DC, Pierard I, Modelska A, Otvos L, Jr., Fu ZF, Koprowski H, et al. Rabies ribonucleocapsid as an oral immunogen and immunological enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Nov 8;91(23):10908-12.
  17. Albertini AA, Clapier CR, Wernimont AK, Schoehn G, Weissenhorn W, Ruigrok RW. Isolation and crystallization of a unique size category of recombinant Rabies virus Nucleoprotein-RNA rings. *J Struct Biol*. 2007 Apr;158(1):129-33.
  18. Gerard FC, Ribeiro Ede A, Jr., Leyrat C, Ivanov I, Blondel D, Longhi S, et al. Modular organization of rabies virus phosphoprotein. *J Mol Biol*. 2009 May 22;388(5):978-96.
  19. Li J, Rahmeh A, Morelli M, Whelan SP. A conserved motif in region v of the large polymerase proteins of nonsegmented negative-sense RNA viruses that is essential for mRNA capping. *J Virol*. 2008 Jan;82(2):775-84.
  20. Rabies in Boston. *J Mass Assoc Boards Health*. 1899 Mar;9(1):17-39.
  21. Lahaye X, Vidy A, Pomier C, Obiang L, Harper F, Gaudin Y, et al. Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. *J Virol*. 2009 Aug;83(16):7948-58.

22. Mebatsion T, Weiland F, Conzelmann KK. 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.* 1999 Jan;73(1):242-50.
23. [www.fai.unne.edu.ar/biologia/virologia/Rhadboviruses.htm](http://www.fai.unne.edu.ar/biologia/virologia/Rhadboviruses.htm). 2005.
24. Jackson AC. Pathogenesis. In: Wunner ACJaWH, editor. *Rabies*. San Diego, USA: Academic Press, Inc.; 2007. p. 341-82.
25. Hampson K, Dushoff J, Cleaveland S, Haydon DT, Kaare M, Packer C, et al. Transmission dynamics and prospects for the elimination of canine rabies. *PLoS Biol.* 2009 Mar 10;7(3):e53.
26. Schnell MJ, McGettigan JP, Wirblich C, Papaneri A. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Jan;8(1):51-61.
27. Willoughby RE, Jr., Tieves KS, Hoffman GM, Ghanayem NS, Amlie-Lefond CM, Schwabe MJ, et al. Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N Engl J Med.* 2005 Jun 16;352(24):2508-14.
28. Baer GM. Animal models in the pathogenesis and treatment of rabies. *Rev Infect Dis.* 1988 Nov-Dec;10 Suppl 4:S739-50.
29. Fekadu M. Canine rabies. *Onderstepoort J Vet Res.* 1993 Dec;60(4):421-7.
30. Bogel K, Joshi DD. Accessibility of dog populations for rabies control in Kathmandu valley, Nepal. *Bull World Health Organ.* 1990;68(5):611-7.
31. Wandeler AI, Matter HC, Kappeler A, Budde A. The ecology of dogs and canine rabies: a selective review. *Rev Sci Tech.* 1993 Mar;12(1):51-71.
32. Niezgodá M, Briggs DJ, Shaddock J, Rupprecht CE. Viral excretion in domestic ferrets (*Mustela putorius furo*) inoculated with a raccoon rabies isolate. *Am J Vet Res.* 1998 Dec;59(12):1629-32.
33. Chotmongkol V, Vuttivirojana A, Cheepblangchai M. Unusual manifestation in paralytic rabies. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1991 Jun;22(2):279-80.

34. Cooke RP, Sharma R, Burman R. Putting theory into practice--infection control lessons following a delayed diagnosis of paralytic rabies. *J Hosp Infect.* 2006 Aug;63(4):482.
35. Brown CM, Conti L, Etestad P, Leslie MJ, Sorhage FE, Sun B. Compendium of animal rabies prevention and control, 2011. *J Am Vet Med Assoc.* 2011 Sep 1;239(5):609-17.
36. Nadin-Davis SA. Molecular Epidemiology. In: Wunner ACJaWH, editor. *Rabies.* San Diego, USA: Academic Press, Inc.; 2007. p. 69-122.
37. Cathleen A. Hanlon MN, and Charles e. Rupprecht. Rabies in Terrestrial Animals. In: Wunner ACJaWH, editor. *RABIES.* San Diego, USA: Academic Press, Inc.; 2007. p. 201-58.
38. Caramori Junior JG, Lubas MA, Kawatake MS, Sales KG, Guedes JC, Schmitt AC. [Epidemiologic investigation into characteristics of canine and feline population in a district close to a rural area in Cuiaba-MT, with a view to control of animal rabies]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003 May-Jun;36(3):419-20.
39. Leroy M, Pire G, Baise E, Desmecht D. Expression of the interferon-alpha/beta-inducible bovine Mx1 dynamin interferes with replication of rabies virus. *Neurobiol Dis.* 2006 Mar;21(3):515-21.
40. George DB, Webb CT, Farnsworth ML, O'Shea TJ, Bowen RA, Smith DL, et al. Host and viral ecology determine bat rabies seasonality and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jun 21;108(25):10208-13.
41. Davis PL, Bourhy H, Holmes EC. The evolutionary history and dynamics of bat rabies virus. *Infect Genet Evol.* 2006 Nov;6(6):464-73.
42. Baer GM, Harrison AK, Bauer SP, Shaddock JH, Murphy FA. A bat rabies isolate with an unusually short incubation period. *Exp Mol Pathol.* 1980 Oct;33(2):211-22.
43. Jackson AC. Why does the prognosis remain so poor in human rabies? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010 Jun;8(6):623-5.
44. Jackson AC, Warrell MJ, Rupprecht CE, Ertl HC, Dietzschold B, O'Reilly M, et al. Management of rabies in humans. *Clin Infect Dis.* 2003 Jan 1;36(1):60-3.

45. Jackson AC, Kammouni W, Fernyhough P. Role of oxidative stress in rabies virus infection. *Adv Virus Res.* 2011;79:127-38.
46. Fishbein DB, Yenne KM, Dreesen DW, Teplis CF, Mehta N, Briggs DJ. Risk factors for systemic hypersensitivity reactions after booster vaccinations with human diploid cell rabies vaccine: a nationwide prospective study. *Vaccine.* 1993 Nov;11(14):1390-4.
47. Willoughby RE, Jr. A cure for a rabies? *Sci Am.* 2007 Apr;296(4):88-95.
48. Willoughby RE, Jr., Hammarin AL. Prophylaxis against rabies in children exposed to bats. *Pediatr Infect Dis J.* 2005 Dec;24(12):1109-10.
49. Warrell MJ. Intradermal Rabies Vaccination: The Evolution and Future of Pre- and Post-exposure Prophylaxis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012;351:139-57.
50. Wunner WH, Briggs DJ. Rabies in the 21 century. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(3):e591.
51. Wunner WH. Rabies in the Americas. *Virus Res.* 2005 Jul;111(1):1-4.
52. Kaare M, Lembo T, Hampson K, Ernest E, Estes A, Mentzel C, et al. Rabies control in rural Africa: evaluating strategies for effective domestic dog vaccination. *Vaccine.* 2009 Jan 1;27(1):152-60.
53. Nau JY. [African rabies has originated from Europe]. *Rev Med Suisse.* 2009 Apr 22;5(200):922.
54. Salahuddin N, Jamali S, Ibraheem K, Sardar S. Awareness about rabies post exposure prophylaxis in Pakistan among patients and health care workers: results from an Asian Rabies Expert Bureau study. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2011 Aug;21(8):491-4.
55. Avilés JE. Antropología e historia de la rabia a nivel mundial y en América. México, D.F. : Ediciones Joma; 1981. p. 33-46
56. Baer GM. Vampire bat and bovine paralytic rabies. In: Baer GM, editor. *The natural history of rabies* Florida: CRC Press, Inc, Boca Raton.; 1991. p. 389-404.

57. Velasco-Villa A, Gomez-Sierra M, Hernandez-Rodriguez G, Juarez-Islas V, Melendez-Felix A, Vargas-Pino F, et al. Antigenic diversity and distribution of rabies virus in Mexico. *J Clin Microbiol.* 2002 Mar;40(3):951-8.
58. Eliminación de la rabia humana transmitida por perros en América Latina. Washington, D.C: Organización Panamericana de la Salud. Área de Prevención y Control de Enfermedades. Unidad de Salud Pública Veterinaria 2005.
59. NOM-011-SSA2-1993 Para la Prevencion y Control de la Rabia, (1993).
60. Boletín de vigilancia epidemiológica de la rabia en las Américas: SINAVE 2002.
61. De Mattos CC, De Mattos CA, Loza-Rubio E, Aguilar-Setien A, Orciari LA, Smith JS. Molecular characterization of rabies virus isolates from Mexico: implications for transmission dynamics and human risk. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Oct;61(4):587-97.
62. Dean S. Rabies and quarantine. *Vet Rec.* 1996 Nov 30;139(22):551.
63. Fooks AR, Johnson N, Freuling CM, Wakeley PR, Banyard AC, McElhinney LM, et al. Emerging technologies for the detection of rabies virus: challenges and hopes in the 21st century. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(9):e530.
64. Velasco-Villa A, Orciari LA, Juarez-Islas V, Gomez-Sierra M, Padilla-Medina I, Flisser A, et al. Molecular diversity of rabies viruses associated with bats in Mexico and other countries of the Americas. *J Clin Microbiol.* 2006 May;44(5):1697-710.
65. Albas A, Souza EA, Lourenco RA, Favoretto SR, Sodre MM. [Antigen profile of rabies virus isolated from different species of non-hematophagous bats in the region of Presidente Prudente, State of Sao Paulo]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009 Jan-Feb;42(1):15-7.
66. Trimarchi C. V. SAN-D. Diagnostic Evaluation. In: Wunner ACJaWH, editor. *Rabies.* San Diego, USA: Academic Press, Inc; 2007.

67. Dean D. J. AMK, Atanasiu P. . The fluorescent antibody test. In: Meslin F.-X. KMM, Koprowski H., editor. Laboratory techniques in rabies. fourth ed. Geneva, Switzerland: WHO; 1996. p. 88-95.
68. Koprowski H. Laboratory techniques in rabies: the mouse inoculation test. Monogr Ser World Health Organ. 1973(23):85-93.
69. Hostnik P. The modification of fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) test for the detection of antibodies to rabies virus. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2000 Aug;47(6):423-7.
70. Cisterna D, Bonaventura R, Caillou S, Pozo O, Andreau ML, Fontana LD, et al. Antigenic and molecular characterization of rabies virus in Argentina. Virus Res. 2005 May;109(2):139-47.
71. David D, Yakobson B, Rotenberg D, Dveres N, Davidson I, Stram Y. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. Vet Microbiol. 2002 Jun 20;87(2):111-8.
72. Araujo DB, Langoni H, Almeida MF, Megid J. Heminested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus detection in stored and decomposed samples. BMC Res Notes. 2008;1:17.
73. Whitby JE, Johnstone P, Sillero-Zubiri C. Rabies virus in the decomposed brain of an Ethiopian wolf detected by nested reverse transcription-polymerase chain reaction. J Wildl Dis. 1997 Oct;33(4):912-5.
74. Kulonen K, Fekadu M, Whitfield S, Warner CK. An evaluation of immunofluorescence and PCR methods for detection of rabies in archival Carnoy-fixed, paraffin-embedded brain tissue. Zentralbl Veterinarmed B. 1999 Apr;46(3):151-5.
75. Biswal M, Ratho R, Mishra B. Usefulness of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of rabies RNA in archival samples. Jpn J Infect Dis. 2007 Sep;60(5):298-9.
76. Heaton PR, Johnstone P, McElhinney LM, Cowley R, O'Sullivan E, Whitby JE. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. J Clin Microbiol. 1997 Nov;35(11):2762-6.

77. Echevarria JE, Avellon A, Juste J, Vera M, Ibanez C. Screening of active lyssavirus infection in wild bat populations by viral RNA detection on oropharyngeal swabs. *J Clin Microbiol.* 2001 Oct;39(10):3678-83.
78. Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 1993 Aug 11;21(16):3761-6.
79. Nagaraj T, Vasanth JP, Desai A, Kamat A, Madhusudana SN, Ravi V. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. *J Clin Virol.* 2006 May;36(1):17-23.
80. Saengseesom W, Mitmoonpitak C, Kasempimolporn S, Sitprijia V. Real-time PCR analysis of dog cerebrospinal fluid and saliva samples for ante-mortem diagnosis of rabies. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2007 Jan;38(1):53-7.
81. Orłowska A. COMPARISON OF REAL-TIME PCR AND NESTED RT-PCR METHODS IN THE DETECTION OF RABIES VIRUS INFECTION IN BATS AND TERRESTRIAL ANIMALS. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2008;52:313-8.
82. Nagarajan T, Mohanasubramanian B, Seshagiri EV, Nagendrakumar SB, Saseendranath MR, Satyanarayana ML, et al. Molecular epidemiology of rabies virus isolates in India. *J Clin Microbiol.* 2006 Sep;44(9):3218-24.
83. David D, Yakobson BA, Gershkovich L, Gayer S. Tracing the regional source of rabies infection in an Israeli dog by viral analysis. *Vet Rec.* 2004 Oct 16;155(16):496-7.
84. Kissi B, Tordo N, Bourhy H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. *Virology.* 1995 Jun 1;209(2):526-37.