

Caracterización con anticuerpos monoclonales de virus de la rabia aislados de fauna doméstica y silvestre de México

Elizabeth Loza-Rubio*
Rina Pedroza-Requénés**
Juan Antonio Montaño-Hirose***
Álvaro Aguilar-Setién†

Abstract

Lyssavirus genus is divided into six sero-genotypes which are: Rabies, Lagos bat, Mokola, Duvenhage, EBL 1, and EBL 2. The purpose of this study was to assess rabies virus isolates from domestic and wildlife species in Mexico, using monoclonal antibodies against nucleocapsid (MA anti NC). The previously stated was performed to check if only serotype 1 is present in the country. Fifty-eight positive rabies isolates were taken from 14 different domestic and wild species from 19 states, and these were assessed using a reduced kit of MA anti NC, which identifies every sero-genotype from the Lyssavirus genus. Results showed that all the samples were identified to be serotype 1 (Rabies). It is concluded that this kit is useful for an adequate epidemiological surveillance of rabies, and this is important for the prevention and control of this disease.

Key words: RABIES, MONOCLONAL ANTIBODIES, ANTINUCLEOCAPSID, WILDLIFE, SEROTYPE 1.

Resumen

El género Lyssavirus se divide en los siguientes serogenotipos: Rabia; Lagos bat; Mokola; Duvenhage; EBL 1; y EBL 2. El objetivo de este estudio fue caracterizar con anticuerpos monoclonales (AM) antinucleocápside, virus de rabia aislados de fauna doméstica y silvestre de México, con el fin de verificar si en México sólo se encuentra presente el serotipo 1 (virus de Rabia). Con este propósito se trabajaron 58 aislamientos positivos a rabia a través de inmunofluorescencia directa de 14 diferentes especies domésticas y silvestres de 19 estados de la República mexicana, aquéllas se replicaron en ratones, y posteriormente se procedió a la caracterización con un panel reducido de ocho AM antinucleocápside que reconoce a todos los serotipos del género Lyssavirus. Los resultados señalan que todas las muestras presentaron similar patrón de reactividad que el serotipo 1. Se concluye que el uso de este panel reducido de AM es de utilidad para una apropiada caracterización del virus de la rabia en el país, ya que permite constatar que en las especies involucradas sólo circula el serotipo 1, lo cual es importante con fines de prevención y control en el manejo de la enfermedad.

Palabras clave: RABIA, ANTICUERPOS MONOCLONALES, ANTINUCLEOCÁPSIDE, FAUNA SILVESTRE, SEROTIPO 1.

Recibido para su publicación el 19 de enero de 1998 y aceptado el 11 de agosto de 1998.

* Proyecto de Rabia Paralítica Bovina, Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria, INIFAP-SAGAR, Carretera Federal México-Toluca, Km 15.5, 05110, México, D.F., manban@data.net.mx.

** Servicios de Salud Pública del Distrito Federal, Dirección de Servicios de Salud. José Antonio Torres 661, Col. Asturias, México, D.F.

*** Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 04510, México, D.F.

† Unidad de Investigación en Inmunología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, México, D.F.

Introducción

Los virus de la familia Rhabdoviridae –incluidos en el orden Mononegavirales– que afectan a los vertebrados, se clasifican en tres géneros: *Vesiculovirus* (prototipo: virus de la estomatitis vesicular), *Lyssavirus* (prototipo: virus de la rabia)¹ y *Ephemerovirus* (prototipo: virus de la fiebre efímera bovina).²

El virus de la rabia se encuentra presente en el mundo entero, con excepción de ciertas regiones insulares, los animales capaces de transmitirlo son muy variados.³

Las pruebas de seroneutralización no muestran relaciones serológicas con otros virus ni tampoco diferencias entre virus de la rabia aislados de diferentes especies animales en varias partes del mundo. Estos resultados ocasionaron que durante muchos años se considerara que el virus de la rabia era antigenicamente homogéneo.^{3,4}

La unicidad antigenica del virus de la rabia, admitida tradicionalmente, ha sido largamente discutida por diversos autores. Aunque Pasteur no habló de diferencias antigenicas, sí fue el primero en establecer que había diferencias entre las cepas y las denominó virus fijos y virus de la calle. A través de pruebas de protección cruzada, Kubes y Gallia⁵ en 1942 concluyeron que en Venezuela existían dos virus de la rabia epizootiológicamente diferentes: el de origen canino y el de origen bovino; estas diferencias no fueron detectadas por seroneutralización. En 1955, Fuenzalida y Palacios⁶ recomendaron que “la composición antigenica de la vacuna debe ser lo más completa posible, de modo de cubrir todas las posibilidades antigenicas que presenta la infección natural. Esto puede conseguirse en vacunas inactivadas, ya sea por el uso, en su elaboración, de una cepa compleja o por la mezcla de varias con antigenicidad diferente y adecuada”.

En 1978, con ayuda de los anticuerpos monoclonales (AM), Wiktor y Koprowski⁷ demostraron diferencias en la composición antigenica de diferentes cepas de virus fijos. En 1980, estos mismos autores detectaron diferencias en virus de la calle aislados de seres humanos.⁸ Los AM han podido demostrar que si bien el virus rábico es más estable en la naturaleza que otros grupos virales, sí existen variantes, debidas probablemente a la presión selectiva a que se encuentra sometido por la gran variedad de géneros y especies que puede afectar.³

Una vez confirmada la presencia de variantes, Hayashi *et al.*⁹ realizaron pruebas de protección cruzada para evaluar la vacuna antirrábica canina más utilizada en Brasil. Se identificaron el virus clásico de la rabia y dos variantes: una en el ciclo canino-humano y otra en los bovinos.

Con el empleo de paneles de AM contra la nucleocápside y la proteína G, se ha demostrado la existencia de diferencias antigenicas en diversos aislamientos del virus de la rabia provenientes de América, Europa, Asia

y África.^{7,8,10,11,12,13,14,15,16,17} Asimismo, se comprobó la diferenciación establecida por seroneutralización entre virus de rabia (serotipo 1) y los virus relacionados Lagos bat, Mokola y Duvenhage que representan a los serotipos 2, 3 y 4, respectivamente, y que han sido aislados exclusivamente en el continente africano. Los *Lyssavirus* de murciélagos europeos tipos 1 y 2 (EBL 1 y EBL 2) son transmitidos exclusivamente por quirópteros insectívoros en Europa y fueron descritos inicialmente como una variante de Duvenhage.^{11,18}

En el continente americano solamente se encuentra presente el serotipo 1. En el norte del continente, las características antigenicas del virus rábico han sido bien estudiadas, pero no en México.¹⁹ Con el aumento de las comunicaciones entre los diferentes países es recomendable realizar estudios periódicos, para corroborar si únicamente el virus de la rabia está presente en el país o si puede detectarse algún otro serotipo, utilizando AM antinucleocápside en aislados de diferentes especies, tanto domésticas como silvestres de la fauna mexicana.

Material y métodos

Aislamientos

Se trabajaron 58 muestras positivas a rabia (46 de especies domésticas y 12 de silvestres) que provenían de 19 diferentes estados de la República mexicana, mediante inmunofluorescencia directa con un conjugado políclonal; algunas de las muestras fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE) en la ciudad México, otras se obtuvieron del banco de aislamientos positivos a rabia del CENID-Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Las muestras se eligieron por su disparidad en cuanto a especie y procedencia geográfica.

Con cada uno de los cerebros positivos se realizó una dilución 1:5 en solución salina tamponada con fosfatos (BAPS), a la que se le agregó 7.5% de albúmina bovina (fracción V), con antibióticos (penicilina 20 000 UI-estreptomicina 2 mg/ml) y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Replicación en ratón

Las suspensiones se descongelaron y centrifugaron a 750 g durante 10 min; el sobrenadante se colocó en viales de 2 ml, previamente identificados. Cada muestra se inyectó por vía intracerebral (0.03 ml) en seis ratones albinos de 1 día de edad.²⁰ Cuando los animales estuvieron en agonía (promedio 14 días) y con los signos característicos de la rabia, fueron sacrificados para obtener sus cerebros, éstos últimos representaron el material de estudio.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Los cerebros se congelaron a -70°C, posteriormente se realizó la IFI, según el método descrito por Thomas.²¹

Anticuerpos monoclonales (AM)

Para cada aislamiento se utilizó un panel reducido de AM antinucleocápside producido en el Instituto Pasteur (París, Francia). En el Cuadro 1 puede observarse el patrón de reactividad producido por cada uno de los ocho AM que identifican a cada uno de los serotipos del género *Lyssavirus*, incluidos los que se han caracterizado más recientemente, que son EBL 1 y el EBL 2 (*Lyssavirus* de murciélagos europeo tipo 1, aislado a partir de *Epseticus serotinus*, y el tipo 2 encontrado en *Myotis dasycneme*).^{22,23}

Los testigos negativos fueron improntas de cerebros normales de ratones (CNR), y los positivos eran cerebros de ratones infectados con virus estándar de desafío (CVS). Los resultados se interpretaron con un signo negativo (-) cuando no hubo fluorescencia, y uno positivo (+) en caso de que se haya presentado.

Resultados

En el Cuadro 2 a pueden apreciarse las especies domésticas a las que se tuvo acceso durante el estudio, así como la procedencia geográfica y el patrón de

reactividad producidos por cada uno de los AM. En estas especies los resultados fueron que el patrón de reactividad obtenido coincidió con el serotipo 1 que corresponde a rabia clásica, lo mismo ocurrió con las especies silvestres a las que se tuvieron acceso (Cuadro 2 b). Las muestras positivas de animales domésticos y silvestres provinieron de 19 diferentes estados de la República mexicana.

El testigo positivo (CVS) coincidió con el patrón de reactividad del serotipo 1, mientras que el negativo (CNR) no presentó ningún tipo de fluorescencia.

Discusión

Entre las especies que transmiten la rabia, la canina presenta mayores problemas de salud pública,²⁴ aunque la enfermedad ha decrecido en esta especie en los últimos años como consecuencia de los programas de vacunación. Por ejemplo, en 1989 solamente en la ciudad de México, se detectaron 1046 perros rabiosos; en 1996 se detectaron únicamente 61 de estos animales. Aunque en este estudio no se incluyeron muestras de la especie humana, cabe comentar que en 1989 hubo 5 muertes por rabia en la ciudad de México, en 1996 no se registró ningún deceso.²⁵

Los gatos domésticos son principalmente huéspedes incidentales de la rabia y es poco frecuente que sean importantes en la perpetuación del agente en su ciclo natural. La presencia de rabia en gatos es normalmente consecuencia de la enfermedad en un importante porcentaje de otras especies domésticas.²⁶

En el ciclo silvestre se cuenta con la participación de diversos mamíferos donde existe una gran diversidad de factores condicionantes, por lo general complejos y poco conocidos.^{27,28} En México este es el primer estudio donde se analizaron muestras positivas a rabia provenientes de diferentes especies de fauna silvestre, además de un murciélagos hematófago (*Desmodus rotundus*) se tuvo acceso a otras seis, como el coyote, gato montés, hurón, tejón, zorro y zorrillo (Cuadro 2 b).

De acuerdo con los resultados obtenidos, no existió otro serotipo del género *Lyssavirus* que se asemeje a los serotipos de África (Lagos bat, Mokola y Duvenhage) y de Europa (EBL 1 y EBL 2). Esto último resulta de importancia puesto que con el aumento de la velocidad de las comunicaciones entre países geográficamente distantes, es recomendable realizar periódicamente este tipo de vigilancia. En México, como en el resto de América, solamente se ha descrito la existencia del serotipo 1, que corresponde a la rabia clásica.^{29,30} Por otro lado, es conveniente el uso de pánneles reducidos de AM antinucleocápside como el empleado en este estudio para un tamizado rápido y sencillo, ya que aunque existen otros pánneles utilizados en diferentes trabajos, algunos llegan a tener hasta 41 AM,^{11,31} lo cual hace su uso muy laborioso. Además se tiene la ventaja de que al estar dirigidos contra la nucleocápside, es posible realizar la

Cuadro 1
PATRÓN DE REACTIVIDAD CON UNA SERIE DE ANTICUERPOS MONOCLONALES UTILIZADOS PARA DIFERENCIAR EL VIRUS DE LA RABIA DE VIRUS RELACIONADOS

Serotipo	Anticuerpo monoclonal							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	+	+	-	-	+	+	-	+
EBL-2	+	+	-	-	+	+	+	+
2								
Lag-1	+	-	+	-	+	-	-	+
Lag-2	+	-	+	-	+	+	-	+
Lag-3	+	-	+	-	+	+	-	-
3	+	-	+	+	+	-	+	+
4	+	-	+	-	-	+	-	-
EBL-1	+	-	+	-	+	-	-	-

Cuadro 1. Serotipo 1, cepas de laboratorio; EBL-2, cepas de *E. serotinus* y un caso de un ser humano (Yuli, Rusia); serotipo 2, Lagos bat; serotipo 3, Mokola; serotipo 4, Duvenhage; EBL-1, cepas de *Myotis dasycneme* y un caso en un ser humano.

Cuadro 2a
PATRÓN DE REACTIVIDAD OBTENIDO CON LAS DIFERENTES MUESTRAS POSITIVAS A RABIA

Animales domésticos			Resultados (AM)							
Muestra	Especie	Procedencia	1	2	3	4	5	6	7	8
1	Bovino	Tulancingo, Hidalgo	+	+	-	-	+	+	-	+
2	Bovino	Catemaco, Veracruz	+	+	-	-	+	+	-	+
3	Bovino	Tuxtla Gtz., Chiapas	+	+	-	-	+	+	-	+
4	Bovino	Mapastepec, Chiapas	+	+	-	-	+	+	-	+
5	Bovino	Carrillo Puerto, Veracruz	+	+	-	-	+	+	-	+
6	Bovino	Coalcomán Michoacán	+	+	-	-	+	+	-	+
7	Bovino	Zapotlán, Hidalgo	+	+	-	-	+	+	-	+
8	Bovino	Zumpango, Edo. de México	+	+	-	-	+	+	-	+
9	Bovino	Cuautitlán, Edo. de México	+	+	-	-	+	+	-	+
10	Bovino	San Gabriel, Oaxaca	+	+	-	-	+	+	-	+
11	Bovino	Zumpango, Edo. de México	+	+	-	-	+	+	-	+
12	Bovino	Huimanguillo, Tabasco	+	+	-	-	+	+	-	+
13	Bovino	Villahermosa, Tabasco	+	+	-	-	+	+	-	+
14	Bovino	Cd. Valles, San Luis Potosí	+	+	-	-	+	+	-	+
15	Bovino	San Gabriel, Oaxaca	+	+	-	-	+	+	-	+
16	Bovino	Huimanguillo, Tabasco	+	+	-	-	+	+	-	+
17	Bovino	Torreón, Coahuila	+	+	-	-	+	+	-	+
18	Bovino	Villahermosa, Tabasco	+	+	-	-	+	+	-	+
19	Bovino	Monterrey Nuevo León	+	+	-	-	+	+	-	+
20	Bovino	Puebla, Puebla	+	+	-	-	+	+	-	+
21	Bovino	Mapastepec, Chiapas	+	+	-	-	+	+	-	+
22	Bovino	Huimanguillo, Tabasco	+	+	-	-	+	+	-	+
23	Bovino	Tenosique, Tabasco	+	+	-	-	+	+	-	+
24	Bovino	Río Verde, San Luis Potosí	+	+	-	-	+	+	-	+
25	Bovino	Cárdenas, Tabasco	+	+	-	-	+	+	-	+
26	Bovino	San Luis Potosí, San Luis Potosí	+	+	-	-	+	+	-	+
27	Bovino	Cd. Victoria, Tamaulipas	+	+	-	-	+	+	-	+
28	Bovino	Cd. Victoria, Tamaulipas	+	+	-	-	+	+	-	+
29	Equino	Otumba, Edo. de México	+	+	-	-	+	+	-	+
30	Equino	Ecatepec, Edo. de México	+	+	-	-	+	+	-	+
31	Equino	Querétaro, Querétaro	+	+	-	-	+	+	-	+
32	Equino	Zumpango, Edo. de México	+	+	-	-	+	+	-	+
33	Equino	Cuautitlán, Edo. de México	+	+	-	-	+	+	-	+
34	Ovino	Zumpango, Edo. de México	+	+	-	-	+	+	-	+
35	Ovino	Pachuca, Hidalgo	+	+	-	-	+	+	-	+
36	Ovino	Tlaxcala, Tlaxcala	+	+	-	-	+	+	-	+
37	Ovino	Saltillo, Coahuila	+	+	-	-	+	+	-	+
38	Porcino	Puebla, Puebla	+	+	-	-	+	+	-	+
39	Porcino	Xalapa, Veracruz	+	+	-	-	+	+	-	+
40	Porcino	Iztapalapa, Distrito Federal	+	+	-	-	+	+	-	+
41	Caprino	Soto La Marina, Tamaulipas	+	+	-	-	+	+	-	+
42	Canino	Milpa Alta, Distrito Federal	+	+	-	-	+	+	-	+
43	Canino	Querétaro, Querétaro	+	+	-	-	+	+	-	+
44	Felino	Ecatepec, Edo. de México	+	+	-	-	+	+	-	+
45	Felino	Xalapa, Veracruz	+	+	-	-	+	+	-	+
46	Felino	Querétaro, Querétaro	+	+	-	-	+	+	-	+

Cuadro 2b
PATRÓN DE REACTIVIDAD OBTENIDO CON LAS DIFERENTES MUESTRAS POSITIVAS A RABIA

Animales domésticos Muestra	Especie	Procedencia	Resultados (AM)							
			1	2	3	4	5	6	7	8
1	Vampiro	Tejupilco, Edo. de México	+	+	-	-	+	+	-	+
2	Coyote	Parral, Chihuahua	+	+	-	-	+	+	-	+
3	Gato montés	Chihuahua, Chihuahua	+	+	-	-	+	+	-	+
4	Gato montés	Hermosillo, Sonora	+	+	-	-	+	+	-	+
5	Hurón	Iztapalapa, Distrito Federal	+	+	-	-	+	+	-	+
6	Tejón	San Luis Potosí, San Luis Potosí	+	+	-	-	+	+	-	+
7	Zorro	Hermosillo, Sonora	+	+	-	-	+	+	-	+
8	Zorro	Hermosillo, Sonora	+	+	-	-	+	+	-	+
9	Zorro	Saltillo, Coahuila	+	+	-	-	+	+	-	+
10	Zorrillo	La Paz, Baja California	+	+	-	-	+	+	-	+
11	Zorrillo	La Paz, Baja California	+	+	-	-	+	+	-	+
12	Zorrillo	Aguascalientes, Aguascalientes	+	+	-	-	+	+	-	+

técnica de inmunofluorescencia indirecta que es rápida cuando se aplica directamente al tejido nervioso afectado.

El uso de este panel antinucleocápside es útil para una vigilancia epidemiológica de la rabia en México, ya que permite constatar que en las especies involucradas sólo circula el serotipo 1. Por otro lado, se recomienda la adopción de técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis del polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLP), o secuenciación que puedan encontrar variaciones dentro del serotipo 1 (rabia clásica) para estudios de epidemiología molecular con el propósito de llevar a cabo eficientes medidas de vigilancia y control.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Monique Lafon (Instituto Pasteur, París, Francia) la donación desinteresada de este panel de AM.

Referencias

1. Wiktor TJ, Clarck HF. Comparison of rabies virus strains by means of the plaque reduction test. *Ann Microbiol* 1973;124A:283-287.
2. Walker PJ, Walker Y, Cowley JA, McWilliam SM, Prehaud JN. Structural and antigenic analysis of the nucleoprotein of bovine ephemeral fever rhabdovirus. *J Gen Virol* 1994;75:1889-1899.
3. Aguilar SA, Kretshmer SR. Anticuerpos monoclonales en enfermedades de origen viral. *Salud Pública Méx* 1985;27:251-259.
4. Hernández BE. Propiedades fisicoquímicas y serotipos del virus rágico. *Memorias del Simposio Sobre la Atención Médica de las Personas Involucradas en un Incidente* de Rabia; 1987 noviembre 17-19; México (DF). México(DF): SSA-OPS-IMSS, 1987:84-95.
5. Kubes V, Gallia F. Estudios inmunológicos sobre la pluralidad de los virus rágicos en Venezuela. *Bol Inst Invest Vet* 1942;1:3-45.
6. Fuenzalida E, Palacios R. Un método mejorado en la preparación de la vacuna antirrábica. *Bol Bact Chile* 1955;8:3-10.
7. Wiktor TJ, Koprowski H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:3938-3942.
8. Wiktor TJ, Koprowski H. Antigenic variants of rabies virus. *J Exp Med* 1980;152:99-112.
9. Hayashi Y, Mora E, Chandelier EL, Montaño-Hirose JA, Ohi M. Estudos de proteção cruzada de 24 cepas de virus rágico isoladas de diferentes espécimes animais no Brasil. *Arq Biol Tecnol* 1984;27:27-35.
10. Charlton KM, Casey GA, Boucher DW, Wiktor TJ. Antigenic variants of rabies virus. *Comp Immunol Infect Dis* 1982;5:113-115.
11. Dietzschold B, Rupprecht CE, Tollis M, Lafon M, Mattei J, Wiktor TJ, Koprowski H. Antigenic diversity of the glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies related viruses: implications for epidemiology and control rabies. *Rev Infect Dis* 1988;10:S785-S798.
12. Rupprecht CE, Glickman LT, Soencer PA, Wiktor TJ. Differentiation using monoclonal antibodies and discriminant analysis. *Am J Epidemiol* 1987;126:298-309.
13. Smith JS. Monoclonal antibodies studies in insectivorous bats of the United States. *Rev Infect Dis* 1988;10:S637-S643.
14. Sureau P, Rollin PE, Chadl S, Zeller H. Etude à l'aide d'anticorps monoclonaux des caractéristiques de souches de virus rágiques de Tunisie. *Arch Inst Pasteur Tunis* 1982;59:87-89.
15. Wiktor TJ, Koprowski H. Antigenic variants of rabies virus. *J Exp Med* 1980;152:99-112.
16. Flamand A, Wiktor TJ, Koprowski H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies related virus protein. I. The nucleocapsid protein. *J Gen Virol* 1980;48:97-104.

17. Flamand A, Wiktor TJ, Koprowski H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies related virus protein. II. The glycoprotein. *J Gen Virol* 1980;48:105-109.
18. Bourhy H, Kissi B, Lafon M, Sacramento D, Tordo N. Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe. *J Clin Microbiol* 1992;30:2419-2426.
19. Loza-Rubio E, Vargas GR, Hernández BE, Batalla CD, Aguilar SA. Investigation of rabies virus strains in Mexico with a panel of monoclonal antibodies used to classify Lyssavirus. *Bull Panam Health Org* 1996;30:31-35.
20. Koprowski H. Prueba de inoculación al ratón. En: Kaplan MM, Koprowski H, editores. *La rabia: técnicas de laboratorio*. 3^a ed. Ginebra, Suiza: OPS, 1976:88-97.
21. Thomas BJ. Realización de la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes de la rabia. Baer GM, editor. *Rabia*. México (DF): La Prensa Médica Mexicana S.A., 1982:177-194.
22. Bourhy H, Kissi B, Tordo N. Molecular diversity of Lyssavirus genus. *Virology* 1993;194:70-81.
23. Montaño-Hirose JA, Bourhy H, Lafon M. A reduced panel of antinucleocapsid monoclonal antibodies for bat rabies virus identification in Europe. *Res Virol* 1990;141:571-581.
24. Vargas GR, Cárdenas LJ. Epidemiología de la rabia: situación actual en México. *Cienc Vet* 1996;7:332-358.
25. Secretaría de Salud. Programa para la prevención y control de la rabia. Informe anual. México (DF): Secretaría de Salud, 1996.
26. Organización Panamericana de la Salud. Boletín epidemiológico. La rabia humana en las Américas. Washington (DC): Organización Panamericana de la Salud, 1995;16:1.
27. Valenzuela RM. Mecanismos de exposición e infección rágica en el ciclo selvático. *Memorias del Simposio Sobre la Atención Médica de las Personas Involucradas en un Incidente de Rabia; 1987 noviembre 17-19; México (DF)*. México (DF): SSA-OPS-IMSS, 1987:51-83.
28. Artois M, Aubert M, Barrat J, Blancou J, Poulle ML, Stahl P. Ecologie des comportements de transmission de la rage. *Ann Rech Vet* 1990;21:309-340.
29. Webster WA, Casey GA, Charlton KM, Wiktor TJ. Antigenic variants of rabies virus in isolates from eastern, central and northern Canada. *Can J Med* 1984;49:186-188.
30. Rupprecht CE, Dietzschold B, Wunner WH, Koprowski H. Antigenic relationships of Lyssaviruses. In: Baer GM, editor. *The natural history of rabies*. Boca Raton (FL): CRC Press, 1991:69-100.
31. Smith J. Rabies virus epitopic variation: use in ecologic studies. *Adv Virus Res* 1989;36:215-253.