

# Caracterización molecular y biológica del virus de la Rabia que circula en zorrillos de México enfocado a la variante del gen de la fosfoproteína (P)

## Molecular and biological properties of rabies viruses circulating in Mexican skunks: focus on P gene variation

Elizabeth Loza-Rubio<sup>a</sup>, Susan A. Nadin-Davis<sup>b</sup>, Elizabeth Morales Salinas<sup>c</sup>

### RESUMEN

El objetivo de este estudio fue la caracterización molecular y biológica del virus de la rabia en zorrillos de México, comparando una porción de la secuencia viral del gen P, con regiones correspondientes de variantes de virus rábico adaptadas en zorrillos y pertenecientes al genotipo 1 (virus de la rabia "clásica"), que circulan en América. Como parte de la caracterización biológica se incluyó el periodo de incubación y las lesiones histopatológicas después de la inoculación del virus por vía intracerebral en ratones. De acuerdo a los resultados de estudios filogenéticos, las cepas de zorrillo mexicano (variante antigénica (AV8 y AV10) son muy distintas en cuanto a su evolución. El aislado AV10 de Baja California Sur está muy relacionado con los virus que circulan en zorrillos de California; mientras que el aislado AV8 de San Luis Potosí tuvo mayor relación con la cepa del zorrillo del Centro/Sur que circula en los estados del sur, como Texas. Estas variantes se reflejaron en algunas propiedades biológicas de ambas cepas en ratones.

**PALABRAS CLAVE:** Rabia zorrillos, Epidemiología molecular, Periodo de incubación, Gene P.

### ABSTRACT

The objective of this work was to characterize molecularly rabies viruses from Mexican skunks, by comparison of a portion of the viral P gene sequence with corresponding regions from other skunk-adapted rabies virus variants and with other genotype 1 rabies viruses that circulate in the Americas. Furthermore, incubation period and histopathologic lesions after virus inoculation by the intra-cerebral route in mice was characterized. According to the results of phylogenetic studies the Mexican skunk strains (Antigenic Variant (AV) 8 and AV10) are evolutionarily quite distinct. The AV10 isolate from South Baja California is quite closely related to the viruses that circulate in Californian skunks; while the AV8 isolate from San Luis Potosí was most closely related to the South central skunk strain that circulates in southern states such as Texas. These variations were reflected in some biological properties of both strains in mice.

**KEY WORDS:** Rabies, Skunks, Molecular epidemiology, Incubation period, P gen.

### INTRODUCCIÓN

La rabia es una enfermedad en la que se presenta encefalitis aguda, progresiva e incurable, causada por todos los miembros del género *Lyssavirus* de la familia *Rhabdoviridae*. Este género contiene hasta

### INTRODUCTION

The disease of rabies is an acute, progressive, incurable encephalitis caused by all members of the *Lyssavirus* genus of the *Rhabdoviridae* family. The genus *Lyssavirus* contains 11 viruses: rabies virus

Recibido el 4 de mayo de 2011. Aceptado el 28 de junio de 2011.

<sup>a</sup> Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal, INIFAP. Carretera México Toluca Km. 15.5, Colonia Palo Alto. CP 05110. México. [eli\\_rubio33@hotmail.com](mailto:eli_rubio33@hotmail.com). Correspondencia al primer autor.

<sup>b</sup> Rabies Center of Expertise, Ottawa Laboratories. Fallowfield, Canadian Food Inspection Agency (CFIA). Ottawa, Ont. Canadá K2H 8P9.

<sup>c</sup> Departamento de Patología. FMVZ-UNAM.

ahora 12 virus: el de la rabia (VRAB), virus del murciélago Lagos, virus Mokola, virus Duvenhage, Lyssavirus del murciélago europeo tipo 1 y 2 (EBLV-1 y EBLV-2), Lyssavirus del murciélago Australiano, virus Aravan, virus Khujand, virus Irkut y virus caucásico del oeste<sup>(1)</sup>. Una nueva especie propuesta es el virus del murciélago de Shimoni que ha sido recientemente aislado del murciélago con nariz en forma de hoja (*Hipposideros commersoni*)<sup>(2)</sup>. Aunque varios genotipos de Lyssavirus son reconocidos mundialmente<sup>(2,3)</sup>, sólo el virus genotipo 1, representado por el virus de la rabia serotipo 1 clásico, es sabido que circula en el continente Americano<sup>(4,5)</sup>.

La rabia urbana en México ha sido significativamente reducida durante la última década por control canino intensivo y campañas de vacunación<sup>(6)</sup>. Sin embargo, al reducir el número de casos de rabia en perros, ha sido muy notoria la presencia de rabia en varias especies silvestres tanto de vida terrestre como aérea<sup>(7,8,9,10)</sup>. El murciélago vampiro (*Desmodus rotundus*) representa al portador que con mayor frecuencia transmite la rabia a humanos y al ganado, principalmente bovino, pero también se ha informado del potencial que presentan los zorrillos para causar esta enfermedad en humanos<sup>(11)</sup>. La especie principal de zorrillo que actúa como reservorio de rabia en México es el zorrillo moteado (*Spilogale putorius*), aunque otras especies como el zorrillo de nariz porcina (*Conepatus leuconotus*) han sido documentadas como rabiosas<sup>(11)</sup>. Por otro lado, en Canadá y en Estados Unidos de América la especie de zorrillo más comúnmente asociado con la rabia es el zorrillo rayado (*Mephitis mephitis*)<sup>(12)</sup>.

Se ha encontrado que los métodos antigénicos, que utilizan un panel reducido de anticuerpos monoclonales, identifican las siguientes variantes antigénicas (AV) en reservorios silvestres mexicanos: AV3 y 11 cuyos portadores son los murciélagos vampiros, AV4 y 9 detectadas en murciélagos de cola de ratón (*Tadarida brasiliensis*), AV7 de lince y zorros, y dos tipos antigénicos, AV8 y AV10 asociados con zorrillos en dos partes del país, una región central que incluye a San Luis Potosí (SLP) y Baja California Sur (BCS), respectivamente<sup>(9)</sup>.

(RABV), Lagos bat virus, Mokola virus, Duvenhage virus, European bat lyssaviruses types 1 and 2 (EBLV-1 and EBLV-2), Australian bat lyssavirus, Aravan virus (ARAV), Khujand virus (KHUV), Irkut virus, and West Caucasian bat virus<sup>(1)</sup>. A proposed new species, Shimoni bat virus has recently been isolated from *Hipposideros commersoni* leaf-nosed bats<sup>(2)</sup>. Although several Lyssavirus genotypes are now recognized world-wide<sup>(2,3)</sup> only genotype 1 viruses, represented by classical serotype 1 rabies virus, is known to circulate on the American Continent<sup>(4,5)</sup>.

In Mexico, urban rabies has been significantly reduced over the past decade due to intensive dog control and dog vaccination campaigns<sup>(6)</sup>. However, with the reduction of dog rabies it has become increasingly evident that sylvatic rabies circulates in several wildlife species of both terrestrial and aerial life-styles<sup>(7,8,9,10)</sup>. The vampire bat (*Desmodus rotundus*) represents the host that most frequently transmits rabies to humans and livestock, especially cattle, but the potential role of skunks in causing human disease has been documented<sup>(11)</sup>. The principal species of skunk that appears to act as a rabies reservoir in Mexico is the spotted skunk (*Spilogale putorius*) although other species such as the hog-nosed skunk (*Conepatus leuconotus*) have been reported as rabid<sup>(11)</sup>. In contrast, in Canada and the US the species of skunk most usually associated with rabies is the striped skunk (*Mephitis mephitis*)<sup>(12)</sup>.

Antigenic methods, employing a small panel of monoclonal antibodies, have been found to identify the following antigenic variants (AVs) in Mexican wildlife reservoirs: AV3 and 11 carried by vampire bats, AV4 and 9 in Mexican free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*), AV7 recovered from bobcats and foxes and two antigenic types, AV8 and AV10 associated with skunks in two different parts of the country, a central region including San Luis Potosí (SLP) state and South Baja California (SBC) respectively<sup>(9)</sup>. It is known that for example AV 8 and AV 10 refer to variants of rabies virus maintained in skunk populations, and so on. It is known that for example AV 8 and AV 10 refer to variants of rabies virus maintained in skunks populations, and so on.

Es sabido por ejemplo que las variantes AV8 y AV10 se refieren a variantes antigénicas del virus de la rabia mantenidas en poblaciones de zorrillos.

La caracterización parcial de las secuencias del gen N del virus de la rabia de algunas representantes de estas variantes no asoció la cepa de zorrillo mexicano de BCS con ninguna variante de rabia, mientras que los aislados del linco mostraron estar muy relacionados con cepas de zorros del sur de Estados Unidos de América<sup>(10,13)</sup>. Adicionalmente, la caracterización genética de la región G/G-L viral ha facilitado el desarrollo de pruebas genéticas rápidas, empleando el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) para descartar aislados de rabia de perro o murciélago vampiro y también para identificar un ciclo epidemiológico conocido como "hipervariable" que está asociado con virus de zorrillos<sup>(14)</sup>. Actualmente, la relación epidemiológica molecular de las dos variantes del virus de la rabia de zorrillos mexicanos no es clara con respecto a otras cepas de rabia de zorrillo de América y en un contexto más amplio de los Lyssavirus. A pesar de su descubrimiento relativamente reciente, es probable que estas cepas de virus de la rabia de zorrillo mexicano hayan surgido durante un periodo de tiempo significativo y ciertamente más temprano de lo que evidencian los datos de monitoreo de la rabia.

El objetivo de este trabajo fue elucidar los orígenes filogenéticos de estos dos virus del zorrillo utilizando una porción de la secuencia del gen P del virus de la rabia con regiones correspondientes de otras variantes del virus de la rabia adaptados a zorrillo y con otros virus de rabia del genotipo 1 que circulan en América. Además, se ha propuesto que la proteína P del virus de la rabia funciona a efecto del movimiento de los componentes del virus de la rabia junto con axones neuronales en virtud de su asociación con el componente de la dineína LC8<sup>(15)</sup>, y puede modular interacciones entre el virus y el hospedero por vía de numerosas características estructurales variables<sup>(3)</sup>. Las secuencias de la proteína P pudieron ser predichas a partir de estos datos y usadas para evaluar si las características estructurales diferentes de la proteína P viral podrían ser responsables de estas características biológicas,

Partial characterization of rabies virus N gene sequences of some representatives of these variants did not associate the Mexican SBC skunk strain together with any other rabies variant while the bobcat isolates appeared to be closely related to fox strains of the southern US<sup>(10,13)</sup>. In addition, genetic characterisation of the viral G/G-L region has facilitated development of rapid genetic tests employing restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) to discriminate dog and vampire bat rabies isolates and also identified a discrete pattern described as "hypervariable" that was associated with viruses from skunks<sup>(14)</sup>. Currently the molecular epidemiological relationship of the two Mexican skunk rabies virus variants, both with respect to other skunk rabies strains of the Americas and in a more global lyssavirus context, is unclear. Despite their relatively recent discovery, it is likely that these Mexican skunk rabies strains have emerged over a significant time span and certainly much earlier than is evident from rabies surveillance data.

The objective of this work was to elucidate the phylogenetic origins of these two skunk viruses by comparison of a portion of the viral P gene sequence with corresponding regions from other skunk-adapted rabies virus variants and with other genotype 1 rabies viruses that circulate in the Americas. Moreover, the rabies virus P protein has been proposed to function to effect movement of rabies virus components along neuronal axons by virtue of its association with the dynein LC8 component<sup>(15)</sup> and may modulate viral-host interactions via a number of variable structural features<sup>(3)</sup>. P protein sequences could be predicted from these data and used to evaluate whether different structural features of the viral P protein might be responsible for these biological features, such as incubation period and histopathological changes observed between the isolates under study.

## MATERIALS AND METHODS

### *Viruses*

Four different viruses, including two different skunk strains, previously determined as antigenic variant (AV) 10 from South Baja California (accession N° AY998247) and AV8 isolated from San Luis Potosi,

tales como periodo de incubación y cambios histopatológicos observados entre los aislados en estudio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Virus*

Para el estudio sobre periodos de incubación e histopatología se emplearon cuatro diferentes virus, incluyendo dos cepas distintas de zorrillo, previamente determinadas como variantes antigénicas (AV) 10 de Baja California Sur (número de acceso AY998247) y AV8 aislada de San Luis Potosí, México (número de acceso AY998275); un aislado de murciélago vampiro en Pánuco, Veracruz (número de acceso AY998253); y como cepa de referencia, la cepa estándar del virus de desafío (CVS). Cada cepa se ajustó a  $10^{2.5}$  LD50% en ratones, título correspondiente a lo encontrado en el primer pase de la cepa de zorrillo.

Para el análisis de la secuencia de nucleótidos se emplearon los siguientes virus de la rabia disponibles en la colección de Lyssavirus del CFIA: cuatro aislados de zorrillo de California (CAV637SK, CAV650SK, CAV652SK y CAV654SK); dos aislados de zorrillo mexicano MXV684SK y MXV854SK pertenecientes a AV10 y AV8<sup>(16)</sup>, respectivamente; y aislamientos previamente caracterizados, incluyendo tres aislados de zorrillo del centro/sur de Estados Unidos de América en Texas (TXV211SK, TXV212SK y TXV215SK); dos del zorrillo del oeste de Canadá (WCL0867SK y WCL1741SK); y un aislado (KY2877DG) representativo del zorrillo del medio-oeste de Estados Unidos de América<sup>(17)</sup>. También se incluyó un aislamiento de murciélago vampiro mexicano (MXV229VB) para comparar.

Todas las secuencias utilizadas en estos estudios han sido depositadas en el "GenBank" y tienen los siguientes números de acceso: CAV637SK, DQ275555; CAV650SK, DQ275556; CAV652SK, DQ275557; CAV654SK, DQ275558; MXV684SK, AY998258; MXV854SK, AY998275; TXV211SK, AF369287; TXV212SK, AF369288; TXV215SK, AF369290; WCL0867SK, AF369285; WCL1741SK, AF369286; KY2877DG, AF369292; MXV229VB,

Mexico (accession N° AY998275), one vampire bat isolated in Panuco, Veracruz (accession N° AY998253) and, as a reference strain, the laboratory adapted challenge virus standard (CVS) strain were employed for the studies on incubation periods and histopathology. Each strain was adjusted to  $10^{2.5}$  LD50% in mice, a titre corresponding to that found in the first passage of the skunk strain.

For the nucleotide sequence analysis the following rabies viruses available in the lyssavirus collection of the CFIA were employed: four California skunk isolates (CAV637SK, CAV650SK, CAV652SK and CAV654SK), two Mexican skunk isolates MXV684SK and MXV854SK belonging to AVs 10 and 8<sup>(16)</sup> respectively, and previously characterized isolates, including three south central US skunk isolates from Texas (TXV211SK, TXV212SK and TXV215SK), two Western Canada skunk specimens (WCL0867SK and WCL1741SK) and an isolate (KY2877DG) representative of the US mid-western skunk type<sup>(17)</sup>. A Mexican vampire bat isolate from (MXV229VB) was also included for comparison.

All sequences employed in these studies have been deposited in GenBank and have the following accession numbers: CAV637SK, DQ275555; CAV650SK, DQ275556; CAV652SK, DQ275557; CAV654SK, DQ275558; MXV684SK, AY998258; MXV854SK, AY998275; TXV211SK, AF369287; TXV212SK, AF369288; TXV215SK, AF369290; WCL0867SK, AF369285; WCL1741SK, AF369286; KY2877DG, AF369292; MXV229VB, AF369362. The CVS sequence employed was recovered from GenBank, accession number D42112.

### *Virus propagation*

Original brains infected with each of the four isolates were propagated by first passage in four 21-d old mice. When the mice showed clinical manifestations characteristic of rabies, they were sacrificed and their brains extracted. The virus was passaged another two times and the incubation period was recorded in each case.

### *RT/PCR and nucleotide sequence analysis*

Rabies virus genomic RNA was extracted from 100 mg of original brain tissue using Trizol (Gibco BRL,

AF369362. La secuencia CVS empleada se obtuvo del GenBank, con número de acceso D42112.

#### *Propagación del virus*

Los cerebros originales infectados con cada uno de los cuatro aislados se propagaron por primer pase en ratones de 21 días de edad. Cuando estos mostraron signos clínicos característicos de rabia, fueron sacrificados y se extrajeron los cerebros. El virus se sometió a dos pases más y el periodo de incubación se registró en cada caso.

#### *RT/PCR y análisis de la secuencia de nucleótidos*

El ARN genómico del virus de la rabia se extrajo de 100 mg del tejido cerebral original usando Trizol (Gibco BRL, Grand Island, NY) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y resuspendido en 100 ml de agua libre de RNAsas. La amplificación completa del gen P se realizó empleando iniciadores que flanquean el marco de lectura abierta del gen P, por lo tanto: rabPrev (5'-CTACTTCTC CGGGGAAACCAGAAG-3' cuyos nucleótidos blanco son los 1249-1272 de la cepa PV de referencia) y rabPrev (5'-GGRAGCCAYAGGTC RTCGTCAT-3' que tiene como blanco a los nucleótidos 2575-2596 de la cepa PV). El método de RT-PCR se realizó como se describió previamente<sup>(3)</sup>. El amplicón de 1348 pb resultante se purificó usando el Wizard Clean-up Kit (Promega, Madison, WI) antes de la secuenciación de los nucleótidos en un secuenciador automático LiCor 4200 usando los acostumbrados iniciadores internos marcados con tinción infrarroja (IR) y también utilizando el Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit (Amstersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). En algunos casos en donde se generaba producto insuficiente a partir de una sola ronda de PCR, se realizaban PCR anidadas o semi-anidadas empleando varias combinaciones de los iniciadores externos, seguidos de los internos: iniciador sentido (+) P967 (5'-GAGATGG CNGARGAGACTGT WGA-3') correspondiente a los nucleótidos 1568-1590 de la cepa PV ó P968 (5'-AYGAAAAAACTAACAC CCCTCCT-3') correspondiente a los nucleótidos 1473-1496 y un iniciador reverso (-) P905 (5'-CCTTAACTA TGTCRTCAAGRTTCA-3')<sup>(18)</sup> correspondiente a los nucleótidos 2208-2231. Las secuencias de los

Grand Island, NY) according to the manufacturer's instructions, and resuspended in 100 ml of RNase-free water. Amplification of the entire P gene was performed employing primers flanking the P gene open reading frame thus: rabPfor (5'-CTACTTCTC CGGGGAAACCAGAAG-3' which targets nucleotides 1249-1272 of the reference PV strain) and rabPrev (5'-GGRAGCCAYAGGTCRTCGTCAT-3' which targets nucleotides 2575-2596 of the PV strain). The reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) method was performed as described previously<sup>(3)</sup>. The resulting 1348 bp amplicon was purified using a Wizard Clean up kit (Promega, Madison, WI) prior to nucleotide sequencing on a LiCor 4200L automated sequencer using custom IR-dye labelled internal primers (LiCor) and a Thermo sequenase primer cycle sequencing kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). In some cases where insufficient product was generated from a single round of PCR, hemi-nested or nested PCRs were performed using various combinations of the outer primers and the following internal primers: forward primer P967 (5'-GAGATGGCNGARGAGA CTGTWGA-3') corresponding to nucleotides 1568-1590 of the PV strain or P968 (5'-AYGAAA AAACTAACACCCCTCCT-3') corresponding to nucleotides 1473-1496 and a reverse primer P905 (5'-CCTTAACTATGTCRTCAAGRTTCA-3')<sup>(18)</sup> corresponding to nucleotides 2208-2231. Nucleotide sequences were aligned using CLUSTALX v1.8<sup>(19)</sup> and phylogenetic analysis was performed by a neighbour joining (NJ) algorithm using PHYLIP v3.61 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) as previously described<sup>(3)</sup>. TREEVIEW<sup>(17)</sup> was used to generate graphical outputs of the trees. Translation of nucleotide sequences to protein was performed using DNAsis software (Hitachi) and protein sequence alignments were performed using CLUSTALX and the PROTPARS programme of PHYLIP.

#### *Histopathology*

Brains infected with each viral isolate were retained for histopathologic evaluation. Tissue was fixed by submersion in 10% neutral buffered formalin, processed by routine procedures and embedded in

nucleótidos fueron alineadas empleando ClustalX version 1.8<sup>(19)</sup> y se realizó el análisis filogenético por algoritmo de unión de vecino (Neighbor joining (NJ) empleando PHYLIP versión 3.61 (ver <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) como previamente está descrito<sup>(3)</sup>. TreeView<sup>(17)</sup> fue usado para generar producción gráfica de los árboles. La traducción de la secuencia de nucleótidos a proteína fue realizada usando el DNAsis software (Hitachi) y los alineamientos secuenciales de proteína fueron llevados a cabo con ClustalX y el programa ProtPars de Phylip.

### Histopatología

Los cerebros infectados con cada aislamiento fueron conservados para la evaluación histopatológica. Los tejidos se fijaron por inmersión en formalina neutra tamponada al 10%, procesado por procedimientos rutinarios y embebidos en parafina. Las secciones fueron de 3 mm y teñidas con hematoxilina-eosina (H & E).

## RESULTADOS

### Caracterización molecular de cepas de zorrillo

Los datos de secuencia de nucleótidos para el gen P de 13 virus de la rabia se obtuvieron como se

paraffin. Sections were made at 3 mm and stained with hematoxylin and eosin (H & E).

## RESULTS

### Molecular characterization of skunk strains

Nucleotide sequence data for the P gene of 13 rabies viruses (see Materials and Methods) were obtained as described. Distance values between all these isolates were generated from aligned nucleotide and predicted protein sequences using the DNADIST and PROTDIST programmes of PHYLIP v3.61 with inclusion of the CVS reference sequence (Table 1). While isolates from epidemiologically related reservoirs exhibited nucleotide distance values < 0.1 (ranging between 0.0411 to 0.0847 for the four Californian viruses, between 0.0302 to 0.0846 for the three Texas skunk viruses and up to 0.0619 for the specimens representative of the mid-western skunk strain of Canada and the US) nucleotide distances between other isolate pairings were greater, ranging from 0.12 to 0.280. Consistent with a previous study which proposed that isolates differing in genetic distance over the length of the rabies P locus by significantly more than 0.08 be considered as distinct genetic variants<sup>(3)</sup>, it appears that the two Mexican isolates, with a nucleotide distance of

Cuadro 1. Valores de distancia para el gen P y las secuencias de la proteína P de 14 aislados del virus de la rabia  
Table 1. Distance values for P gene and P protein sequences of 14 rabies virus isolates

	CVS	MXV684SK	MXV854SK	CAV637SK	CAV650SK	CAV652SK	CAV654SK	TXV211SK	TXV212SK	TXV215SK	KY2877DG	WCL0867SK	WCL1741SK	MXV229VB
CVS	-	0.1445	0.2718	0.1385	0.1462	0.1321	0.1334	0.2771	0.2804	0.2751	0.1333	0.1200	0.1239	0.2447
MXV684SK	0.0924	-	0.2607	0.1437	0.1385	0.1307	0.1412	0.2832	0.2702	0.2710	0.1467	0.1383	0.1385	0.2546
MXV854SK	0.1561	0.1519	-	0.2568	0.2583	0.2542	0.2570	0.2151	0.2225	0.2095	0.2523	0.2570	0.2587	0.1999
CAV637SK	0.0929	0.1087	0.1674	-	0.0477	0.0847	0.0418	0.2710	0.2653	0.2726	0.1316	0.1247	0.1286	0.2434
CAV650SK	0.1003	0.1058	0.1679	0.0313	-	0.0774	0.0524	0.2771	0.2748	0.2786	0.1299	0.1258	0.1297	0.2470
CAV652SK	0.0981	0.0837	0.1437	0.0604	0.0641	-	0.0798	0.2796	0.2727	0.2827	0.1301	0.1271	0.1297	0.2503
CAV654SK	0.0886	0.0975	0.1548	0.0314	0.0349	0.0470	-	0.2804	0.2781	0.2819	0.1226	0.1145	0.1184	0.2326
TXV211SK	0.1752	0.1760	0.1394	0.1715	0.1765	0.1573	0.1634	-	0.0846	0.0302	0.2675	0.2608	0.2640	0.2510
TXV212SK	0.1742	0.1760	0.1417	0.1706	0.1822	0.1822	0.1696	0.0499	-	0.0748	0.2602	0.2670	0.2703	0.2513
TXV215SK	0.1745	0.1725	0.1285	0.1779	0.1830	0.1637	0.1699	0.0277	0.0405	-	0.2595	0.2603	0.2635	0.2540
KY2877DG	0.0917	0.0947	0.1472	0.0933	0.0859	0.0850	0.0821	0.1540	0.1632	0.1604	-	0.0606	0.0619	0.2343
WCL0867SK	0.0746	0.0705	0.1500	0.0749	0.0754	0.0704	0.0642	0.1397	0.1525	0.1502	0.0415	-	0.0033	0.2355
WCL1741SK	0.0813	0.0771	0.1572	0.0817	0.0822	0.0770	0.0708	0.1468	0.1597	0.1573	0.0480	0.0061	-	0.2441
MXV229VB	0.1852	0.1770	0.1513	0.1864	0.1912	0.1726	0.1768	0.1892	0.1953	0.1881	0.1691	0.1724	0.1766	-

The top right segment of the table shows the values of distance of the nucleotide sequence and the left lower segment values of distance of the protein.

mencionó. Los valores de distancia entre todos estos aislamientos se generaron a partir del nucleótido alineado y las secuencias proteicas predichas empleando los programas DNADIST y PROTDIST de Phylip versión 3.61, con inclusión de la secuencia de referencia del CVS (Cuadro 1). Mientras que los aislados de reservorios relacionados epidemiológicamente mostraron valores de distancia de nucleótidos  $> 0.1$  (con un rango de 0.0411 a 0.0847 para los cuatro virus de California, entre 0.0302 a 0.0846 para los tres virus de zorrillo de Texas y hasta 0.0619 para los especímenes representativos de la cepa de zorrillo del medio-oeste de Canadá y Estados Unidos de América); las distancias de nucleótidos entre los aislados pareados fueron mayores, con una escala de 0.12 a 0.280. Consistente con un estudio previo que proponía que los aislados que difieren más de 0.08 en la distancia genética del locus P de la rabia deben considerarse como variante genética distinta<sup>(3)</sup>, parece ser que los dos aislados mexicanos, con una distancia de nucleótidos de 0.2606 entre estos, son claramente representativos de dos cepas distintas que no tienen relación con los otros aislamientos de zorritos examinados en este trabajo.

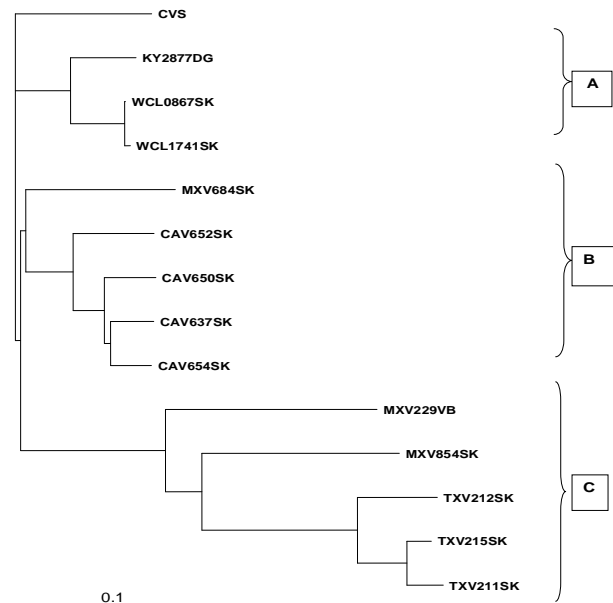
El análisis de NJ de estos virus de la rabia se muestra en la Figura 1. Basado en los valores asociados con los mayores clados de los árboles filogenéticos, hubo claramente un fuerte soporte de agrupamiento geográfico de aislamientos de rabia de zorritos como se indica a continuación: (A) el clado de zorrillo de (centro/sur) Texas, fue la variante terrestre más claramente divergente estudiada y estuvo relativamente asociada con la cepa de murciélago vampiro representativo de cepas de murciélagos en América; (B) el clado del zorrillo de California; y (C) un clado comprometiendo tanto con aislados del oeste de Canadá como del medio-oeste de Estados Unidos de América. Los dos aislados de zorrillo mexicano agrupados distintivamente dentro de este árbol, tanto la variante AV10 (MXV684SK) ubicada en el grupo de California, pero con poco soporte (437), como el aislado AV8 de zorrillo (MXV854SK) agrupado más cercanamente con el clado de zorrillo de Texas con soporte moderado (678) (Figura 1).

0.2606 between them, are clearly representative of distinct strains neither of which group closely with the other skunk isolates examined in this report.

A NJ analysis of these rabies viruses is illustrated in Figure 1. Based upon the bootstrap values associated with the major clades of the tree, there was clearly strong support for geographical clustering of skunk rabies isolates as follows: (A) the Texas (south-central) skunk clade, which was clearly the most divergent terrestrial variant studied and was relatively closely associated with the vampire bat strain representative of bat strains of the Americas, (B) the Californian skunk clade, (C) a clade comprising both Western Canada and mid-western US skunk isolates. The two Mexican skunk isolates clustered quite distinctly within this tree;

Figura 1. Filogenia de los virus de la rabia del zorrillo de Norteamérica determinado por el análisis de (Neighbor Joining (NJ) en la región base 910, que incluye al ORF (marco de lectura abierto) del gen P completo

Figure 1. Phylogeny of North American skunk rabies viruses as determined by a NJ analysis on a 910 base region that includes the complete P gene ORF



Isolates were as described in the text. Numbers at branches indicate bootstrap values (out of 1000 replicates) for the clade to the right of the branch. The scale at bottom indicates genetic distance.

Con el objetivo de investigar más a fondo el linaje de los aislados del zorrillo mexicano, se llevó a cabo otro análisis filogenético empleando secuencias del gen P derivadas de una colección más global del virus de la rabia(2) con la secuencia de un aislamiento de Lyssavirus de murciélago australiano utilizado como grupo externo (Figura 2). El aislado AV10 (MXV684SK) fue segregado con un buen soporte (855) a partir de una colección de virus obtenida de varias zonas geográficas y especies incluyendo al perro mexicano, al zorro gris de Texas, variantes y cepas del zorrillo de California y del medio-oeste del viejo mundo. Estas cepas han sido consideradas como representativas del linaje cosmopolita que fue transferido a muchas regiones del mundo durante la época de la colonia(20). La inclusión de MXV684SK en el subtipo 1 del virus de la rabia genotipo(3) está fuertemente respaldado (valor bootstrap de 1000). En comparación, el aislado AV8 (MXV854SK) agrupado dentro del subtipo 2 del genotipo 1 (valor bootstrap de 819) estaba asociado con el clado que incluía cepas terrestres albergadas por zorrillos y mapaches (valor bootstrap de 742).

*Comparación de proteínas P predichas*

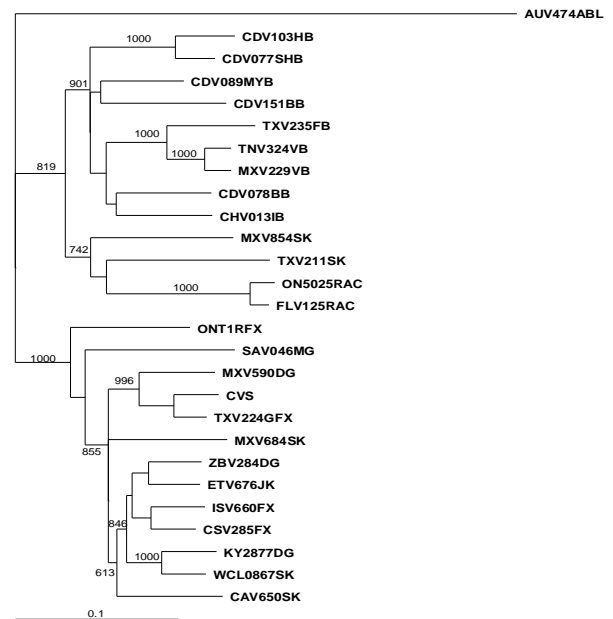
Para explorar si las diferencias observadas en el periodo de incubación entre cepas fijas de rabia (CVS), zorrillo y murciélago vampiro podían ser explicadas por diferencias en dominios funcionales importantes de la proteína P, se generó un alineamiento de secuencias de la proteína P como representativo de cepas de zorrillos, cepas de CVS así como de murciélago vampiro para compararlas (Figura 3). Consistente con observaciones previas de la organización estructural de la proteína P, las regiones más conservadas (aminoácidos 1-50 y 200-240 en este alineamiento) y dominios altamente variables (residuos 55-80 y 130-180) fueron evidentes. Sin embargo, la comparación de CVS y las secuencias del virus del murciélago vampiro con aquellas determinadas para todas las cepas de zorrillo no aclararon la identificación de patrones de sustitución que mostraron ser típicos de cepas de zorrillos; en cambio, los sustitutos parecían reflejar las relaciones filogenéticas de los aislados. Se examinó a fondo la conservación de varias

the AV10 variant (MXV684SK) clustered with the Californian grouping although with poor bootstrap support (437). The AV8 skunk isolate (MXV854SK) clustered most closely with the Texas skunk clade with moderate bootstrap support (678) (Figure 1).

To further investigate the lineage of the Mexican skunk isolates another phylogenetic analysis was performed using P gene sequences derived from a more global collection of rabies viruses with the

Figura 2. Análisis filogenético de una colección global de Lyssavirus genotipo 1 para determinar los orígenes evolutivos de las cepas de rabia del zorrillo de Norteamérica

Figure 2. Phylogenetic analysis of a global collection of genotype 1 lyssaviruses to determine the evolutionary origins of North American skunk rabies strains



A NJ analysis was performed. The additional isolates included in this analysis have been described previously and may be identified by their three digit V numbers [see 3]. CD= Canada; CH= Chile; ET= Ethiopia; CS= Czechoslovakia; FL= Florida, US; IS= Israel; MX= Mexico; SA= South Africa; TN= Trinidad; ZB= Zimbabwe.

BB= Big brown bat; DG= dog; FB= free-tailed bat; FX= fox; GFX= grey fox; HB= hoary bat; IB= insectivorous bat; JK= jackal; MG= mongoose; MYB= Myotis bat; RAC= raccoon; RFX= red fox; SHB= silver-haired bat; SK= skunk; VB= vampire bat. ONT1RFX represents the arctic fox lineage present in various regions of Canada and ON5025RAC is an isolate of raccoon rabies recovered from Ontario in 1999. AUV474ABL is an Australian bat lyssavirus isolate (genotype 7). The groupings show to the right of the tree place the isolates in their global context.



características de la proteína P, que en caso de ser modificadas, podían tener impacto en las interacciones virus-hospedero; éstas incluyeron el motivo de unión de LC8<sup>(15)</sup>, residuo de serina conocido como blanco de fosforilación de por lo menos dos proteínas cinasas distintas<sup>(21)</sup> y cuatro residuos internos de metionina mostrando, en el caso de la cepa CVS, ser capaces de dirigir la iniciación de la traducción interna para producir N-terminal truncado del producto gen P<sup>(22)</sup>. Como se muestra en la Figura 3, el motivo LC8 de unión localizado en los residuos 139-151 muestra variación

sequence of an Australian bat lyssavirus isolate used as outgroup (Figure 2). The AV10 isolate MXV684SK segregated with good bootstrap support (855) with a collection of viruses recovered from diverse geographical areas and species including the Mexican dog, Texas grey fox, the Californian and mid-western skunk variants and strains from the old world. These strains have previously been considered as representative of the cosmopolitan lineage that was transferred to many areas of the world during colonial times<sup>(20)</sup>. Inclusion of MXV684SK in subtype 1 of the genotype 1 rabies

Figura 3. Alineamiento de las proteínas P predichas de 10 aislados del virus de la rabia

Figure 3. Alignment of the predicted P proteins of 10 rabies virus isolates. The P protein sequences deduced for 10 representative rabies isolates studied in Figure 2 were aligned as described

	1					60
CVS	<u>MSKIFVNP</u> SA	<u>IRAGLADLEM</u>	<u>AEETVDLINR</u>	<u>NIEDNQAH</u> LQ	<u>GEP</u> IEVDNLP	<u>EDMKRLHL</u> DD
MXV854SK	.....	.....	.....A	.....	.....S	D..R..Q...
MXV684SK	.....	.....	.....K	.....	.....	...RQ.....
TXV211SK	.....	.....	.....A	...E.....	.....S	...R..Q..NN
TXV212SK	.....	.....	.....A	.....	.....S	...R..Q..NI
KY2877DG	.....	.....	.....	.....	.....	D..R.....
WCL1741SK	.....	.....	.....	.....	.....	...R.....
CAV652SK	.....	.....	.....K	.....	.....	...R.....N
CAV650SK	.....	.....	.....	.....	.....	D..R.....
MXV229BT	.....	.....	.....A	.....	.....D	...R..Q...
	61					120
CVS	<b>EKSSNLGEMV</b>	<b>RVGEGKYRED</b>	<b>FQMDGEDDPN</b>	<b>LLFQSYLDNV</b>	<b>GVQIVRQMRS</b>	<b>GERFLK</b> ISQ
MXV854SK	...G...AA	KA..S.CQ..	.....R	.....	...M..R...	.....
MXV684SK	G.....A	N...RH...	.....	.....	.....	.....
TXV211SK	..QYG.ADV	KE..N.SH..	.....S	.....	.....	.....
TXV212SK	..QYG.T.VD	KE..N.S...	.....S	.....	...H.....	.....
KY2877DG	RNR.....A	K.....C	.....E..S	..L.....	.....	.....
WCL1741SK	G.....A	K...R...	..I.....S	..L.....	.....	...F.....
CAV652SK	G.....A	EM..S.H..	.....S	.....	.....	.....
CAV650SK	G.....D..T	EKRDN...	.....R..S	.....	.....	.....
MXV229BT	D.P.G...SIA	KAE.S.CQ..	.....A..A	.....	.....I	...K..G...
	121					180
CVS	<b>TV</b> EEIVSYVT	<b>VNFPNPPRRS</b>	<b>SEDKSTQTTG</b>	<b>RELK</b> KET TSA	<b>FSQ</b> RESQPSK	<b>ARMVAQ</b> VPAG
MXV854SK	.....I.....	...S..G.P	...A...AN	...D.A..	H.K...S..	VK.A..T.S.
MXV684SK	I.....I.....	...HSG...	.....I	DS.TG..	P...S...	K.A..T.S.
TXV211SK	.....I...M	I...SSSQG.P	.....AN	G...V.V	P...N.S.	K.A..A.S.
TXV212SK	.....I...M	I...SSSLG.P	.....AD	G..R..V..	P...N.S.	KT..T.S.
KY2877DG	.....I...M	.....G	.....RA	..P...T	P...S..	IA..A.S.
WCL1741SK	.....I...M	.....S.G	.....L	VP...T	P...D.S.	..A.A.S.
CAV652SK	I.....I.....	.....G	L.....	P...T	H...S..	K...A.S.
CAV650SK	.....I.....	.....SG	L.....	P...T	H...S..	...A.S.
MXV229BT	.....I.....	...SGA.GK	LK..A...V	VV...R..	S...A...	VKIA..TVS
	181					240
CVS	<b>PPALEWSATN</b>	<b>EEDDLSVEAE</b>	<b>IAHQIAESFS</b>	<b>KKYKFP</b> SRSS	<b>GIFLYN</b> FEQL	<b>KMNLDD</b> IVKE
MXV854SK	..H.....A	..E.....	.....	.....	.....	.....
MXV684SK	.....D.....	.....	.....	.....	.....	.....
TXV211SK	.....D.....	.....	.....	.....	.....	.....
TXV212SK	.....D.....	.....	.....	.....	.....	.....
KY2877DG	.....	.....	.....	.....	.....	.....
WCL1741SK	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CAV652SK	.....	.....I	.....	.....	.....	.....
CAV650SK	.....	.....I	.....	.....	.....V	.....
MXV229BT	.....VA	.....P	.....	.....	.....	.....
	241					297
CVS	<b>AKNVPGVTRL</b>	<b>AHDGSKIPLR</b>	<b>CVLGWVALAN</b>	<b>SKKFQ</b> LLVEA	<b>DKLSKIMQDD</b>	<b>LNRYT</b> TSC
MXV854SK	.....E...L	.....L	.....S	...R...I..P	...N.....	...V.R
MXV684SK	.....L	.....L	.....S	.....S	.....	...A..
TXV211SK	S.D.....L	.....L	.....S	.....P	...N.....	...L.N
TXV212SK	S.....L	.....L	.....S	...R...P	...N.....	...L.N
KY2877DG	.....L	.....L	.....S	.....P	...N.....	...A..
WCL1741SK	.....L	.....L	.....S	.....P	...N.....	...A..
CAV652SK	.....L	.....L	...L...S	...R...P	...N.....	...A..
CAV650SK	.....S	.....L	.....S	.....P	...N.....	...A..
MXV229BT	S.....L	.....L	.....S	.....P	...N.....	...A.L

Dots represent identity with the CVS strain used as the reference sequence. The following features are highlighted: five methionine residues used for translation initiation as well as the LC8 binding domain (residues 143-147) are underlined; serine residues which act as phosphorylation targets in the CVS strain are in bold.

en la secuencia primaria, aunque el motivo de unión crítico (DKXTQT) localizado en los residuos 143-147 fue retenido en todas las cepas a excepción de una sustitución (T a R) en el residuo 147 de la muestra KY22877DG. Mientras que hubo variación significativa en residuos inmediatamente adyacentes a este motivo de unión del residuo 6, las dos cepas mexicanas no mostraron diferencias consistentes con la cepa de referencia CVS. De los cuatro residuos de metionina internos que inician la traducción interna, todos los residuos en posiciones 20 y 53 se conservaron, no así los de posición 69 y 83. Los residuos serina 63, 64, 162, 210 y 271 de la cepa CVS, de los que se conoce que son blanco de fosforilación<sup>(23)</sup>, se mantuvieron en ambas secuencias de la cepa de zorrillo mexicano, excepto los residuos 63 y 64, que permanecen en una de las regiones hipervariables, no se conservaron en alguna de las otras cepas de zorrillo (como por ejemplo, la cepa de zorrillos de Texas). En todos los casos los residuos 162, 210 y 271 se conservaron en las últimas dos posiciones mantenidas dentro del contexto de la secuencia de consenso de proteína kinasa C.

#### *Periodo de incubación viral*

La inoculación intracerebral en ratones con cepa CVS dio por resultado un periodo de incubación consistentemente más corto (6 días) comparado con lo observado para las cepas de zorrillo (hasta 21 días), mientras que la cepa de murciélago vampiro tuvo un periodo de incubación de longitud intermedia (entre 12 a 15 días). Cuando los datos para los tres pases fueron considerados como ANDEVA de una vía, no hubo diferencia significativa para los cuatro grupos ( $P < 0.001$  excepto  $P = 0.029$  para las dos cepas de zorrillo). La comparación de los datos para los tres pases secuenciales (P1, P2 y P3) de cada cepa mostraron que, por ANDEVA de una vía, no había cambio significativo para el aislado de zorrillo de BCS ( $P = 0.81$ ), pero los periodos de incubación aparentemente más cortos para las cepas de zorrillo de SLP y murciélago vampiro al pase 3 fueron significativos ( $P = 0.014$  y  $0.027$ , respectivamente). Estas conclusiones se reforzaron por comparación de la prueba *t* de Student de periodos de incubación

lineage [3] is very strongly supported (bootstrap value of 1000). In contrast, the AV8 isolate MXV854SK clustered within subtype 2 of genotype 1 (bootstrap value of 819) and was most closely associated with a clade that included terrestrial strains harboured by skunks and raccoons (bootstrap value of 742).

#### *Comparison of predicted P proteins*

To explore whether the observed differences in incubation period between CVS, skunk and vampire bat rabies strains could be explained by differences in functionally important domains of the P protein, an alignment of the P protein sequences for representative skunk strains, as well as the CVS and vampire bat strains for comparison, was generated as shown in Figure 3. Consistent with prior observations on the organisational structure of the P protein, regions of high conservation (amino acids 1–50 and 200–240 in this alignment) and highly variable domains (residues 55–80 and 130–180) were evident. However, comparison of the CVS and vampire bat virus sequences with those determined for all skunk strains did not clearly identify substitution patterns that appeared to be typical of the skunk strains; rather the substitutions appeared to mirror the phylogenetic relationships of the isolates. The conservation of several features of the P protein, that if modified could impact virus–host interactions, were examined closely; these included the LC8 binding motif<sup>(15)</sup>, serine residues known to be targets for phosphorylation by at least two distinct protein kinases<sup>(21)</sup> and four internal methionine residues shown, in the case of the CVS strain, to be capable of directing internal translation initiation to produce N-terminally truncated P gene products<sup>(22)</sup>. As illustrated in Figure 3, the LC8 binding motif located within residues 139-151 does exhibit some variation in primary sequence although the critical binding motif (DKXTQT) located at residues 143-147 was retained in all strains with the exception of a substitution (T to R) at residue 147 of the KY22877DG sample. While there was significant variation in residues immediately adjacent to this 6 residue motif the two Mexican strains did not exhibit consistent differences with the CVS reference strain. Of the four internal methionines shown to initiate internal translation, the residues

de P1 y P3 para los tres aislados virales de "calle"; la diferencia para la cepa de zorrillo de BCS no fue significativa ( $P=0.539$ ), pero las diferencias en estos valores para las cepas de zorrillo de SLP y murciélago vampiro sí fueron significativas ( $P=0.025$  y  $0.016$ , respectivamente).

### *Histopatología*

Los ratones inoculados con CVS presentaron infiltración linfocitaria perivascular de leve a moderada en el cerebelo, corteza cerebral y región del tálamo, junto con microgliosis leve. La Figura 4A muestra que las lesiones resultantes de la inoculación con cepa de murciélago vampiro presentaron infiltración perivascular de leve a moderada en cerebelo y corteza cerebral, infiltración perivascular leve en hipocampo, región del tálamo; y el puente, con gliosis leve. Las lesiones histopatológicas causadas por infección de ratones con virus de la rabia del zorrillo (AgV 8) incluyeron lesiones en forma de esponja en el neuropilo del tálamo (Figura 4B). Además se observó microgliosis leve (Figura 4C) e infiltración linfocitaria perivascular de moderada a severa en cerebelo, corteza cerebral y puente; e infiltración linfocitaria perivascular severa en hipocampo y región del tálamo. Se examinaron secciones duplicadas para todas las regiones cerebrales y los resultados fueron reproducidos en todos los casos. Los ratones control no manifestaron cambios histológicos.

### **DISCUSIÓN**

Como se informó previamente, los virus AV10 han sido hallados en zorrillos de la península de Baja California, mientras que los virus AV8 estaban asociados con zorrillos de las regiones centrales de México, como San Luis Potosí, Aguascalientes y Jalisco. Anteriormente, la caracterización de una porción del gen N de dichos aislados ha concluido que las cepas de zorrillos mexicanos de BCS pertenecen a distintos linajes de aquéllos encontrados en otros reservorios terrestres y silvestres<sup>(11,13)</sup>.

En este estudio, la caracterización molecular se enfocó al gen P, una región relativamente divergente del virus que ha mostrado ser adecuada para estudios

at positions 20 and 53 were all conserved whereas those at positions 69 and 83 were not. Serine residues 63, 64, 162, 210 and 271 of the CVS strain, which are known to be phosphorylation targets<sup>(23)</sup>, were all retained in both of the Mexican skunk strain sequences but residues 63 and 64, which lie in one of the hypervariable regions, were not conserved in some of the other skunk strains (e.g. Texas skunks). Residues 162, 210 and 271

Figura 4. Lesiones causadas por la cepa de murciélago vampiro

Figure 4. Lesions produced by a vampire bat strain

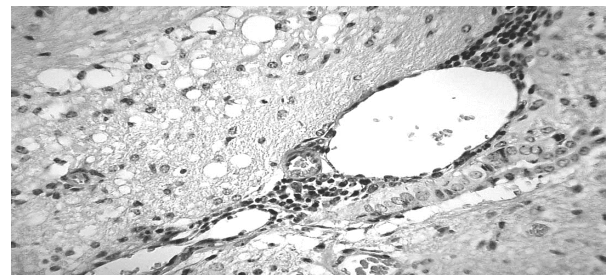


Figure 4 A

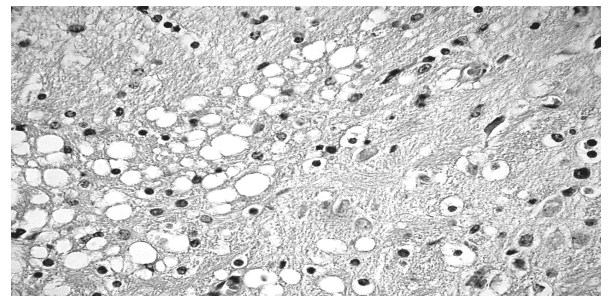


Figure 4 B

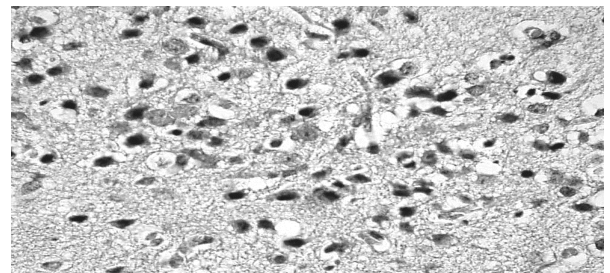


Figure 4 C

A, showing mild-to-moderate perivascular infiltrations in the hippocampus. B, thalamic region and the bridge, with mild gliosis and C. Histopathological lesions produced upon infection of mice with skunk rabies virus (AgV8) included spongiform lesions in the neuropil from the thalamus and mild microgliosis.

epidemiológicos tanto globalmente extensos como finamente detallados<sup>(3,24)</sup>. La comparación de secuencias del gen P determinadas para ambas variantes antigénicas del virus de la rabia que circulan en zorrillos mexicanos conllevó a las siguientes conclusiones: 1) las dos variantes de zorrillo mexicano son evolutivamente distintas. 2) el aislado AV10 de BCS está muy relacionado con los virus circulantes en zorrillos de California, siendo un hallazgo consistente con sus parientes geográficamente cercanos. Sin embargo, la evidencia no fue lo suficientemente fuerte para la naturaleza monofilética de los virus que circulan en California y BCS; por lo tanto, actualmente no se puede suponer que una surgió directamente de la otra. El análisis de otros especímenes mexicanos puede ayudar para posteriormente elucidar la relación evolutiva de estos dos grupos virales. 3) el aislado AV8 de SLP estaba cercanamente relacionado con la cepa del zorrillo del centro/sur que circulaba en los estados del sur-este, como Texas; sin embargo, no hubo evidencia suficiente para respaldar la naturaleza monofilética del virus de la rabia del zorrillo de México y de Texas y se argumentaría que, debido la distancia genética observada entre estos dos grupos, deben ser considerados como dos clados distintos.

Se ha propuesto que las cepas de rabia circulando en hospederos terrestres de América (e.g. mapaches y zorrillos) surgieron por parte de quirópteros hospederos<sup>(25)</sup>. De hecho, se ha documentado el potencial para el surgimiento de nuevas cepas de rabia posteriores a la transmisión de esta enfermedad por el murciélago como reservorio, a una población localizada de zorrillos (fenómeno denominado "spillover")<sup>(26)</sup>. De la misma manera, la variante AV8 bien pudo emerger de ciertas cepas de murciélago. Dada la diferencia en especies de zorrillos que portan rabia en México comparadas con las de Estados Unidos de América y Canadá, así como la distancia genética entre los virus AV8 en México y aquéllos en Texas, es probable que esta cepa de zorrillo mexicano surgiera como fenómeno de "spillover" de un murciélago que actuó como reservorio de la rabia independientemente de otros fenómenos de este tipo más hacia el norte.

were conserved in all cases with the latter two positions maintained within the context of a protein kinase C consensus sequence.

#### *Viral incubation period*

Intracerebral mouse inoculation with the CVS strain consistently resulted in a shorter incubation period (6 d) compared to that observed for the skunk strains (up to 21 d) while the vampire bat strain had an incubation period of intermediate length (between 12 to 15 d). When the data for all 3 passages was considered a one way ANOVA indicated a statistically significant difference between all four groups ( $P < 0.001$  except  $P = 0.029$  for the two skunk strains). Comparison of the data for the three sequential passages (P1, P2 and P3) of each strain indicated that, by one way ANOVA, there was no significant change for the SBC skunk isolate ( $P = 0.81$ ) but the apparently shorter incubation periods for the skunk SLP and vampire bat strains at passage 3 were significant ( $P = 0.014$  and  $0.027$  respectively). These conclusions were reinforced by a t-test comparison of P1 and P3 incubation times for the three street isolates; the difference for the skunk SBC was not significant ( $P = 0.539$ ) but the differences in these values for the skunk SLP and vampire bat strains were significant ( $P = 0.025$  and  $0.016$  respectively).

#### *Histopathology*

Mice inoculated with CVS presented a mild-to-moderate perivascular lymphocytic infiltration in the cerebellum, brain cortex, and thalamic region, together with mild microgliosis. Figure 4A shows the lesions resulting from inoculation with the vampire bat strain presented mild-to-moderate perivascular infiltrations observed in the cerebellum and brain cortex, mild perivascular infiltrations in the hippocampus, thalamic region, and the bridge, with mild gliosis. The histopathological lesions produced upon infection of mice with skunk rabies virus (AgV 8) included spongiform lesions in the neuropil from the thalamus (Figure 4B). Additionally, mild microgliosis (Figure 4C) and moderate-to-severe perivascular lymphocytic infiltration in the cerebellum, brain cortex and bridge, and severe perivascular lymphocytic

La variación molecular y antigénica claramente puede afectar la patogénesis del virus de la rabia, siendo una propiedad que puede manifestarse en diferencias en el periodo de incubación, cambios histopatológicos y presentación clínica. Este trabajo ha demostrado que ambas cepas de zorrillo causan en ratones un periodo de incubación más largo que lo observado con aislados aéreos, y en cuanto a periodos de incubación de cepas de zorrillo de BCS mostraron menor adaptación al ratón que la cepa de zorrillo de SLP o la cepa aérea. Además, las dos cepas de zorrillo causaron lesiones histopatológicas similares a las lesiones en forma de esponja reportadas en zorrillos infectados con cepas de rabia de zorrillo canadiense<sup>(26,27)</sup>; aunque este tipo de lesiones se ha encontrado en cerebro de ratón inoculado con virus de la rabia de lince mexicano<sup>(28)</sup>, que es molecularmente similar al virus de zorros de Texas<sup>(13)</sup>, estas lesiones fueron muy distintas de las originadas por la cepa aérea incluida en este estudio. Así, el virus de la rabia del zorrillo norteamericano provoca cambios patológicos similares en animales infectados a pesar de sus muy distintos orígenes evolutivos. Se anticipa que esta similitud en la patología debe ser consecuencia de atributos funcionales similares en una o más proteínas virales. Aunque, es evidente que la proteína G tiene un papel importante en la patogénesis viral<sup>(29)</sup>, la neuroinvasividad del virus de la rabia ha sido ligado a varios elementos genómicos virales<sup>(30)</sup>. Los dominios funcionales específicos dentro de una o más proteínas virales pueden impactar la susceptibilidad en diferentes especies, periodo de incubación, duración de signos clínicos y frecuencia de comportamiento agresivo; todos estos parámetros pueden contribuir al fenómeno de selectividad de especies en la rabia enzoótica<sup>(12)</sup>

Sin embargo, la base molecular para estas diferencias en adaptación al ratón puede no ser evidente sin la caracterización molecular completa de estos virus a lo largo de sus genomas. Las comparaciones de la proteína P realizadas en este estudio, no identificaron características de este producto para la cepa de zorrillo de BCS que fueron claramente diferentes de las otras cepas estudiadas (CVS y murciélago vampiro) o, para ese propósito, características estructurales que claramente

infiltration in the hippocampus and thalamic region were observed. Duplicate sections were reviewed for all brain areas examined and results were reproducible in all cases. Control mice did not manifest any histological changes.

## DISCUSSION

As reported previously AV10 viruses have been found in skunks of the Baja California peninsula while AV8 viruses were associated with skunks in central regions of Mexico such as San Luis Potosi, Aguascalientes and Jalisco. Previously, characterisation of a portion of the N gene of such isolates had concluded that Mexican skunk strains from SBC belong to lineages distinct from those found in other terrestrial and wild reservoirs<sup>(11,13)</sup>.

In this study molecular characterization targeted the P gene, a relatively divergent region of the virus shown to be suitable for both globally broad and finely detailed epidemiological investigations<sup>(3,24)</sup>. Comparison of P gene sequences determined for both antigenic variants of the rabies viruses that circulate in Mexican skunks lead to the following conclusions: 1) The two Mexican skunk variants are evolutionarily quite distinct. 2) The AV10 isolate from SBC is quite closely related to the viruses that circulate in Californian skunks, a finding consistent with their relative close geographical proximity. However, support for the monophyletic nature of the viruses circulating in California and SBC was not strong, thus it cannot presently be surmised that one emerged directly from the other. Analysis of other Mexican specimens may help to further elucidate the evolutionary relationship of these two viral groups. 3) The AV8 isolate from SLP was most closely related to the south central skunk strain that circulates in southern states such as Texas. However, there was insufficient support for the monophyletic nature of the Texas and Mexican skunk rabies viruses and the genetic distance observed between these two groups would argue that they should be considered as two distinct clades.

It has been proposed that the rabies strains circulating in terrestrial hosts of the Americas (i.e.

distinguen a las cepas de zorrillo de las otras, lo cual explicaría el mayor periodo de incubación observado. La caracterización de otros genes virales, particularmente la secuencia completa del gen G, que codifica para la superficie de la glicoproteína responsable del receptor de la célula huésped vinculante y entrada del virus en la célula, es otro producto viral que merece mayor escrutinio.

En México, durante el año 2000, se diagnosticaron ocho zorrillos rabiosos y una muerte humana fue atribuida a esta especie<sup>(31)</sup>. Desde entonces, los casos de rabia en zorrillo han sido 7, 7, 6 y 2 en los años 2001-2004, respectivamente<sup>(32)</sup>. En 2001, dos de siete muertes en México, representando alrededor de 30 % del total de los casos, fueron atribuidos a zorrillos. Recientemente, se notificó un caso de un humano muerto por rabia transmitida por un zorrillo infectado en Batopilas, Chihuahua. El caso fue confirmado por la Secretaría de Salud, después de haber realizado las pruebas correspondientes en el animal capturado. Estas cifras marcan claramente la importancia del surgimiento de la rabia portada por animales silvestres terrestres en este país y la necesidad de comprender la biología y epidemiología de esta enfermedad para ayudar en los esfuerzos de control.

## LITERATURA CITADA

1. Dietzgen RG, Calisher CH, Kurath G, Kusmin IV, Rodríguez LL, Stone DM, et al. Family Rhabdoviridae. In: King AM, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editors. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, San Diego: Elsevier; 2011. [In press].
  2. Kuzmin IV, Mayer AE, Niezgodna M, Markotter W, Agwanda B, Breiman RF, Rupprecht CE. Shimoni bat virus, a new representative of the *Lyssavirus* genus. *Virus Res* 2010;149:197-210.
  3. Nadin-Davis SA, Abdel-Malik M, Armstrong J, Wandeler AI. *Lyssavirus* P gene characterization provides insights into the phylogeny of the genus and identifies structural similarities and diversity within the encoded phosphoprotein. *Virology* 2002;298: 286-305.
  4. Loza-Rubio E, Vargas R, Hernández E, Batalla D, Aguilar-Setién A. Investigation of rabies virus strains in Mexico with a panel of monoclonal antibodies used to classify *Lyssavirus*. *Bull PAHO*. 1996(30):31-35.
  5. Smith JS. New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis, and prevention of the disease in the United States. *Clin Microbiol* 1996(9):166-176.
- raccoons and skunks) arose due to spill-over events from chiropteran hosts<sup>(25)</sup>. Indeed the potential for the emergence of new rabies strains subsequent to spill-over transmission from a bat reservoir to a localised skunk population has recently been documented<sup>(26)</sup>. Thus the AV8 variant might well have emerged from certain bat strains in a similar manner. Given the difference in species of skunks that carry rabies in Mexico compared to the US and Canada, as well as the genetic distance between the AV8 viruses in Mexico and those in Texas, it is possible that this Mexican skunk strain arose as a spill-over event from a bat reservoir independently of other such events further north.
- Clearly antigenic and molecular variation could affect the pathogenesis of rabies viruses a property that could be manifested in differences in incubation period, histopathological changes and clinical presentation. This study has shown that both skunk strains elicit a longer incubation period in mice than that observed with an aerial isolate, and that with respect to incubation periods the SBC skunk strain exhibited less adaptation to the mouse than either the SLP skunk strain or the aerial strain. In addition, both skunk strains elicited histopathological lesions which are similar to the spongiform lesions reported in skunks infected with Canadian skunk rabies strains<sup>(26,27)</sup>; although these sort of lesions have been found in mouse brain inoculated with Mexican bobcat rabies virus<sup>(28)</sup>, which is molecularly similar to the foxes virus from Texas<sup>(13)</sup>, these lesions were quite distinct from those caused by the aerial strain included in this study. Thus North American skunk rabies viruses appear to effect similar pathological changes in infected animals despite very distinct evolutionary origins. It is anticipated that this similarity in pathology must be a consequence of similar functional attributes in one or more viral proteins. Although, it is apparent that G protein has an important role in viral pathogenesis<sup>(29)</sup>, rabies virus neuroinvasiveness has been linked to several other viral genomic elements<sup>(30)</sup>. Specific functional domains within one or more viral proteins could impact susceptibility in different species, incubation period, duration of clinical signs, frequency of aggressive behaviour; all of these parameters may contribute to the

6. Velázquez-Monroy O, Vargas-Pino F, Gutiérrez-Cedillo V, Lecuona-Olivares A. Advances in canine rabies control in México. In: 14<sup>th</sup> Annual Rabies in the Americas Conference, Philadelphia, Pennsylvania, 2003. Thomas Jefferson Institute, USA. 2003.
  7. Loza-Rubio E, Pedroza-Requenes R, Montano-Hirose JA, Aguilar-Setién A. Caracterización con anticuerpos monoclonales de virus de la rabia aislados de fauna doméstica y silvestre de México. *Vet Mex* 1998;29:345-349.
  8. Loza-Rubio E, de Mattos CC, Aguilar-Setién A, de Mattos CA. Aislamiento y caracterización molecular de un virus rábico, obtenido de un murciélago no hematófago en la Ciudad de México. *Vet Mex* 2000;31:147-152.
  9. Velasco-Villa A, Gómez-Sierra M, Hernández-Rodríguez G, Juárez-Islas V, Meléndez-Félix A, Vargas-Pino F, Velázquez-Monroy O, Flisser A. Antigenic Diversity and Distribution of Rabies virus in Mexico. *J Clin Microbiol* 2002;40:951-958.
  10. Velasco-Villa A, Orciari LA, Souza V, Juárez-Islas V, Gómez-Sierra M, Castillo A, Flisser A, Rupprecht C. Molecular epizootiology of rabies associated with terrestrial carnivores in México. *Virus Res* 2005;11:13-27.
  11. Aranda M, López de Buen L. Rabies in Skunks from Mexico. *J. Wildlife Dis* 1999;35:574-577.
  12. Charlton KM, Webster WA, Casey GA, Rupprecht CE. Skunk rabies. *Rev Infect Dis* 1998;10(Suppl 4):S626-628.
  13. de Mattos CC, de Mattos CA, Loza-Rubio E, Aguilar-Setién A, Orciari LA, Smith JS. Molecular Characterisation of Rabies virus Isolates from Mexico: Implications for transmission dynamics and human risk. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:587-597.
  14. Loza-Rubio E, Aguilar-Setién A, Bahloul C, Brochier B, Pastoret PP, Tordo N. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in Mexico. *Arch Med Res* 1999;30:144-149.
  15. Poisson N, Real E, Gaudin Y, Vaney C, King S, Jacob Y, Tordo N, Blondel D. Molecular basis for the interaction between rabies virus phosphoprotein P and the dynein light chain LC8: Dissociation of dynein-binding properties and transcriptional functionality of P. *J Gen Virol* 2001;82:2691-2696.
  16. Los anticuerpos monoclonales en la caracterización y vigilancia de los virus de la rabia en América Latina y el Caribe. *Pan Am J Public Health* 2000;8:214-217.
  17. Page RDM. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp Appl Biosci* 1996;12:357-358.
  18. Nadin-Davis SA, Loza-Rubio E. The molecular epidemiology of rabies associated with chiropteran hosts in Mexico. *Virus Res* 2006;117:215-226.
  19. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc Acids Res* 1997;24:4876-4882.
  20. Smith JS, Orciari LA, Yager LA, Seidel HD, Warner CK. Epidemiologic and historical relationships among 87 rabies virus isolates as determined by limited sequence analysis. *J Infect Dis* 1992;166:296-307.
  21. Gupta AK, Blondel D, Choudhary S, Banerjee AK. The phosphoprotein of rabies virus is phosphorylated by a unique cellular protein kinase and specific isomers of protein kinase C. *J Virol* 2000;74:91-98.
  22. Chenik M, Chebli K, Blondel D. Translation initiation at alternate in-frame AUG codons in the rabies virus phosphoprotein mRNA is mediated by a ribosomal leaky scanning mechanism. *J Virol* 1995;69:707-712.
- phenomenon of species selectivity in enzootic rabies<sup>(12)</sup>.
- However, the molecular basis for these differences in adaptation to the mouse between strains may not be evident without complete molecular characterisation of these viruses along the length of their genomes. The P protein comparisons undertaken in this report did not identify features of this product for the Mexican SBC skunk strain that were clearly different from those of the other strains investigated (CVS and vampire bat) or for that matter structural features that clearly distinguished the skunk strains from the others that would explain the longer incubation period observed. Characterisation of other viral genes, especially the complete coding sequence of the G gene, which encodes the surface glycoprotein responsible for host cell receptor binding and viral entry into the cell, is another viral product that deserves further scrutiny.
- In Mexico, during the year 2000, eight rabid skunks were diagnosed and one human death was attributed to this species<sup>(31)</sup>. Since then cases of rabies in skunks have numbered 7, 7, 6 and 2 in the years 2001-2004, respectively (SIVE, 2004, see: [senasica.senasica.sagarpa.gob.mx](http://senasica.senasica.sagarpa.gob.mx) and [32]). In 2001, 2 of 7 human deaths in Mexico, representing around 30 % of total cases, were attributed to skunks. These numbers clearly underscore the emerging importance of rabies carried by terrestrial wildlife in this country and the need to better understand the biology and epidemiology of this disease to aid in control efforts.

*End of english version*

- 
23. Nadin-Davis SA, Simani S, Armstrong J, Fayaz A, Wandeler AI. Molecular and antigenic characterization of Rabies viruses from Iran identifies variants with distinct epidemiological origins. *Epidemiol Infect* 2003;131:777-790.
  24. Badrane H, Tordo N. Host-switching in Lyssavirus history from the chiroptera to the carnivora orders. *J Virol* 2001;75:8096-8104.
  25. Smith J, Rohde R, Mayes B, Parmely C, Leslie MJ. Molecular evidence for sustained transmission of a bat variant of rabies virus in skunks in Arizona. In: 12<sup>th</sup> Ann Rabies in the Americas Conf. Peterborough, Ontario, CFIA, Canada, 2001.

26. Bundza A, Charlton KM. Comparison of spongiform lesions in experimental scrapie and rabies in skunks. *Acta Neuropathol* 1988;76:275-280.
27. Charlton KM, Casey GA, Campbell JB. Experimental rabies in skunks: effects of immunosuppression induced by cyclophosphamide. *Can J Comp Med* 1984;48:72-77.
28. Weimersheimer JE, Loza-Rubio E, Morales SE. Histopathological lesions in mice caused by rabies virus molecular variants circulating in Mexican wildlife. *Téc Pecu Méx* 2004;42:411-417.
29. Faber M, Faber ML, Papaneri A, Bette M, Weihe E, Dietzschold B, Schnell MJ. A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity. *J Virol* 2005;79:14141-8.
30. Faber, M, Pulmanausahakul R, Nagao, K, Prośniak M, Rice AB, Koprowski H, Schnell Mj, Dietzschold B. Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasiveness. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2004;101:16328-16332.
31. OPS. Boletín Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud: Organización Mundial de la Salud. 2000(XXXII).
32. OPS. Boletín Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas Volumen.. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud: Organización Mundial de la Salud. 2004(XXXVI).