



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN DE  
RABIA PARALÍTICA EN GANADO REPRODUCTOR BOVINO.

AUTOR

Jonathan Baruc Moreno Reyes

AÑO

2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN DE  
RABIA PARALÍTICA EN GANADO REPRODUCTOR BOVINO.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología

Profesor Guía

Msc. Wilson David Tapia López

Autor

Jonathan Baruc Moreno Reyes

Año

2018

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

"Declaro haber dirigido el trabajo, Implementación de un protocolo para la detección de Rabia parálitica en ganado reproductor bovino, a través de reuniones periódicas con el estudiante Jonathan Baruc Moreno Reyes, en el semestre 2018-1, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Wilson David Tapia López

Master en Gestión y Planificación Ambiental

CI: 1714205281

## **DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO**

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

---

Ana Dolores Garrido Haro  
Master en Biología Molecular  
CI: 1718496928

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR**

"Declaro haber revisado el trabajo, Implementación de un protocolo para la detección de Rabia parálitica en ganado reproductor bovino, a través de reuniones periódicas con el estudiante, Jonathan Baruc Moreno Reyes, en el semestre 2018-1, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Alina Aguirre Quevedo  
Doctorado en Ciencias Biológicas  
CI: 1756594600

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

---

Jonathan Baruc Moreno Reyes

CI: 1716562804

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios y a la vida por la oportunidad diaria que hasta ahora me permite respirar; a mi padre y madre por apoyarme incondicionalmente a pesar de mis errores continuos, a mi familia por el cariño infinito, a mis amigos por estar pendientes de mi avance y a cada persona que en mí sembró una enseñanza a lo largo de este pequeño camino.

## **DEDICATORIA**

A mi madre, quien con un simple gesto me aportó la fuerza necesaria para seguir; a mi padre porque sin él nada fuera lo mismo, a mis hermanos por estar ahí siempre sin dudarlo, a toda mi bella familia que cada momento me hizo sentir que nunca voy a estar solo.

## RESUMEN

La rabia paralítica bovina constituye un grave problema para el sector pecuario en el Ecuador, en especial para la ganadería bovina debido a las grandes pérdidas económicas que ocasiona así como también por el inminente peligro de transmisión para las personas que manejan hatos ganaderos. En el país no existe una metodología implementada para determinar mediante PCR la presencia del virus de la rabia bovina y únicamente se han reportado casos de esta enfermedad empleando inmunofluorescencia directa (IFD), inoculación en cultivos celulares y en ratones. La IFD posee algunas desventajas debido a que el marcaje de estructuras subcelulares se encuentra limitada a su uso en células fijadas ya que los anticuerpos no son capaces de atravesar las membranas íntegras de las células vivas. Además, puede ocurrir que las proteínas de interés queden unidas por enlaces cruzados a otras proteínas, lo que puede causar tanto falsos positivos, como falsos negativos. Para la implementación de la técnica de PCR se utilizaron controles positivos obtenidos en animales de experimentación (ratones), de los cuales se tomó el cerebro para la extracción del RNA mediante TRizol. Para la amplificación del gen central de la nucleoproteína N se realizó una PCR acoplada a transcripción inversa (RT-PCR) del ARN seguida de la amplificación del ADNc mediante PCR convencional. Se verificó la presencia del amplicon de interés mediante electroforesis y se analizó tanto la sensibilidad como la especificidad, así como se evaluaron las condiciones óptimas de reacción. El presente trabajo permite concluir que la PCR es una técnica molecular confiable, sensible y específica para la detección del virus rábico. Además, fue posible determinar que las mejores condiciones de reacción fueron 58°C para el anillado 1mM para MgCl<sub>2</sub> y 0.275 μM para la concentración de cebadores, así como una sensibilidad teórica para una concentración mínima de 1x10<sup>-2</sup> ng/μl. Los resultados obtenidos permiten disponer de un protocolo para la detección de este virus que posibilita el análisis de un gran número de muestras en menor tiempo y adicionalmente, el desarrollo de futuros estudios epidemiológicos que faciliten la identificación del origen geográfico de las cepas naturales.

## ABSTRACT

Paralytic bovine rabies is a serious problem for the livestock sector in Ecuador, especially for cattle farming due to the great economic losses it causes as well as the imminent danger of transmission for people who manage livestock herds. In the country there is no methodology implemented to determine the presence of bovine rabies virus by PCR and only cases of this disease have been reported using direct immunofluorescence (IFD), inoculation in cell cultures and in mice. DIF has some disadvantages because the labeling of subcellular structures is limited to its use in fixed cells since the antibodies are not able to cross the intact membranes of living cells. It can also happen that the proteins of interest are cross-linked to other proteins, which can cause both false positives and false negatives. For the implementation of the PCR technique, positive controls obtained in experimental animals (mice) were used, from which the brain was taken for the extraction of RNA by TRizol. For the amplification of the nucleoprotein N central gene, a PCR was carried out coupled to reverse transcription (RT-PCR) of the RNA followed by the amplification of the cDNA by conventional PCR. The presence of the amplicon of interest was verified by electrophoresis and the sensitivity and specificity were analyzed as well as the optimal reaction conditions were evaluated. The present work allows us to conclude that PCR is a reliable, sensitive and specific molecular technique for the detection of rabies virus. It was also possible to determine that the best reaction conditions were 58 ° C for 1mM banding for MgCl<sub>2</sub> and 0.275 μM for the primer concentration, as well as a theoretical sensitivity for a minimum concentration of 1x10<sup>-2</sup> ng / μl. The results obtained allow us to have a protocol for the detection of this virus that allows the analysis of a large number of samples in less time and additionally, the development of future epidemiological studies that facilitate the identification of the geographical origin of the natural strains.

# ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Planteamiento del problema .....	3
1.3 Objetivo General.....	6
1.4 Objetivos Específicos .....	6
1.5 Justificación de la investigación.....	6
2. Marco teórico .....	7
2.1 Historia .....	7
2.2.1 Taxonomía.....	8
2.2.2 Morfología.....	9
2.2.3 Composición Proteica .....	10
2.2.4 Genoma viral .....	14
2.2.5 Replicación viral.....	15
2.2.6 Propiedades físico-químicas .....	17
2.3 Transmisión.....	17
2.3.1 Hospederos.....	19
2.4 Epidemiología .....	20
2.5 Signos y síntomas clínicos en Bovinos .....	23
2.6 Diagnóstico .....	24
2.6.1 Técnicas Inmunológicas .....	24
2.6.2 Prueba Biológica.....	25
2.6.3 Aislamiento viral en cultivo celular .....	26
2.7 PCR.....	26
2.7.1 Fundamento de la técnica.....	26
2.7.2 RT-PCR.....	28
2.7.3 Ventajas del método de PCR.....	29
3. Diseño del plan experimental.....	31
4. Procedimientos.....	31

4.1 Población y muestra .....	31
4.2 Materiales y métodos para la obtención de datos.....	32
4.2.1 Obtención de controles positivos .....	32
4.2.2 Verificación de controles positivos por IFD .....	32
4.2.3 Extracción de ARN .....	33
4.2.4 Cuantificación del ARN .....	34
4.2.5 Cebadores .....	35
4.2.6 RT-PCR.....	35
4.2.7 PCR convencional .....	36
4.2.8 Estandarización de las condiciones de reacción .....	38
4.2.9 Análisis de sensibilidad.....	40
4.2.10 Especificidad del ensayo .....	40
4.2.11 Muestreo de validación del ensayo .....	41
5 Resultados y discusión .....	41
5.1 Verificación de controles positivos por IFD.....	41
5.2 Resultados de la extracción de ARN por el método de TRizol.....	42
5.3 Optimización de la temperatura de anillado de los cebadores .....	44
5.4 Optimización de la concentración de MgCl <sub>2</sub> .....	45
5.5 Optimización de la concentración de cebadores.....	47
5.6 Sensibilidad analítica de la PCR estandarizada.....	48
5.7 Especificidad de la PCR estandarizada .....	49
5.8 Muestreo de validación del ensayo .....	51
6. Conclusiones y Recomendaciones .....	54
6.1 Conclusiones.....	54
6.2 Recomendaciones .....	54
REFERENCIAS .....	55

## 1. Introducción

### 1.1 Antecedentes

Los estudios de interés en relación con la rabia parálitica en bovinos se iniciaron debido al gran número de pérdidas en el sector pecuario causadas por el virus, así como el peligro que representa para la salud pública. Se determinó que era de esencial importancia la caracterización molecular del virus comenzando por la implementación de la técnica de PCR para la amplificación del mismo. En algunos países, ya desde hace algunos años se han llevado a cabo estudios moleculares del virus con la finalidad de esclarecer su origen y la ubicación geográfica de los focos de infección.

En el año de 1991 el Instituto Pasteur de Francia toma en cuenta por primera vez la posibilidad de realizar una prueba de PCR para la detección e identificación de virus relacionados con la rabia debido a la variabilidad de serotipos existentes. Ese mismo año, se investigó este ensayo como un protocolo alternativo para el diagnóstico tomando en cuenta las regiones conservadas en el virus y sus variantes. Se desarrollaron cebadores que permitían amplificar la mayoría de genes de la nucleoproteína, además se determinó que para estudios epidemiológicos futuros sería necesario diseñar cebadores que flanqueen la región altamente evolutiva  $\Psi$  gen del virus. (Sacramento, 1991)

Unos años después se determinó que era de vital importancia no solo realizar la amplificación del gen de la nucleoproteína N sino también de la fosfoproteína debido a las variantes que se presentaban en la región de la nucleoproteína según el serotipo y cepa. Por esta razón y para asegurar la detección viral se desarrollaron dos pares de cebadores que amplifican las regiones anteriormente mencionadas con el fin de reducir resultados falsos negativos flanqueando regiones con diferencias oligonucleotides. (Wright, Rampersad, Ryan y Ammons, 2002)

Debido a la variabilidad de secuencias del virus en distintas locaciones geográficas, Heaton y colaboradores decidieron poner a punto un ensayo de PCR para detectar 6 genotipos del virus. Se lograron amplificar satisfactoriamente seis de los siete genotipos que fueron detectados por RT-PCR. El número total de ampliaciones por PCR fueron positivos confirmados, lo que demuestra la alta eficiencia y sensibilidad del método frente a otros. La comparación de sensibilidad de la prueba tradicional de marcaje con anticuerpos fluorescentes frente al ensayo molecular demostró que en muestras de tejido degradado infectado con el genotipo uno, el ARN viral no pudo ser detectado para tiempos de degradación mayores a 72 horas, mientras que la PCR detectó el virus en muestras con procesos de degradación mayores a 360 h (Heaton y Johnstone, 2000).

Con el transcurso del tiempo la técnica fue tomando fuerza con diferentes fines. En los años 90 hubo un brote del virus en humanos y la falta de un método de detección rápido y confiable fue evidente. Debido a esto fue necesario poner a punto una PCR a partir de muestras de saliva y líquido cerebroespinal lo que se logró con un protocolo optimizado de RT-PCR específico para este tipo de muestras. Este ensayo se hizo a partir de muestras clínicas de pacientes con sospechas de infección debido a los síntomas clínicos, se confirmó que el ensayo era eficiente y confiable ya que en los 9 pacientes en los cuales se comprobó la infección post mortem, se habían tenido resultados positivos tanto en las muestras de saliva con baja carga viral, así como en el líquido cerebroespinal (Crepin y Audry, 2001).

Se pudo también determinar que la PCR es tanto sensible como específica para la detección del virus y además de esto, cabe recalcar que se demostró que el ensayo tiene una relación directa con la concentración del virus infeccioso. Se estableció la capacidad del ensayo frente a las posibles variaciones del segmento diana y se determinó que la cantidad de desajustes entre oligonucleótidos de este segmento afecta significativamente a la amplificación ( $P < 0,001$ ). Se demostró a su vez que la heterogeneidad del gen diana es un factor

fundamental y puede considerarse un obstáculo para el diagnóstico de rabia por PCR (Hughes, Smith, Hanlon y Rupprecht, 2004).

Los estudios realizados acerca de metodologías de detección viral de alta eficiencia van en constante crecimiento por lo que en 2005 se hizo un contraste para la detección de corpúsculos de Negri comparando metodologías tradicionales como la inmunohistoquímica y la RT-PCR. La inmunohistoquímica resultó ser muy precisa, sin embargo, en algunos casos no detectó la presencia de rabia debido a que las inclusiones producidas por el virus en las células son raras y en pocas ocasiones se les puede observar. Esta es la razón por la cual se recomienda el uso de RT-PCR en muestras de las cuales se tiene sospecha de presencia de rabia y que presenten un resultado negativo en inmunohistoquímica. En este estudio se llegó a la conclusión de que la técnica molecular permite la determinación más precisa de la carga viral en el cerebro de los animales estudiados (Nuovo, De Faria y Chanona-Vilchi, 2005).

En el Ecuador no existen en la actualidad métodos moleculares como la PCR para la detección de la rabia y únicamente se realiza por métodos tradicionales como inmunohistoquímica, inmunofluorescencia directa e inoculación en ratones. Actualmente la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (Agrocalidad) busca optimizar la detección del virus por PCR con el objetivo de mejorar los controles zoonosarios a través de estudios epidemiológicos.

## **1.2 Planteamiento del problema**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la rabia se encuentra entre las enfermedades infecciosas de los animales con mayor impacto económico, ocupando el quinto lugar en el mundo. Es una enfermedad que afecta al sistema nervioso y sigue siendo la zoonosis más importante en el mundo debido a la mortalidad que genera. En el Ecuador y toda América Latina, causa grandes pérdidas económicas directas debido a la muerte del animal infectado que en el

caso de los bovinos se traduce en una disminución de la producción de leche y carne. Los productos producidos por animales con sospecha de infección no son comercializables lo que a su vez afecta la producción de otros subproductos de esta actividad pecuaria. Además de esto se generan constantemente gastos debido a los programas de control-prevención que emplean gran cantidad de insumos veterinarios.

Algunos ejemplos ponen de manifiesto el impacto económico de la rabia como es el caso del brote epizootico del virus en 1946 en el estado de Georgia (EE.UU.), en el que la muerte de los animales de granja ocasionó pérdidas económicas por un valor de \$ 138.678. Otro ejemplo que demuestra las millonarias pérdidas económicas que causa esta enfermedad zoonótico fue el brote en la República de Tartaristán en el período 1991-1995 el cual ocasionó pérdidas valoradas en 996 millones de dólares (Gulyukin, 2016).

En el Ecuador en la última década, los brotes del virus de rabia bovina han afectado a más de 12 provincias y tienen un promedio mensual no menor de 25 casos y han llegado a alcanzar los 150. En el país en los últimos años la rabia transmitida por los murciélagos hematófagos ha alcanzado niveles de incidencia preocupantes, principalmente en la región amazónica, debido a su ubicación geográfica. Otras provincias afectadas son Loja, Manabí, Tungurahua, El Oro, Esmeraldas, Guayas y Pichincha donde la prevalencia del virus va en aumento (Agrocalidad, 2016).

Referente a los humanos, debido al carácter zoonótico transmisible y de evolución aguda, constituye un problema potencial para las personas que manejan los hatos ganaderos. En el caso de una infección en humanos, una vez que los síntomas han aparecido en el paciente es muy difícil revertir la situación y en la mayoría de los casos causa la muerte. En el caso de una mordedura animal de peligro, la profilaxis en el país tiene gastos de relevancia para la salud pública los cuales alcanzan los 90 dólares debido al costo de las tres dosis de la vacuna, por lo que es necesario generar nuevas herramientas de control.

Uno de los principales problemas en el país es la falta de un método que permita el análisis de un gran número de muestras además de la necesidad de contar con un ensayo que permita iniciar el estudio epidemiológico del virus como podría ser la PCR. La carencia de estudios en el país acerca de métodos que permitan caracterizar el virus molecularmente y no solo detectar su presencia es de esencial importancia (Sumi et al., 2001). Los estudios epidemiológicos son de gran ayuda para generar programas de control zoonosario ya que los aislados de rabia del ganado pueden ser analizados y establecer la relación con los virus encontrados en las poblaciones de murciélagos hematófagos. Sin estos patrones epidemiológicos es difícil tratar de generar estrategias para controlar los focos de infección, así como directamente los principales reservorios ubicados geográficamente.

Las técnicas tradicionales para la detección del virus de la rabia son principalmente, la inmunofluorescencia directa (IFD) e inoculación del virus en ratones, si bien muestran en general ser bastante eficientes poseen algunos inconvenientes. Una de las desventajas de la IFD es que el marcaje es limitado debido a que los anticuerpos no logran atravesar la membrana celular íntegra de las células vivas por lo que su eficiencia para el marcaje de estructuras subcelulares se limita a células fijadas. Además, muchas veces puede ocurrir que las proteínas de interés se unan por enlaces cruzados a otras proteínas lo que puede generar falsos negativos, así como falsos positivos. Otra de las desventajas de la IFD es que cuando se hace el análisis de serotipos específicos como RRV o cuando se emplea en tejido cerebral en estado de descomposición puede presentar problemas de sensibilidad. Otra técnica utilizada es la prueba biológica o inoculación en ratones, esta no proporciona resultados rápidos (en relación con pruebas de inoculación celular *in-vitro*) y su costo es extremadamente alto cuando se emplean ratones libres de patógenos (SPF), además del peligro inminente por el manejo de animales infectados.

### 1.3 Objetivo General

- Implementar un protocolo basado en la reacción en cadena de la polimerasa para la detección del virus de la rabia parálitica bovina.

### 1.4 Objetivos Específicos

- Determinar las condiciones de temperatura,  $MgCl_2$  y cebadores óptimos para la reacción en cadena de la polimerasa para la detección del virus de rabia.
- Comprobar la especificidad y sensibilidad analítica de la técnica implementada en muestras de campo positivas.

### 1.5 Justificación de la investigación

La importancia del desarrollo de esta técnica radica en que la PCR es una prueba rápida, sensible y específica, que asegura resultados de alta fidelidad. Además, los procedimientos de diagnóstico estándar hacen muy difícil clasificar el genotipo del virus implicado, mientras que esta prueba posee ventajas como el hecho de que cuando está acoplada a la secuenciación puede derivar en genotipificación precisa e información epidemiológica. La información de genotipificación es de gran importancia ya que puede dictar el método de control a emplear en casos de brotes. Por otra parte, la PCR también permite reducir el consumo de insumos y el tiempo de detección. Los resultados negativos por IFD muchas veces son falsos negativos ya que este ensayo no logra detectar la presencia del virus cuando se encuentra en baja concentración. Este tipo de resultados requieren su confirmación con la prueba biológica de inoculación en ratones, la cual requiere 28 días para poder observar sintomatología y realizar una nueva IFD. Esto se traduce en nuevas pérdidas económicas debido al tiempo de diagnóstico antes de generar un control por vacunación al hato ganadero. Repetir la IFD genera aún más gastos debido a la necesidad de emplear un anticuerpo monoclonal marcado y demás reactivos que hacen de

esta, una técnica costosa. Por otra parte, la PCR permite procesar un gran número de muestras al mismo tiempo debido a la facilidad de manipulación de las mismas en relación con las técnicas tradicionales. Es importante destacar que existe una relación directa entre el rendimiento de un ensayo de detección y la concentración viral, factor al cual la PCR responde con alta eficiencia gracias a la elevada sensibilidad que posee. Finalmente, se ha demostrado que en muestras de tejido degradado las técnicas tradicionales no tienen buena respuesta mientras la PCR posee alta eficiencia de detección.

## **2. Marco teórico**

### **2.1 Historia**

El virus rábico se conoce desde la antigüedad, la palabra rabia se deriva de una raíz india “rabh”, que significa conducta violenta. Esta enfermedad se cree que puede ser más antigua inclusive que la raza humana. En la antigüedad se creía que las personas u otros mamíferos que la sufrían estaban bajo el efecto de fuerzas sobrenaturales. Los síntomas asociados a la infección como cambios de conducta, irritabilidad y otros, podían observarse con mayor frecuencia en las épocas de calor por lo que a estos lapsos de tiempo se los denominó “canicula” por la acción de la constelación Can Mayor sobre el sol y porque en la mayor parte de los casos, la enfermedad se presentaba en perros.

Las primeras descripciones de la enfermedad se encuentran en el código Eshuma, escrito en Babilonia en 1 930 a.C. También en los códigos de la antigua Mesopotamia hace 400 a.C, Aristóteles describió algunas de las características de la rabia en humanos y su estrecha relación con las mordeduras animales que presentaban los enfermos. Hipócrates (400 a.C), determinó que en las personas infectadas se presentaban síntomas generales como el delirio por beber agua, temblores ante ruidos menores, miedo generalizado, convulsiones y parálisis. Celso (100 a.C) describió los síntomas principales a profundidad y los posibles tratamientos a las heridas por “cauterización”.

Fracastoro en el siglo XVI, dictaminó que la rabia era una enfermedad que no podía ser transmitida por ninguna clase de contacto y únicamente era posible cuando la piel se encontrara expuesta. En 1881, Gruner propuso como sistema de diagnóstico de la enfermedad la inoculación de saliva de los animales con sospecha de infección en animales sanos. En 1885, Louis Pasteur consiguió obtener una vacuna antirrábica gracias a sus investigaciones sobre las vacunas preventivas por medio de inoculación de microbios de virulencia atenuada (López, 2009).

La llegada del virus al continente americano se cree que fue mucho antes de la colonización europea, esta afirmación se basa en las leyendas que se relataban en las poblaciones nativas del Norte del Pacífico. En México en 1703, Málaga Alba fue el primero en señalar la presencia de la enfermedad, mientras que en Perú los primeros datos fueron recogidos a partir de algunas obras literarias y científicas de Don Hipólito Unuáne que describió su presencia en los valles de la costa norte en 1803. Eduardo Liceaga que en 1887 ostentaba el cargo de presidente del Consejo de Salubridad de México, señaló a la rabia como un problema de salud pública de alto riesgo y desarrolló la vacuna a partir de las indicaciones personales de Pasteur. La primera Reunión de Directores de Programas Nacionales de Control de la Rabia se produjo en 1983 en la ciudad de Guayaquil, en la cual se discutieron temas como el desarrollo de un plan de acción para erradicar la rabia de las zonas urbanas debido a la cantidad de casos que se presentaban anualmente (Finnegan et al., 2002).

## **2.2 Etiología**

### **2.2.1 Taxonomía**

La rabia paralítica bovina es una infección viral aguda que se manifiesta a causa de una encefalomiелitis no supurativa. Es invariablemente fatal y principalmente transmitida por mordedura ya que el virus se encuentra en la saliva de los animales infectados. Afecta de manera directa al sistema nervioso central con síntomas en bovinos claramente ligados al comportamiento neurológico. La

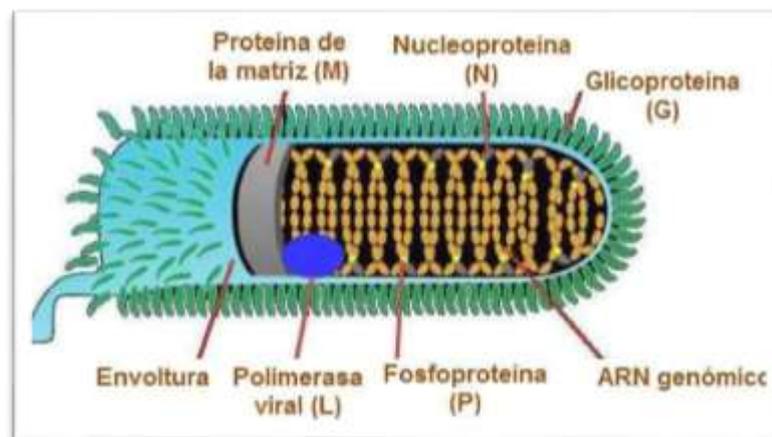
enfermedad se desarrolla en la mayoría de casos a causa del serotipo 1 de un *Lyssavirus* neurotrópico, siendo todos los animales de sangre caliente susceptibles de contagio. (Pabello, 2010)

El virus de la rabia pertenece al orden Mononegavirales, familia Rhabdoviridae, género *Lyssavirus*. Dentro de la familia Rhabdoviridae se encuentran al menos tres géneros de virus presentes en animales, *Lyssavirus*, *Vesiculovirus* y *Ephemerovirus*. En el género *Lyssavirus* en la actualidad se conocen doce serotipos que han sido reconocidos por el comité de taxonomía. Dentro de estos se encuentran, virus *Lagos bat* (LBV), virus clásico de la rabia (RABV), *Mokola virus* (MOKV), *Lisavirus* europeo murciélago tipo 1 (EBLV1), *Lisavirus* europeo murciélago tipo 2 (EBLV2), *Duvenhage virus* (DUVV), *Khujand virus* (KHUV), virus australiano (ABLV), *IrKut virus* (IRKV), *Aravan virus* (ARAV), virus murciélago caucásico oeste (WCBV) y *Shimoni virus* (SHIV). En los últimos años se han descrito tres tipos más del virus los cuales son, *Bokeloh virus* (BBLV), *Lisavirus* murciélago Lleida (LLEBV) e *Ikoma virus* (IKOV). A pesar de la gran cantidad de tipos del virus, y que todos ellos pueden causar la infección, la mayor parte de los casos que llegan a ser informados son causados por el virus clásico de la rabia (RABV), gracias a su amplia distribución mundial (MAGE, 2013).

### 2.2.2 Morfología

Los viriones están caracterizados por tener forma de bala con un extremo redondeado y otro aplanado con cuerpo cilíndrico, miden entre 60 y 80 nm de diámetro y entre 130 y 220 nm de largo además de estar constituidos en su superficie por peplómeros de 6 a 8 nm de largo. El material genético está constituido por ácido ribonucleico (ARN) de simple cadena con sentido negativo, con un peso molecular de  $3.5 \times 10^6$  daltons contenidos en una nucleocápside helicoidal. El ARN se encuentra rodeado por una envoltura que posee proyecciones superficiales fungiformes (Center for Disease Control and Prevention, 2017).

En general los *Rhabdovirus* están compuestos por dos estructuras fundamentales: un núcleo helicoidal formado por la ribonucleoproteína y una envoltura circundante. La envoltura del virus está constituida por capas de lípidos en los que se encuentra insertada la glicoproteína G que forma aproximadamente 400 puntas trimétricos utilizadas para iniciar la interacción con las células hospederas. Hacia el interior se encuentra la proteína de matriz M, que interviene en el ensamblaje del virus, seguida de la nucleocápside conformada por tres proteínas, la Nucleoproteína N, que actúa en la inmunidad celular y humoral, la proteína polimerasa L, implicada en la transcripción y replicación, y la fosfoproteína P, encargada de la encapsulación del ARN (Figura 1).



*Figura 1.* Composición molecular del virus de la rabia. Proteínas que conforman los viriones y su distribución.

Tomado de The Rabies Virus CDC, 2017.

### 2.2.3 Composición Proteica

#### Nucleoproteína N

La nucleoproteína N se encuentra ubicada dentro del genoma del virus entre las posiciones 52 a 1482 con un peso molecular de 1424 nucleótidos, y conforma aproximadamente el 90% de la nucleocápside (NC), aportando un promedio de 1750 moléculas a este complejo. Además, se encuentra asociada al ARN por medio del complejo NC que contiene y protege el material genético. Esta proteína

no se encuentra glicosilada a pesar de que posee segmentos altamente propensos a esta modificación, pero se encuentra fosforilada la serina en la posición 378. La actividad de esta proteína está directamente relacionada con la regulación del proceso transcripcional para la formación de los ARNm por medio de los cuales se realiza la síntesis de proteínas víricas. También se encarga de regular la replicación (clonación de virus) y conferir estabilidad estructural y funcional al ARN recién sintetizado protegiéndolo de enzimas que lo degradan.

La secuencia aminoacídica presenta pocas variaciones en relación con otras cepas y en comparación con la proteína G. Debido a su abundancia de producción y presencia en el sistema nervioso central y en los cultivos celulares, es considerada el antígeno contra el cual se desarrollan anticuerpos para emplearlos en métodos de detección como la inmunofluorescencia. Es también la proteína por medio de la cual se han logrado hacer clasificaciones según el serotipo. Mediante el desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos se han determinado tres sitios antigénicos sobre esta proteína empleando pruebas de competición entre los anticuerpos y la localización topográfica de los mismos, por medio de análisis inmunoquímico de fragmentos enzimáticos de la nucleoproteína N (Montano, 1996).

Es importante mencionar que esta proteína tiene fragmentos dentro de sus 1424 pares de base (pb) altamente conservados debido a que posee varios epítotos T y B que son comunes en varios serotipos. Se ha demostrado que la nucleoproteína N es un superantígeno (SAg) ya que logra desarrollar una potente estimulación inmunitaria por lo que es ampliamente utilizada para el desarrollo de vacunas. La capacidad de superantígeno consiste en la activación fuerte de los linfocitos de forma policlonal sin importar su especificidad.

### **Fosfoproteína P**

La fosfoproteína P se encuentra ubicada dentro del genoma del virus entre la posición 1485 y 2475 con una talla de 991 nucleótidos y también forma parte de la nucleocápside helicoidal. Esta proteína es un componente estructural

minúsculo del virión, cuyo aporte entre un 2 y 11 %. Sin embargo, la proteína se acumula en altas concentraciones en el citoplasma del huésped y está compuesta por aproximadamente 300 aminoácidos.

Con ayuda de anticuerpos monoclonales se han descrito los dos sitios antigénicos de la proteína. Al poseer características hidropáticas se convierte en la proteína más hidrofílica gracias a la gran cantidad de aminoácidos hidrofílicos en los primeros 2/3 de su estructura localizados hacia el extremo amino. La posición nucleotídica 1928 a 2025 es una de las regiones con mayor afinidad con el agua y particularmente, a su vez, posee gran cantidad de sitios de fosforilación en treonina y serina (Montano, 1996).

### **Proteína de la matriz M**

Es la proteína más pequeña de todas y se trata de una estructura muy básica no glicosilada de aproximadamente 200 aminoácidos (aa), su ubicación dentro del genoma va desde la posición 2481 a 3285. Dentro de su secuencia presenta un fragmento central con gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos, lo que explica que el virión tenga afinidad para adherirse a membranas. Además, y de gran importancia, al localizarse la proteína dentro de la envoltura lipídica, posee capacidad de interactuar con la bicapa lipídica y ribonucleoproteína (Sokol, Stancek y Koprowski, 1972).

Dentro del ciclo viral la proteína se ubica en el citoplasma y se ha demostrado que no se encuentra en exposición a la superficie debido a la alta interacción con la nucleocápside y su elevada resistencia al hidrólisis cuando se la expone a actividad enzimática proteolítica.

El modelo más aceptado de la distribución de las proteínas en el virión describe que esta proteína se encuentra formando parte de la membrana viral y es aprovechada para unir la nucleocápside y la envoltura del virus. Se ha descrito que una parte de la proteína logra bloquear la transcripción por lo que parecería, que esta se encuentra involucrada jugando un papel importante en la regulación

del ciclo de replicación. Esto se corrobora con el hecho de que en un experimento en el cual se micro inyectaron anticuerpos anti proteína M, las células demostraron un aumento en la producción del virus (Finke y Conzelmann, 2005).

### **Glicoproteína G**

Se encuentra dentro del genoma del virus desde la posición 3291 y se extiende hasta la 4964. Llamada también glicoproteína G, se encuentra formando las cerca de 400 espículas que caracterizan la envoltura de la familia Rhabdoviridae. Conforman aproximadamente 1/3 de la masa proteica del virión y se cree que, en promedio, la envoltura cuenta con 1200 proteínas G (400 trímeros) que salen a la superficie como trímeros.

Se trata de una proteína transmembrana que posee una secuencia de señal N-terminal. Está constituida por tres dominios: dominio transmembrana (25 aa), ectodominio (440 aa) y dominio citoplasmático (44 aa), el cual es indispensable para el ensamblaje normal de la proteína y su actividad inmunógena. Además, esta es la única proteína glicosilada, siendo los sitios potenciales para este proceso: asparagina-X-serina, N-acetilgalactosamina y asparagina-X-treonina

La proteína se adhiere a los receptores celulares resultando ser el blanco de los anticuerpos neutralizantes. La penetración del virus al citoplasma se da por un proceso de endocitosis y no a través de la membrana plasmática, esto debido a que los trímeros de la proteína G presentan cambios conformacionales a pH 6,1 dejando que una región hidrofóbica sea expuesta y se de la unión con la membrana lisosomal. Esta fusión de la envoltura viral y la membrana lisosomal tiene como consecuencia la inyección de la nucleocápside rábica en el citoplasma donde se dará la polimerización del ARN viral.

Se ha determinado que la proteína G posee aminoácidos que ciertamente tienen un papel fundamental en la virulencia. Es el caso de la arginina 333, que en algunas cepas mutantes se encuentra sustituida por glutamina, glicina o isoleucina, lo cual tiene un efecto negativo sobre la neurovirulencia. Se ha

observado que este tipo de cepas no tienen la capacidad de infección en ratones adultos, pero ratones de corta edad, inmunodeprimidos y deficientes de linfocitos T, podrían desarrollar la enfermedad, lo que parece afirmar que la mutación en la posición 333 y pérdida de virulencia, están relacionadas con la capacidad de estos a inmunosuprimir sus hospederos (Montano, 1996).

Es importante mencionar a su vez, que la inmunogenicidad de la glicoproteína depende directamente de su conformación tridimensional ya que al fragmentar la proteína en péptidos más pequeños, los mismos resultan ser claramente menos inmunógenos. Esto se evidencia también en el hecho de que las proteínas G solubles secretadas por células infectadas al carecer de los últimos 58 aa de la porción COOH-terminal no logran inducir ninguna protección a pesar de ser reconocidas por los anticuerpos monoclonales dirigidos a diferentes epítopos de la proteína. (Sokol, Stancek y Koprowski, 1972).

### **Polimerasa viral L**

Denominada L por *large* (del inglés grande) debido a su peso molecular de 240 kD, se ubica dentro del genoma viral entre las posiciones 5388 y 11683. Posee múltiples funciones enzimáticas y está estrechamente relacionada con la proteína P con la cual constituye la ARN polimerasa. El gen que la codifica representa aproximadamente el 60% del genoma y es el que se encuentra más conservado entre las cepas del virus, permitiendo la comparación entre las proteínas de más de 100 virus de ARN monocatenario de polaridad negativa. Esta región conservada parece resultar de la necesidad evolutiva de mantener funciones enzimáticas vitales (Sokol, Stancek y Koprowski, 1972).

### **2.2.4 Genoma viral**

El virus guarda su información genética en un total de 11 932 nucleótidos que en su mayoría contienen la información para codificar las 5 proteínas que constituyen el virión y se distribuyen en sentido 3'-5' secuencialmente N-P-M-G-L. Un factor a destacar y que llama mucho la atención es la existencia de un

intergen de 423 nucleótidos entre los cistrones de las proteínas G y L (Figura 2). La región fue denominada por algunos autores como  $\Psi$  ya que esta es hipervariable y no tiene actividad conocida. Esta región posee una señal para detener la transcripción y su actividad varía entre cepas, por ejemplo, la maquinaria de transcripción puede ignorar la señal de parada en el gen G hasta reconocer la señal ubicada en  $\Psi$ , produciendo un mRNA largo G- $\Psi$ . Este fenómeno ocurre en cepas como *IrKut* virus (IRKV), mientras que en otras puede ocurrir que coexistan las dos formas de replicación mRNA G y mRNA G- $\Psi$ . Es importante mencionar este aspecto, debido a que se cree que este es un mecanismo de regulación sobre las tasas de transcripción del gen distal L (polimerasa), que en consecuencia tiene un efecto directo sobre la expresión del genoma y la replicación vírica (Allendorf, 2012).

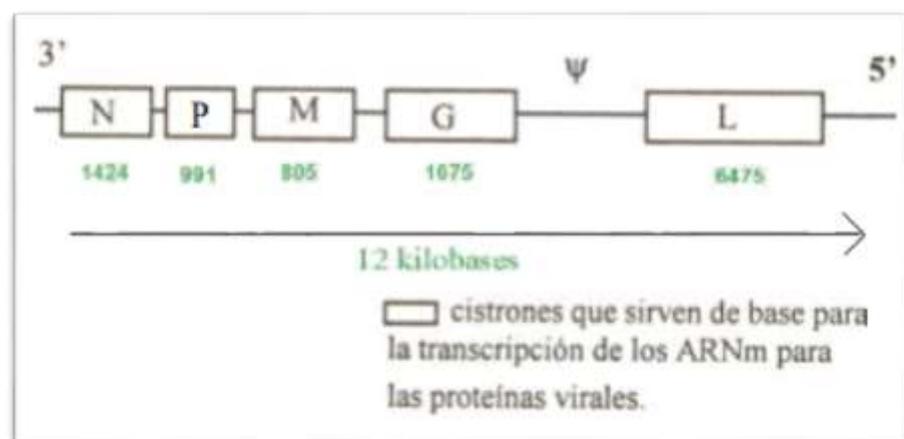


Figura 2. Estructura, ubicación y peso molecular de los genes del virus de la rabia.

Tomado de Montano, 1996, p. 68.

### 2.2.5 Replicación viral

La replicación del virus es un proceso complejo que sigue siendo estudiado. Este proceso comienza con la adsorción del virus mediante la fusión con la membrana de la célula huésped por la afinidad de la proteína G con los receptores específicos de la superficie.

Después de la adsorción, mediante pinocitosis el virus logra entrar a través de fosas recubiertas de clatrina desde la membrana hacia el citoplasma. Las partículas virales son agregadas en las grandes vesículas citoplasmáticas (endosomas), donde las membranas del virus y del endosoma se funden generando la liberación de la ribonucleoproteína (RPN) en el citoplasma. Al tener el virus rábico ARN lineal negativo, como todos los virus de la familia Lyssavirus, es necesario que se dé un proceso de transcripción para que el virus pueda replicarse y provocar su buscada actividad infectiva.

Para la transcripción del ARN monocatenario de polaridad negativa hacia ARNm y ARN líder es necesaria la actividad de la polimerasa codificada por el gen L del virus. Por tanto, la traducción a partir de este ARNm que dará lugar a las proteínas víricas N, P, M, G y L será llevada a cabo en los ribosomas que se encuentran libres en el citoplasma y que han sido reiniciados con la nueva información de producción proteica. A pesar de que la proteína G en una primera fase es producida en estos ribosomas, la finalización de su síntesis y glicosilación es llevada a cabo específicamente en el aparato de Golgi y en el retículo endoplasmático.

El ARN líder que contiene el gen que codifica para la síntesis de la proteína N, y su presencia en el citoplasma es fundamental, debido a su actividad reguladora en la transcripción y la replicación. Cuando este interruptor se encuentra en funcionamiento se da lugar la replicación viral donde se originan hebras positivas (complementarias) del virus. Si se pone en funcionamiento la transcripción, la producción masiva de copias es posible debido a que este sistema se convierte en un proceso imparable el cual ignora por completo los codones de parada. Este proceso comienza por el ingreso de la polimerasa en el extremo 3' único de reconocimiento por la misma, donde procede a iniciar la síntesis de copias de longitud completa de todo el genoma. Las nuevas hebras positivas de ARN servirán como molde para la síntesis de cadenas negativas de longitud completa (Finke y Conzelmann, 2005).

En el proceso de ensamblaje de los nuevos viriones, el complejo conformado por N, P y L, encapsula el ARN de cadena negativa formando el núcleo RPN (ribonucleoproteína). La proteína M se encarga de formar una cápsula inmediatamente alrededor de RPN para su protección. Este nuevo complejo NPL-M aún no está completo por lo que viaja a una zona de la membrana plasmática donde se encuentran insertos de glicoproteína los cuales comienzan a unirse al complejo y a los nuevos brotes víricos terminados presentes en la membrana.

### **2.2.6 Propiedades físico-químicas**

Los viriones resultan ser muy sensibles y propensos a degradación frente a factores como: luz ultravioleta, desecación, solventes orgánicos, álcalis y ácidos fuertes, solventes de lípidos, calor, tripsina y detergentes catiónicos. Compuestos como el formol y el fenol logran inactivar al virus, pero mantienen las propiedades antigénicas del mismo por lo que por este proceso es posible generar vacunas. La conservación del virus es buena a 4 °C por algunos días y puede mantenerse a -70 °C por mucho tiempo. Suelen ser bastante estables a pH entre 5 y 10 y se inactivan a pH muy ácido (menor a 3), o muy alcalino (superior a 11), además poseen un coeficiente de sedimentación de 600 U Sdverberg (Wiktor et al., 1977)

### **2.3 Transmisión**

En bovinos generalmente la enfermedad es transmitida a causa de las mordeduras o arañazos producidas por los murciélagos hematófagos pertenecientes a la subfamilia *Desmodinae*, La transmisión por mordedura es posible debido a la elevada concentración del virus en las glándulas salivales y casi en el 99% de los casos, este es la vía de infección. Asia y África son los continentes que tienen mayor incidencia de la enfermedad debido a su población de murciélagos y a su poco control. En América continúan siendo los murciélagos

los reservorios del virus ya que la mordedura por perros rabiosos se ha eliminado casi por completo (García, 1996).

La transmisión entre animales carnívoros generalmente es por mordedura, pero en el caso de bovinos la infección puede darse por exposición sin mordedura, a partir de fluidos como la saliva que entra en contacto directo en los ojos, boca, nariz o alguna herida del animal sano.

Otro método de transmisión por exposición sin mordedura es la inhalación del virus en forma de aerosol, la cual es menos probable porque estos fenómenos son menos eventuales en condiciones de campo. Este tipo de transmisión se ha probado experimentalmente en conejos, terneras y cuyes por inhalación, y en ratas, hámsters, murciélagos y ratones por vía de instilación nasal. En algunas cuevas de Texas donde habitan murciélagos hematófagos, se ha demostrado que la infección por aerosoles es posible. Al ingresar zorros y coyotes dentro de jaulas sin posibilidad de mordedura, los animales enfermaron únicamente debido a la producción de aerosoles (Hernandez, 2000).

La capacidad de infección varía entre diferentes cepas ya que se ha observado que algunas tienen la capacidad de infectar por vía oral mientras otras no, y existen otros factores involucrados en la efectividad de la infección como la edad del animal y su estado inmunológico. La cepa CVS tiene gran eficiencia de infectividad vía oral y se cree que la infección se puede dar a través de las papilas gustativas, y la mucosa nasal pudiendo en algunos casos resistir el pH del tracto intestinal por lo que la infección posiblemente puede darse también por esta vía.

Algunos animales alimentados con balanceado que contenía virus desarrollaron anticuerpos, pero ninguno enfermó, lo que demuestra la respuesta del sistema inmunológico contra el virus y la capacidad de infección del mismo a través del sistema digestivo del animal. También se ha observado que en animales carnívoros que han consumido carne fresca contaminada de sus presas llegan a desarrollar la enfermedad (García, 1996).

La infección a los fetos es posible a través de la placenta, en el caso de que las madres hayan muerto por el virus días antes del parto o ese mismo día. Además, es poco probable la transmisión a los fetos si los mismos nacieron al menos 15 días antes de la aparición de los síntomas, y la transmisión es posible en algunos casos, si los signos han aparecido durante la gestación. Actualmente se ha determinado que la infección trasplacentaria es un tema difícil de dilucidar debido a que están involucrados gran cantidad de factores como estado de gestación, inmunidad materna, tipo de cepa, etc.

Las condiciones básicas para que la transmisión sea posible son:

- Contacto directo entre el huésped susceptible y el virus intacto.
- El patógeno debe alcanzar las terminaciones nerviosas y penetrar las uniones del huésped. Por tanto, es necesario que exista penetración de la piel y contacto con tejido subcutáneo.
- El virus necesita ser depositado en membranas mucosas permeables altamente inervadas.
- Contacto eficiente, virus-abrasiones de piel, mordedura o contacto con mucosas (Hernandez, 2000).

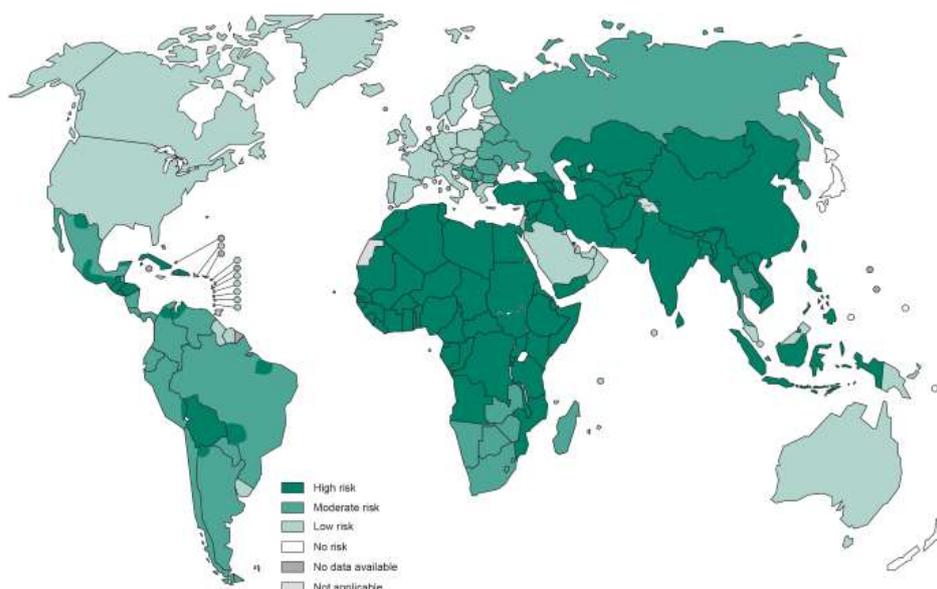
### 2.3.1 Hospederos

La rabia puede desarrollarse en todas las especies de sangre caliente, pero solo algunas de estas son reservorios relevantes del virus, siendo el murciélago hematófago el más importante. Las principales especies de murciélagos que transmiten la enfermedad al ganado son: *Desmodus murinus* y *Desmodus rotundus rotundus* al ser las más abundantes. Otras especies de murciélagos hematófagos como *Diphylla centralis* tienen un porcentaje menor de transmisión al ganado, y en el caso de *Diæmus youngi*, la transmisión suele ser muy escasa. Los reportes indican que al menos cada murciélago muerde un animal por día, siendo los bovinos con mayor actividad menos propensos a la mordedura que aquellos con actitud sosegada (Agrocalidad, 2016).

Los transmisores considerados de mayor importancia por su frecuencia de infección son también los zorrillos, lobos, zorros, coyotes, ardillas, mangostas y casi cualquier animal silvestre. Los vectores cambian según la ubicación geográfica y el control epidemiológico que se les proporcionen Oriente Medio, África y Asia, el perro es uno de los transmisores más importantes en cuanto a rabia urbana, en Europa occidental, Canadá y algunas regiones de Estados Unidos los zorros constituyen el problema, en Ontario del este y otras zonas de Canadá los mapaches, mientras que en Sudáfrica la preocupación son las mangostas. Los murciélagos siguen siendo a nivel mundial el transmisor principal y representan un problema actual en Sudamérica y Asia suroriental, al ser casi el único transmisor. Otras especies como los marsupiales son significativamente mucho menos susceptibles a contraer la enfermedad en comparación con los mamíferos placentarios (Giron, 2001).

## **2.4 Epidemiología**

El virus de la rabia está presente en todas partes del mundo a excepción de la Antártida y la mayoría de países de Oceanía (Figura 3), siendo especialmente elevada su presencia en Asia y África. Según la ubicación geográfica existen variantes virales que pueden infectar a diferentes huéspedes, proceso que estaría definido por un único aminoácido en la posición 183 en el ectodominio del gen G. Esto radica en que existe una baja tasa de mutación no sinónima en aislados naturales, ya que es necesaria la replicación del virus en varios tipos de células dentro del huésped, lo que facilita la transmisión a nuevas especies (Holmes, 2002).



*Figura 3.* Distribución virus Rábico a nivel mundial. Países con alto, medio, bajo y riesgo inexistente.

Tomado de Rinsho, 2005.

En África debido a su difícil realidad socioeconómica los perros siguen siendo huéspedes principales del virus, aunque también se documenta continuamente rabia silvestre a través de todo el continente. Existen evidencias de que existe circulación del virus de la rabia en poblaciones carnívoras, pero únicamente en África meridional y especialmente en canidos salvajes. Los miembros de la familia *Herpestidae*, como la mangosta, son responsables de transmitir variantes del virus a lo largo de África del sur (World Health Organization, 2016).

En Asia continental y sus estepas, el virus de la rabia se mantiene en canidos salvajes particularmente en zorros, en el oriente extremo ruso el principal transmisor es el mapache mientras que en el sur de China el tejón se ha asociado como el principal foco de infección para la transmisión de rabia a humanos. La rabia en lobos está presente en la Franja de Gaza, Jordania, Israel y en Turquía, donde los casos en ganado bovino en su mayoría son causados por zorros rabiosos.

En Europa, así como en América del Norte se ha erradicado desde inicios del siglo XX la rabia canina por lo que la rabia silvestre comenzó a emerger. A diferencia de otras regiones del mundo, en las cuales la rabia puede estar presente en distintas especies, en estas zonas geográficas se involucra un ciclo mediado por huéspedes primarios como mapaches y zorros, los mismos que propiciaron la propagación del virus por todos los territorios en pocas décadas. Un aspecto importante a destacar, es que en cada especie silvestre predomina una variante específica del virus adaptada a esta, sin embargo, las variantes encontradas en los huéspedes primarios como murciélagos pueden infectar a cualquier especie (Rinsho, 2005).

En América del Sur se han determinado especies de monos como *Callithrix* spp. y algunos carnívoros como principales reservorios del virus, pero los problemas primordiales siguen siendo los murciélagos. Los *Lyssavirus* se han detectado en murciélagos en cualquier parte del mundo, sin embargo, especies como *Lyssavirus mokola* y *Lyssavirus iksa* no han sido encontradas en murciélagos lo que sugiere que estas especies no deben estar adaptadas a este huésped debido a factores como tamaño pequeño, tasa de crecimiento, variedad de nichos ecológicos y baja población intrínseca. En consecuencia, los *Lyssavirus* adaptados a este huésped no pueden ser transmitidos a todos los animales carnívoros, debido a factores adaptativos pero si son susceptibles a la transmisión, el resto de especies de herbívoros como animales de granja (Rinsho, 2005).

En el Ecuador, el virus rábico está ubicado principalmente en la región amazónica debido a que en la misma se encuentra la mayor población de murciélagos hematófagos. Se cree que a partir de un serotipo naciente en esta región la rabia ha llegado a provincias como Loja, Manabí, Tungurahua, El Oro, Esmeraldas y Guayas. La incidencia de la enfermedad en ganado es mayor en la región Amazónica y Litoral por sus condiciones ambientales como humedad relativa y temperatura, pero en el último año se ha visto que el virus ha llegado

a infectar gran cantidad de animales, en la mayoría de provincias de la Sierra indicando una evolución rápida (Agrocalidad, 2016).

## **2.5 Signos y síntomas clínicos en Bovinos**

Los síntomas de la rabia en el ganado bovino y sus manifestaciones están directamente asociados a la concentración viral presente periodo de incubación, definido como el tiempo que transcurre entre el establecimiento de la infección viral y su primera manifestación, está determinado por algunos factores como el tiempo entre la penetración viral y la invasión del Sistema Nervioso Central (SNC). La dosis con la que se infecta el animal, determinada por el estado de la enfermedad en el hospedero determinará el tiempo de vida del animal (INIFAP, 2017).

En la mayoría de los casos, la infección no muestra ninguna reacción inflamatoria en el sitio de transmisión. Una vez establecido el virus en el SNC causa una rápida degeneración neuronal, seguida de una muerte rápida sin observarse a nivel cerebral ningún cambio morfológico significativo. Sin embargo, en algunos casos es posible que se presente una hidrocefalia y se note un abundante aumento de la cavidad craneana.

En bovinos el virus tiene una media de incubación entre 15 días y 2 meses. Los síntomas que presenta el animal son muy variables pero los más predominantes son pupilas dilatadas, pelo erizado, somnolencia y depresión. Otro síntoma importante presente en la mayoría de casos es la sialorrea, también llamada ptialismo en la cual se produce una cantidad exorbitante de saliva a causa de la parálisis faríngea. Es posible también que se presenten contracciones tónico-clónicas del cuello, cola, tronco y extremidades, dificultad para deglutir y rumiar, además de estreñimiento y catarro continuo e incesante. Mientras la enfermedad avanza entre el día dos y tres aparecen síntomas paralíticos manifestados en la cabeza, cuello y extremidades posteriores. En este punto los animales pierden casi por completo su actividad motora y la emaciación o adelgazamiento

patológico es notable. Por otra parte, el morro se viste de una baba espumosa y amarillina y los animales finalmente se postran hasta su muerte a causa de un paro cardiorrespiratorio al colapsar su sistema nervioso. La enfermedad tendrá un tiempo de permanencia máximo de diez días a partir del origen sintomatológico (Bonavitta, 2007).

## **2.6 Diagnóstico**

### **2.6.1 Técnicas Inmunológicas**

#### **Inmunofluorescencia directa**

Esta prueba es una de las más utilizadas en el diagnóstico de rabia, y está validada por su alta fiabilidad por la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). Consiste en el inmunomarcaje por medio de anticuerpos unidos por afinidad química a un fluoróforo: el isotiocianato de fluoresceína (FITC), que permitirá la visualización de la molécula blanco. Esta técnica aprovecha la capacidad de los anticuerpos para adherirse a la nucleoproteína N que es la más abundante en el virus. El complejo anticuerpo- fluoróforo se hace reaccionar con la muestra biológica, la cual será posteriormente expuesta a una fuente de luz de onda corta. Esta luz genera fluorescencia en la molécula marcadora.

Algunos factores como la calidad de la muestra, grado de autólisis, cepa vírica y eficiencia del personal que desarrolla el ensayo, determinarán el grado de sensibilidad de la IFD. Se debe tomar en cuenta que en animales que fueron vacunados contra el virus, la sensibilidad de la técnica es más baja debido a que el antígeno únicamente puede observarse en el tallo cerebral. El procedimiento general de la IFD consiste en la fijación de tejido cerebral en un objeto con la ayuda de acetona fría y la tinción de la muestra con el conjugado específico (Burtis, 2008).

### **Pruebas Inmunoquímicas**

El anticuerpo puede encontrarse asociado a una enzima peroxidasa a diferencia de un fluoróforo como en la IFD. Este complejo anticuerpo-enzima a pesar de tener la misma sensibilidad que la IFD, puede generar en algunos casos falsos positivos inespecíficos. Es importante mencionar que este ensayo posee un paso más de incubación en comparación con la IFD. El conjugado con peroxidasa también es usado para pruebas inmunohistoquímicas en cortes finos de tejido previamente fijados con formalina (Pascacio, 2007).

#### **2.6.2 Prueba Biológica**

Se conoce también como inoculación en ratones y consiste en la infección via intracerebral de cinco a diez ratones de 3-4 semanas (edad adulta) con un peso entre 12 y 14 g. En la mayoría de los casos se utilizan ratones libres de patógenos (SPF), aunque esto aumenta significativamente los costos del ensayo. El inóculo es tomado a partir de una muestra de asta de Ammon, cerebelo, médula oblonga o córtex, de un animal infectado. La muestra es macerada y centrifugada en una solución isotónica tamponada y antibióticos para evitar que la muerte del animal sea por infección bacteriana. El inóculo es el sobrenadante clarificado resultante y los ratones así infectados se observan durante 28 días.

Esta prueba *in-vivo* es cara y debe evitarse cuando sea posible ya que proporciona resultados a largo plazo (en relación con pruebas de inoculación *in-vitro*). A pesar de esto cuando la prueba resulta ser positiva se puede obtener gran cantidad de virus aislados que permitirán la identificación de la cepa. Otra ventaja de este ensayo es su baja demanda tecnológica ya que puede usarse con facilidad en situaciones en las que no se dispone de la infraestructura requerida (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2004).

### **2.6.3 Aislamiento viral en cultivo celular**

En el diagnóstico diario del virus rábico son utilizadas algunas líneas celulares de neuroblastoma, como la CCL- 131. Las células son cultivadas en la mayoría de casos en medio DMEM con un 5% de suero fetal bovino, además de ser incubadas a 36°C en presencia de dióxido de carbono. Otra línea celular empleada es la BHK-21, la cual es adecuada para aislamientos de cepas de rabia sin pasos previos de adaptación, pero para su uso es necesario evaluar la susceptibilidad celular a variantes predominantes del virus. Los resultados mediante estos métodos se obtienen tras 18 horas como mínimo, debido a que este es el tiempo necesario para la replicación del virus. En la mayoría de casos, la incubación se prolonga hasta 48 horas y puede extenderse hasta 4 días. Estas pruebas llegan a ser igual de sensibles que la inoculación en ratones por lo que sí existe una unidad de cultivos celulares, este ensayo debería sustituir la prueba biológica ya que evita el uso de animales vivos, además de tener menor costo (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2004).

## **2.7 PCR**

### **2.7.1 Fundamento de la técnica**

La reacción en cadena de la polimerasa o por sus siglas en inglés PCR, es una técnica molecular usada para la amplificación de uno o varios fragmentos de ADN generando miles o millones de copias de esta secuencia específica. La técnica posee grandes ventajas ya que puede amplificar estos fragmentos a partir de pequeñas cantidades de ADN e incluso funciona cuando el material genético de origen tiene calidad relativamente baja. El principio de esta es simple: una molécula de ADN es usada como molde para producir dos copias, luego cuatro, luego ocho con una duplicación continua a través de la actividad enzimática de una polimerasa. Esta enzima tiene la capacidad de encadenar bloques de construcción individuales para formar largas hebras de ADN. Los bloques de construcción que deben ser suministrados, son los que conforman el

ADN, es decir, las bases nitrogenadas timina (T), guanina (G), adenina (A) y citosina (C) (Sambrook & Russel, 2001). También es necesario suministrar a la reacción un fragmento pequeño de ADN conocido como primer o cebador, el mismo que servirá para flanquear el segmento de ADN a amplificar además de ser el sitio de unión de las bases nitrogenadas. Los componentes fundamentales de la PCR son:

1. **ADN origen:** ADN bicatenario de interés, extraído de la muestra.
2. **Agua grado PCR:** Medio de reacción.
3. **Buffer PCR:** Controla las condiciones óptimas de pH requeridas durante la reacción.
4. **dNTPs:** bloques de construcción de nuevas cadenas, unidades individuales de las bases G, C, A y T.
5. **MgCl<sub>2</sub>:** Trabaja como cofactor enzimático suministrando los cationes divalentes de Mg<sup>+2</sup>.
6. **Cebadores:** secuencias cortas de ADN monocatenario que son complementarias a las cadenas antisentido y sentido de los extremos 3' y 5'. Delimitan el fragmento de ADN a ser amplificado.
7. **ADN polimerasa:** enzima polimerasa con propiedades termoestables por lo que no se desnaturaliza rápidamente a altas temperaturas. Tiene una temperatura óptima de funcionamiento de 70°C.

### Procedimiento de PCR

Una vez ensamblada la reacción con todos sus componentes la mezcla es expuesta a tres reacciones cíclicas (Figura 4) durante las cuales se irá amplificando continuamente el segmento requerido.

1. **Desnaturalización del ADN:** La mezcla se calienta hasta los 95°C por 45 segundos causando que el ADN de doble cadena se desnaturalice y se abra en dos cadenas simples por la ruptura de los enlaces de hidrógeno.
2. **Anillamiento:** la temperatura baja rápidamente a un rango entre los 52 y 64°C por 45 s, donde la reducción de temperatura permite que los

cebadores se adhieran a sus secuencias complementarias dentro del ADN origen.

3. **Extensión:** también llamado elongación se produce a una temperatura de 72°C y tiene una duración de 60 s, periodo que es variable según la longitud del fragmento a amplificar. En esta etapa la enzima comienza a adherirse a ambos cebadores secuencialmente y de manera complementaria al ADN origen, se van incorporando las bases nitrogenadas extendiendo la secuencia de ADN en la dirección 5' a 3'. Si las condiciones son favorables para la encima esta puede añadir aproximadamente 1000 pb / minuto (James, Baker, Levine y Stephen, 2013).

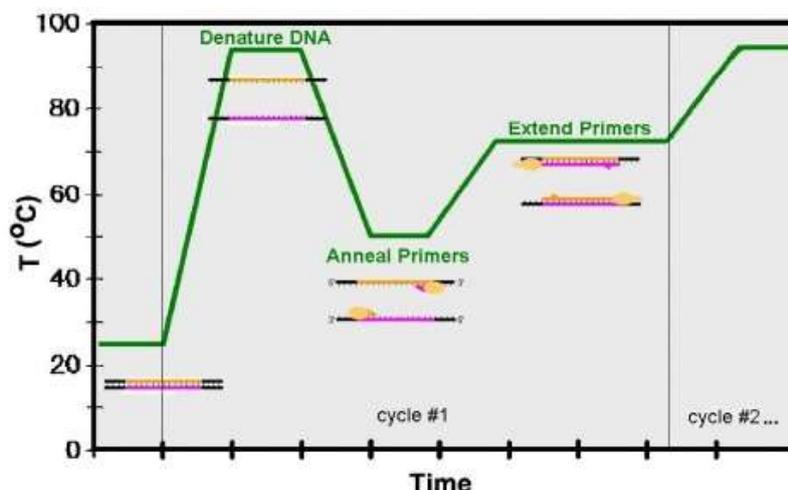


Figura 4. Etapas de la reacción de PCR

Tomado de Strachan y Read, 1999.

### 2.7.2 RT-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa es una variante de la PCR convencional. Esta técnica es utilizada para la detección cualitativa de la expresión génica por medio de la creación de transcritos de ADN complementario (ADNc) formados a partir de ARN. El proceso se da por la transcripción inversa del ARN blanco en ADNc mediada por una enzima de

actividad inversa. El producto de esta reacción será amplificado mediante una PCR convencional.

Para el desarrollo de esta técnica es necesario combinar el ARN extraído, que servirá de plantilla, con los bloques de construcción de las nuevas cadenas (dNTPs), un primer o cebador sentido o antisentido según las características del ADN ya sea este monocatenario de hebra positiva o negativa, agua libre de nucleasas como medio de reacción, Buffer RT específico para mantener el pH de trabajo de la enzima, RNAsin o Inhibidor de RNAsas para impedir la degradación enzimática del ARN, y finalmente enzima transcriptasa inversa (Sambrook & Russel, 2001).

La reacción es expuesta a un programa controlado de temperaturas el cual está compuesto por una etapa de reconocimiento en la cual en primer sentido se alinea con la cadena molde en la región de complementariedad. La siguiente etapa es la extensión, donde comienza la adición de los dNTPs, y finalmente la fase de inactivación de la transcriptasa inversa. Una vez finalizado el tiempo de termociclaje el producto de la RT PCR que es el ADNc es utilizado como molde o ADN origen para la PCR convencional.

### **2.7.3 Ventajas del método de PCR**

La técnica presenta grandes ventajas frente a otros métodos de detección de patógenos debido a que esta trabaja a nivel molecular. Entre las principales ventajas se encuentran:

- a. Sensibilidad:** la PCR tiene la capacidad de amplificar secuencias génicas a partir de cantidades ínfimas de material genético. Su elevada sensibilidad le permite amplificar secuencias del ADN diana incluso a partir de una única célula por lo que se ha convertido en una herramienta de grandes aplicaciones en ciencias forenses, diagnóstico molecular y estudios paleontológicos, donde el ADN suele estar presente en

concentraciones muy bajas. Esta sensibilidad debe ser manejada con precaución debido a la elevada probabilidad de contaminación.

- b. Rapidez y facilidad de uso:** este ensayo permite amplificar ADN en pocas horas mediante el uso de equipos poco sofisticados. Una reacción de PCR demora en promedio dos horas en comparación con otros métodos de diagnóstico del virus de la rabia que pueden durar semanas. El diseño y síntesis de cebadores puede ser una tarea complicada ya que debe ser minuciosamente evaluada *in silico* para lo cual existen programas bioinformáticos. A pesar de esto una vez que la PCR ha sido estandarizada y puesta a punto, la reacción puede ser repetida de forma rápida y sencilla.
  
- c. Robustez:** la PCR permite la clonación de las secuencias diana a partir de ADN muy degradado, o a partir de una muestra con gran cantidad de compuestos orgánicos. Otra gran ventaja es que la técnica puede ser acoplada para su uso en muestras altamente degradadas, o para tejidos de muestras previamente fijadas en formol, lo que representa una gran ventaja en patología molecular (Strachan & Read, 1999)

### 3. Diseño del plan experimental

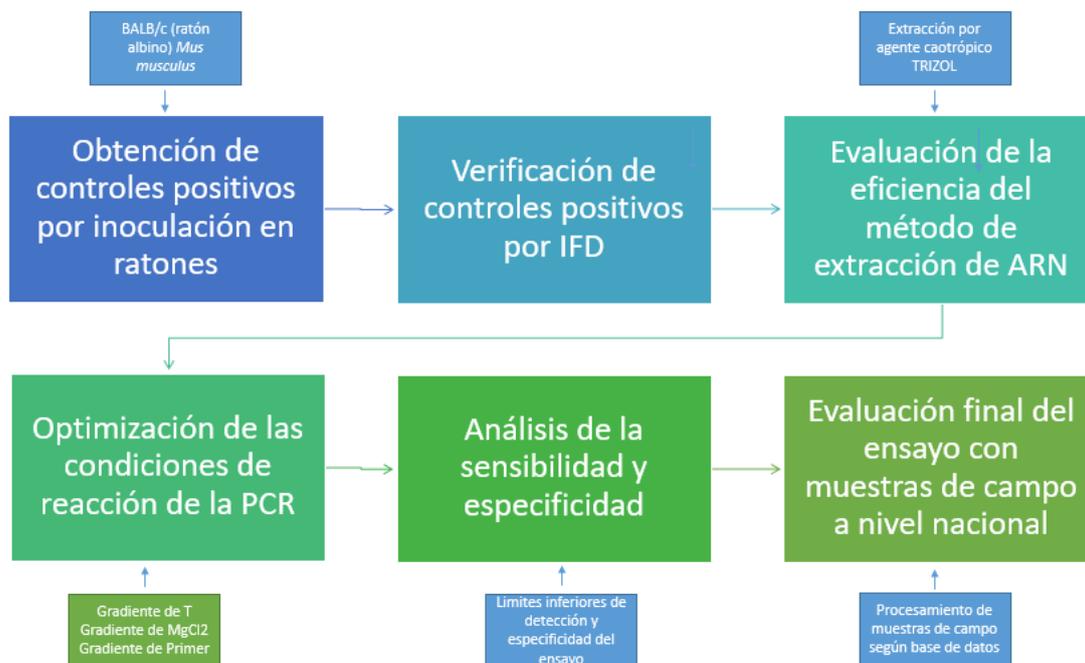


Figura 5. Diseño del plan experimental para la estandarización de la PCR en rabia virus.

## 4. Procedimientos

### 4.1 Población y muestra

Se trabajó con 60 muestras colectadas a nivel nacional de masa blanca cerebral, Asta de Ammón, tallo encefálico, así como también parte del cerebro y cerebelo bovino. Las mismas se recibieron, preservadas por congelación en condiciones óptimas para ser procesadas en el laboratorio de Biología molecular de Agrocalidad.

En su mayoría las muestras provinieron de hatos ganaderos ubicados en la región amazónica debido a la prevalencia de casos, factor relacionado con su ubicación geográfica y a sus condiciones climáticas. Además, se recibieron muestras para análisis de las provincias de Loja, Manabí, Tungurahua, El Oro,

Esmeraldas, Guayas y Pichincha donde se han presentado casos en el último año.

## **4.2 Materiales y métodos para la obtención de datos**

### **4.2.1 Obtención de controles positivos**

Los controles positivos se obtuvieron por prueba biológica. Los ratones (*Mus musculus*) utilizados para la obtención de controles positivos fueron de la cepa BALB/c (ratón albino) en edad adulta. La muestra que se inoculó fue obtenida a partir de 1-2 g de tejido cerebral verificado positivo por inmunofluorescencia directa. El tejido se maceró en mortero hasta conseguir una consistencia pastosa y se le agregó diluyente con antibiótico y medio de enriquecimiento DMEM (Invitrogen). Se centrifugó por 15 minutos a 3000 rpm y se recogió el sobrenadante (inóculo).

La inoculación del ratón se realizó trazando una línea imaginaria entre el ojo y la oreja del animal. Se tomaron 0.03 mL del inóculo en la jeringa y se introdujo la aguja con un ángulo recto dirigida hacia la base del cráneo. Los animales que murieron dentro de las siguientes 48 h fueron descartados y solo se consideraron para su uso como controles positivos aquellos que presentaron síntomas clínicos de la enfermedad (observados en un periodo de 28 días post inoculación) tales como incoordinación, temores, pelo erizado, ataxia, postración o parálisis o aquellos donde se produjo muerte sintomática. Una vez terminado el ciclo se procedió al sacrificio de los animales empelando aspiración de fenol cloroformo y se extrajo la masa cerebral para su verificación por IFD.

### **4.2.2 Verificación de controles positivos por IFD**

Se realizaron cortes del Asta de Ammón, cerebelo y corteza cerebral de los ratones previamente infectados. A partir de estas estructuras se preparó un pool y se tomó un portaobjetos previamente identificado para realizar dos improntas

por cada lámina, tratando de conseguir las lo más finas y poco densas posibles. Se procedió a eliminar el exceso de humedad con papel absorbente. Para fijar el tejido en el portaobjetos, se sumergieron los portaobjetos en un vaso Coplin con acetona a 4° C por una hora. Finalizado este tiempo se delimitaron las improntas con lápiz correctivo y se añadieron 3 ml del conjugado, solución que contiene el anticuerpo específico para la nucleoproteína N conjugado a un fluoróforo que permite la visualización de las muestras positivas.

Para que la reacción anticuerpo-proteína sea posible se colocaron las preparaciones en una cámara húmeda para evitar la evaporación del conjugado. La cámara se colocó en la incubadora a 37°C durante 30 min y finalizado el tiempo de incubación se realizó un lavado de las placas con PBS 1X durante 10 min con la ayuda de una canastilla. A continuación, se lavaron dos veces las placas con agua destilada por 5 min y se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente, se agregó una gota de glicerina tamponada a pH 8.4 por impronta y se colocó el cubreobjetos. Las placas se observaron en un microscopio de fluorescencia (CNOEC, A16.0207, China) a una magnificación de 10X con el objetivo de localizar los corpúsculos de Negri, los cuales tienen una apariencia típica de estructuras virales intracitoplasmáticas de color verde manzana intenso, pero no brillante. Fue necesario comenzar las observaciones examinando primero los controles positivos y negativos para validar la actividad del conjugado.

#### **4.2.3 Extracción de ARN**

Para el procesamiento de la muestra se utilizaron aproximadamente entre 100 y 150 mg de tejido cerebral para cada ml de agente caotrópico TRizol. La muestra se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 400 µl del agente para evitar derrames durante la maceración. Se maceró con un mini-pistilo hasta conseguir una mezcla totalmente homogénea donde el tejido este completamente desecho. Una vez terminada la maceración se agregaron los 600 µl de TRizol restantes, se aplicó vortex al máximo por 20 s y se dejó incubar a temperatura ambiente

por 10 min. Posteriormente se añadieron 200  $\mu$ l de cloroformo, se mezcló por inversión y/o vortex por 15 s y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Una vez finalizado este tiempo se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4°C, en esta etapa se generaron dos fases, una inferior de color rosa que contiene TRizol y algunas impurezas como membranas lipídicas, proteínas y algunos componentes celulares y una superior transparente donde se encuentran los ácidos nucleicos. Se extrajo la fase superior transparente y se la colocó en un nuevo tubo de Eppendorf de 1.5 ml al que se le añadieron 500  $\mu$ l de isopropanol a 4°C. Se aplicó vortex y se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 min. Finalizado este tiempo se sometió la muestra a centrifugación a 12000 rpm por 10 min a 4°C. Posteriormente fue verificada la presencia del precipitado y se descartó el sobrenadante cuidadosamente por inversión, el precipitado entonces se lavó adicionando 1 ml de etanol al 75% y se aplicó centrifugación a 12000 rpm por 5 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante por inversión y se dejó el tubo boca abajo sobre papel absorbente estéril por aproximadamente 20 min hasta que no se observó etanol dentro del tubo.

#### **4.2.4 Cuantificación del ARN**

La cuantificación del ARN extraído se llevó a cabo en un espectrofotómetro NANODROP 8000 (THERMO SCIENTIFIC, EEUU). Para limpiar y blanquear los sensores del espectrofotómetro se agregaron 3  $\mu$ l de agua Dietilpirocarbonato (DEPC). Para verificar la limpieza de cada sensor, el valor de la primera medida con 2  $\mu$ l de blanco (agua DEPC) debía estar por debajo de 0.001 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>. Posteriormente se colocaron 2  $\mu$ l de la muestra y se cuantificó tomando en cuenta los parámetros de absorbancia a 260-280 nm de longitud de onda. Una vez cuantificadas las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso en la RT-PCR.

#### 4.2.5 Cebadores

Los cebadores utilizados en esta investigación (Tabla 1) fueron reportados por Allendorf, *et al*, 2012. Los cebadores amplifican un segmento de ADNc de 295 pb que se corresponde con la región central de la nucleoproteína N. Este fragmento se encuentra conservado entre varios serotipos del virus debido a su relación con las necesidades virales de replicación.

Tabla 1.

*Cebadores sentido y antisentido para la amplificación de la Nucleoproteína N del virus rábico.*

Primer	Secuencia 5' – 3'	Tamaño amplicón
F_P510	ATAGAGCAGATTTTCGAGACAGC	295 pb
R_P784	CCTCAAAGTTCTTGTGGAAGA	

#### 4.2.6 RT-PCR

La reacción para la RT-PCR como para la PCR convencional se realizó según las indicaciones especificadas en el inserto de la enzima MLV reverso transcriptasa (Promega, EEUU) así como en el protocolo de Allendorf *et al*, 2012. La RT-PCR se llevó a cabo con los siguientes reactivos: cebador Forw\_P510 (Allendorf *et al*, 2012), dNTPs (Invitrogen, EEUU), agua DEPC (Invitrogen, EEUU), Buffer RT MLV (Promega, EEUU), RNAsin Inhibitor (Promega, EEUU) y MLV reverse transcriptasa (Promega, EEUU). Para la reacción se generó un master Mix I (Tabla 2), el cual fue expuesto al termociclador por 5 min a 94°C y 1 min en hielo una vez agregado el ARN. Simultáneamente se preparó Mix II (Tabla 3), que se sometió a 37°C para la activación enzimática. El Mix II finalmente fue agregado a cada muestra con el Mix I para un volumen final de 20 µl. La mezcla se llevó al termociclador con el perfil térmico indicado en la Tabla 4.

Tabla 2.

*Master Mix I, concentración de reactivos y volumen de reacción.*

<b>Mix I</b>			
<b>Reactivo</b>	<b>Conc. Inicial</b>	<b>Conc. Final</b>	<b>Vol. 1 Rx</b>
Forw_P510	10 µg/ml	1 µg/ml	1 µl
dNTPs	10 mM	1 mM	1 µl
H <sub>2</sub> O	--	--	3 µl
Vortex y toque de centrifuga; colocar en frío en bloque térmico			
ARN			5 µl
<b>Volumen total Mix I</b>			<b>10 µl</b>

Tabla 3.

*Master Mix II, concentración de reactivos y volumen de reacción.*

<b>Mix II</b>			
<b>Reactivo</b>	<b>Conc. Inicial</b>	<b>Conc. Final</b>	<b>Vol. 1 Rx</b>
Buffer RT	5x	2x	4 µl
RNA sin	40 U/µl	40 U/Rx	1 µl
H <sub>2</sub> O	--	--	4 µl
Mezclar Suave e incubar a 37°C por 2 min y agregar:			
ARN	200 U/µl	200 U/Rx	5 µl
<b>Volumen total Mix II</b>			<b>10 µl</b>

Tabla 4.

*Perfil térmico de RT-PCR para la síntesis de ADNc.*

<b>Numero de ciclos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>
1	25	15
1	37	50
1	70	15
1	4	∞

#### 4.2.7 PCR convencional

Una vez finalizada la síntesis del ADNc se realizó la PCR empleando la enzima *Go Taq Hot start polymerase* (Promega, EEUU). De igual manera la reacción se ensambló siguiendo las indicaciones del fabricante adaptando el protocolo

descrito por Allendorf *et al*, 2012. Para la reacción de amplificación del ADNc de un fragmento de la nucleoproteína N se emplearon los siguientes reactivos: Flexi Buffer Green (Promega, EEUU), MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, EEUU), agua DEPC (Invitrogen, EEUU), dNTPs (Invitrogen, EEUU), cebadores Forw\_P510 y Rev\_P784 y *Go Taq Hot start polymerase*, como se muestra en la Tabla 5. En la Tabla 6 se puede observar el perfil térmico empleado en la PCR para el proceso de amplificación.

Tabla 5.

*PCR Master Mix concentración de reactivos y volumen de reacción*

<b>PCR Master Mix</b>			
<b>Reactivo</b>	<b>Conc. Inicial</b>	<b>Conc. Final</b>	<b>Vol. 1 Rx</b>
Buffer	5 X	1 X	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1 mM	1 µl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.50 µl
Go Taq	5 U/ µl	0.625 U/Rx	0.125 µl
Primer F	10 µM	0.275 µM	0.69 µl
Primer R	10 µM	0.275 µM	0.69 µl
H <sub>2</sub> O	--	--	12 µl
	<b>ADNc</b>		5 µl
	<b>Volumen total Master Mix II</b>		25 µl

Tabla 6.

*Perfil térmico de la PCR para la amplificación del fragmento central de la nucleoproteína N del virus rábico.*

<b>Numero de ciclos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>
1	94	5 min
35	94	45 s
35	58	45 s
35	72	60 s
1	72	10 min

## 4.2.8 Estandarización de las condiciones de reacción

### 4.2.8.1 Optimización de la temperatura de anillado

Con el fin de reducir uniones inespecíficas de los cebadores se optimizó la temperatura de annealing, para lo cual se ensayó un gradiente de temperatura, el mismo se basó en la temperatura de annealing teórica de los cebadores y se realizó en un termociclador Bio-rad en las condiciones que se describen en la Tabla 7.

Tabla 7.

#### *Gradiente de temperaturas de hibridación*

Numero de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	5 min
35	94	45 s
35	<b>Gradiente*</b>	45 s
35	72	60 s
1	72	10 min

Nota: \*Gradiente 52; 54; 56; 58; 60; 62 °C

### 4.2.8.2 Optimización de la concentración de MgCl<sub>2</sub>

Para determinar la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> o en la reacción, se varió la concentración del reactivo en un rango de 0.5 mM hasta 4 mM con intervalos de 0.5 mM (Tabla 8). Las distintas reacciones se llevaron a cabo en ocho microtubos Eppendorf, en los cuales se colocaron cantidades variables de H<sub>2</sub>O y MgCl<sub>2</sub> como se especifica en la Tabla 9.

Tabla 8.

*Gradiente de concentración de MgCl<sub>2</sub>*

<b>PCR Master Mix</b>			
<b>Reactivo</b>	<b>Conc. Inicial</b>	<b>Conc. Final</b>	<b>Vol. 1 Rx</b>
Buffer	5 X	1 X	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	<b>Gradiente</b>	<b>Gradiente</b>
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.50 µl
Go Taq	5 U/ µl	0.625 U/Rx	0.125 µl
Primer F	10 µM	0.275 µM	0.69 µl
Primer R	10 µM	0.275 µM	0.69 µl
H <sub>2</sub> O	--	--	<b>Gradiente</b>
	<b>ADNc</b>		5 µl
	<b>Volumen total Master Mix II</b>		25 µl

Tabla 9.

*Volumen de H<sub>2</sub>O y MgCl<sub>2</sub> en cada reacción*

	<b>0.5 mM</b>	<b>1 mM</b>	<b>1.5 mM</b>	<b>2 mM</b>	<b>2.5 mM</b>	<b>3 mM</b>	<b>3.5mM</b>	<b>4 mM</b>
<b>H<sub>2</sub>O(µl)</b>	13.25	12.75	12.25	11.75	11.25	10.75	10.25	9.75
<b>MgCl<sub>2</sub>(µl)</b>	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4

**4.2.8.3 Optimización de la concentración de cebadores**

Para la optimización de la concentración de los cebadores se varió la concentración de los mismos (Tabla 10) diluyendo la solución madre de concentración 100 µM a 10 µM. A partir de esta concentración se varió secuencialmente en un rango de 0.05 µM hasta 0.5 µM con intervalos de 0.075 µM como se aprecia en la Tabla 11.

Tabla 10.

*Gradiente de concentración de Cebadores*

<b>PCR Master Mix</b>			
<b>Reactivo</b>	<b>Conc. Inicial</b>	<b>Conc. Final</b>	<b>Vol. 1 Rx</b>
Buffer	5 X	1 X	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1 mM	1 µl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.50 µl
Go Taq	5 U/ µl	0.625 U/Rx	0.125 µl
Primer F	10 µM	<b>Gradiente</b>	<b>Gradiente</b>
Primer R	10 µM	<b>Gradiente</b>	<b>Gradiente</b>
H <sub>2</sub> O	--	--	<b>Gradiente</b>
	<b>ADNc</b>		5 µl
	<b>Volumen total Master Mix II</b>		25 µl

Tabla 11.

*Volumen de H<sub>2</sub>O y cebadores en cada reacción*

	<b>0.05µM</b>	<b>0.125 µM</b>	<b>0.2 µM</b>	<b>0.275µM</b>	<b>0.350µM</b>	<b>0.425 µM</b>	<b>0.5µM</b>
<b>H<sub>2</sub>O (µl)</b>	10.13	9.75	9.38	9	8.63	8.25	7.88
<b>Cebador(µl)</b>	0.13	0.31	0.5	0.69	0.88	1.06	1.25

**4.2.9 Análisis de sensibilidad**

Sensibilidad analítica: Se realizaron diluciones 1:10 del ARN para definir el rango mínimo de ARN de virus rábico que puede ser detectado por la técnica estandarizada de PCR.

**4.2.10 Especificidad del ensayo**

La PCR se realizó utilizando ARN de una cepa del virus de la estomatitis vesicular (EV) que pertenece a la misma familia del virus rábico (*Rhabdoviridae*) y posee la misma estructura vírica. El objetivo de valorar la especificidad de los cebadores fue determinar que los mismos amplifiquen únicamente el segmento central conservado de la nucleoproteína N y garantizar que no amplifiquen secuencias génicas ajenas a esta.

#### **4.2.11 Muestreo de validación del ensayo**

Del número total de muestras trabajadas en el estudio, se seleccionaron 18 tanto positivas como negativas, las cuales habían sido corroboradas por IFD y prueba biológica. Este ensayo permitió validar el funcionamiento de la reacción con muestras de campo provenientes de diferentes zonas del país como Zamora, Pastaza, Pichincha, Loja, Manabí, Tungurahua, El Oro, Esmeraldas, Guayas y Pichincha.

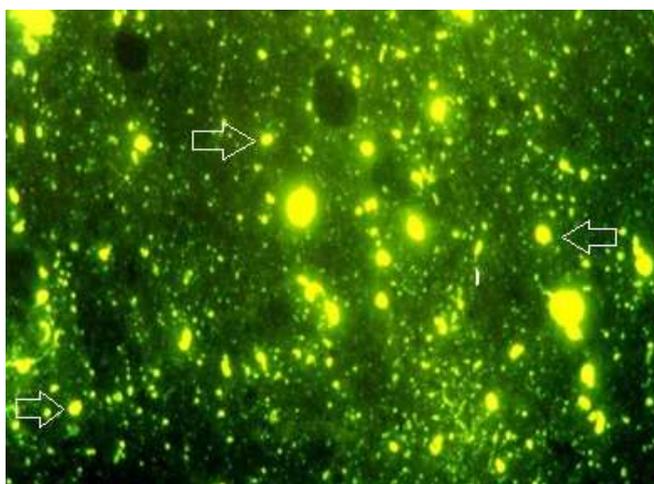
### **5 Resultados y discusión**

La rabia bovina es considerada actualmente una de las zoonosis más importantes en el mundo, por lo que se siguen buscando algunos métodos para su detección que generen ventajas respecto a los rutinarios. La PCR ha resultado ser una herramienta ideal para la detección del virus ya que su eficiencia y fidelidad ha sido corroborada con resultados reportados en la literatura. La técnica muestra un comportamiento reproducible gracias a los cebadores utilizados en el estudio. La obtención de controles con concentraciones virales elevadas y estables ha sido un factor fundamental para probar cada ensayo y obtener las condiciones óptimas de reacción. La sensibilidad también ha sido determinada teóricamente y se realizó una validación del ensayo a través de un muestreo nacional con el fin de poner la técnica a punto.

#### **5.1 Verificación de controles positivos por IFD**

Para desarrollar los distintos ensayos implicados en este estudio fue necesario obtener muestras con carga viral alta y estable. Para fijar la confiabilidad fue necesario generar controles positivos a partir de la inoculación de ratones con el virus rábico y validarlos con un método tradicional de alta eficiencia como lo es la IFD. Los resultados de la validación se pueden observar en la Figura 5 donde se aprecian estructuras características de la actividad viral a nivel celular como lo son los corpúsculos de Negri que tienen morfología redonda, estable y con

fluorescencia propia debido al anticuerpo con el cual se encuentran marcados. Estas estructuras corresponden a un típico control positivo de rabia y la gran cantidad de corpúsculos de Negri presentes revela que la concentración viral en el tejido es elevada. Los primeros estudios de Charlton y Casey en 1980 revelaron que la IFD era un método altamente confiable para detectar la rabia ya que al inocular el virus en el musculo abductor de zorrillos lograron detectarlo en zonas cercanas antes de que fuera posible detectarlo en el SNC. Además, es importante mencionar que este método es la prueba primaria más importante usada clínicamente para detectar la infección post mortem y ha tenido muy buena respuesta a lo largo de estos años, lo que la convierte en un buen método para la validación de los controles. En nuestra investigación los controles obtenidos tienen un buen rango de lectura debido a su concentración y que poseen gran cantidad de estructuras características del proceso de infección, las flechas señalan los corpúsculos de Negri como se observa en la figura 6.



*Figura 6.* Inmunofluorescencia directa de improntas a partir de un pool de masa blanca cerebral de ratones infectados por el virus de la rabia.

## **5.2 Resultados de la extracción de ARN por el método de TRizol**

La obtención del ARN total con el cual se desarrollaron los ensayos posteriores como la RT-PCR se hizo a partir de estructuras del SNC del animal como masa blanca cerebral, Asta de Ammón, tallo encefálico, así como también parte del cerebro y cerebelo bovino. En la Tabla 12 se puede observar el valor promedio

de los rangos de concentración y la calidad del ARN obtenido por el método de TRizol una vez estandarizado.

Tabla 12.

*Cuantificación de ARN total de tejido cerebral.*

<b>ARN total</b>	
Promedio de rendimiento (ng mg <sup>-1</sup> )	54.8
Calidad promedio (260/280)	1.93

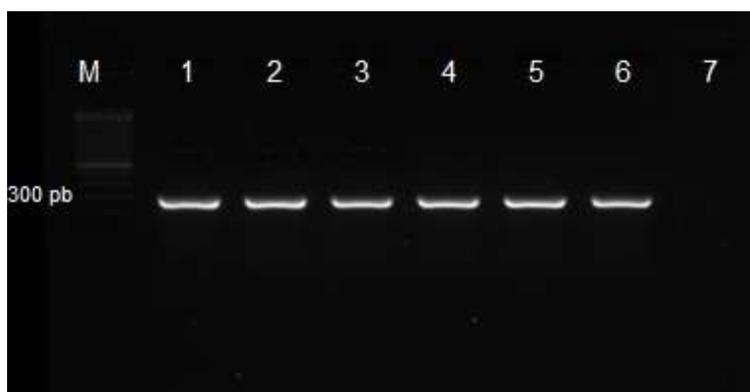
El proceso de extracción se llevó a cabo bajo las condiciones del fabricante (Trizol ®, Invitrogen). Es importante mencionar que el método por TRizol es el más utilizado para la detección del virus rábico ya que extrae ARN total con buen rendimiento, además de ser el método estándar manejado por la OIE. La relación 260/280 que se obtuvo mediante este método fue cercana a 2.00 en todas las muestras y el rango obtenido fluctuó entre 1.85 y 2.01 lo que revela que a pesar de la alta concentración de proteínas en el tejido cerebral la calidad del ARN extraído se encuentra en el rango óptimo. Cabe recalcar que comparaciones de la extracción de este método tanto en muestras vegetales como animales frente a otros han determinado en todos los casos que este posee la mayor eficiencia. El elevado rendimiento observado para la obtención de ARN en el presente estudio según Guzmán, 2013, se debe a la actividad del agente caotrópico tioisocianato de guanidina que tiene la capacidad de inhibir la actividad enzimática de las RNAsas siendo este el punto crítico para la obtención de ARN con alto rendimiento, integridad y calidad. Además es importante considerar el hecho de que las casas comerciales que producen este reactivo no revelan el resto de agentes desnaturizantes fuertes que posee el compuesto, los mismos que tienen una actividad significativa en el proceso de aislar y precipitar el ARN (Sambrook & Russel, 2001). La extracción de ARN por TRizol genera un producto con elevada concentración y pureza debido también al tipo de agente precipitante del material genético. Cuando se utiliza el isopropanol que posee gran eficiencia para este proceso, es posible evitar la precipitación de otras sustancias contaminantes tales como carbohidratos y proteínas siempre y

cuando se manejen temperaturas y tiempos de incubación adecuados (Xueyu Xiang, 2000)

### 5.3 Optimización de la temperatura de anillado de los cebadores

Optimizar la temperatura de anillado permitió mejorar la especificidad de la PCR ya que se redujo la formación de productos inespecíficos. La temperatura de anillado se determina como aquella a la cual la mitad de las moléculas de cebadores se encuentran apareadas con el ADN molde y tiene un rango estándar de 50 a 65 °C. La temperatura de anillado descrita por Allendorf *et al*, 2012 para la amplificación del fragmento central de la nucleoproteína N del virus de la rabia es de 55°C, la cual fue determinada teniendo en cuenta la relación que guarda el  $T_m$  de ambos cebadores. En este estudio se determinó la eficiencia de los cebadores para la detección del virus en diferentes órganos del animal, obteniéndose que tanto para el cerebro y glándula salival siempre hubo una eficiencia del 100% ya que se detectó en todos los casos. El valor de temperatura de fusión ( $T_m$ ) calculada para el presente estudio fue de 61.1 para el cebador sentido Forw\_P520 y 57.4 para el antisentido Rev\_P784. A partir de estos datos se definió que el rango de temperatura óptimo para determinar el  $T_m$  real del ensayo estaría entre 52 y 62°C. La temperatura de anillado es de vital importancia para el éxito del ensayo y está determinada por factores fisicoquímicos del cebador relacionados con el contenido de G y C presentes. Las secuencias que poseen gran contenido de G y C tienen mayor dificultad en su amplificación debido a que sus interacciones llegan a ser más fuertes y afectan directamente la eficacia de disociación del ADN molde (Ishii y Fukui, 2001). Como se puede observar en la Figura 6, en los carriles 1-3, a medida que la  $T_m$  es más baja la inespecificidad de la PCR aumenta, lo que se produce precisamente porque la unión cebador-molde es inespecífica a temperaturas por debajo de la  $T_m$  ideal de ambos cebadores. Cuando sucede esto los oligonucleótidos con una coincidencia absoluta o un emparejamiento inespecífico se hibridan con la cadena molde a velocidades similares por lo que se puede dar la formación de bandas inespecíficas y dímeros de cebador (Cortazar, 2004). Mientras la temperatura de fusión aumenta, la banda se reduce

en tamaño (Figura 6) debido a que el proceso se vuelve más específico existiendo menor cantidad de producto amplificado y se minimiza la presencia de productos inespecíficos. A pesar de que la especificidad del ensayo mejora a mayor temperatura, un valor de esta muy elevado (superior a los 62°C) puede causar problemas en la amplificación debido a que se reduce la probabilidad de anillamiento, por lo que la temperatura seleccionada para este estudio, 58°C, se encuentra dentro del rango aceptable. El-Tholoth y colaboradores en 2015, desarrollando una PCR para identificar y analizar la secuencia de nucleótidos del gen de la nucleoproteína (N) del virus de la rabia determinaron que la reacción funcionaba de forma óptima a una temperatura de fusión de 57°C.



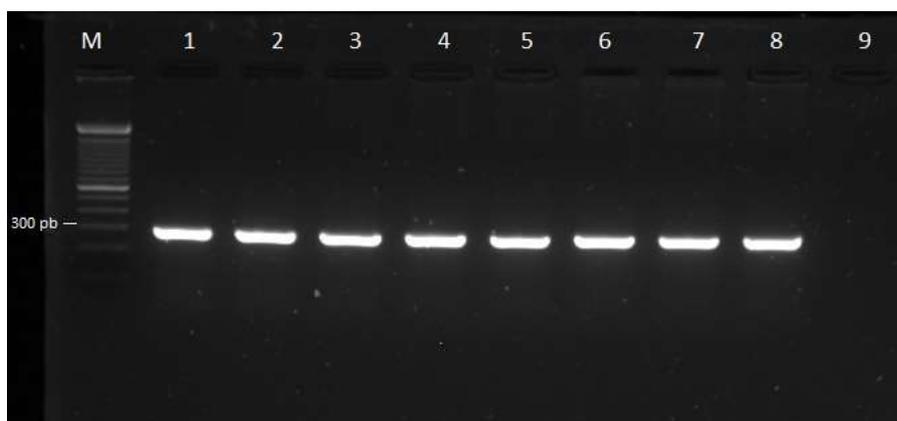
*Figura 7.* Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % del ensayo de optimización de la temperatura de hibridación de los cebadores.

- a) Carril M. Marcador de peso (1kb Invitrogen)
- b) Carril 1. 52°C, C2. 54°C, C3. 56 °C, C4. 58 °C, C5. 60 °C, C6. 62°C
- c) Carril 7. Control negativo

#### **5.4 Optimización de la concentración de MgCl<sub>2</sub>**

Determinar la concentración óptima de cloruros en la reacción, la cual generalmente se encuentra en el rango de 1.5 a 3 mM, es fundamental ya que su exceso reduce la fidelidad de la polimerasa, mientras que su carencia puede inactivar la enzima, además de que permite reducir gastos por el consumo de reactivos. Para optimizar la concentración de MgCl<sub>2</sub> inicialmente se tomó un rango de 1.5 a 3 mM pero al no obtener diferencias significativas, se optó por un rango más amplio siendo este de 0.5 a 4 mM. El MgCl<sub>2</sub> provee los iones

divalentes que cumplen una función crítica en el proceso de amplificación ya que funcionan como cofactor de la enzima *Taq* polimerasa y la reacción no puede ser llevada a cabo sin la presencia de los mismos. En la Figura 7 se puede observar que para este ensayo y bajo las condiciones de reacción, no existe una diferencia significativa en cuanto a la variación de concentración de  $MgCl_2$ . Es por esto, que el valor seleccionado para la reacción se fijó en el límite inferior según el inserto de la enzima siendo esta la concentración de 1 mM ya que se obtuvo buena respuesta de amplificación. La concentración seleccionada coincide con lo reportado en el estudio realizado por Allendorf en el año 2012 el cual definió su concentración en 1 mM para la amplificación de un fragmento de 295pb de la nucleoproteína del virus rábico. Según Bolivar y colaboradores (2013), la concentración de  $MgCl_2$  puede tener menor impacto en la reacción debido a la interferencia de los dNTPs presentes en la misma ya que estos pueden unir cationes divalentes reduciendo la concentración efectiva de  $Mg^{++}$ . A pesar de no observarse diferencias en la eficiencia de la amplificación para las diferentes concentraciones de  $MgCl_2$  ensayadas, es importante tener en cuenta que elevadas concentraciones de  $Mg^{++}$  reducen la especificidad de la PCR mientras que las concentraciones bajas pueden ayudar a mejorar la especificidad del ensayo (Kramer, 2001).

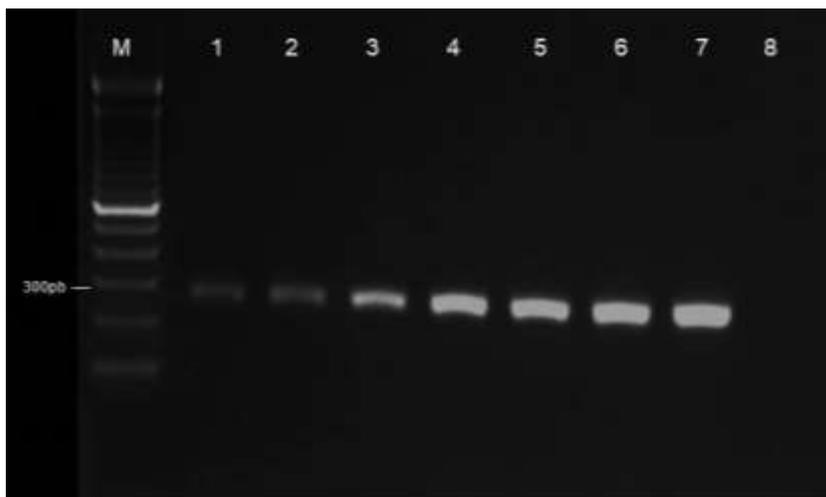


*Figura 8.* Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % del ensayo de optimización de la concentración de  $MgCl_2$ . M.

- Carril M. Marcador de peso (1kb Invitrogen),
- Carril 1. 0.5 mM, C2. 1 mM, C3. 1.5 mM, C4. 2 mM, C5. 2.5 mM, C6. 3 mM, C7. 3.5 mM, C8. 4 mM
- Carril 9. Control negativo

## 5.5 Optimización de la concentración de cebadores

Los cebadores se encargan de delimitar la zona del ADNc a amplificar ya que son estos los que se hibridan con la cadena molde. La concentración de los cebadores para una reacción de PCR se encuentran en un rango de 0.1 a 0.5  $\mu\text{M}$ . Según Appolinário *et al*, 2015 y Allendorf *et al*, 2002, el ensayo funciona bien a una concentración de 0.5  $\mu\text{M}$  por lo que se ensayaron concentraciones menores a las cuales la amplificación sea eficiente. En la Figura 8 se puede apreciar que a medida que aumenta la concentración de los cebadores a razón de 0.075  $\mu\text{M}$ , el tamaño de banda aumenta debido a que el producto amplificado es mayor. La concentración mínima requerida para obtener una banda óptima, clara y de buen tamaño que sea útil para la detección del virus rábico es de 0.275  $\mu\text{M}$ , como se observa en el carril 4 (Figura 8). Cuando la concentración de cebadores es muy elevada puede afectar la eficiencia de la reacción ya que el exceso de estos puede dar lugar a la formación de dímeros. Los cebadores diseñados para la amplificación del fragmento de interés, como se observa en la Figura 8 no generan productos inespecíficos debido a que su longitud de 24 y 26 nucleótidos para el cebador directo y el inverso respectivamente, proporcionan una secuencia lo suficientemente compleja para evitar la hibridación con secuencias diferentes a la de interés (Marchesi, 1998). Allendorf *et al*, 2012, emplearon una concentración de cebadores de 0.5  $\mu\text{M}$  obteniendo buenos resultados con una banda clara y de buen tamaño, por lo que tomaron esa concentración como estándar. El presente estudio tuvo como objetivo optimizar las condiciones de reacción por lo que a una concentración de 0.275  $\mu\text{M}$  se observó una banda eficiente para los objetivos del estudio, con la cual es posible detectar la presencia del virus.



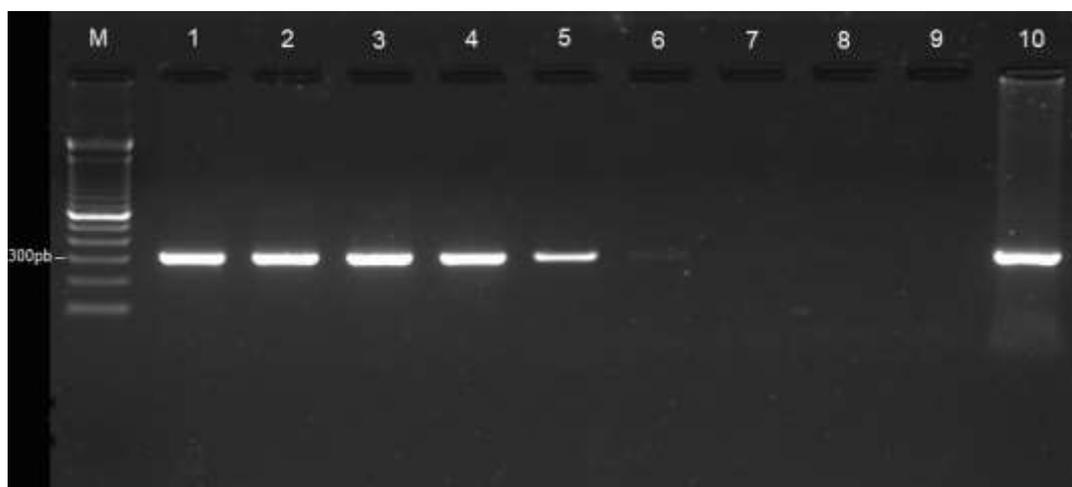
*Figura 9.* Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % del ensayo de optimización de la concentración de los cebadores.

- a) Carril M. Marcador de peso (1kb Invitrogen)
- b) Carril 1. 0.05  $\mu\text{M}$ , C2. 0.125 $\mu\text{M}$ , C3. 0.20 $\mu\text{M}$ , C4. 0.275 $\mu\text{M}$ , C5. 0.350  $\mu\text{M}$ , C6. 0.425  $\mu\text{M}$ , C7. 0.50  $\mu\text{M}$
- c) Carril 8. Control negativo

## 5.6 Sensibilidad analítica de la PCR estandarizada

Con la determinación de la sensibilidad analítica se puede fijar la concentración mínima a la cual es posible realizar la detección del ARN viral. Este valor se obtuvo realizando diluciones seriadas al décimo a partir de la cuantificación del ARN total. En la Figura 9 se puede observar que mientras mayor es la dilución del ARN menos intensa es la banda amplificada, hasta que finalmente no es posible detectar la presencia del virus. La dilución a la cual se puede observar amplificación es la correspondiente a 1:1000000 (Carril 6) pero esta banda resulta ser tenue, casi indetectable y de baja calidad por lo que el valor al cual se fijó el límite de detección es para la dilución correspondiente a 1:10000 (Carril 4). Según Suazo y colaboradores, esta sensibilidad de la PCR es únicamente confiable cuando se puede obtener y cuantificar la concentración de ARN viral, ya que una extracción por TRizol contiene además ADN genómico (Suazo, 2010). Además, como la sensibilidad fue establecida a partir de ARN extraído del cerebro de un ratón previamente infectado, la cantidad de ARN viral es alta y su desarrollo en el sistema nervioso es relativamente controlado. Al inyectar el

virus directamente en el SNC, su desarrollo es más rápido ya que cuando se transmite de manera natural debe viajar hacia esta ubicación por lo que su replicación dependiente de este tipo de células se vuelve más lento. Por tanto, las condiciones difieren de las que se observan en campo ya que los animales pueden morir antes de desarrollar todos los síntomas de la enfermedad debido a otros problemas como el estado inmunitario del animal, su edad, el sexo, la forma y lugar de transmisión del virus y si ha sido o no vacunado con anterioridad, lo que impide que se obtengan concentraciones virales elevadas (Urzúa, 2016). Debido a esto, las concentraciones del virus son variables de un animal a otro por lo que la sensibilidad analítica determinada para el ensayo se puede definir únicamente como teórica.



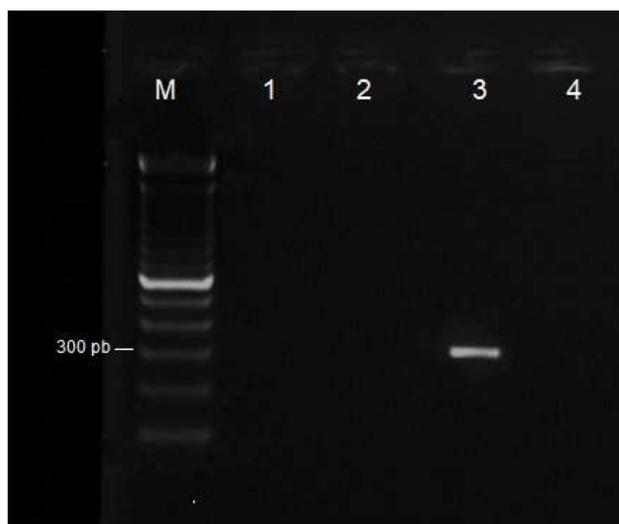
*Figura 10.* Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % del ensayo de determinación de la sensibilidad analítica de la PCR estandarizada.

- a) Carril M. Marcador de peso (1kb Invitrogen)
- b) Diluciones seriadas del ARN: Carril 1. 1:10, C2. 1:100, C3.1:1000, C4. 1:10000, C5. 1:100000, C6. 1:1000000, C7. 1:10000000, C8. 1:100000000
- c) Carril 9. Control negativo
- d) Carril 10. Control positivo

### 5.7 Especificidad de la PCR estandarizada

Generar un ensayo para valorar la especificidad de los cebadores es fundamental ya que permite definir que los mismos amplifiquen únicamente el segmento central conservado de la nucleoproteína N y no amplifiquen

secuencias génicas ajenas a esta. Para comprobar lo anteriormente expuesto, se realizó una RT-PCR a partir de ARN del virus de estomatitis vesicular. En la Figura 10 se puede observar la especificidad de los cebadores para el virus rábico. Este ensayo determinó, como se puede observar en los carriles 1 y 2, que no existe ninguna amplificación inespecífica cuando se emplearon las condiciones estandarizadas para la amplificación del ADNc del virus de la estomatitis vesicular. Se seleccionó este virus para verificar la especificidad del ensayo ya que pertenece a la misma familia del virus rábico (*Rhabdoviridae*) y comparte numerosas características morfológicas con el virus de la rabia. Es importante mencionar que este ensayo fue escogido para validar la especificidad de los cebadores ya que algunos autores como Smythe *et al*, 2002, determinaron que la especificidad podía ser evaluada frente a otro patógeno el cual mantenga una relación familiar y funcional con el microorganismo de interés. El virus de la estomatitis vesicular posee en su genoma ARN que codifica solo 5 genes en igual orden que el virus de la rabia 3'-N-P-M-G-L-5' donde en cada extremo y entre genes se encuentran secuencias no codificantes las mismas se encuentran flanqueados por dos secuencias repetitivas. Adicionalmente, su ciclo de replicación se produce de manera idéntica, iniciado por la detección por parte del virus de la membrana celular por interacción de su glicoproteína G y su posterior replicación citoplasmática.



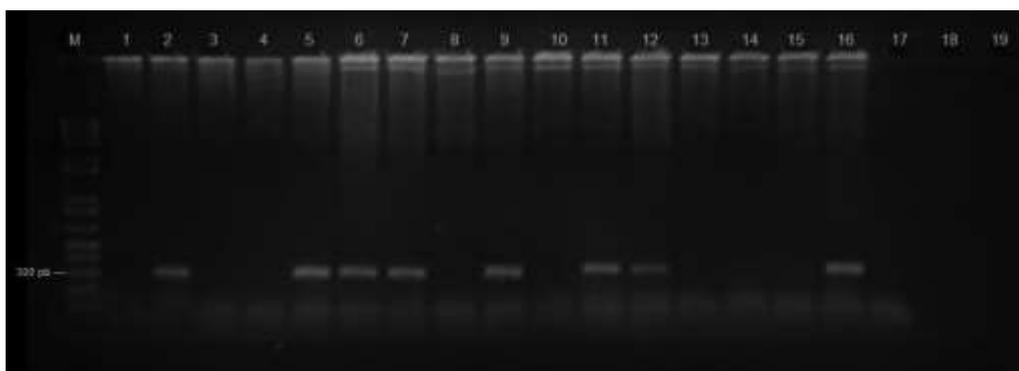
*Figura 10.* Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % del ensayo de determinación de la especificidad de la PCR estandarizada.

- a) Carril M: Marcador de peso (1kb Invitrogen)
- b) Carril 1. ADNc del virus de la estomatitis vesicular muestra 1, C2. ADNc estomatitis vesicular muestra 2
- c) Carril 3. Control positivo
- d) Carril 4. Control negativo

### 5.8 Muestreo de validación del ensayo

La validación del ensayo se llevó a cabo para determinar el funcionamiento de la técnica en muestras de campo y permitió determinar su reproducibilidad una vez fue estandarizado. Para esto se tomaron 18 muestras provenientes de diferentes zonas geográficas del país para permitir la detección de posibles variantes del virus. En la Figura 11 y en la Tabla 13, se observa que la PCR corroboró los resultados de diagnóstico obtenidos por los métodos tradicionales, lo que permite concluir que el método molecular estandarizado es reproducible. Es importante recalcar que el fragmento que amplifican los cebadores es una región altamente conservada del virus, es por ello, que a pesar de que existen diferentes variantes génicas en dependencia de las zonas geográficas, así como del tipo de huésped, la PCR es capaz de detectarlas (Mohamed, 2015). Los resultados que se observan en la Figura 11 también permiten concluir que el ensayo funciona adecuadamente como método diagnóstico en muestras de campo. Maanen, 2004, demostró que la técnica de PCR tiene mayor eficiencia que los

métodos inmunohistoquímicos ya que no solo tiene la capacidad de detectar al virus activo sino también, cuando este se encuentra latente, así como restos virales y concentraciones mínimas del ARN viral gracias a su sensibilidad. David *et al*, 2002, comprobó esta capacidad de la PCR al detectar el virus de la rabia en cerebros en estado de descomposición que habían sido infectados por la vía natural. Esto permitió corroborar la eficiencia de la técnica con respecto a métodos como el cultivo celular e inoculación en ratones de muestras en estado de descomposición. La técnica de PCR, mostró un 100% de eficiencia de detección frente al 30% alcanzado por ambos métodos tradicionales.



*Figura 11.* Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % del ensayo en muestras de campo para la validación de la PCR estandarizada.

- a) Carril M: Marcador de peso (1kb Invitrogen)
- b) Carril 1-18. Muestras de campo recolectadas a nivel nacional
- c) Carril 19. Control negativo

*Tabla 13.*

*Muestras de campo recolectadas a nivel nacional etiquetadas con el código interno del laboratorio de diagnóstico animal Agrocalidad. Diagnóstico por IFD y por PCR.*

Muestra	Lugar	IFD	PCR	Carril
13689	Guayas	-	-	1
13685	Pichincha	+	+	2
11853	Esmeraldas	-	-	3
13183	Manabí	-	-	4
11855	El Oro	+	+	5
13152	Loja	+	+	6
13191	Zamora	+	+	7
13175	Tungurahua	-	-	8

<b>13684</b>	Pichincha	+	+	9
<b>13520</b>	Guayas	-	-	10
<b>13196</b>	Zamora	+	+	11
<b>13188</b>	Zamora	+	+	12
<b>11826</b>	Los Ríos	-	-	13
<b>13478</b>	El Oro	-	-	14
<b>13119</b>	Loja	-	-	15
<b>13252</b>	Zamora	+	+	16
<b>13670</b>	Manabí	-	-	17
<b>13527</b>	Zamora	-	-	18

Las muestras fueron previamente evaluadas por la técnica de IFD y posteriormente fueron confirmadas por PCR. Las 10 muestras que arrojaron resultados negativos para la IFD también resultaron negativas para PCR, un resultado similar se obtuvo para las muestras positivas. Esta concordancia de resultados entre ambas técnicas revela la fiabilidad de la PCR y demuestra que constituye una herramienta confiable y reproducible para el diagnóstico de rabia en bovinos. Estos resultados demuestran por otra parte, que el ensayo tiene la capacidad de detectar el virus a pesar de las posibles variaciones que presente según su distribución geográfica, gracias a la especificidad de los cebadores diseñados para flanquear una región no variable relacionada con la actividad replicativa del virus. Los resultados obtenidos sugieren que la PCR constituye una herramienta para la detección del virus que presenta varias ventajas, tales como el diagnóstico a partir de muestras que han sido almacenadas inadecuadamente, y la posibilidad de confirmar los resultados de la IFD que puede arrojar falsos negativos. Por otra parte, este ensayo resulta ser mucho más rápido y permite la detección a partir de pequeñas cantidades de muestras como las obtenidas de murciélagos y animales de experimentación. En estos casos la efectividad de la técnica es superior a las empleadas en el diagnóstico rutinario (Appolinário *et al*, 2015).

## **6. Conclusiones y Recomendaciones**

### **6.1 Conclusiones**

El protocolo de extracción de ARN por TRizol es satisfactorio para la amplificación del gen central de la nucleoproteína N ya que garantiza material genético de alta calidad con baja concentración de impurezas.

Las condiciones de reacción estandarizadas permiten una amplificación óptima del fragmento de interés para el diagnóstico molecular del virus de la rabia.

Los cebadores empleados son específicos para la región central de la nucleoproteína N ya que amplifican únicamente dicho fragmento. La PCR estandarizada funciona para la detección de distintas variantes del virus por lo que puede ser un método de diagnóstico adecuado para muestras de campo.

La sensibilidad del ensayo es netamente teórica ya que se determinó en controles con concentraciones víricas altas y estables que difieren a las que se pueden encontrar en muestras de campo.

### **6.2 Recomendaciones**

Determinar el impacto de contaminantes presentes en las muestras que puedan inhibir la actividad de la enzima polimerasa.

Validar el límite de detección del ensayo en muestras de campo ya que existe variabilidad en la concentración de ARN viral en cada muestra debido a factores ambientales e infectivos del virus.

Realizar estudios posteriores de caracterización molecular del gen central de la nucleoproteína que permitan establecer la relación filogenética entre las diferentes variantes del virus, de acuerdo con su distribución geográfica.

## REFERENCIAS

- Allendorf, S., Cortez A., Heinemann M., Harary C. (2012). Rabies virus distribution in tissues and molecular characterization of strains from naturally infected non-hematophagous bats. *ELSEVIER*, 119-125. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.01.011>
- Appolinário C., Allendor S., Vicente F., Devidé B., Clóvis R., Fonseca R. (2015). Fluorescent antibody test, quantitative polymerase chain reaction pattern and clinical aspects of rabies virus strains isolated from main reservoirs in Brazil. Recuperado el 1 de enero de 2018 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867015001361>
- Agrocalidad. (2016). Programa nacional sanitario de prevención y control de rabia bovina. *sanidad animal*. Recuperado el 18 de enero de 2018 de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2016/07/resolucion-0074-programa-nuevo-05-06-2017.pdf>
- Bonavitta, P. (2007). Rabia en bovinos . *Sitio Argentino de Producción Animal, Tiempo Agroempresario*. Recuperado el 20 de enero de 2018 de <http://redbiblio.unne.edu.ar/opac/cgi-bin/pgopac.cgi?VDOC=6.200755>
- Burtis, A. y Bruns, D. (2008). Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. Editorial *ELSEVIER*, 7<sup>ma</sup> edición, Madrid-España.
- Center for Disease Control and Prevention*. (2017). The Rabies Virus. Recuperado el 22 de enero de 2018 de <https://www.cdc.gov/rabies/transmission/virus.html>
- Cortazar, D. (2004). Metodos fisico-quimicos en Biotecnología . Recuperado el 21 de enero de 2018 de <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>
- Charlton K., Casey G. (1979). Experimental rabies in skunks: immunofluorescence light and electron microscopic studies.

- Recuperado el 6 de enero de 2018 de <http://europepmc.org/abstract/med/376938>
- Crepin, P., Audry, L. (2001). Intravitam Diagnosis of Human Rabies by PCR Using Saliva and Cerebrospinal Fluid. Recuperado el 21 de enero de 2018 de <http://jcm.asm.org/search?author1=P.+Crepin&sortspec=date&submit=Submit>
- David D., Yakobson B., Rotenberg D., Dveres N., Davidson I. (2002). Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. Recuperado el 18 de enero de 2018 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12034539>
- Edward, C., Holmes, C.(2002). Genetic Constraints and the Adaptive Evolution of Rabies Virus in Nature. *ELSEVIER*, 247-257. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1271>
- Finke, S.(2005). Replication strategies of rabies virus. *ELSEVIER*, 120-131. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.04.004>
- Finke, S. (2005). Replication strategies of rabies virus. *ELSEVIER*, 120-131. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.04.004>
- Finnegan C., Sharon, M. (2002). Rabies in North America and Europe. *Journal of the Royal Society of Medicine (JRSM)*, 9-13. <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/014107680209500104>  
<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/inmunoquimica.pdf>
- Garcia, R., Cardenas, J. (1996). Epidemiologia de la rabia, situacion actual en mexico. Recuperado el 21 de enero de 2018 de <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol7/CVv7c12.pdf>
- Giron, P. (2001). La rabia, manifestaciones clinicas, transmision, prevencion y tratamiento. Recuperado el 20 de enero de 2018 de <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol3/CVv3c04.pdf>
- Gulyukin, A. (2016). The economic damage caused by rabies of agricultural animals in russia. *Academia Rusa de Ciencias*, 34-38. <https://dx.doi.org/10.18551/rjoas.2016.06>

- Guzmán, A., Barney, M. (2013). Comparación de métodos de extracción de RNA para la detección por RT-PCR del Potato yellow vein virus (PYVV) en diferentes órganos de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja. Recuperado el 5 de enero de 2018 de <https://search.proquest.com/openview/c8208a4fe7624a3da65150e8828134d3/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2035764>
- Heaton, R., Johnstone, P. (2000). Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *Clinical Microbiology*, 40-52. Recuperado el 14 de enero de 2018 de <http://jcm.asm.org/content/35/11/2762.short>
- Hernandez, B. (2000). Patogenia de la Rabia. Recuperado el 17 de enero de 2018 de <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol2/CVv2c3.pdf>
- Hughes, G., Smith, J., Hanlon, C., Rupprecht, C. (2004). Evaluation of a TaqMan PCR Assay To Detect Rabies Virus RNA: Influence of Sequence Variation and Application to Quantification of Viral Loads. Recuperado el 10 de enero de 2018 de <http://jcm.asm.org/content/42/1/299.short>
- INIFAP. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (2017). Diagnóstico y control de la rabia parálitica bovina. Recuperado el 21 de enero de 2018 de [http://www.ugrj.org.mx/index2.php?option=com\\_content&do\\_pdf=1&id=611](http://www.ugrj.org.mx/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=611)
- Ishii, K., Fukui, M. (2001). Optimization of Annealing Temperature To Reduce Bias. Recuperado el 21 de enero de 2018 de <http://aem.asm.org/content/67/8/3753.short>
- James, W., Baker, T., Levine, M., Stephen, B. (2013). *Molecular Biology of the Gene*. Recuperado el 21 de enero de 2018 de <https://www.amazon.com/Molecular-Biology-Sixth-James-Watson/dp/080539592X>

- López, L., Orozco, P. (2009). Rabia, Infeccion viral del sistema nervioso central. Recuperado el 28 de enero de 2018 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmexneu/rmn-2009/rmn093g.pdf>
- Kramer, M., Coen, D. (2001). Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization. *Current Protocols in Toxicology*, 50-76. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142727.mb1501s56/tables>
- MAGE. Ministerio de agricultura de España (2013). *Plan de contingencia para el control de la rabia en animales domésticos en españa*. Recuperado el 11 de enero de 2018 de [https://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/sanidadExterior/docs/planContingencia\\_control\\_rabia\\_animales\\_domesticos\\_esp\\_rev3\\_Junio2013.pdf](https://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/sanidadExterior/docs/planContingencia_control_rabia_animales_domesticos_esp_rev3_Junio2013.pdf)
- Marchesi, J., Sato, T., Weghtman, A., Martin, T. (1998). Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. Recuperado el 12 de enero de 2018 de <http://aem.asm.org/content/64/2/795.short>
- Montano, J. (1996). Estructura antigenica y mecanismos de infeccion del virus de la rabia . *Ciencia Veterinaria* , 67-90. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182008000200016>
- Maanen, V., Woouda, S. (2004). An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *ELSEVIER*, 351-364. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.08.016>
- Mohamed, E-T., Mohamed, H.(2015). Identification and genetic characterization of rabies virus from Egyptian water buffaloes (*Bubalus bubalis*) bitten by a fox. Recuperado el 22 de enero de 2018 de <https://link.springer.com/article/10.1007/s13337-015-0263-y>
- Nuovo, G., De Faria, D., Chanona-Vilchi, J. (2005). Molecular detection of rabies encephalitis and correlation with cytokine expression. Recuperado el 15de enero de 2018 de <https://polbase.neb.com/references/9195>

- OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal (2004). Manual de la OIE sobre animales terrestres. <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/>
- Pabello, J. (2010). *Inmunología Veterinaria*. Mexico-Mexico DF: El Manual Moderno. Recuperado el 23 de enero de 2018 de <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=uccma.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=004706>
- Pascacio, R., Calderon, V. (2007). Técnicas Inmunoquímicas Guía de principios. En R. V. Pascacio, *Técnicas Inmunoquímicas Guía de principios*. Recuperado el 21 de enero de 2018 de
- Rinsho, N. (2005). Epidemiology of rabies virus and other lyssaviruses. Recuperado el 15 de enero de 2018 de. <http://europepmc.org/abstract/med/16363690>Sacramento
- Sambrook, J., Russel, D. (1999). *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Recuperado el 28 de enero de 2018 de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19901616061>
- Sokol, F., Staneck, D. (1972). Structural Proteins of Rabies Virus. Recuperado el 18 de enero de 2018 de <http://jvi.asm.org/content/7/2/241.short>
- Smythe, L., Smith, I., Smith, G., Dohnt, M., Symonds, M., Barnett, L., McKay D. (2002). A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. BMC Infectious Diseases (10) 2-13. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-2-13>
- Strachan, F., Read, A. (1999). *Genética molecular humana*. Recuperado el 14 de enero de 2018 de [https://www.casadellibro.com/?utm\\_source=google&utm\\_medium=GoogleBooks&utm\\_campaign=2922&utm\\_content=GoogleProducts2](https://www.casadellibro.com/?utm_source=google&utm_medium=GoogleBooks&utm_campaign=2922&utm_content=GoogleProducts2)
- Suazo, D. (2010). Sensibilidad y especificidad de PCR anidada y Spoligotyping como pruebas rápidas de diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco. Recuperado el 08 de enero de 2018 de

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-11242010000400008&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-11242010000400008&script=sci_arttext&tlng=en)

- Sumi, M. (2001). Diagnostic utility of polymerase chain reaction and immunohistochemical techniques for the laboratory diagnosis of intracranial tuberculoma. Recuperado el 09 de enero de 2018 de <http://europepmc.org/abstract/med/11495007>
- Urzúa, S. (2016). Sensibilidad analítica de una reacción en cadena de la polimerasa convencional, para el diagnóstico de brucella canis en cultivo puro y muestras de sangre y orina. Recuperado el 13 de enero de 2018 de <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/143671>
- WHO. World Health Organization (2016). Expertos consultores en Rabia, segundo reporte. *WHO Expertos consultores en Rabia, segundo reporte* (págs. 1-131). Mexico : OMS.
- Wiktor T., Dietzschold B., Leamson R., Koprowski H., D.(1977). Induction and biological properties of defective interfering particles of rabies virus. Recuperado el 8 de enero de 2018 de <http://europepmc.org/articles/PMC353865>
- Wright, A., Rampersad, J., Ryan, J., Ammons, D. (2002). Molecular characterization of rabies virus isolates from Trinidad. *ELSEVIER*, 95-102. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00045-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00045-7)
- Xiang, X., Diwen, Q., Hegele, R., Tan, W. (2000). Comparison of different methods of total RNA extraction. Recuperado el 10 de enero de 2018 de [https://www.kapabiosystems.com/region-selector/?redirect=%2Fproduct-applications%2Fproducts%2Fnext-generation-sequencing-2%2Frna-library-preparation-2%2Frna-hyperprep-kits-riboerase-hmr%2F%3Fmsclkid%3D74dd3d4693a5115cebfb67d9e07c61af%26utm\\_source%3Dbing%26utm\\_medium%3Dcpc%26utm\\_campaign%3DKAPA%2BNon-Brand%253EHyperPrep%2BRNA%26utm\\_term%3Dtotal%2Brna%26utm\\_content%3DHyperPrep%2BKits%2Bwith%2BRiboErase%253EPhrase](https://www.kapabiosystems.com/region-selector/?redirect=%2Fproduct-applications%2Fproducts%2Fnext-generation-sequencing-2%2Frna-library-preparation-2%2Frna-hyperprep-kits-riboerase-hmr%2F%3Fmsclkid%3D74dd3d4693a5115cebfb67d9e07c61af%26utm_source%3Dbing%26utm_medium%3Dcpc%26utm_campaign%3DKAPA%2BNon-Brand%253EHyperPrep%2BRNA%26utm_term%3Dtotal%2Brna%26utm_content%3DHyperPrep%2BKits%2Bwith%2BRiboErase%253EPhrase)

