

1 01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION

Y DE LA SALUD ANIMAL

**PRUEBA DE REACCION EN CADENA DE LA
POLIMERASA(PCR) PARA DETECCION DE VIRUS
RABICO EN MUESTRAS DE TEJIDO NERVIOSO
PRESERVADAS CON FORMALDEHIDO O GLICERINA**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

JOSE HECTOR MIGUEL AGUILA TECUATL

TUTOR:

DR. J. ALVARO AGUILAR SETIEN

COMITÉ TUTORAL:

**DR. RAUL VARGAS GARCIA
DR. JOSE BARAJAS ROJAS**

MÉXICO,D.F.

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

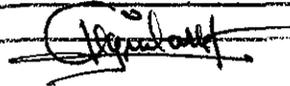
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

... a la Dirección General de Bibliotecas • • •
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: JOSE HECTOR MIGUEL
AGUILA TECUATL

FECHA: 31 OCTUBRE 2002

FIRMA: 

El autor da consentimiento a la División de Estudio de Posgrado e investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

MVZ. JOSE HECTOR MIGUEL AGUILA TECUATL

AUTOR

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Dedicatorias

Dedico este trabajo de todo corazón a mi Esposa María Esperanza Barrios Figueroa, y a mis hijos Fátima Cecilia y Hector Pablo con la esperanza de que en el futuro ellos sigan por el camino de la ciencia y la investigación.

A mis padres Hector y Mercedes cuya vida ejemplar ha servido de cimiento para mi vida de estudiante y ahora como padre de familia.

A la memoria de mis queridos e inolvidables abuelos Miguel, Guadalupe, Ponciano y Sebastiana, de quienes recibí solo su cariño y sabiduría.

A mis hermanos y cuñados Maritza y Hugo, Roberto y Socorro, Alfonso y Rosa, Marco y Teresa, Armando y en especial a la memoria de mi hermana Silvia, quien me inspiró a la obtención de este posgrado. Maria auxlio y Efren, Manuel Angel. A mis suegros Manuel y Maria Auxilio.

A mis tíos Jaime y Angeles, Carlos y Marta, Arturo e Irene, Jacinto y Alicia, Mariano y Gloria, Raúl y Blanca Rosa, Rodolfo y Frida.

A mis primos Raúl y Laura, Rosa María y Juan, Lorena y Eduardo, Sonia, Javier y Donaji, Ana Carla y Liliana, Marta y Richard, Lourdes, Carlos y Selene, Miguel Angel, Angeles y Gerardo, Frida, Roxana y Adrian, Rodolfo y Jesica, Pepe, Lourdes y Manuel, Leti y Pier Ives Alicia y Gregorio, Miguel Angel y Herminia, Arturo, Fernanda y Andrea.

A todos mis sobrinos, esperando que ellos también sigan por este camino del estudio y el esfuerzo continuo

A mis entrañables amigos MVZ Luis Mijangos Patiño, Lic. Guillermo de la Vega Esparza Oteo, MVZ MC Luz Ma. Galindo Chirinos y Alicia Cervantes Pérez por su apoyo y cariño.



AGRADECIMIENTOS:

Agradezco profunda y sinceramente su desinteresada cooperación a las siguientes personas:

Dra. Vilma Carolina Baker Méndez

Bióloga Leticia Ramos Ramirez

QFB Yolanda León campos

MVZ MC Rolando Reina Granados

Bióloga Mónica Salas Rojas

Bióloga Emma Lucia Espinosa Larios

Dr. José Barajas Rojas

Dr. Raúl Vargas García

Dr. Rogelio Alonso Morales

Dr. Antonio Verdugo Rodríguez

MVZ Renate Thummler Blum

Especialmente mi reconocimiento y agradecimiento a mi asesor principal por su guía y asistencia en todo momento:

Dr. J. Alvaro Aguilar Setien

A todo el personal del Laboratorio de Investigación en Inmunología del Hospital de Pediatría del Centro Medico-Nacional Siglo XXI

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ÍNDICE

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
CAPITULO 1. INTRODUCCION	1
Objetivos	6
CAPITULO 2. EL VIRUS DE LA RABIA	8
Reseña histórica	8
Epidemiología	10
Rabia en América	16
Rabia en México	16
Presentación urbana de la rabia	18
Manifestaciones clínicas de la rabia	19
Patología	21
Propiedades y características morfológicas del virus rábico	23
El genoma rábico	25
CAPITULO 3. MATERIAL Y METODOS	28
Clasificación del estudio	28
Diseño del estudio	28
Inoculación del virus	29
Fijación con formaldehído	29
Preservación con Glicerol	30
Digestión con proteinasa K	30
Proceso de desparafinación	30
Proceso de extracción del ácido ribonucleico	31
Observación del ácido ribonucleico	32

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Oligonucleótidos específicos	32
Obtención del ácido desoxirribonucleico complementario	33
Amplificación de productos por PCR	33

CAPITULO 4. RESULTADOS	35
------------------------	----

CAPITULO 5. DISCUSION	44
-----------------------	----

APENDICE 1	49
------------	----

LITERATURA CITADA	51
-------------------	----

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1	Subgrupos de lisavirus	12
Cuadro 2	Variación de temperatura en 24 horas.	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de las estructuras del virus rábico.	24
Figura 2	Representación esquemática del genoma del virus de la rabia.	27
Figura 3	Gel de Agarosa donde se muestra el producto de amplificación del virus de la rabia de dos muestras preservadas en glicerina durante uno y tres días.	40



- Figura 4** **Gel de Agarosa donde se muestra el producto de amplificación del virus de la rabia de dos muestras preservadas en glicerina durante siete días.** **41**
- Figura 5** **Gel de Agarosa donde se muestra el producto de amplificación del virus de la rabia de dos muestras preservadas en glicerina durante 14 días.** **42**
- Figura 6** **Gel de Agarosa donde se muestra el producto de amplificación del virus de la rabia de dos muestras preservadas en glicerina durante 21 días.** **43**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Resumen

PRUEBA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA DETECCION DE VIRUS RABICO EN MUESTRAS DE TEJIDO NERVIOSO FIJADAS CON FORMALDEHIDO O GLICERINA.

Se aplicó la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detección del virus rábico en cerebro de ratones previamente inoculados con el mismo y positivos a la prueba de anticuerpos fluorescentes. Las muestras fueron preservadas en soluciones de glicerina a concentraciones, de 40%, 50% y 80% y de formaldehído al 10 y al 15% a temperatura ambiente desde 1 a 21 días. El producto de amplificación del virus rábico se detectó en las todas muestras preservadas en glicerina al 50% desde 1 hasta los 21 días, utilizando un oligonucleótido de 872 pares de bases con los segmentos G-ψ-L. Ninguna de las otras muestras preservadas en glicerina o formaldehído fueron positivas. Se concluye que la glicerina a concentración del 50% es recomendada como preservador de tejidos para pruebas de biología molecular en ausencia de refrigeración y variaciones extremas de temperatura; pues durante las pruebas, la temperatura osciló entre los 12 y los 33 C diariamente.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Abstract

PCR TEST FOR RABIES DETECTION ON GLICERIN OR FORMALIN PRESERVED TISSUES.

A pollimerase chain reaction (PCR) test for rabies detection was performed on previously inoculated- and positive antibody fluorescent test (AFT) mouse brain tissues. Samples were preserved in glycerin concentrations of 40, 50 and 80% and formalin at concentrations of 10 and 15% under environmental temperature from 1 to 21 days. A rabies virus amplification product was detected using a 872 pb containing the G-ψ-L segment in all semples preserved in glycerin at 50% from one to 21 days. No other glycerin or formalin preserved tissues were positive. It is concluded that glycerin at a 50% concentration is recommended regarding tissue preservation for molecular biology test purposes without refrigeration and extreme temperature variations, namely, the PCR test was performed with temperature varying from 12 an 33 C on a 24h period.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO 1

INTRODUCCION

Los dos principales temas de interés en la investigación actual de la rabia son la búsqueda de técnicas que permitan el diagnóstico rápido y certero a partir de muestras infectadas y la tipificación molecular de las cepas involucradas en las distintas cadenas epidemiológicas, tanto aérea como terrestre, las especies involucradas y la distribución geográfica de las mismas.

El tratamiento post-exposición de la rabia en el humano y las medidas sanitarias profilácticas, dependen de estos resultados de laboratorio. El método de diagnóstico de rutina para la rabia en nuestro medio, es la prueba de anticuerpos fluorescentes (PAF) y para que ésta sea correctamente realizada, es necesario que las muestras estén frescas, es decir, que los tejidos nerviosos, estén bien preservados y hayan sido refrigerados, de modo que las proteínas virales estén intactas (1). Adicionalmente a este examen, se requiere la confirmación por aislamiento viral, ya sea por la prueba de inoculación intracerebral a ratones recién nacidos (PIR) o la prueba de infección de rabia en cultivo de tejidos (PICT).

Es frecuente que en los laboratorios de diagnóstico se reciban muestras de tejido nervioso preservadas en formaldehído, a las que no es posible aplicarles los exámenes de rutina ya mencionados, el uso del formaldehído se debe generalmente a la carencia de medios de refrigeración adecuados, de modo que bajo estas condiciones, se usa como alternativa para la preservación de las mismas. El radical aldehído del formaldehído o formol, se conjuga con la materia orgánica, se combina con la albúmina, la caseína, la gelatina y los radicales amino

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

formando axometinas y otros compuestos insolubles, por lo que es necesario someterlos a digestión enzimática.

En concentraciones bajas, el formaldehído tiene acción tóxica sobre las células, especialmente para los microorganismos, a los que afecta en la solubilidad de sus proteínas. En concentraciones mayores, precipita las mismas. Esta acción se aprovecha en la fijación de piezas histológicas. La conservación de cadáveres con formaldehído depende más del efecto antimicrobiano que del endurecimiento de los tejidos (2). En los virus, concentraciones mayores a 0.5% alteran las proteínas de superficie, desnaturalizándose e inactivando a los mismos.

Al formaldehído se le encuentra comercialmente en solución al 37%; de ésta, se preparan soluciones del 15% al 10% para fijar tejidos. Las muestras así preservadas se procesan para su análisis histopatológico por medio de la técnica de la parafina, aunado a su tinción posterior y observación al microscopio.

En cuanto al examen histopatológico de las muestras, éste no es definitivo para el diagnóstico de la rabia. En 1999 la Comisión Nacional de Sanidad Animal, reportó que de 321 muestras positivas a rabia por examen de PAF, solo 24 de las mismas fueron positivas a la histopatología (3) al identificar los cuerpos de Negri (4).

El uso de soluciones de glicerol es recomendado por los textos de microbiología de las décadas de los sesenta y setenta para el envío de muestras refrigeradas a las que se les aplicaría un examen diagnóstico convencional, cayendo en desuso en la actualidad.

La glicerina o 1,2,3-Propanetriol es un alcohol que tiene amplio uso en la industria química, que posee características emolientes, solventes, humectantes,

plastificantes, endulzantes, absorbentes, etc. (5) siendo la más importante para este estudio, la de preservar los tejidos, como posible resultado de la adición de todas estas propiedades.

Roux en 1887, utilizando glicerina, reportó la obtención de partículas viables del virus de la rabia después de 30 días a temperatura ambiente en el Instituto Pasteur de Saigón, siendo el preservador de tejidos de elección en épocas en que no se contaba con medios de refrigeración (6).

Con el nacimiento de la biología molecular y el advenimiento de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en 1983 (7) con la que se puede copiar secuencias completas de fragmentos de Acido Desoxirribonucleico (ADN) a partir del mismo ADN o de Acido Ribonucleico (ARN) por medio de la transcriptasa-reversa PCR (Rt-PCR) y reproducirlas en cantidades exponenciales de 2^{17} tan solo después de algunas horas, se tuvo una herramienta poderosa que se propagó rápidamente a todos los laboratorios de investigación y diagnóstico. La capacidad de la técnica de PCR como método diagnóstico se probó por primera vez en la anemia de células falciformes (8) y desde entonces se aplica al estudio genético de diversos microorganismos como bacterias, virus, parásitos, hongos, etc., apoyándose en literatura científica bien documentada con más de 1000 artículos a la fecha.

Tordo y colaboradores (9) reportaron la técnica de PCR como un método alternativo de diagnóstico y como un método de estudio de la epidemiología molecular del virus de la rabia en 1991 al permitir el estudio del código genético del mismo.

Al mencionar los méritos y desventajas de los diferentes métodos diagnósticos hasta la fecha existentes para la rabia, así como sus bondades económicas y técnicas, podemos citar por ejemplo que:

La prueba de anticuerpos fluorescentes es rápida y económica, pero requiere de la disponibilidad y mantenimiento de microscopio de luz ultravioleta así como de personal entrenado. La prueba de Inoculación en ratones no es rápida y de ética cuestionada; mientras que la prueba de inoculación en cultivo de tejidos es rápida, pero costosa, además de requerir técnicos expertos en cultivo celular. El uso de anticuerpos monoclonales o la detección de antígeno de rabia por medio de ensayo inmunoenzimático (ELISA) requieren también de entrenar y mantener personal altamente calificado, así como la adquisición de material, reactivos y equipo costoso (10, 11, 12, 13). De estas técnicas el PCR permite un diagnóstico en solo 4 horas cuando se usa saliva o líquido cerebroespinal (14) o 24 horas con muestras de tejido nervioso, por lo que ha sido adoptado mundialmente sobre todo para estudiar el origen epidemiológico de los brotes de rabia.

La epidemiología molecular se ha definido recientemente como la ciencia que se enfoca a estudiar la contribución de factores potenciales de riesgo ambiental o genético identificados en el ámbito molecular, sobre la etiología y la prevención de enfermedades dentro de la familia y sobre las poblaciones (15).

El genoma del virus de la rabia está constituido de ARN de cadena simple y cuenta con 11932 nucleótidos(15) contiene 5 genes: N, M1, M2, G, Ψ (Pseudogen) y L, mismos que codifican para igual número de proteínas, estos genes poseen secuencias de nucleótidos con mayor o menor grado de variabilidad, lo que permite reconocerlos, de modo que su identificación es útil para estudiar características

constantes que permiten agrupar al virión dentro del género, mientras que los más específicos son útiles para diferenciar virus aislados de especies divergentes, de zonas geográficas, o ambas.

El gen N, estrechamente relacionada con el ARN viral (15), es el más estable y puede ser usado para diagnóstico, mientras que el gen G, Ψ y L, para diagnóstico, taxonomía, tipificación, y estudios epidemiológicos e inmunológicos (16,17).

Por otro lado, el genoma del virus posee una región o espacio que no codifica para ninguna proteína, situada entre los genes G y L (región llamada "pseudogenΨ"). Esta región no traducida es también hipervariable (18,19,20,21).

Para aislamientos divergentes entre sí, es necesario comparar la secuencia de la región más conservada del genoma, es decir la que codifica para la proteína interna o N y que cuando se trata de diferenciar de manera precisa aislamientos próximos (mismo nicho ecológico o misma especie) es preferible el análisis de las regiones variables como G y L, esto ha permitido el desarrollo del árbol genealógico de la rabia en Europa, Estados Unidos de Norteamérica, Brasil, y Sudáfrica (22,23,24,25,26).

En México, utilizando la técnica de PCR y la del análisis del polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLP) y secuenciación, sobre el genoma (regiones hipervariables), se ha determinado que existen al menos 3 ciclos bien definidos: 1) Reservorios aéreos, 2) Reservorios terrestres, y 3) muestras procedentes de zorrillos (hipervariable) (27,28,29).

Las muestras aisladas de murciélagos hematófagos (ciclo aéreo, grupo 1) forman un grupo más compacto que aquellas aisladas de animales terrestres (grupo 2), y las muestras aisladas de zorrillos (grupo 3) forman un conjunto separado que

difiere aproximadamente en un 19% respecto a las que conforman los grupos 1 y 2 (30,31). Reyna, usando la técnica de RFLP reporta también que los dos ciclos, tanto el aéreo como el terrestre se identifican claramente con el uso de las enzimas BamHI y BsrGI; Solo un bajo porcentaje, el 6% no respondió a ninguna de las dos, sugiriendo su posible pertenencia al grupo hipervariable (32).

Objetivos

Los objetivos de este estudio fueron dos:

- 1) Encontrar una solución de formol o de glicerina que en ausencia de medios de refrigeración preserve sin daño alguno y al menos por 7 días, el ARN de muestras de tejido nervioso, de modo que pueda referirse a un laboratorio de biología molecular para su análisis y con ello el diagnóstico de rabia.
- 2) Desarrollar una técnica que permita la extracción del ARN para su análisis por PCR procedente de las muestras preservadas en soluciones de formaldehído o de glicerina.

El uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (8) para examinar el ADN de tejidos preservados en formol o glicerina, puede ser realizado con escasa cantidad del genoma, además de poder trabajar con fragmentos relativamente cortos del mismo, debido a la relativa fuerza estructural química de la molécula, lo que ha permitido analizar especímenes hasta con mas de 40 años de antigüedad (33).

Los estudios a partir del ARN son complicados debido a la fácil degradación de éste por las ribonucleasas, lo que exige técnicas refinadas de manejo y conservación del mismo. Algunos estudios han presentado resultados parciales al obtener solo

fragmentos de ARN después de la digestión prolongada con Proteinasa K de muestras fijadas en formol, para los que fue necesario diseñar especialmente un amplicon de 130-150 pares de bases (pb) siendo el tiempo crítico para obtención de ARN de 4 semanas de fijación (34).

En los últimos años, se ha reportado que los ácidos nucleicos se preservan en óptimo estado, aun después de 8 semanas a temperatura ambiente para la técnica de PCR en soluciones de isotiocianato de guanidina (35), lo que permite hacer llegar a un laboratorio calificado el ARN para su análisis por PCR.

La preservación adecuada de una muestra desde su obtención hasta la extracción de los ácidos nucleicos, es una necesidad prioritaria, sobre todo en las condiciones de nuestro país, tanto de índole económica como tecnológica. El uso de los preservadores a emplear debe ser normado y estandarizado en todos los laboratorios del país, para de esta forma completar la cadena de preservación y garantizar que aun con carencia de medios de refrigeración, sea posible aplicar los métodos de la biología molecular.

CAPITULO 2

EL VIRUS DE LA RABIA

Resefia histórica

" La persona o animal atacada por un perro que padece la locura, invariablemente muere por la misma causa..." esta aseveración es bien conocida desde las primeras civilizaciones. A la rabia, se le cita y describe con exactitud en forma directa o indirecta en la literatura de los pueblos más antiguos, asirios, griegos, egipcios, chinos, galos, romanos y árabes entre otros, pueblos que conocieron y padecieron ésta enfermedad cuyo significado etimológico es "locura" (21).

El término *Virus*, que significa "veneno", (6) fue aplicado por los romanos a la saliva del perro rabioso, ya identificada como la causante de la enfermedad; asociada a la rabia podemos encontrar: dioses, héroes, astros y otros personajes mitológicos como Acteon, Artemisa, Sirio, Aristaeus que actuaban como protectores o acarreadores del mal y que explicaban el origen de la misma. Plutarco asevera que se le observó por primera vez en la humanidad en los días de los asclepiadeos, los descendientes del dios de la medicina Esculapio. Se cree que Homero se refiere a la rabia cuando menciona que Sirio, la estrella perro del Orión, ejerce una influencia maligna sobre la salud de la humanidad. La estrella perro se asociaba con perros rabiosos a través de todo el Mediterráneo oriental y Egipto y posteriormente en Roma (21). Los griegos tenían en su mitología a un dios que contrarrestaba los efectos de la rabia (6).

Entre los escépticos, estudiosos y científicos que la describieron con exactitud y trataron de explicar su origen surgen nombres como Democrito, Aristóteles,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Hipócrates, Plutarco, Epimarcus, Virgilio, Horacio, Ovidio, Plinio, Celso, Aetius el asirio quien da una descripción muy exacta de la enfermedad. Todos ellos trataron de explicar su origen, algunos creando mitos y supersticiones que sobrevivieron durante siglos al hacerse populares.

Durante la edad media la mayoría de las descripciones y reportes de la enfermedad se limitan a brotes aislados originados la mayoría por perros rabiosos y ocasionalmente por lobos, zorros, tejones y aún osos. La primera gran epidemia se describe en el año 1271 causada por lobos; de éstas son particularmente interesantes las surgidas en tierras recién exploradas en donde los brotes alcanzaron niveles alarmantes al encontrar una población virgen, obligando a medidas de erradicación de perros lo que se acompañó de actos de barbarie y crueldad inusitados. Los brotes de rabia afectaron además a porcinos, equinos, y bovinos, siendo tan severas que muchos de ellos fueron clasificados erróneamente como una nueva enfermedad, como los ocurridos en Jamaica, Carolina del norte, Filadelfia, Maryland, etc., todos ellos durante el siglo XVIII (6).

Ya en el siglo XIX la rabia se había reportado en casi todo el mundo. La situación se tornó verdaderamente alarmante en Europa especialmente en Alemania, Francia e Inglaterra, en donde alcanzó niveles de pánico entre la población debido a su alta frecuencia. Zinke, en 1804 reconoció la naturaleza infecciosa de la saliva de un perro rabioso; Luis Pasteur en 1881 demostró por vez primera el neurotropismo del virus de la rabia y el mérito de haber realizado la celebre inoculación con vacuna antirrábica de un niño mordido por un perro rabioso en 1885 al aplicar por primera vez el "Método para la prevención de la rabia después de una mordedura" (21) y

quien además desarrolló los métodos profilácticos aún vigentes que han permitido controlarla y aun erradicarla de algunos países(6).

Remlinger en 1903, demostró la naturaleza viral de este agente por su calidad filtrante, y en el mismo año Negri señaló el valor diagnóstico de las inclusiones intracitoplasmáticas específicas (cuerpos de Negri) en las células nerviosas de los animales rabiosos (19, 21).

Roux fue el primero en reportar el uso de la glicerina en 1887 como un preservador para el virus de la rabia al permitir el aislamiento del mismo de cerebros aún después de 4 semanas (6).

Epidemiología

Las especies que son susceptibles a la rabia se pueden dividir en dos categorías:

La primera son los Reservorios, es decir los animales que mantienen el virus y lo diseminan en forma eficaz, son principalmente predadores como perros, zorros, lobos, coyotes, mapaches, mangostas, zorrillos, etc., así como un mamífero volador que habita en la América latina tropical y subtropical, el murciélago hematófago, llamado vampiro *Desmodus rotundus*. Todos ellos se caracterizan por atacar y morder, actividades propias de carnívoros cazadores (22).

La segunda, corresponde a los animales susceptibles, que pueden padecer la enfermedad, pero no la diseminan tan eficazmente como los primeros. Dentro de esta categoría encontramos a los bovinos, equinos, ovinos, caprinos, porcinos y al ser humano, considerados huéspedes incidentales, pues una vez que el virus los infecta, le resulta más difícil propagarse hacia otros animales susceptibles, debido a que éstos no son predadores.

Se ha observado que los microorganismos patógenos tienden a adaptarse a sus huéspedes naturales, y el virus rábico no es la excepción, ya que se adapta a un reservorio predeterminado por la zona geográfica. El virus adaptado a la especie vector circula y se mantiene en el seno de la misma, y en ciertas ocasiones, en forma extraordinaria, es transmitido a otras especies susceptibles que resultan ser los huéspedes incidentales ya mencionados (22).

En un principio se pensó que el virus de la rabia era único en todo el mundo. Sin embargo, a medida que se desarrollaron técnicas de diagnóstico más finas, a través de los años, los investigadores establecen la existencia de variantes, dependiendo la especie animal involucrada y la zona geográfica y se tienen clasificados actualmente diversos virus relacionados dentro del género *Lisavirus*. (28)

VÉASE CUADRO 1

Serotipo 1

Virus de la rabia clásica: comprende a la cepa prototipo de desafío "Challenge" Virus Standar, (CVS) y a la mayoría de los virus de campo aislados de mamíferos terrestres, del murciélago insectívoro de Norteamérica y de los murciélagos hematófagos de Latinoamérica; también incluye cepas de virus fijo de laboratorio. Se encuentra distribuida en el mundo entero excepto Escandinavia, Islandia, Reino Unido, Irlanda, Australia, Nueva Zelanda, Japón, Hawai y la Antártida. Afecta a hombres, carnívoros domésticos y silvestres, herbívoros y murciélagos.

CUADRO 1. Subgrupos de Lisavirus (28)

Virus	Serotipo	Genotipo	Origen Geográfico	Huésped Original	Huésped secundario
Virus Rábico	1	1	Mundial excepto: Escandinavia, Islandia Reino Unido, Irlanda, Australia, Nueva Zelanda	Perro, gato, Zorro, zorrillo mapache, mangosta, murciélago (América)	Mamíferos, hombre
Legos bat virus	2	2	Nigeria y otros países africanos	murciélago (frugívoro)	Gato, perro
Mokola virus	3	3	Nigeria y otros países africanos	Musarafia, roedores	Gato, perro, hombre
Duvenhage vat Virus	4	4	Sudáfrica, Zimbabwe	murciélago (insectívoro)	Hombre Sudáfrica, 1971
European bat Lyssavirus 1 ^a (EBL-1 ^a)	7	5	Dinamarca, Alemania, Holanda, Rusia Polonia	murciélago (insectívoro)	Hombre (Rusia, 1985)
European bat Lyssavirus 1b (EBL-1b)	?	5	Holanda, Francia, España	murciélago (insectívoro)	
European bat Lyssavirus 2a (EBL-2a)	?	6	Holanda, Reino Unido	murciélago (insectívoro)	
European bat Lyssavirus 2b Bat (EBL-2b)	?	6	Finlandia, Suiza	murciélago (insectívoros y frugívoros)	Hombre Finlandia 1986
Australian bat Lyssavirus	?	?	Australia	murciélago (insectívoros y frugívoros)	Hombre Australia 1997

Tomado de Ronsholt L, et al. Clinically silent rabies infection in (Zoo) bats.

Veterinary Record 1998; 142: 519-520.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Serotipo 2

Virus Lagos bat. Primeramente aislado de una mezcla de cerebro de murciélagos en Nigeria (Lagos bat 1), después se aisló en un murciélago de la República Central de África (Lagos bat 2) y un tercero aislado en un murciélago de Guinea y un gato en Zimbabwe (Lagos bat 3). Este virus se encuentra distribuido en Nigeria, República Centroafricana, África del sur, Zimbabwe, Guinea, Senegal y Etiopía. Afecta a murciélagos frugívoros, gatos y perros.

Serotipo 3

Virus Mokola. Aislado por primera vez de musarañas de Nigeria y luego de un humano (Mokola 1), después se encontró en las musarañas de Camerún (Mokola 2) y luego fue aislado de perros de Zimbabwe (Mokola 3). Se encuentra distribuido en Nigeria, República Centroafricana, Zimbabwe, Camerún y Etiopía; afecta a hombres, musarañas, gatos, perros y roedores.

Serotipo 4

Virus Duvenhage. Primero se aisló de un humano de Sudáfrica (Duvenhage 1) después de un murciélago de Sudáfrica (Duvenhage 2) y finalmente de murciélago de Zimbabwe (Duvenhage 3). Se distribuye en África del sur y Zimbabwe, afecta a hombres y murciélagos insectívoros(29).

Los siguientes Lisavirus no tienen un serotipo definido:

Genotipo 5

Lyssavirus de Murciélago Europeo 1(EBL1). Se encuentra distribuido en Holanda y afecta a hombres y murciélagos insectívoros (géneros Epseticus pipistrellus) (28).

Genotipo 6

Lyssavirus de Murciélago Europeo 2 (EBL2). Se distribuye en Holanda y afecta a hombres y murciélagos insectívoros (géneros myotis) (17,19,30,31,32,33,34,35).

Aún sin clasificación se encuentra el Lisavirus hallado en murciélagos insectívoros y frugívoros australianos y causantes de la muerte de un hombre en el año de 1997 (36).

En Europa, varios países del Oeste como Bélgica y Francia, han permanecido libres de rabia silvestre en el año 2000 y 2001, esto gracias a la erradicación de la rabia canina debido a la vacunación de los perros domésticos y de la eliminación de perros callejeros (36) como primer paso y luego a la aplicación de la vacuna oral en zorros.

La adaptación del virus rábico al zorro rojo (*Vulpes vulpes*), ha permitido que ésta prevalezca a bajos niveles en el resto de Europa; en el 2001, se reportaron 2911 casos en total, siendo 2295 casos de animales silvestres, de estos fueron 2010 casos en zorros, el resto en lobos, mapaches, venado rojo, tejón, etc. En animales domésticos se reportaron 614 casos que involucran a perros y gatos principalmente con 442 casos, bovinos con 133, 23 en ovinos y el resto en otros animales. Se reportaron también dos casos en humanos en Rusia (38).

Por lo común, las personas que llegan a presentar la enfermedad en el continente europeo, fueron mordidas o agredidas por animales rabiosos silvestres o en regiones endémicas de Africa y Asia (39).

En Asia se identifican la mayoría de los casos de rabia humana en el mundo, generalmente se acepta que el número estimado de muertos es del orden de 36000 al año, de los cuales la mayoría se concentran en la India. Ciertos países han hecho disminuir sensiblemente el número de casos (China, Indonesia, Malasia, Tailandia). El principal vector de rabia en Asia es el perro (30,31).

En África, el perro continúa siendo también el principal vector de rabia (alrededor del 90%) (40) y ciertas especies silvestres, notablemente la mangosta amarilla (Cynictis penicillata), juega un papel importante en ciertas áreas (41).

Sin embargo, En Sudáfrica hay una gran diversidad de especies animales que están involucradas en la epidemiología de la rabia, se incluyen entre éstas, el chacal lomo negro (Canis mesomelas), el chacal rayado (Canis adustus) y el zorro orejas de murciélago, los zorros voladores (Otocyon megalotis) y gatos salvajes (Felis lybica) (42,43). Se han identificado 2 biotipos del virus de rabia por PCR, uno para la familia *Canidae*, y otro para la familia *Viverridae* (44).

En Kenia, un muestreo de animales salvajes reportó la detección de anticuerpos de virus rábico en 72 hienas y 18 perros salvajes (45).

Como ejemplo de la adaptación y de la circunstancia cambiante del virus de la rabia es el que se ha presentado en algunas islas del Caribe, como Cuba, pues en estos lugares se importaron mangostas del continente asiático para control de roedores durante el presente siglo. Este animal predador, que anteriormente no existía en dicho hábitat, actualmente se ha convertido en el principal reservorio de la rabia en esas latitudes (22).

Rabia en América

En 1994, quince de los veintidós países latinoamericanos reportaron 144 casos de rabia en humanos, siendo el perro la especie más frecuentemente incriminada como fuente de infección. El área andina en Perú, fue la subregión y país que presentaron mayor número de casos con 41.7% y 28.5% respectivamente (46).

En Brasil, Chile y Paraguay, los estudios de epidemiología molecular, reportan la existencia de dos ciclos epidemiológicos con diferentes reservorios, el de los perros, y el que implica a murciélagos hematófagos y recientemente a no hematófagos (37,47,48,49).

En Canadá y Estados Unidos de Norteamérica una vez que la rabia canina ha sido controlada se ha revelado que murciélagos no hematófagos, insectívoros principalmente, son transmisores ocasionales y remanentes de la rabia en el ser humano. Durante 1980 a 1996, se han reportado en los Estados Unidos 17 decesos por rabia asociados con murciélagos insectívoros; 12 decesos asociados con perros fuera del país; 2 asociados con perros domésticos autóctonos y un caso asociado con un zorrillo (50). En 1999 fueron reportados 7067 casos de rabia animal, mientras que solo 5 casos de rabia en humanos, de estos, 4 casos por contacto con murciélagos y uno por contacto con un perro (51).

Rabia en México

Debe considerarse la situación geográfica de México, en donde confluyen dos zonas del continente Americano, la neoártica y la neotropical, lo que provoca que a pesar del gran deterioro ecológico, encontremos aun una gran riqueza genética que complica el problema de la rabia.

Los murciélagos vampiros (*Desmodus*) transmiten la rabia parálitica bovina en regiones endémicas del trópico que se extienden desde el Norte de México, al Norte de Argentina y al Caribe. De los tres géneros de murciélagos hematófagos: *Desmodus*, *Diphilla* y *Diaemus*, el primero tiene la más amplia distribución ya que se encuentra en toda la región Tropical y Subtropical de América Latina, dada su accesibilidad, prefiere la sangre bovina y son transmisores muy eficaces de la rabia (30). *Diphilla* y *Diaemus* tienen una distribución más limitada y al preferir sangre de aves su importancia como vector ha sido considerada poco importante, así como la de los murciélagos frugívoros, hasta que los estudios de epidemiología molecular han demostrado la implicación ocasional de estas especies (48,52).

En México, la rabia es endémica en los bovinos y comprende los estados de Campeche, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco, Veracruz y Yucatán, en forma parcial los estados de Chihuahua, Durango, Hidalgo, México, Puebla, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas (21,30).

Los reportes de casos clínicos de rabia en México en el periodo de 1986 a 1995 fueron 6809, de los cuales solo 972 fueron diagnosticados por laboratorio; se asocian 52 casos de rabia en humanos con murciélagos (53).

Otros reportes de casos de rabia animal confirmada por laboratorio entre 1989 y 1994, observan una reducción sostenida a partir de 1990, con un rango entre 4,668 en 1989 y de 1,443 para 1994. El perro fue en el 91% de los casos, la especie más afectada, seguida por el gato 3.4%, el murciélago 0.3% y el restante 5.3 por otras especies (30).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el periodo de 1989 a 1995, ocurrieron en el país 265 casos de rabia humana, la mayor frecuencia ocurrió en el grupo de edad entre 5 y 14 años, representando el 57% del total. La principal especie agresora fueron el perro, el que contribuyó con 226 casos (86%), seguidos por los murciélagos con 22 (8.4%), gatos 8 (3%), y 6 casos (1.6%) provocados por bovinos, zorro, mapache, coyote, gato montés y zorrillo (30,54). En general, la principal especie responsable en la transmisión de la rabia a los humanos es el perro con 82% aproximadamente, siguiendo los murciélagos con un 6.5 a 8%, el resto se debe a un tipo no determinado de fauna (32). México ocupa uno de los primeros lugares en incidencia en América Latina (55).

Presentación urbana de la rabia:

En la presentación urbana, los perros son una población en crecimiento, por razones de seguridad y protección, esto genera a su vez un incremento de perros ambulantes o que son verdaderamente callejeros. El gato es infectado accidentalmente y representa un riesgo para el humano, pero no juega un papel importante en la cadena de transmisión y mantenimiento. La rata no representa ningún papel en la epidemiología de la enfermedad (20, 21).

La mordedura, es la más importante ruta de transmisión de la rabia. En los perros, son los animales jóvenes, con una edad de 4 meses, más susceptibles que los adultos. La propagación y transmisión por aerosoles ha llegado a ocurrir en cavernas con grandes poblaciones de murciélagos donde su orina y heces contienen virus rábicos que encuentran temperatura y humedad adecuadas o en

laboratorios donde se trabaja con grandes volúmenes de virus concentrado (21,56).

En las zonas afectadas, la rabia no esta uniformemente distribuida, pudiéndose encontrar tanto zonas libres como zonas de bajo y de alto riesgo, también áreas con brotes epidémicos (30,57).

La letalidad a la rabia es del 100% en humanos; la susceptibilidad varia en las diferentes especies, siendo muy alta para Zorros, cóyotes, chacales, lobos, ratas, y ratones. Alta para hámsters, zorrillos, mapaches, gatos y murciélagos, moderada para perros, ovejas, cabras, caballos y primates, por último las zarigüeyas son de susceptibilidad media (6, 30).

Manifestaciones clínicas de la rabia

El virus de la rabia se transmite mediante la saliva por la mordedura de un animal infectado produciendo encefalomiелitis (57,58,59,60).

Es una enfermedad fatal, por lo que el diagnóstico temprano en los animales sospechosos es muy importante en salud pública para las personas que fueron mordidas o expuestas a un animal posiblemente rabioso ya que estos tienen una variedad de signos clínicos que dificultan diferenciarla de otras formas de encefalomiелitis aguda (61).

La edad reportada en gatos y perros transmisores, es desde las ocho semanas hasta los ocho años, aunque actualmente son los cachorros los más frecuentemente involucrados. El reporte principal del propietario es el cambio en la conducta del animal como depresión, demencia o vicios. El animal puede estar extremadamente desorientado y atacar objetos inanimados. Otras anomalías



son prurito, coprofagia, pica, conducta sexual anormal, ladrido anormal, y exceso de jugueteo. El animal puede parecer demente, tener ptialismo marcado, disfagia, depresión y otros trastornos de nervios craneales y del alto tallo cerebral. Ataxia y parésis de los miembros posteriores. El curso clínico de la enfermedad desde la aparición de los signos hasta la muerte, se considera que dura de 3 a 8 días (61,62,63).

El establecimiento de una infección depende de la inoculación del virus en una herida, la cual, en las infecciones naturales, se produce corrientemente por mordedura de un animal rabioso. La contaminación de una herida reciente por saliva o tejidos infectados es de riesgo mucho menor.

No hay duda de que el virus se transporta a través de los nervios periféricos hasta el sistema nervioso central, y de allí continuar centrifugamente por todos los nervios periféricos, de tal modo que en los casos fatales el virus puede hallarse en el sistema nervioso central y el periférico así como en otros tejidos y la leche. Este tipo de migración a lo largo de los nervios periféricos es una peculiaridad de los virus neurotrópos más estrictos. En los mamíferos, el virus de la rabia tiene una afinidad también por las glándulas salivales, en los murciélagos parece que la afinidad por éstas glándulas puede ser mayor que la que se muestra por el tejido nervioso (63).

En la enfermedad transmitida al hombre, el periodo de incubación es de entre uno y dos meses, acortándose en los casos de laceración severa múltiple con introducción de grandes cantidades del virus. La enfermedad inicia como en otros tipos de encefalitis con prodromos de malasia, fiebre, anorexia, nausea, garganta

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

adolorida, somnolencia, irritabilidad y debilidad. Pudiendo presentarse hiperestesia, parestesia o anestesia en el área de la mordedura y a lo largo de los nervios periféricos involucrados. El progreso de la enfermedad se acompaña del incremento en la ansiedad e hiperexcitabilidad con fiebre recurrente, delirio, movimientos masticatorios involuntarios y convulsiones generalizadas se observan con frecuencia y conducta maniaca alternada con periodos de letargia. Violentas contracciones espasmódicas de los músculos de la boca, faringe o laringe al intento de beber o a la simple vista del agua, son las características patognomónicas que le dan a la rabia el sinónimo de hidrofobia (64,65).

Los espasmos dolorosos pueden iniciar con estímulos relativamente medianos como la luz o el tacto, el paciente puede eliminar profusamente la saliva al evitar el acto de la deglución de la misma, la cual esta asociada con el espasmo. Dentro de pocos días la condición del paciente empeora, su pulso se incrementa, la respiración se torna laboriosa e irregular, la temperatura aumenta marcadamente. Los periodos de respuesta se hacen menos frecuentes, los espasmos pueden terminar en parálisis. El colapso periférico vascular, el coma y la muerte sobrevienen. La enfermedad rara vez sigue un curso de mas de 5 o 6 días, siendo siempre fatal (65).

Patología

En el hombre los cambios principales se encuentran en el SNC consistiendo en necrosis neuronal en la mayor parte del tálamo, hipotálamo, materia gris, pons y médula. Los núcleos de los nervios craneales severamente dañados y la inflamación por mononucleares se hace patente aquí mas que en cualquier otro

lugar. El cordón espinal muestra cambios neuronales especialmente en las astas o cuernos posteriores. La inflamación es grave en la médula y en el bulbo, pero mucho más moderada hacia hemisferios cerebrales. Las lesiones de la rabia son típicas de la encefalomielititis no supurativa con ganglioneuritis y adenitis parotídea. No hay lesiones macroscópicas (64).

En los animales las alteraciones inflamatorias y degenerativas son más graves desde el puente hasta el hipocampo y en la médula cervical, respetando relativamente el bulbo. Esta falta relativa de afección del bulbo parece ser aplicable a todas las especies domésticas. Las lesiones más graves de la enfermedad se encuentran generalmente en los perros, mientras que otras especies, especialmente los rumiantes que son altamente susceptibles, pueden mostrar poco más que algún vaso con un ligero infiltrado linfocitario perivasculoso, y muy pocos nódulos gliales pequeños (nódulos de Babes) a pesar de mostrar abundantes corpusculos de Negri (63).

Los cuerpos de Negri intracitoplasmáticos se encuentran por lo general en las neuronas del hipocampo y en las células de Purkinje del cerebelo. Al examen neurológico, se observan signos de los nervios craneales del tallo cerebral como caída de mandíbula, parálisis facial, ataxia y parálisis flácida de los miembros con depresión o ausencia de reflejos espinales, el estado febril y conjuntivitis son comunes (62).

La muerte sobreviene por paro respiratorio ocasionado por la degeneración neuronal del centro respiratorio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Clasificación del virus.

El virus de la rabia se clasifica dentro del orden Mononegavirales, que agrupa a virus que poseen ARN monocatenico, no segmentado y de polaridad negativa. Comprende tres familias: *Paramyxoviridae*, *Filoviridae* y *Rhabdoviridae*. Dentro de la familia *Rhabdoviridae* se agrupan una gran cantidad de virus que afectan a mamíferos, peces, crustáceos, reptiles y plantas. Los *Rhabdoviridae* que infectan a mamíferos se dividen en tres géneros: Los Vesiculovirus (virus de la estomatitis vesicular; VSV), los Ephemerovirus (virus de la fiebre efímera bovina) y los Lyssavirus (virus de la rabia) (57,66,67,68).

Los *Rhabdoviridae* son virus con espículas, estructura helicoidal interna, y estructura morfológica muy particular (69,70,71). El género Lyssavirus, tiene forma de bala de fusil y son virus envueltos.

Propiedades y características morfológicas del virus rábico.

Los rhabdovirus son virus frágiles, inactivados por calor, los rayos ultravioletas, la desecación, los solventes orgánicos y la tripsina. Son bastante estables entre pH 5 y 10. Los rhabdovirus se conservan varios días a 4 °C y durante mucho tiempo a -70 °C y liofilizados. El virus de la Estomatitis Vesicular VSV ha sido el más estudiado y sirve como virus de referencia de los rhabdovirus. A pesar del gran parecido, la analogía antigenica entre los diferentes géneros de rhabdovirus es poca; por ejemplo, las proteínas G del virus de la rabia y de VSV solamente tienen 20% de homología en frecuencia de aminoácidos (21,41,63,72).

Observado con microscopio electrónico, el virión rábico presenta un diámetro de 75nm y un largo que varía entre 130 nm y 180 nm; la envoltura viral está erizada

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de espículas de 9 nm de longitud (38,72). Está constituido por una doble envoltura fosfolípida, de un ácido ribonucleico enrollado en espiral y de cinco proteínas mayores (Figura 1). La replicación del genoma viral tiene lugar en el citoplasma celular.

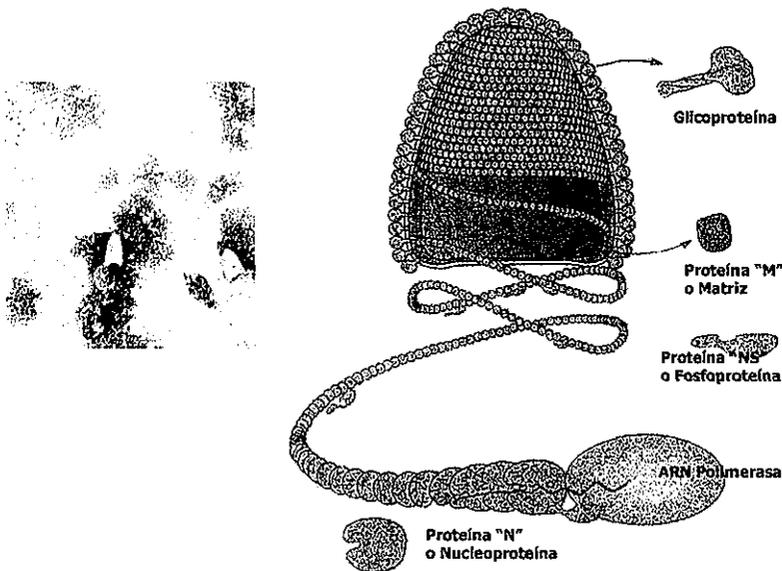


Figura 1. Esquema de las estructuras del virus rábico, basado en la forma de bala del virus mostrada en la fotografía.

Una sola molécula de ARN está presente por virión, constituida de 11932 nucleótidos y peso molecular de 4,6.106 daltones. El ARN del genoma es de polaridad negativa, lo que significa que el genoma no puede ser transcrito directamente a proteínas virales por los ribosomas celulares, se requiere de un

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

paso de transcripción preliminar para producir el RNAs mensajero complementario de cadena positiva capaz de producir las proteínas virales (70).

El virión contiene 67% de proteína, 26% de lípidos, 4% de RNA y 3% de carbohidratos vinculados en forma covalente al lípido y proteína. Se han identificado cinco polipéptidos del virus (20,63).

Este virus esta compuesto de 2 unidades estructurales: Una envoltura externa de lipoproteína que es de origen celular y la ribonucleocápside (RNP), una estructura enrollada helicoidal interna que envuelve al genoma viral tan estrechamente que es insensible a la actividad de la ribonucleasa.

El virión entra a la célula por pinocitosis por medio de una proteína de transmembrana G que se une a un sitio aún no conocido. Sobre la superficie celular y después de la fusión de las membranas viral y lisosomal, la ribonucleocápside es liberada al citoplasma celular, la RNP posee todos los elementos virales necesarios para la transcripción y replicación(70).

El genoma rábico.

El virus rábico está constituido por cinco proteínas, cada una de las cuales es codificada por un gen. La secuencia de los 11932 nucleótidos del genoma de la cepa Pasteur virus (CPV) del virus de la rabia ha permitido estudiar los elementos reguladores de la transcripción y de la replicación. La secuencia completa de aminoácidos fue deducida de la secuencia de los genes que codifican respectivamente las 5 proteínas: N, M1, M2, G y L. Por otro lado, el análisis de las secuencias parciales de diferentes Lyssavirus ha permitido su estudio comparativo y evolutivo (21,63,70,73).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La nucleoproteína N (450 aminoácidos), estrechamente asociada al ARN viral es expresada en abundancia en el huésped después de una infección por virus rábico. La Proteína N es una de las más conservadas y se utiliza para estudios de diagnóstico de Iisavirus (32,55,74).

La fosfoproteína NS o M1 (297 aminoácidos), se acumula en el citoplasma de las células infectadas. Inicialmente se había propuesto que esta proteína formaba parte de la envoltura; por esta razón, le fue atribuida la denominación M1, por primera proteína de membrana no glicosilada. Posteriormente, se demostró que no forma parte de la membrana sino de la Nucleocápside. La proteína M1 rábica y la NS de VSV son dos denominaciones de la misma proteína y solamente la denominación NS debe de ser empleada para todos los Rhabdovirus. Todavía se desconoce que papel juega esta proteína en la protección.

La proteína L (2142 aminoácidos) "Large" es responsable de la transcripción y de la replicación del ARN viral, es la más conservada de todas las proteínas de los virus ARN monocatenarios de polaridad negativa. Ésta estabilidad aparentemente resulta de la necesidad de conservar funciones enzimáticas vitales para el virus. Ningún anticuerpo monoclonal específico de la proteína L del virus rábico ha sido obtenido hasta hoy, lo que aparentemente refleja el carácter "universal" de los motivos antigénicos que ella posee (39,51). Estas tres proteínas (N, NS, L), asociadas al ARN viral, constituyen la "Nucleocápside".

La proteína M (202 aminoácidos), se localiza sobre la cara interna de la envoltura lipídica. Es la menor de las proteínas del virus de la rabia. A diferencia de VSV, la proteína M del virus de la rabia no está fosforilada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La glicoproteína G (504 aminoácidos) está inserta en la membrana lipídica del virus; es la responsable de la inducción de los anticuerpos neutralizantes y de la estimulación de los linfocitos T, es la única proteína externa del virión y representa aproximadamente un tercio de la masa proteínica viral (20,63,70,75).

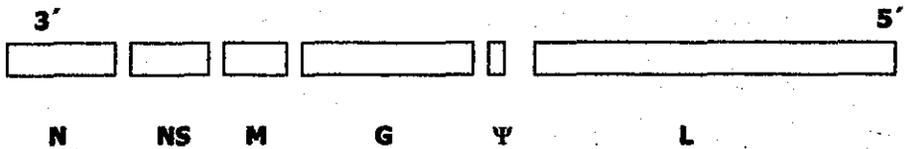


Figura 2. Representación esquemática del genoma (y sus proteínas) del virus de la rabia (31, 71).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO 3

MATERIAL Y METODOS

Clasificación del estudio:

Este es un estudio de tipo observacional, descriptivo.

Criterios de inclusión:

Se utilizaron para este estudio las siguientes muestras:

Una muestra de encéfalo humano perteneciente a un niño muerto de rabia, preservada en formol sin conocerse el tiempo de fijación de la misma, cuando se efectuaron los estudios; se le calcularon 3 meses como mínimo.

Una muestra de cerebro embebido en parafina del mismo niño muerto de rabia.

31 cerebros de ratón infectados con la cepa CVS del virus rábico.

Diez cerebros de ratón infectados con la cepa HQ-01 del virus rábico.

Diseño del Estudio

Inicialmente se tenían solo las muestras de encéfalo humano en formol y en bloque de parafina, al no conocerse exactamente el tiempo de fijación del cerebro ni la concentración usada del formol, se decidió iniciar el estudio con cerebros de ratón inoculados con el virus de la rabia, preservándolos en una solución de formol al 15% durante 24 horas, aumentando el tiempo de fijación hasta que ya no fuese posible obtener el ARN de las muestras.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Inoculación del virus

Se utilizaron los virus rábicos cepa Challenge Virus Standard (CVS) y el virus aislado HQ-01, procedente de un murciélago hematófago del Estado de México y pertenecientes al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Se descongeló cada cepa durante 10 min. se centrifugó a 2000 xg durante 2 min del sobrenadante se tomó 1ml al que se agregaron 9ml de medio Baby Hamster Kidney (BHK), todo el procedimiento se realizó a 4 C.

Se anestesiaron un total de 41 ratones de la cepa Balb/C, de 20-21 días de edad por vía intraperitoneal con 0.08 ml de Ketamina (ketamina 50 mg/ml, sector salud); 31 ratones se inocularon con cepa CVS y diez ratones con cepa HQ-01, todos con 0.03 ml por vía intracerebral.

Después de 7 días los ratones mostraron como signos pelo hirsuto, movimientos lentos, incoordinación, columna vertebral arqueada y parálisis, procediéndose entonces a su sacrificio en una campana con monóxido de carbono y se extrajeron el cerebro y cerebelo completos. Se comprobó por la prueba de anticuerpos fluorescentes PAF la presencia del virus, mismo que resultó positivo para todas las muestras. Los encéfalos se mantuvieron en congelación a -75 C.

Fijación con formaldehído

Se sumergieron 22 mitades de encéfalo en solución de formaldehído al 15% Y 12 mitades con formaldehído al 10% durante 1, 2, 4 y 7 días. Transcurridos los siete días, se sumergieron en 100 ml de solución salina fisiológica (SSF) durante 30 min. Finalmente en 100 ml de solución al 1% de albúmina sérica de bovino por otros 30 min. Todas las muestras se congelaron a -20 C.

Preservación con Glicerol.

Se sumergieron cuatro mitades de encéfalo en solución de glicerol al 80%, otras cuatro en solución al 50% y cuatro en solución al 40% con variables de 1, 2, 3, 7 y 21 días. Para su lavado se sumergió cada mitad de encéfalo en 50 ml de solución buferada de fosfato (Phosphate Buffer Solution, PBS) a 4 C, agitándose durante 3 minutos y repitiéndose el procedimiento 3 veces. Las muestras fueron almacenadas a -20 C.

Digestión con Proteinasa K

A cada mitad de encéfalo fijado en formol se le adicionaron 100 µl de Proteinasa K (10mg/ml) (76), se maceró en el homogeneizador de Tembruk y se incubó a 54 C durante de 1, 2, 8 y 24 h. Las muestras con digestión de 8 y 24 h se incubaron a TA. Después de la incubación y para desactivar a la Proteinasa K, se calentó la mezcla a 75 C durante 5 min. Las muestras fueron almacenadas a -20 C (78).

Técnica de desparafinación

Se hicieron 105 cortes con el microtomo a 10 µm de grosor de la muestra de cerebro de niño en bloque de parafina. Se colocaron 5 muestras en cada tubo de 1.8 ml, tratando de eliminar al máximo el exceso de parafina.

Se añadió 1 ml de eptano a cada tubo y se mezcló en agitador a TA durante 30 min. Enseguida se centrifugó a 20,000 Xg durante 5 minutos. Se removió el eptano y se repitió todo el procedimiento. Se adicionaron 0.5 ml de Etanol al 100% a cada tubo y se mezcló invirtiéndolo. Se centrifugó a 20,000 Xg. Se eliminó todo el etanol

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

posible. Se repitió este procedimiento y finalmente se dejó secar en estufa a 26 C durante 10 min. Estas muestras se digirieron con Proteinasa K (81).

Proceso de extracción de ARN

Se utilizó el protocolo de extracción del TRizol (77), cuyo componente es una solución de Isotiocianato de guanidina y fenol.

Para cada extracción se tomó la mitad de un encéfalo, el peso aproximado fue de 80-100 mg por muestra. Se maceró la muestra en un homogeneizador de Tembruck, agregando 1ml de TRizol por cada 100 mg de muestra.

En las muestras digeridas con Proteinasa K, o en las muestras frescas, el macerado se transfirió a viales de 1.8 ml de capacidad.

Se incubaron las muestras homogeneizadas por 10 min para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteína. Se le adicionaron 0.2 ml de cloroformo; se tapó y agitó vigorosamente por 15 seg, incubándose nuevamente durante 5 min. La muestra se centrifugó durante 15 min a 12,000 Xg a 5 C; sólo se utilizó la fase superior transparente en la que permanece el ARN, siendo el volumen de ésta, un 40 a 60% del volumen inicial.

Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se le adicionó 0.5 ml de Alcohol isopropílico. Se incubó durante 10 min a TA y se centrifugó a 12,000 Xg por 10 min a 5 C.

Se tiró el líquido sobrenadante quedando en su caso el ARN adherido a la pared del tubo; se le adicionó 1ml de etanol al 75%. Se mezcló en el agitador y se centrifugó a 7,500 Xg por 5 min a 5 C.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Obtención del ADN complementario (ADNc)

En un tubo de 500 µl se mezclaron los siguientes reactivos y cantidades:

ARN -5 µl, Dithiothreitol (DTT) -2 µl, Buffer Fs-4 µl, Rnasin- 0.5 µl, DNTP'S (10mM) - 2µl y H₂O DEPC-4.5 µl.

La mezcla se calentó a 80 C durante 5 min; a continuación se colocó en hielo durante 1 min. Se le agregó 1 µl de Primer G (250ng) y se calentó a 65 C durante 10 min colocandose inmediatamente en hielo durante 1 min. Se agregó 1 µl de SuperScript y se eliminaron las burbujas con agitación, se incubó 1 h a 37 C. El volumen final de la reacción fue de 20 µl. Para inactivar la reacción se calentó a 98°C durante 5 minutos. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C (9, 70).

Amplificación de productos por PCR

Para amplificar el fragmento de ADNc de interés (porción G-L) se procedió a mezclar los siguientes reactivos en un tubo de 500 µl :

DNAc-5 µl, DNTP'S (2mM)-2 µl, Mezcla de iniciadores G3 y G4 (10mM)-1 µl, Buffer PCR (10X)-2 µl, *Taq* polimerasa(250-500 U/ µl) -0.5 µl y H₂O DEPC-9.5 µl.

Se homogeneizó perfectamente en agitador y se colocó el tubo en el termociclador, bajo el siguiente programa.

Ciclo 1: 94°C durante 3 minutos	Repeticiones:	1
Ciclo 2:		
Fase 1: 94°C durante 30 segundos		30
Fase 2: 60°C durante 30 segundos		30
Fase 3: 72°C durante 1 minuto	Repeticiones:	30
Ciclo 3: 72°C durante 3 minutos		1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Después de completarse el programa, las muestras se almacenaron a -20 C (9,70).

Para la determinación de tamaño del producto amplificado, se agregó un carril con marcador de peso molecular ladder de pB y otro con el marcador Lambda Hind III, que marca a 702 y 1264 pB.

La prueba de PCR se acompañó de los siguientes testigos:

1 positivo a PCR(tejido en fresco positivo a rabia)

1 negativo a PCR(ratón no inoculado)

La fotodocumentación de este trabajo se realizó con cámara fotográfica Polaroid con filtro UV, y película blanco y negro (22,24).

Las cepas del virus de la rabia CVS y HQ-01, ratones y todo el material para este trabajo realizado de noviembre de 1999 a agosto de 2001. Son propiedad del Laboratorio de la Unidad de Investigación en Inmunología del Hospital de Pediatría del Centro Medico Nacional Siglo XXI, IMSS.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO 4

RESULTADOS

Muestras preservadas en glicerina

Se procesaron un total de 16 muestras de cerebro de ratón inoculado con virus de rabia cepa CVS y cepa HQ-01 y preservadas en glicerina a TA, misma que varió de acuerdo a la hora del día hasta en 21 C. **Cuadro 2.**

Inicialmente se utilizó la glicerina a concentraciones de 80%, 50% y 40% con cuatro muestras para cada concentración. A la totalidad de las muestras preservadas en glicerina al 50% fue posible extraerles el ARN. En contraste, no se obtuvo ARN de ninguna de las cuatro muestras conservadas en glicerina al 40% ni de las cuatro al 80%.

En las siguientes doce muestras se usó sólo la concentración de glicerina al 50%.

El tiempo mínimo de inmersión de la muestra en glicerina fue de un día, con variables de 3, 4, 7, 14 y 21 días como se observa en las **figuras 3, 4, 5 y 6.**

De todas las muestras fue posible extraer el ARN y también obtener el producto amplificado del virus de la rabia mediante PCR, obteniendo el fragmento esperado en los 872 pares de bases.

Con la finalidad de evitar errores y la posible degradación de alguno de estos componentes, desde la extracción del ARN hasta la obtención del producto amplificado del virus rábico, todo el procedimiento se realizó aproximadamente en 7-8 h en el mismo día.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Muestras fijadas con Formaldehído

El presente estudio dio inicio con el intento de extracción de ARN partir de la muestra de cerebro del niño; se realizaron en total 46 pruebas de extracción de ARN con Trisol en trozos de cerebro de forma cúbica de 0.5 cm. Se procedió lavando las muestras con agua bidestilada desionizada, sometiéndolas directamente a la acción del mismo de acuerdo a protocolo y con resultado negativo.

Muestras digeridas con Proteinasa K

En todas las pruebas subsecuentes se utilizo Proteinasa K a concentración de 10 mg/ml, en volumen de 100 µl para cada muestra, iniciando con tiempos de digestión de 1 hora y aumentándose a 2, 4 y 8 h a 54 C en baño María siendo negativas también estas pruebas. Se repitieron las pruebas aumentando la concentración de Proteinasa K a 22 mg/ml y una serie más con la misma concentración pero aumentando el volumen a 500 µl para cada muestra. También se aumento el tiempo de digestión a 24 h. Utilizando ambas concentraciones con 500 µl para cada muestra. Todas las pruebas fueron negativas.

Muestras con técnica de desparafinación

El siguiente objetivo fue la muestra del bloque de parafina. Después de aplicar la técnica de desparafinación se realizaron 23 pruebas de extracción de ARN con trisol, previa digestión de las mismas con Proteinasa K, iniciando con concentraciones de 20mg/ml y posteriormente de 50, 100 y de 200 mg/ml; el volumen de las muestras inició con 150 µl, pasando por 500 µl, 1 ml y 2 ml. Con

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

tiempos de digestión de 2, 4, 12, 18 y 24 h a 37 y a 54 C. Tampoco fue posible la extracción del ARN.

Muestras de los ratones inoculados con el virus rabico

Se realizaron un total de 34 pruebas de extracción con trisol, 22 de ellas utilizando formaldehído a concentración del 15% y 12 muestras al 10%. Los tiempos de fijación de las muestras fueron de 1, 2, 4 y 7 días. Al finalizar con el tiempo de fijación asignado, las muestras se lavaron con agua adicionada de albúmina de bovino al 1% durante 30 min. Al igual que en las anteriores muestras se utilizaron primero tiempos de digestión con Proteinasa K de 1, 2,4,8 y 24 h con 100 µl por muestra a concentración de 10 mg/ml para cada una de las concentraciones ya mencionadas. Todas las pruebas resultaron igualmente negativas. La concentración de Proteinasa K se elevó hasta 200 mg/ml sin que fuese posible obtener una sola extracción de ARN positiva. Las pruebas se aplicaron a muestras con los dos tipos de cepas empleadas.

Para verificar el correcto funcionamiento de las pruebas, se utilizaron 7 muestras sin preservar en formaldehído, obteniendo extracciones positivas de ARN de todas las muestras control. Después de las primeras 24 h en formol, las muestras tenían un aspecto elástico y duro semejante a una liga, no habiendo variaciones comparadas con las muestras de 7 días.

El tiempo de digestión mínimo de las muestras con Proteinasa K a 56°C, fue de 1 hora, con variables de 2, 4, 8, 20, 24 y 48 horas, siendo los mayores tiempos de digestión de hasta 5 y 7 días.

La concentración de la Proteinasa K también fue variable, iniciando con 4 mg/ml y posteriormente con 6, 11, 20, 200, 590, 1120 y 1690 mg por cada ml.

Los experimentos iniciaron con la concentración más baja de Proteinasa K y el menor tiempo de digestión, aumentándose gradualmente ambos hasta probar la mayor parte de las combinaciones lógicas posibles.

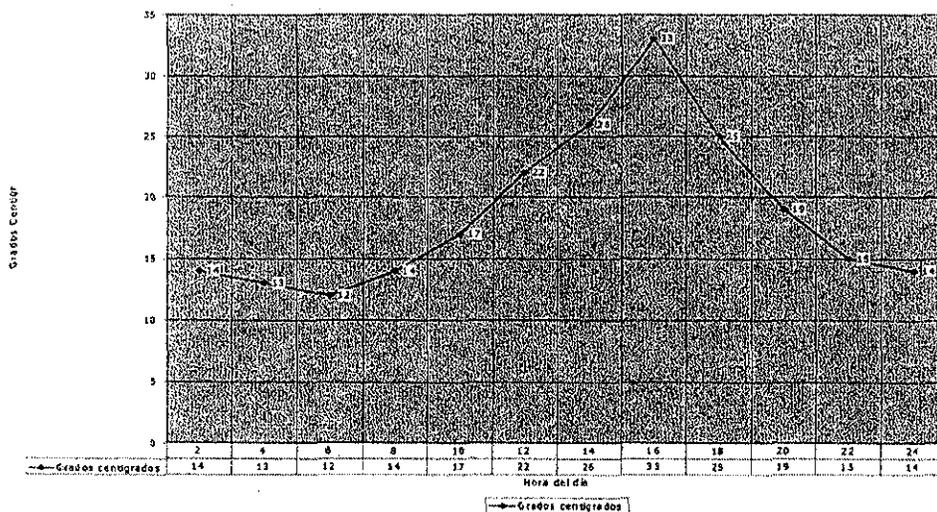
Se observó al microscopio las muestras post-digestión para corroborar el estado de las membranas, mostrándose muy poca actividad digestiva sobre ellas.

También se sometieron a digestión durante 20, 24 y 48 h, 5 y 7 días, muestras positivas a rabia conservadas en bloques de parafina, previamente desparafinadas con heptano y cortadas a 10 μm de grosor. Utilizándose las más altas concentraciones de Proteinasa K.

No fue posible obtener ARN de ninguna de las muestras mencionadas, aún aplicando los tiempos de digestión más largos y con las concentraciones de Proteinasa K más altas.

Cuadro 2. Variación de temperatura dentro del laboratorio en 24 horas

Cuadro 2. Variación de temperatura en 24 horas



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

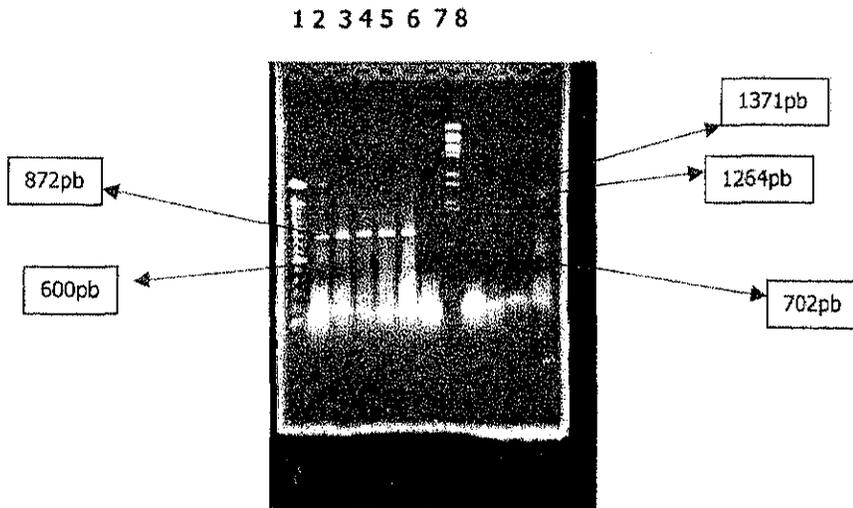


Figura 3. Gel de Agarosa donde se muestra el producto de amplificación del virus de la rabia de dos muestras preservadas en glicerina durante uno y tres días.

Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2: testigo positivo. Carriles 3 y 4: amplicón del virus de la rabia de muestras preservadas durante un día. Carriles 5 y 6: amplicón del virus de la rabia de muestras preservadas durante 3 días. Carril 7: control negativo. Carril 8: marcador de peso molecular λ / Hind III. Se puede apreciar claramente la formación de la banda del amplicon de la rabia en los 872 pares de bases de las muestras preservadas durante 1 y 3 días. Se han utilizado dos marcadores de peso molecular diferentes, en el carril 1 un marcador que muestra cada 100 pb y en el carril 8 el marcador λ que marca a 702, 1204 y 1371 pb.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1 2 3

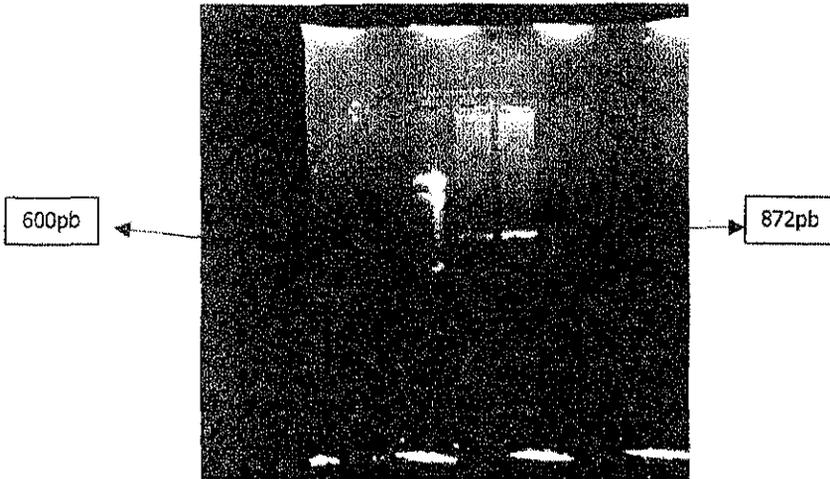


Figura 4. Gel de Agarosa donde se muestra el producto de amplificación del virus de la rabia de dos muestras preservadas en glicerina durante siete días.

Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 2 y 3: Amplicon del virus de la rabia de muestras preservadas durante siete días. La banda de los 872 pares de bases del carril 3 corresponde a una muestra trabajada ininterrumpidamente en un mismo día. La banda del carril 2, corresponde a una muestra de ARN almacenada durante 7 días a -20 C .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1 2 3

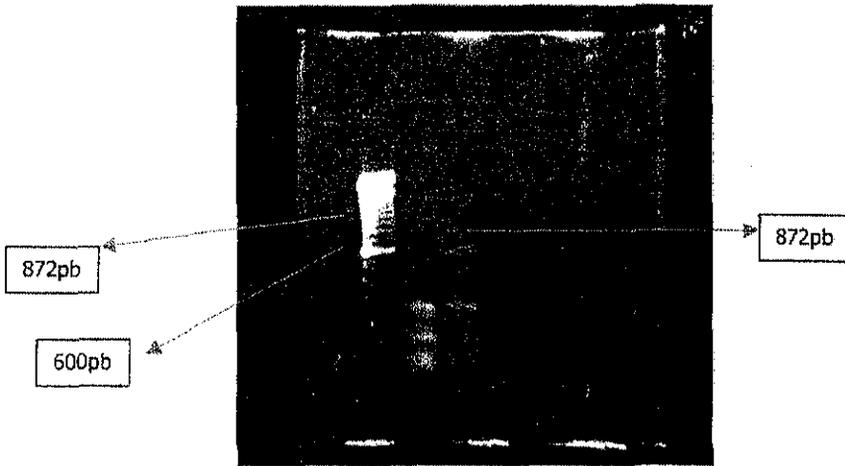


Figura 5. Gel de Agarosa donde se muestra el producto de amplificación del virus de la rabia de dos muestras preservadas en glicerina durante 14 días.

Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2: Control negativo. Carril 3: Amplicon del virus de la rabia de la muestra preservada durante 14 días en glicerina. Se muestra claramente la banda en los 872 pares de bases en el carril 3 con un ladder de 100pb en el carril 1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

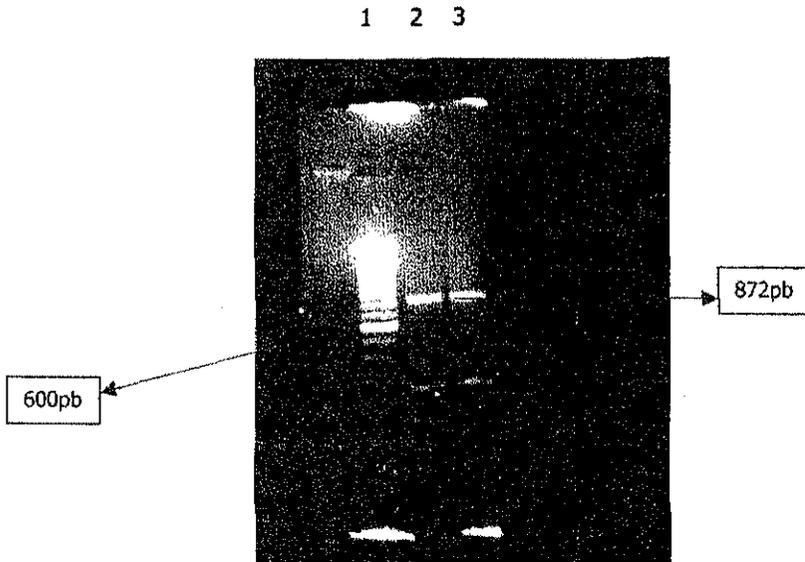


Figura 6. Gel de Agarosa donde se muestra el producto de amplificación del virus de la rabia de dos muestras preservadas en glicerina durante 21 días.

Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 2 y 3: Amplicon del virus de la rabia de la muestra preservada durante 21 días en glicerina. En esta fotografía se muestra un nítido amplicon en los 872 pares de bases después de 21 días de preservación en glicerina.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CAPITULO V

DISCUSION

En el presente trabajo, ha sido posible extraer exitosamente el ARN y el producto de amplificación del virus rabico de todas las muestras preservadas en glicerina al 50% hasta por 21 días, siendo éste el primer reporte del uso de la glicerina como preservador en muestras sometidas a pruebas de biología molecular.

Estos 21 días es tiempo más que suficiente para hacer llegar las muestras a cualquier laboratorio de biología molecular capaz de realizar la prueba de PCR para el virus de rabia, en donde la rapidez para obtener resultados es crucial; actualmente se puede realizar la prueba de PCR de muestras de saliva y líquido céfaloraquídeo para detección del virus rábico en tan solo 4 horas (14), lo que contrasta con los tiempos necesarios para diagnosticar rabia en nuestro país.

La glicerina al 80% se desechó por su difícil manejo y por impedir que las muestras se sumergieran mientras que la concentración del 40% no arrojó ningún resultado en la obtención del ARN. Los resultados de la glicerina en concentración al 50% fueron constantes en todas las pruebas realizadas y resultó ser un preservador idóneo para muestras de tejido nervioso hasta por 21 días (figura 6), siendo estos tejidos los más fácilmente degradados por su naturaleza química e histológica, se deduce que podríamos adelantar iguales o mejores resultados en los otros tres diferentes tejidos histológicos. Cabe resaltar las propiedades preservadoras de la glicerina conocidas desde el siglo pasado y reportadas por Roux (6) al extraer virus viable de rabia después de 30 días a

temperatura ambiente en el Instituto Pasteur de Saigón, donde la temperatura ambiente promedio, oscila entre los 34 y 37 C, aún bajo estas condiciones extremas resalta la recuperación de virus viable.

Actualmente sé esta probando la glicerina en muestras preservadas en periodos de hasta 80 días, esto basado en la excelente preservación mostrada en el ARN de 21 días.

Se ha reportado la extracción exitosa del ARN del virus de la rabia de tejidos preservados en guanidina a temperatura de 22°C, hasta por 60 días (27), atribuyéndose dicho efecto a la destrucción de las ARN-asas, solo que a un costo muy superior.

Debemos considerar las marcadas fluctuaciones de temperatura en nuestra área de trabajo en el laboratorio; estas alcanzan hasta 33°C durante el día, descendiendo durante la noche a 12°C (ver cuadro No.2). Lo que contrasta con las condiciones de laboratorios de otros países que reportan resultados positivos y cuya temperatura se mantiene estable a 22°C.

Otras observaciones a resaltar son las siguientes:

Después del tiempo de inmersión de las muestras en glicerina al 50% deben lavarse con solución de PBS fría, enjuagando tres veces, esto hizo que las bandas de los 872 pb del amplicon de la rabia, fueran más nítidas que las observadas después de lavar con solución salina fisiológica o con agua bidestilada deionizada; este efecto se atribuyó al uso de la solución buferada y a la baja temperatura, lo que permitió estabilizar las moléculas. También es importante señalar el cambio en la nitidez de las bandas en el gel de agarosa cuando no se analizan inmediatamente las muestras, como lo muestra la figura No.4, en donde se compara ARN preservado durante 7 días a -20°C con ARN procesado inmediatamente (ver figura 4).

Para este estudio se utilizaron amplicones o primers que reconocieron el segmento G, pseudogen y L del genoma rábico, con una longitud de 872 pb, siendo éste el mismo segmento que se usa para el reconocimiento de las variedades del ciclo epidemiológico por la técnica de enzimas de restricción (24); lo que permitiría la continuidad del estudio, en caso necesario, lo que significaría un ahorro importante sobre los costos aplicar esta prueba.

Es importante que el país estandarice los medios en que se envíen las muestras a los laboratorios para análisis de biología molecular, ya que estos métodos substituirán paulatinamente a los convencionales por su precisión y rapidez. El éxito de la técnica aplicada dependerá de las condiciones de la muestra, el tiempo de fijación o exposición al agente preservador, el primer o amplicon utilizado y a la integridad de la muestra.

No fue posible extraer el ARN a partir de la muestra de encéfalo preservada en formol, tampoco del bloque de parafina del infante muerto de rabia, ni de los tejidos nerviosos preservados en formol inoculados.

Se usaron distintos tiempos de inmersión de las muestras, mismas que iniciaron con 7 días, 3 días, 2 días y concluyeron con 1 día, todas ellas a temperatura ambiente, en concentraciones de formaldehído del 15% y del 10%.

Es posible deducir a partir de estas experiencias, que el formaldehído es un agente agresivo para las cadenas del ARN y que aunado a la exposición digestiva de la Proteínasa K, parece irremediable la fragmentación del mismo, cuya detección podría remediarse mediante la búsqueda y diseño de primers más cortos. Esta situación, dificulta e incrementa los costos de la investigación. Al término de la fijación, las muestras

presentaron una consistencia dura y elástica, misma que no se modificó aún después del período de digestión por lo que se procedió a examinar las muestras bajo el microscopio notándose las membranas celulares integra, por lo que se duda que nuestra fase de digestión trabajara adecuadamente. Otro factor importante a considerar sería la calidad del formaldehído que se trabaja.

Nuestros resultados contrastan con lo reportado por Orciari (26) quien obtuvo el ARN de tejidos preservados en formol hasta por 12 semanas y de tejidos conservados en bloques de parafina con más de 10 años de antigüedad. Para obtener dichos resultados, fue necesario como ya se mencionó, el diseñar amplicones o primers de menor número de pares de bases, siendo éstos de 130-150pb, ya que el ARN tiende a fragmentarse a mayor concentración del Formaldehído y al mayor tiempo de exposición al mismo, así como al tiempo de digestión y concentración de la Proteinasa K.

Es recomendable el reproducir estos experimentos con un estricto control de las condiciones necesarias para el adecuado funcionamiento de la Proteinasa K, ya que en este estudio los resultados negativos podrían atribuírsele al mal funcionamiento de la misma.

Es posible que el glicerol sea capaz, por medio de mecanismos aún no dilucidados, de inhibir la acción de las ARNasas tan comunes en la naturaleza. Su utilidad para estabilizar cadenas de ARN en diversas condiciones debe ser aprovechada.

El estudio de la variabilidad genética de los virus ARN es de primordial importancia ya que son los microorganismos con mayor capacidad de variación conocidos. Se calcula que en los virus ARN ocurre una tasa de 10^{-4} incorporaciones erróneas por nucleótido copiado y

ronda de copia. Esto da lugar a la generación en tiempo y espacio de las llamadas cuasiespecies (80).

El glicerol al 50% mostró ser un preservador del ARN idóneo para realizar pruebas de biología molecular por su bajo costo y su fácil adquisición, lo que representaría seguramente un costo menor al actualmente ejercido para dicho fin a cambio de un mayor beneficio, al menos hasta que se encuentre otro preservador con características superiores.

APENDICE 1.

MATERIAL PARA OBTENCION DEL ARN DEL VIRUS RABICO

Agarosa Marine coloids, INC

AGUA DEPC (dietil pirocarbonato)

Alcohol isopropilico

Bromuro de Etidio Sigma cat. E-8751

BUFFER Fs (SuperScript)

Buffer PCR

Cloroformo

Dithiothreitol DTT (GIBCOBRL cat):15508-013

DNTP's 100mM SET(GIBCOBRL Cat):10297-018

Etanol al 75%

Medio de cultivo BHK (Baby Hamster Kidney)

PRIMER 3 ó G

PRIMER 4 ó L

Proteinasa K (Fungal) 100mg Gibco BRL cat.No. 2530-0-15

Ratones cepa Balb/ C

Rnasin Ribonuclease inhibitor (Promeg1a, cat):N2111

Solución al 1% de Dietilpirocarbonato(DEPC)

Solución de Albúmina de Bovino al 1%

Solución de Azul de bromofenol

Solución de formaldehído al 15%

Solución de Glicerol al 40%

Solución de Glicerol al 50%

Solución PBS (Phosphate Buffer Solution)

Solución Salina Fisiológica 0.09%

Solución TBE (Tris, Borico, Edta)

SUPERSCRIPT First-Strand Synthesis for RT-PCR(GIBCOBRL cat):15508-013)

***Taq* DNA Polymerase (Amplificasa, Biotecnologías Universitarias)**

TOBOS EPENDORF DE 500 μ L

TRIzol Reagent Life Technologies cat.No.15596-026

Virus Rábico cepa Challenge Virus Standard (CVS)

LITERATURA CITADA

1. Bourhy H , Rollin P E , Vincent J & Sureau P. Comparative field evaluation of the fluorescent-antibody test, virus isolation from tissue culture and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. *Journal of Clinical Microbiology* 1989; 27: 519-523.
2. Goodman L , Gilman A. Bases farmacológicas de la terapéutica. Quinta edición, Ed. Interamericana. México 1978: 831.
3. Informe del SIVE sobre la rabia 8ª. Reunión anual CONASA. México D.F. 1999.
4. Negri A. Beitrag zum studium der aetiologie del Tollwut. *Zentralblatt für Bakteriologie. Parasitenkunde, infectionskrankheiten und Hygiene.* 1903; 43: 507-528.
5. The Merk Index. 11 Edition Merck & Co., Inc. 1989: 4384.
6. Baer G. Natural history of rabies. Academic Press Inc. New York 1975.
7. Mullis K. Specific synthesis of DNA in vitro via A polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 1987; 155 : 335-350.
8. Salki R. Enzymatic amplification of B globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemie. *Science* 1985; 230:1350-1354.

9. Sacramento D, Bourhy H , Tordo N. PCR thecnique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. Mol Cell Probes 1991; 5: 229-240.
10. Perrin P , Rollin P. A rapid rabies enzyme immuno-diagnosis(RRIED): a useful and simple technique for the routine diagnosis of rabies. Journal of Biological Standarization 1986; 14: 217-222.
11. Johnson H N. The virus neutralization index test in mice. Laboratory Techniques in Rabies: 94-97. Geneva: World Health Organization. 1973.
12. Smith J S , Yager P & Baer G M. A rapid tissue culture test for determining rabies neutralization antibody. Laboratory Techniques in Rabies: 354-357. Geneva: World Health Organization 1973.
13. Wiktor T J , Koprowski H. Monoclonal antibody agains rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants. Proccedings of the National Academy of Sciences, USA. 1978; 75: 3938-3942.
14. Wacharapluesadee S , Hemachudha T. Nucleic acid sequence based amplification in the rapid diagnosis of rabies. Lancet-North-American-Edition; 2001. 358: 892-893.

15. Millán S F. La epidemiología molecular: generalidades, memorias: Introducción a la biología molecular aplicada a médicos veterinarios. CENID-MICROBIOLOGIA. Palo Alto, México D.F. 1998.
16. Smith J S , Orciari L A , Yager P A , Seidel H D and Warner C K. Epidemiologic and historical relationships among 87 rabies virus isolates as determined by limited sequence analysis. Journ Of Infec Diseases 1992; 166(2): 296,307.
17. Bouhry H , Kissi B , Lafon M , Sacramento D and Tordo N. Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in europe. J Clin Microbiol 1992; 30(9): 2419, 2426.
18. Montaña H J A y Mata V A E. Estructura antigénica y mecanismos de infección del virus de la rabia. Ciencia Vet. Vol.7 Talleres Ed. De la UNAM. México D.F. 1996: 67-102.
19. Bahloul Ch. Immunisation génique: Immunogénicité de la glicoprotéine rabique et vaccins élargis aux Lyssavirus. Thèse Présentée à l'Unité de formation et de recherche, Université de Paris pour l'obtention du grade de Docteur, Paris 1997: 181.

20. Tordo N , Bourhy H and Sureau P. Rabies and rabies-related viruses. First Congress of the European Society for Veterinary Virology. Contribution of Molecular Biology to Veterinary Virology. Liege, Belgium 1989: 5-7 .
21. Acha N P y Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2ª Edición. OPS/OMS 1991: 502-526.
22. Aguilar S A , Loza R E. El árbol genealógico de la rabia en México. Ciencia y Desarrollo.1999; Vol. XXV. 146: 17-25.
23. Loza R E , Aguilar S A. Estudio de la variabilidad molecular del virus de la rabia en México. Ciencia Veterinaria. UNAM 1998. Vol. 8: 67-84.
24. Reyna G R. Caracterización molecular del virus de la rabia en fauna doméstica y silvestre mexicana. (Tesis de maestría). México D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autónoma de México 2000.
25. Shibata D. Analysis of forty year old paraffin embedded thin tissue sections: a bridge between molecular biology and classical histology. Cancer res 1988;48: 4564-4566.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

26. Orclari L A , Smith J S , Whitfield S G , Niezgodá M , Fekadu M , Rupprecht C. Methods for RNA extraction from formalin fixed tissues. Centers for Disease Control and Prevention, Poster Presentations-Session A. Rabies World Congress. Atlanta, GA, USA 1999.
27. Tuttle R. Preservation of nucleic acids for PCR after prolonged storage at room temperature. *Diag Mol Pathol* Dec 1988; 7(6): 302-309.
28. Ronsholt L , et al. Clinically silent rabies infection in (Zoo) bats. *Veterinary Record* 1998; 142: 519-520.
29. Mohanty S B , Dutta S K. *Virología Veterinaria*. 1a. Edición. México, D.F. Interamericana 1985: 234-236.
30. Vargas G R y Cárdenas L J. Epidemiología de la Rabia: situación actual en México. *Ciencia Veterinaria 7- TALLERES EDITORES DE LA UNAM*. México, D.F., 1996: 331-360.
31. Tordo N , Badrane H. Molecular epidemiology of wild isolates of lyssaviruses practical course. Institut Pasteur. Paris, France. 1995. 15-22.

32. Loza R E. Detección de variantes antigénicas del virus de la rabia proveniente de diversas regiones de México, identificadas por anticuerpos monoclonales (Tesis de Maestría). México (DF). México Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 1993.
33. Innis M A. PCR Protocols: A guide to methods and applications. Ac Press Inc. New York 1990.
34. Heaton P R , Johnstone P , McElhinney L M , Cowley R , O'Sullivan E and Whitby J E. Heminsted PCR Assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. J Clin Microbiol 1997; 3511: 2762-2766.
35. Oelofsen M J and Smith M S. Rabies and bats in a rabies endemic area of southern Africa: application of two commercial test kits for antigen and antibody detection. Onderstepoort J of Vet Res 1993; 60(3): 275-260.
36. Brochier B , Copsty F , Peharpre D. Two years free of fox rabies in Belgium Annals of Veterinary Medicine 2000; 144: 255-260.
37. Ito M , Arai Y , Ito T, Sakai T. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolated in Brazil. Virology 2001; 284: 214-222.

38. Montañó-Hirose J A , Bourthy H and Lafon M. A reduced panel of antinucleocapside monoclonal antibodies for bat rabies virus identification in Europe. *Res Virol* 1990; 141: 571-581.
39. Larski Z. *Virología para Veterinarios*. 2ª. Edición. Prensa Medica Mex. México D.F 1980: 426, 431.
40. Fekadu M. Canine rabies. *Onderstepoort J of Vet Res* 1993; 60(4): 421-427.
41. Perry B D. Dog ecology in eastern and southern Africa: Implications for rabies control. *Onderstepoort J of Vet Res* 1993;60(4): 429-436.
42. Beingham J , and Foggin C M. Jackal rabies in Zimbabwe. *Onderstepoort J of Vet Res* 1993; 60(4): 365-366
43. Nel L H , Thompson G R and Teichman V. Molecular epidemiology of rabies virus in South Africa. *Onderstepoort J of Vet Res* 1993; 60(4): 301-306.
44. Nel L H , Bingham J , Jacobs J A , Jaftha J B. A nucleotide- specific polymerase chain reaction assay to differentiate rabies virus biotypes in South Africa. *Onderstepoort J of Vet Res* 1998; 65: 297-303.
45. Alexander K A , Smith J S , Macharia M J and King A A. Rabies in the Massai Mara, Kenya: preliminary report. *Onderstepoort J of Vet Res* 1993; 60(4): 411-414.

46. World Health Organization. Guidelines for dog rabies control. Geneva. 1994: 1-5.
47. De-Mattos C A , Favi M , Yung V. Bat rabies in urban centers in Chile. *Journal of Wildlife Disease* 2000; 36: 231-240.
48. Vieda W. Rabies in the insectivorous bat *Tadarida brasiliensis* in southeastern Brazil. *Revista de Saude Publica* 1998; 32: 484-485.
49. Sheeler G L , Smith J S. Survey of bat populations from Mexico and Paraguay for rabies. *Journal of Wildlife disease* 2001; 37: 582-593.
50. Noah D L , Drenzek C J , Smith J S. Epidemiology of human rabies in the United States, 1980 to 1996. *Annals of Internal Medicine* 1998; 128: 922-930.
51. Chomel B B. The modern epidemiological aspects of rabies in the world. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 1993; 16(1): 11, 20
52. Loza R E , de-Mattos C C , Aguilar S A , de-Mattos C A. Aislamiento y caracterización molecular del virus de la rabia de un murciélago no hematófago en México. *Veterinaria México* 2000; 31: 147-152.

53. Jaramillo A C J , Martínez M J J. Evaluación epidemiológica de la rabia parálitica bovina en México durante el periodo 1986-1995. Técnica Pecuaria Mexico 1998; 36: 2.
54. Aranda M , Lopez D L. Rabies in skunks from Mexico. Journal of Wildlife Disease 1999; 35: 574-577.
55. Martínez B J , Vargas M G , Moguel P A , Casar S A , Reyes H A. Avances de técnicas comparativas para el diagnóstico de rabia y su incidencia en el estado de Tamaulipas. Memorias de la reunión de investigación pecuaria en México en 1987. Mexico D.F. 1987: 49.
56. Constantine D C. Transmission experiment with bat rabies isolate: response of certain carnivore to rabies virus isolated from animals infected by non bite route. Am Journ Vet Res 1996; 27 (116): 13.
57. Loza R E. Técnicas Serológicas para el Diagnóstico de Rabia. Folleto de Divulgación No.1. INIFAP. Proyecto Vigilancia Epidemiológica 1995: 2-4.
58. Bell J F. Nonfatal rabies in dogs. Am J Vet Res 1971; 32 (12): 2049.
59. Blenden D C. Rabies in the domestic cat. V M S A C 1961: 339.

60. Minor R. Rabies in the dog. *Vet Rec* 1977; 101: 516.
61. Pederson N C. Rabies vaccine virus infection in three dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1978; 172(9): 1092.
62. Kirk. *Small Animal Practice VII*. W.V. Saunders. 1980. 738, 1252-1253, 1257, 1258, 1260, 1261-1265.
63. Chrisman C. *Problemas Neurologicos en Pequeñas Especies*. Primera Ed. Continental 1986: 141-143.
64. Jub K , Kennedy P. *Patología de los animales domésticos*. Upome 1984: 489-493.
65. Krugman S , Ward R. *Infectious diseases of children*. Third Edition. Mosby Company. Saint Louis 1964.
66. Coulon P , Lafay F and Flamand A. Rabies virus antigenicity: an overview. *Onderstepoort J of Vet Res* 1993; 60(4): 271-275.
67. Bourhy H , Kissi B And Tordo N .Taxonomy and evolutionary studies on Lyssaviruses whith special reference to Africa. *Onderstepoort J of Vet Res* 1993; 60(4): 277-282.

68. Murphy F A , Fauquet C M , Bishop D H L , Ghabrial S A , Mayo M A and Summer M D. Virus Taxonomy. Sixt report of the ITCV. Arch Of Virol 1995; 10, Springer Verlang.
69. Van-Regenmortel M V H , Fauquet C M , Bishop D H L , Carstens E B , Estes M K , Lemon S M , Maniloff J , Mayo M A , McGeoch D J , Pringle C R , Wicner R B. Virus taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. VIIIth report of the ICTV. Academic Press, San Diego, Ca., U.S.A. 2000: 1167.
70. Tordo N , Badrane H , Bourhy H and Sacramento D. Molecular Epidemiology of wild isolates of Lyssaviruses: focus on the glicoprotein and pseudogenes. Onderstepoort J of Vet Res 1993; 60(4): 315-323.
71. Tordo, N. And Kouknetzoff, A. The rabies virus genome: an overview. Onderstepoort J of Vet Res 1993; 60(3): 263-269.
72. Wandeler A I. Wildlife rabies in perspective. Onderstepoort J of Vet Res 1993; 60: 347-350.
73. Montafio H J A y Mata V A E. Estructura antigénica y mecanismos de infección del virus de la rabia. Ciencia Vet. Vol 7. TALLERES EDITORES DE LA UNAM. México, D.F. 1996: 67-102.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

74. Levine M, Woodrow G. New Generation Vaccines. 2nd. Edition. Marcel Dekker, Inc. New York 1997: 607-617.
75. Smith J S, Orciari L A, Yager P A, Seidel H D and Warner C K. Epidemiologic and Historical Relationships among 87 Rabies Virus Isolates as Determined by Limited Sequence Analysis. *Journ of Infec Diseases* 1992; 166(2): 296,307.
76. Barrera S H, Ortiz L A , Rolas M A. Reacción en cadena de la polimerasa. Una nueva época dorada en la biología molecular. CENID-MICROBIOLOGIA. Palo Alto México. 1993: 51-60.
77. GIBCO BRI Life Technologies. TRIzol Reagent. Total RNA Isolation Reagent. Cat. No. 15596-026 2000.
78. Davis L ,Dibner M, Batley J. Basic Methods in Molecular Biology. Elsevier 1986: 5-2,44.
79. Ausubel F, Brant R. Short protocols in molecular biology. 4^a. Edition. Willey 1999:4-1, 4-4.
80. Domingo E, Baranowski J I, Nuñez C M, et al. Cuasiespecies y evolución molecular de virus. *Rev Sci Tech Off int Epiz* 2000; 19 (1): 55-63.