

10524  
53



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL GENOMA DEL VIRUS DE LA  
RABIA MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA (PCR) EN CEREBROS DE RATON EXPERIMENTALMENTE  
INOCULADOS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

EDITH ROJAS ANAYA

DIRECTORES:

- DR. ELISEO HERNÁNDEZ BAUMGARTEN
- M. EN C. ELIZABETH LOZA RUBIO
- M. EN C. VÍCTOR MANUEL BANDA RUIZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO. 2003



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN**  
**UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR**  
**DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO**  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Determinación de la estabilidad del genoma del virus de la  
rabia mediante la técnica de reacción en cadena de la  
polimerasa (PCR) en cerebros de ratón experimentalmente  
inoculados.

que presenta la pasante: Edith Rojas Anaya  
con número de cuenta: 9756308-4 para obtener el título de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**A T E N T A M E N T E**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 26 de Julio de 2002

PRESIDENTE	<u>Dr. Eliseo Hernández Baumgarten</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Patricia Zúñiga Cruz</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Susana E. Mendoza Elvira</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M. en C. Enrique Salas Téllez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Gabriela Escalante Reynoso</u>	

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Esta investigación se realizó en el laboratorio del Proyecto Rabia del Centro Nacional de Investigaciones en Disciplinas Veterinarias – Microbiología del I.N.I.F.A.P. apoyado en el Proyecto G34635B del CONACyT bajo la dirección de la Dra. Elizabeth Loza Rubio

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*DEDICATORIAS*

*A Dios*

*A mis padres Estela y Bernardo*

Gracias por el apoyo y cariño que me han brindado para que ser una mejor persona, por todos los esfuerzos que han hecho para que yo tenga una profesión gracias por darme todo lo que necesito para conseguir lo que quiero, porque si he llegado hasta aquí es por ustedes y para ustedes.

Los quiero mucho.

*A mis hermanos Javier, Diana y Osvaldo*

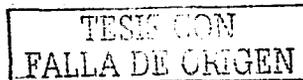
Por todo su cariño, apoyo y comprensión cuando más los he necesitado y por que en todo momento me han ayudado.

*A Alejandro*

Gracias Alex por darme siempre lo mejor de tí porque haz estado todo el tiempo conmigo, por inspirarme, porque me haz ayudado siempre que te he necesitado, y porque en el momento más difícil llegaste a mi vida para seguir adelante. Te amo.

*A mi tía Maria Elena Rojas Fuentes<sup>†</sup>*

Gracias por apoyar todas mis decisiones y enseñarme a creer y defender lo que quiero y pienso. Siempre vas a estar conmigo.



**AGRADECIMIENTOS.**

**A mi *Alma mater* la U.N.A.M. por darme la oportunidad de superarme personal y profesionalmente.**

**A todos mis profesores y a todos aquellos que han contribuido a mi formación académica y personal para superarme día con día.**

**A mis compañeros y amigos de la FESC con los que compartí tantas experiencias inolvidables durante la Licenciatura, gracias Q.F.B.'s Gen. 24 por brindarme su amistad y su apoyo siempre que los necesite.**

**A Zaida, Alma, Catalina, Olga, Vianey y Fabiola por su amistad, ayuda y experiencias.**

**Especialmente a mi amiga Elizabeth Tejeda por estar conmigo en las buenas y en las malas, por brindarme su amistad y apoyo en todo momento, por estar a mi lado siempre que la necesito.**

**A mis amigos Daniel Alarcón, Carolina Cortez y a Hamlet del Real porque han estado a mi lado siempre que los necesito y por que a pesar de los años siempre he contado con su amistad.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*AGRADECIMIENTOS*

**A la Dra. Elizabeth Loza Rubio y al Dr. Víctor Manuel Banda Ruiz por darme la oportunidad de trabajar en el Proyecto Rabia por confiar en mi, y por las facilidades que me brindaron para realizar esta investigación. Quiero agradecerles los consejos que me han dado para ser una mejor profesionalista.**

**Al Dr. Eliseo Hernández Baumgarten, Director del CENID-Microbiología, por todo el apoyo recibido para llevar a cabo esta investigación.**

**Al Jurado Evaluador de este trabajo por todos los consejos que me dieron para mejorarlo, especialmente a la Dra. Susana Elvira Mendoza por contribuir a esta investigación con la donación de la cepa del virus de Aujeszky.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# INDICE

	Pág.
Índice de figuras	I
Índice de cuadros	II
Índice de gráficas	III
Lista de abreviaturas	IV
Resumen.....	1
<b>1. Introducción.....</b>	<b>2</b>
1.1. Historia.....	2
1.2. Epidemiología.....	2
1.2.1. Europa.....	3
1.2.2. Asia.....	3
1.2.3. África.....	4
1.2.4. América Latina.....	4
1.2.4.1 México.....	4
1.2.5. El mundo.....	6
1.3. La enfermedad.....	7
1.4. Agente etiológico.....	9
1.5. Patogenia.....	12
1.6. Prevención y tratamiento.....	13
1.6.1. Tratamiento post - exposición.....	13
1.6.2. Tratamiento pre - exposición.....	16
1.7. Diagnóstico.....	17
1.7.1. Generalidades.....	17
1.7.2. Histopatología.....	18
1.7.3. Inmunofluorescencia.....	20
1.7.4. Prueba biológica.....	22
1.7.5. Inmunohistoquímica.....	22
1.7.6. Aislamiento celular.....	23
1.7.7. Detección rápida inmunoenzimática de antígenos rábico.....	23
1.7.8. Reacción en cadena de la polimerasa.....	24
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>31</b>
2.1. Objetivos generales.....	31

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

7

2.2. Objetivos particulares.....	31
3. Hipótesis.....	32
4. Justificación.....	33
5. Material y métodos.....	34
5.1. Obtención de los cerebros.....	34
5.2. Controles.....	34
5.3. Extracción del ARN.....	34
5.4. Cuantificación del ARN.....	35
5.5. Síntesis de ADNc.....	35
5.6. Iniciadores.....	36
5.7. Reacción en cadena de la polimerasa.....	36
5.8. Determinación del límite más bajo de detección de la PCR para el virus de la rabia.....	38
5.9. Especificidad de la PCR para el virus de la rabia.....	38
5.10. Diagrama de flujo.....	39
6. Resultados.....	40
6.1. Obtención del ARN.....	40
6.2. Estandarización de la técnica de PCR.....	44
6.3. Especificidad de la PCR.....	46
6.4. Determinación del límite más bajo de detección de la PCR.....	47
6.5. Determinación de la caducidad del virus.....	49
7. Discusión.....	51
8. Conclusiones.....	67
9. Apéndice.....	68
10. Bibliografía.....	70

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

8

## INDICE DE FIGURAS

	Pag.
1. Morfología del virus de la rabia.....	9
2. Gen N del virus de la rabia.....	10
3. Secuencia del gen N del virus de la rabia.....	10
4. Modelo de infección del virus de la rabia.....	12
5. Gel de agarosa para las muestras de ARN degradado.....	43
6. Gel de agarosa para el producto de PCR con gradiente de temperatura.....	44
7. Gel de agarosa para la primera replica del PCR con los iniciadores N1 y N2.....	45
8. Gel de agarosa para la primera replica del PCR con ForN1 y RevN1.....	46
9. Gel de agarosa para los productos de PCR de los virus de Aujeszky y de Ojo Azul.....	47
10. Gel de agarosa para los productos de PCR a diferentes concentraciones de ADNe.....	48
11. Gel de agarosa para los productos de PCR con diluciones logarítmicas del virus.....	49
12. Gel de agarosa para los productos de PCR de cerebros de ratón conservados a temperatura ambiente.....	50

## INDICE DE CUADROS

	Pág.
1. Estadísticas de casos de rabia en México.....	5
2. Casos de rabia humana en el mundo hasta 1997.....	6
3. Recomendaciones a seguir sugeridos por la OMS, para el tratamiento contra la rabia.....	14
4. Protocolo de reacción para la síntesis de ADNc.....	35
5. Protocolo de reacción para la PCR con los iniciadores N1 y N2.....	36
6. Programa de termociclado para los iniciadores N1 y N2.....	37
7. Protocolo para la PCR con los iniciadores ForN1 y RevN1.....	37
8. Programa de termociclado para los iniciadores ForN1 y RevN1.....	37
9. Concentración de ARN en los cerebros de ratón expuestos a temperatura ambiente.....	40

## INDICE DE GRAFICAS

	Pág.
1. Casos de rabia humana de 1983 a 1993.....	5
2. Concentración de ARN en cerebros expuestos a temperatura ambiente.....	41

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BHK	Células de riñón de hámster
c.b.p.	Cuanto baste para
CRI	Cerebro de ratón inoculado
CRN	Cerebro de ratón normal
CVS	Cepa de virus desafió
dAF	Anticuerpos fluorescentes directos
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
fg	Fentogramos
GBM	Grado biología molecular
°C	Grados centígrados
HE	Hematoxilina – eosina
hr	Horas
IF	Inmunofluorescencia
IHQ	Inmunohistoquímica
kb	kilobases
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo
min	Minutos
mM	Milimolaridad
µg	Microgramos
µL	Microlitros
ME	Microscopía electrónica
MIT	Prueba de inoculación del ratón (siglas en ingles)
MNA	Neuroblastoma de ratón
ng	Nanogramos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

O.M.S.	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pg	Picogramos
pmol	Picomoles
rpm	Revoluciones por minuto
RREID	Detección rápida inmunoenzimática de antígeno rábico.
RT-PCR	Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa
T.A.	Temperatura ambiente
U	Unidades
UI	Unidad internacional
UI/mL	Unidades internacionales en mililitro

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# PAGINACIÓN DISCONTINUA

## RESUMEN

La rabia es una de las enfermedades más viejas ya que se descubrió en el siglo 23 A.C. Desde entonces se había establecido una relación entre la rabia humana y la de animales enfermos.

El virus de la rabia pertenece a la familia de los Lyssavirus. Su genoma es ARN de polaridad negativa, de aproximadamente 12 Kb. Posee cinco genes que codifican para el mismo número de proteínas: nucleoproteína N (N), fosfoproteína (NS), proteína de matriz (M), glicoproteína (G) y la polimerasa (L). Para confirmar la presencia del virus se han desarrollado diferentes técnicas de diagnóstico, entre ellas el diagnóstico clínico, la histología, la tinción de séller, la identificación de los corpúsculos de Negri y la inmunofluorescencia (IF) y más recientemente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, debido a que el virus de la rabia es ARN, el objetivo de este estudio fue establecer si existía correlación entre la calidad del ARN extraído a partir de cerebros de ratón positivos al virus, y la amplificación de un segmento del gen N. Se expusieron cerebros de ratón positivos a rabia al medio ambiente 24°C durante 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 15, 17 y 23 días, posterior a cada tiempo establecido se realizó la extracción de ARN, síntesis de ADNc y la PCR para o cual se utilizaron un par de iniciadores reportados en la literatura y un par diseñados por Nadin-Davis S y Loza-Rubio E., 2001 (ForN1 y RevN1). Asimismo, se determinó el límite más bajo de detección de prueba utilizando diferentes diluciones tanto del virus como de el ADNc obtenido de controles positivos al igual que la especificidad de los iniciadores sintetizados confrontándolos con los el virus de Aujeszky y el virus de Ojo Azul. Los controles negativos fueron cerebros de ratón sin inocular. Al analizar geles específicos para ARN extraído en cada tiempo se observó que este comenzó a degradarse después del día 11, a pesar de ello los productos de PCR obtenidos de los cerebros positivos a rabia se visualizaron hasta el día 23 que permanecieron a temperatura ambiente. Estos datos fueron obtenidos con los iniciadores ForN1 y RevN1, ya que cuando se utilizaron los otros iniciadores los resultados no fueron consistentes. Por otra parte se determinó que el punto más bajo de detección de la PCR estandarizada fue de 5fg/μL y se confirmó la especificidad de los iniciadores ya que estos no reconocieron el genoma el virus de Aujeszky y el virus de ojo azul. Con base a estos resultados se concluye que a pesar de la fragilidad del ARN es posible utilizarlo para llevar a cabo la PCR en cerebros positivos a rabia, que se hayan mantenido expuestos a temperatura ambiente sin detrimento de los resultados.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 1.0 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Historia

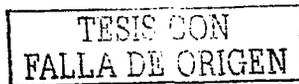
La rabia es una enfermedad muy antigua tal vez tanto como la humanidad misma, 3000 años A.C. ya se encuentra el origen de la palabra en lengua sánscrita donde "*Rabbas*" significa "*agredir*". En cuanto a su clasificación, al pertenecer al género de los *Lyssavirus*, la raíz griega "*lyssa*" significa "*violento*" <sup>(56)</sup>.

La primera descripción de la enfermedad se remonta al siglo XXIII A.C. en el código Eshmuna en Babilonia y ya entonces se relacionaba la enfermedad en los humanos con la mordedura de animales enfermos, principalmente del perro. Aristóteles en el siglo IV A.C. escribió en su "Historia Natural de los Animales" que los perros sufrían de un mal violento, esto los ponía irritables y todos los animales que eran mordidos se enfermaban. Carnadanus, escribió en Roma que la saliva era la infecciosa, por lo que enfatizó que todas las mordidas de los animales contenían al virus. En el siglo XI Avicena describió que la enfermedad terminaba en apoplejía. En 1026 y en el periodo posterior a este año la rabia fue aumentando. La primera gran epidemia de rabia fue en Franconia en 1271; posteriormente se presentaron otras epidemias en 1500 en la península Ibérica; 1586 en Austria, Hungría y en Turquía; 1604 en París y 1700 en varias partes de Europa incluyendo Inglaterra. No fue hasta 1671 que en la Sorbona se inició la práctica para el tratamiento de la rabia. <sup>(56)</sup>.

### 1.2 Epidemiología

La rabia animal está presente en todos los continentes. La situación de la rabia en el mundo evoluciona constantemente y es muy diferente de un continente a otro.

En 1995, 7877 casos con una mayoría de animales silvestres (92%) son declarados rabiosos. Los principales animales incriminados son los mapaches, los zorrillos, los zorros



y los coyotes. Los murciélagos juegan un papel importante por ser responsable de muertes humanas (alrededor de 3 a 5 casos humanos son registrados todos los años). El informe publicado en diciembre de 1996 sobre la vigilancia de la rabia en los Estados Unidos describe una situación compleja, debido a que los casos presentados de rabia se ubican en la fauna silvestre la cual es difícil de controlar <sup>(73)</sup>.

### 1.2.1 Europa

En el curso del último siglo, la historia de la rabia ha variado, luego de la erradicación de la rabia canina gracias a la vacunación de los perros domésticos y de la eliminación de perros callejeros, varios países de Europa del Oeste han permanecido libres de rabia <sup>(73)</sup>.

Al final de la última guerra mundial, la adaptación del virus rábico a los zorros ha permitido a la rabia invadir numerosos países. La caza de zorros y la utilización de veneno no disminuyeron la rabia vulpina en este continente. La utilización de vacunas antirrábicas contenidas en cebos ha permitido que el número de casos de rabia haya disminuido en toda Europa. Los casos de rabia humana son escasos en Europa, ocurren sobre todo en los países del este europeo donde la rabia canina es menor a 10 casos por año, excepcionalmente, las personas mordidas en regiones con rabia endémica, como África y Asia desarrollan la enfermedad en un país europeo. Por ejemplo en Francia, ésta disminución ha sido particularmente notable, ya que desde 1997, solo se han presentado casos de rabia importada <sup>(73)</sup>.

### 1.2.2 Asia

El principal reservorio de la rabia en Asia es el perro. Es aquí donde la mayoría de los casos de rabia humana son identificados. Generalmente se admite que el número estimado de muertos (cifra superior al número oficialmente declarado) es del orden de 40,000 de los cuales la mayoría de los casos se encuentran en India. Algunos países han establecido, programas nacionales de lucha contra la rabia que han hecho disminuir sensiblemente el número de muertos en China, Indonesia, Malasia y Tailandia <sup>(73)</sup>.

### 1.2.3 África

El perro continúa siendo el principal reservorio de rabia en este continente (alrededor del 90%). Según la OMS, más de 4000 casos de rabia animal han sido diagnosticados los cuales no reflejan sino una parte de la situación de la rabia en África, alrededor de 100-200 personas mueren de rabia cada año. Sin embargo, en la mayoría de esos casos, el diagnóstico es únicamente clínico. Al igual que en Asia, hay verdaderamente una subestimación del número de casos de rabia <sup>(73)</sup>.

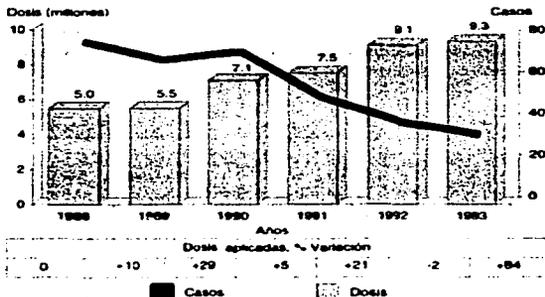
### 1.2.4. América Latina.

En el conjunto de América Latina un programa de vacunación ha permitido disminuir el número de casos de rabia humana (alrededor de 200 casos por año). Además de la rabia canina, los murciélagos hematófagos o vampiros han llegado a ser el segundo transmisor de rabia a humanos, y el principal para los bovinos. <sup>(64, 73)</sup>

#### 1.2.4.1 México.

En nuestro país la rabia se considera un grave problema de salud pública principalmente por la cantidad de animales callejeros que se encuentran expuestos a este patógeno. En 1990, 72 personas murieron de rabia, 60 de las cuales adquirieron la enfermedad por mordedura de perro <sup>(40)</sup>. Para 1994 la Secretaría de Salud en el Compendio Estadístico de Morbilidad reportó una tasa de 0.03/100, 000 habitantes. Como se muestra en la Gráfica 1, el Instituto Nacional de Salud Pública reportó una disminución en los casos de rabia humana con relación a los perros vacunados hasta 1993.

Gráfica 1: Casos de rabia humana de 1983-1993.



Fuente: <http://www.insp.mx/salud/y/y4360415.002.gif>

Por otra parte la Comisión de Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas reporta las siguientes estadísticas para casos de rabia en nuestro país: <sup>(72)</sup>

Cuadro 1. Estadísticas de casos de rabia en México.

Especie	Año 2000	Año 2001	Semana 16 del año 2002
Humanos	1	1	0
Perros	135	217	0
Gatos	7	9	0
Bovinos	169	318	3
Otros	24	41	0

Fuente: [www.panaflora.org.br/novo/download/rabia/Rabia.pdf](http://www.panaflora.org.br/novo/download/rabia/Rabia.pdf)

### 1.2.5 El mundo.

El Instituto Pasteur de Francia reportó para el mes de agosto de 1997 (Cuadro 2) un total de entre 35,000 - 45,000 casos de rabia humana en el mundo <sup>(73)</sup>.

Cuadro2. Casos de rabia humana en el mundo hasta 1997

Continentes	Nº de casos
Europa	10-20
América del Norte	4-8
América Latina	200-400
África	500-5,000
Asia	35,000-45,000
Indiaa	30,000-40,000
Total	35,000-45,000

Fuente: [www.pasteur.fr/recherche/rage/OLD/oldrabia.html](http://www.pasteur.fr/recherche/rage/OLD/oldrabia.html)

**Reservorios.** El principal vector y reservorio en el mundo es el perro. Los animales silvestres pueden agredir directamente al hombre o de manera indirecta contaminando a los animales domésticos. Muchos reservorios silvestres pueden coexistir como en caso de América del Norte, en donde los mapaches, zorrillos, son los reservorios silvestres <sup>(63)</sup>.

Los reportes de enfermedad fatal en humanos por mordedura de vampiros se registra en España en 1527 y en 1911 se reconocen cuerpos de Negri en muertes de ganado en Brasil. La colonización del hombre en áreas exclusivamente pobladas por vampiros y la inducción de ganado y otras especies domesticas pueden proveer a los murciélagos de comida abundante y fácil de obtener, esto permite el escape del virus de sus reservorios naturales silvestres <sup>(37)</sup>.

En toda América Latina el perro continúa siendo el principal reservorios y junto con el murciélago hematófago son el origen de la enfermedad. Los murciélagos insectívoros pueden igualmente ser fuente de contaminación en diferentes regiones del mundo. En México la primera identificación de un virus rábico se realizo en un murciélago no hematófago del genero *Artibeus rda* <sup>(15, 16, 38)</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **1.3 La enfermedad**

La rabia es una enfermedad siempre mortal que ataca el sistema nervioso y provoca encefalitis en los animales de sangre caliente. En algunas especies como los roedores y los rumiantes, existe una forma paralítica y una forma furiosa en los carnívoros. Los síntomas en el hombre pueden expresarse en las dos formas. <sup>(41)</sup>

La exposición al virus de la rabia puede resultar en una infección fatal en humanos a menos que la enfermedad este prevenida por vacunación post o pre exposición. La decisión para proveer o no la vacunación esta frecuentemente basada en el resultado de la detección el antígeno en las pruebas realizadas en el tejido cerebral del animal que mordió, esto mediante la prueba de anticuerpos fluorescentes <sup>(51)</sup>

El virus de la rabia es transmitido a través del contacto con la saliva del animal enfermo, esto quiere decir, que para ser inoculado no necesita necesariamente ser mordido sino que basta que exista una solución de continuidad en la piel que entre en contacto con la saliva del animal rabioso.

En general el tiempo de incubación es de 30 días, pero varía con la naturaleza del virus, el lugar y la cantidad inoculada. Sin embargo, se han reportado casos extraordinarios con periodos de incubación largos en humanos, la enfermedad se ha identificado por la presencia de los síntomas clásicos en donde las pruebas de diagnóstico de rutina han sido negativas; sin embargo el RT-PCR resultado positivo. La existencia de periodos de incubación extremadamente largos (2-19 años) han sido cuestionados porque los pacientes han provenido de lugares en donde la rabia es endémica. Por otra parte se han reportado casos de perros infectados capaces de llevar el virus en la saliva por periodos prolongados mientras permanecen como excretores asintomáticos <sup>(55)</sup>.

El periodo de incubación será más breve, si el punto de contacto ha sido la cabeza, el cuello o los miembros superiores, porque el virus alcanzará la región predilecta con

mayor rapidez (llega al sistema nervioso central principalmente a través de los troncos nerviosos, propagándose a lo largo de los nervios) por lo que llega al sistema nervioso central con mayor rapidez, para que de ahí el virus emigre hacia los tejidos, pero sobre todo hacia las glándulas salivales, de donde es excretado a través de la saliva <sup>(63)</sup>.

El tratamiento post-exposición debe ser hecho a la brevedad posible, cuando el paciente aún no presenta síntomas. En el hombre, el primer síntoma es fiebre poca intensa (38 °C) acompañada de dolor de cabeza y depresión nerviosa, enseguida, la temperatura se eleva, llegando a los 40 - 42 °C, luego, la víctima comienza a mostrarse inquieta y agitada, sufre espasmos dolorosos en la laringe y comienza a respirar y a tragar con dificultad, los espasmos se extienden después a los músculos del tronco y de las extremidades, en forma intermitente acompañados por temblores generalizados, taquicardia y detención de la respiración. Cualquier tipo de excitación (luminosa, sonora, aérea, etc.) puede provocarlos <sup>(63)</sup>.

A la inversa del perro, el hombre se torna hidrófobo (sufre espasmos violentos cuando ve o trata de beber agua), frecuentemente experimenta ataques de terror y de depresión nerviosa, presentando tendencia a la vociferación, los alaridos y la agresividad, con accesos de furia, alucinaciones visuales y auditivas, babas y delirio. Ese período de extrema excitación dura cerca de tres días, y enseguida le sigue la etapa de parálisis, más rápida y menos común en los hombres que en los animales, es entonces cuando se observa parálisis flácida del rostro, de la lengua, de los músculos de la deglución, de los oculares, y de las extremidades de los miembros. Más tarde, la perturbación puede extenderse a todo el cuerpo. A veces, la enfermedad puede manifestar una evolución diferente: surge como parálisis progresiva de las extremidades y luego se generaliza. Pero sea cual fuere el tipo, la rabia siempre presenta una evolución inexorablemente fatal para el paciente. <sup>(47,50)</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

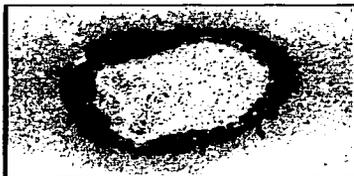
#### 1.4 Agente etiológico.

##### Características del virus <sup>(4, 47, 67)</sup>

El virus de la rabia pertenece a la familia de los *Rhabdoviridae* que son virus infectantes de animales vertebrados e invertebrados, y al género de los *Lyssavirus*. Una de las características únicas de los genomas de ARN de cadena negativa de un rhabdovirus es que esto sirve como un plantilla para ambos la transcripción (síntesis de ARNm) y la replicación (síntesis del genoma de ARN).

Su morfología es cilíndrica y tiene la forma característica de bala de fusil (Figura 1). El peso molecular del virus es de 46, 106 daltones.

Figura 1. Morfología del virus de la rabia.

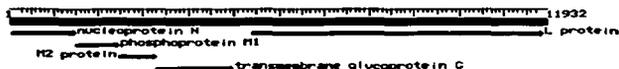


(Fuente: [www.pasteur.fr/recherche/range/OLD/oldrabia.html](http://www.pasteur.fr/recherche/range/OLD/oldrabia.html))

Su material genético es una molécula de ácido ribonucleico (ARN), enrollado en espiral, su polaridad es negativa por lo que no es infeccioso por sí mismo. Este ARN está conformado por 11 932 nucleótidos, su diámetro es de 75 nm y tiene 130 nm de largo. Este ARN codifica para 5 proteínas, esta constituido por cinco genes: N, NS, M, G, L y un segmento intragénico ( $\phi$ ) entre los genes G y L (Figura 2).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 2. Gen del virus de la rabia.



Fuente: GeneBank, No. de acceso AJ296211

El gen de importancia para el diagnóstico molecular es el gen N, que es el más conservado y el que posee más alta homología entre las diferentes cepas, por lo que es el gen que se utiliza para el diagnóstico molecular (Figura 3).

Figura 3. Secuencia del gen N del virus de la rabia

BASES	111 a	64 c	77 g	78 t
1	gagaagaac	ttcaagaata	cgaggcggct	gaactgacaa agaccgcagt ggcattggca
61	gatgatggaa	ctgtcaactc	tgacgatgag	gactacttct ccggtgaaac cagaagtcca
121	gaggctgttt	atactcgaat	catgatgaat	ggaggtcgac taaagagatc gcatataagg
181	agatatgtct	cagtcagttc	aaatcatcaa	gctcgtccaa actcatttgc tgagttctca
241	aacaagacat	actcggacga	ctcatgagga	gttgataaac agtgtgccag aaatctgtcg
301	atttgtgata	ttcatcatga	aaaaaaaaa	

Fuente: GenBank, No de acceso AJ296211

Este es un virus envuelto, con doble envoltura fosfolipida. La bicapa esta formada por lipidos derivados de la membrana plasmática de la célula hospedera. En la superficie externa de la bicapa lipidica los peplomeró tienen 10 nm de glicoproteina viral (67 KD) lo que le da una apariencia de espinas. Es esta glicoproteina el mayor antígeno de superficie

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

del virus. La glicoproteína G está inserta en la membrana lipídica del virus; es responsable de la inducción de los anticuerpos neutralizantes y de la estimulación de los linfocitos T<sup>(67)</sup>.

La nucleoproteína N (450 aminoácidos), esta ligada al ARN viral. Es la proteína con la más alta conservación en la secuencia de aminoácidos, correlaciona con la invariabilidad antigénica. Se ha demostrado experimentalmente que la nucleoproteína ligada al ARN es resistente a la acción de las ARNasas durante la transcripción *in vitro*. La fosfoproteína NS de 297 aminoácidos, esta asociada a la nucleoproteína e interactúa con la transcriptasa y es responsable de la transcripción y la replicación del virion del ARN. La proteína L (2142 aminoácidos) es la responsable de la transcripción y de la replicación del ARN viral. El gen que codifica esta proteína consta de 6380 nucleótidos; esta proteína es una de las subunidades del complejo de la ARN polimerasa, la proteína por si misma actúa como polimerasa y la NS parece actuar como una proteína reguladora de la transcripción. Otra de las actividades relacionadas es la polimerización de los nucleótidos. Es termolábil y altamente reactiva a los sulfidrilos. 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 una proteína estructural. Su peso molecular es de 26 kDa. Cuando existen mutaciones indican que hay una lesión en la proteína M<sup>(4, 59, 67)</sup>.

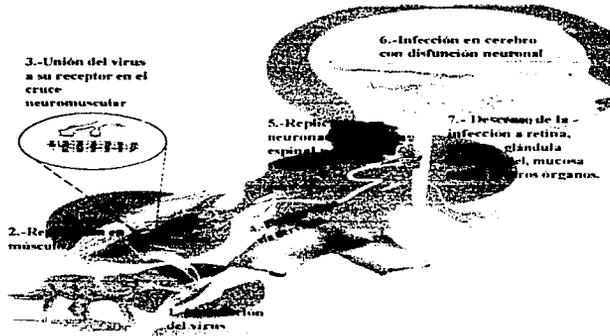
La transcripción del virus es como la de todos los rhabdovirus, su requiere de ATP para generar un transcrito en moléculas complementarias positivas, capaces de producir las proteínas virales. Se generan cinco diferentes tipos de ARNm que codifican para las cinco proteínas estructurales. En pruebas *in vitro* todas las especies de ARNm son iniciadas con una secuencia idéntica en 5' terminal. La transcripción de los genes puede ser muy discontinua. La replicación tiene lugar en el citoplasma celular debido a que es un virus que contiene ARN. Para todos los virus con genoma de cadena negativa, la infección comienza con la síntesis de ARNm por la polimerasa ARN asociada al virion. Este paso de síntesis del ARN generalmente se le llama transcripción primaria. La traducción de este transcrito es el comienzo para la replicación. Se requiere de una síntesis completa de proteínas para mantener la replicación del genoma, así como la síntesis de inhibidores, tal como la cicloheximida que bloquea la replicación pero no la transcripción primaria. La

conversión de una cadena negativa a una cadena positiva de tamaño genómico es mediada por ARN polimerasa de la transcripción para el modo de replicación. La nueva cadena positiva, sirve entonces como plantilla para la replicación y amplificación de nuevas cadenas negativas; las cadenas positivas no contienen órdenes para la transcripción, sirven solamente como plantilla de replicación <sup>(4)</sup>.

### 1.5 Patogenia

El principal modo de contaminación es la mordedura de un animal rabioso y en un grado menor los arañazos y el lamido. Se han observado casos de contaminación por aerosoles o por trasplante de córnea. La vía nerviosa es el modo de transporte viral (Figura 4), del punto de inoculación al sitio preferencial de replicación en el sistema nervioso. Contrariamente a los virus transportados por vía sanguínea (viremia), el virus rábico es transportado por vía nerviosa, es decir que toma prestado el sistema de transporte de su célula blanco (la neurona) para progresar de la periferia (sitio de inoculación) hacia los centros nerviosos. Este sistema de transporte hace intervenir los microtúbulos de la célula <sup>(4)</sup>.

Figura 4: Modo de infección del virus de la rabia.



## **1.6 Prevención y tratamiento.**

El tratamiento en el hombre, es de una importancia capital, consiste principalmente en una vacunación.

### **1.6.1 Tratamiento post-exposición.**

El tratamiento pasteuriano contra la rabia fue aplicado por primera vez en el hombre el 6 de julio de 1885 por los doctores Grancher y Vapulian, bajo la dirección de Luis Pasteur. A pesar de la eficacia y la inocuidad del tratamiento actual, entre 35000 y 50000 personas mueren cada año de rabia porque no son tratadas. A pesar de que la enfermedad es conocida desde milenios, y que desde hace más de 100 años existe un tratamiento eficaz, la rabia ocupa el décimo lugar entre las enfermedades infecciosas mortales a nivel mundial<sup>(73)</sup>.

Más de 6.5 millones de tratamientos post-exposición se practican cada año en el mundo, de los cuales 90% corresponden a Asia. Las indicaciones del tratamiento post-exposición, se llevarán cabo en función de la epidemiología de la rabia en la región de donde tuvo lugar la contaminación o en la región de donde proviene el animal; de la naturaleza, de la localización y de la gravedad de la contaminación; de la posibilidad de establecer un diagnóstico en el animal, sea sometiéndolo a vigilancia veterinaria, o sea practicando un diagnóstico de laboratorio en el cadáver.

Las recomendaciones del 8º Comité de expertos de la OMS para la Rabia 1992, sobre la conducta a seguir para el tratamiento post-exposición; pueden observarse en el Cuadro 3<sup>(73)</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Cuadro 3. Recomendaciones a seguir sugeridos por la OMS, para el tratamiento contra la rabia.**

Categoría	Naturaleza del contacto con un animal salvaje <sup>(a)</sup> o doméstico presumiblemente rabioso o con rabia confirmada o que aún no ha sido puesto en observación	Tratamiento recomendado
I	Contacto con el animal o alimentación del mismo. Lamido sobre piel intacta	Ninguno, si se obtiene una anamnesis confiable
II	Piel descubierta mordisqueada, arañazos benignos o excoriaciones sin sangrado y lamido de piel escoriada.	Administrar la vacuna inmediatamente <sup>(b)</sup> . Suspender el tratamiento si el animal sigue en buena salud después de los 10 días de observación <sup>(c)</sup> o si después de la eutanasia la investigación de la rabia, con técnicas de laboratorio apropiadas, es negativa.
III	Mordedura o arañazo que atravesaron la piel y contaminación de mucosas por saliva (lamido).	Administrar inmunoglobulinas y vacuna antirrábica <sup>(b)</sup> . Suspender el tratamiento si el animal sigue en buen estado de salud después de 10 días de observación <sup>(c)</sup> o si después de la eutanasia la investigación de rabia por técnicas de laboratorio apropiadas es negativa.

<sup>(a)</sup> Un contacto con roedores, conejos o liebres no exige jamás por así decirlo, tratamiento antirrábico específico.

<sup>(b)</sup> Si se trata de un gato o perro identificado y aparentemente en buena salud, residente o proveniente de un lugar de riesgo débil, que esté puesto en observación, se podrá retardar la puesta en marcha del tratamiento.

<sup>(c)</sup> Esta duración de observación no se aplica más que a gatos y perros. Con excepción de especies en vía de desaparición o amenazadas, los animales domésticos o salvajes presumiblemente rabiosos serán sacrificados y sus tejidos examinados con técnicas de laboratorio apropiadas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El tratamiento post-exposición comienza por el tratamiento no específico: limpieza, curación de las heridas, antibioterapia y profilaxis antitetánica.

Las vacunas antirrábicas usadas en el mundo son todavía, en su mayoría, vacunas producidas con cerebro de animales adultos o recién nacidos, tipo Fuenzalida, que aunque han sufrido numerosas mejoras, han producido accidentes neuroinmunológicos ligados a la presencia de mielina; por lo que las vacunas producidas en cultivo de células han tendido a reemplazarlas ya que son más inmunogénicas y mejor toleradas. En este tipo de vacunas se siguen dos protocolos <sup>(68)</sup>:

- 1) 5 inyecciones practicadas los días 0, 3, 7, 14 y 28.
- 2) Simplificada. 4 inyecciones: 2 el día 0 en dos puntos diferentes, y el día 17 y 21.

Las inyecciones deben realizarse en el deltoides, por vía intramuscular profunda. La vía intradérmica puede ser utilizada con el fin de disminuir el costo del tratamiento, reduciendo la dosis de antígeno inyectada: el protocolo de la Thai Red Cross consiste en 2 inyecciones en 2 puntos, los días 0, 3, 7 y una inyección el día 28, 90. Las inyecciones son de 1/5 de la dosis utilizada por vía intramuscular y son puestas en los brazos <sup>(68, 63)</sup>.

Otros protocolos multisitios usando la vía intradérmica son estudiados con el fin de disminuir el costo del tratamiento y de asegurar una respuesta en anticuerpos neutralizantes más rápida en la ausencia de seroterapia. <sup>(46, 47)</sup>

La seroterapia está indicada en las contaminaciones de categoría III de la OMS que se describe en el Cuadro 3. Las inmunoglobulinas disponibles son de origen equino y humano. Las inmunoglobulinas humanas no tienen los efectos indeseables alérgicos de las inmunoglobulinas equinas, pero son escasas y costosas. Las inmunoglobulinas deben ser infiltradas localmente a nivel de la mordedura en su mayor parte; el resto de la dosis se inyecta por vía intramuscular profunda del lado opuesto a la mordedura. La posología es de 20 UI/kg para las inmunoglobulinas humanas y de 40 UI/kg para las inmunoglobulinas equinas <sup>(73)</sup>.

Algunos fracasos ocasionales de los tratamientos han sido descritos cuando las inmunoglobulinas no fueron asociadas a la vacuna, cuando el tratamiento comenzó

tardíamente, o en sujetos inmunodeprimidos. En éstos casos, las inyecciones suplementarias y la vigilancia serológica permitirán adaptar el tratamiento a la respuesta individual <sup>(73)</sup>.

### **1.6.2 Tratamiento pre - exposición.**

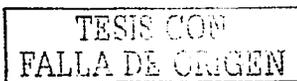
Es útil para permitir una respuesta rápida del organismo a una exposición refuerzo a continuación de una vacunación posterior, ya que no existe ningún tratamiento eficaz de la rabia confirmada <sup>(69, 73)</sup>.

*Indicaciones.* La vacunación preventiva está recomendada para las personas expuestas a riesgo elevado de contaminación rábica o a contaminaciones que puedan pasar inadvertidas. Esta recomendación se aplica a diferentes categorías de profesionales: personal de laboratorio que manipula virus rábico, veterinarios, guardabosques, personal de perreras y de diferentes sociedades protectoras de animales. Se ha extendido desde hace una decena de años a los viajeros que pasan temporadas en zonas con rabia enzotica <sup>(29, 62, 48)</sup>.

El tratamiento de la rabia declarada no existe: cuando los primeros síntomas aparecen, la evolución hacia la muerte es inexorable, puede ser en algunos días o algunas semanas, según las posibilidades de tratamiento sintomático o de reanimación <sup>(68)</sup>.

*Profilaxis de la rabia canina* La lucha pasa por la eliminación del vector canino cuando este último es un animal errante y por la vacunación preventiva de los perros con dueño responsable. Además de ellos, los gatos son igualmente vectores a tener en cuenta. En los países libres de rabia se aplica la cuarentena <sup>(70)</sup>.

*Profilaxis de la Rabia en la fauna silvestre.* La eliminación de los animales silvestres, sean vectores o reservorios, es difícil. En los países en vía de desarrollo, estos animales son poco accesibles, en los países industrializados la fauna silvestre está protegida. Una campaña de vacunación oral de zorros comenzada a fines de los años 80's ha reducido significativamente el número de casos en Europa del Oeste. En América Latina los



murciélagos hematófagos "vampiros" son el origen de importantes pérdidas en el ganado bovino. La sola posibilidad actual consiste en usar productos vampiricidas y la vacunación de los animales <sup>(70)</sup>.

## **1.7 Diagnóstico**

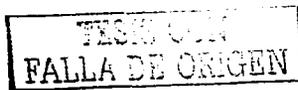
### **1.7.1 Generalidades.**

El diagnóstico permite identificar sin dudas, la presencia viral en los tejidos infectados en personas o animales sospechosos. El diagnóstico rápido y exacto del laboratorio de las infecciones de la rabia en seres humanos y otros animales es esencial para la administración oportuna de la profilaxis post-exposición. En algunas horas, un laboratorio de diagnóstico puede determinar si un animal es rabioso o no e informar al personal médico responsable. Además, la identificación del laboratorio de casos positivos puede ayudar en definir modelos epidemiológicos actuales de la rabia y en el reconocimiento de la necesidad del desarrollo de los programas de control de la rabia. <sup>(20)</sup>

En humanos el diagnóstico clínico es más difícil que en animales puesto que los pacientes presentan síndromes paralíticos parecidos al síndrome de Guillan – Barre. La detección de antígenos por lo general es sensible durante los primeros días, mientras que los anticuerpos neutralizantes del virus son usualmente detectados después de los 7 y 10 días después de haber contraído la enfermedad <sup>(69)</sup>.

Son muchas las pruebas de laboratorio que se han usado para el diagnóstico de rabia tanto en animales como en humanos y los avances en nuevas tecnologías han ayudado a que el diagnóstico sea cada vez mas preciso. Estas pruebas se realizan en muestras de suero, líquido cerebro espinal, saliva y biopsias de la piel <sup>(8, 11, 55)</sup>.

Las pruebas que se usan para el diagnóstico y la investigación son: la histopatología, Tinción de Seller's, inmunofluorescencia (IF), la microscopía electrónica (EM), inmunohistoquímica, aislamiento en cultivos celulares y más recientemente la reacción en cadena de la polimerasa reversa (PCR-RT), entre otros; como la hibridación con <sup>32</sup>P. Esta



técnica ha sido también usada para el diagnóstico de rabia pero solo detecta el genoma de rabia en ejemplares altamente infectados. <sup>(22)</sup>

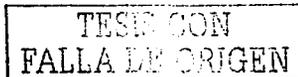
La técnica que recomienda la Secretaría de Salud en nuestro país para la "Identificación del virus de la rabia para muestras clínicas", es la siguiente <sup>(74)</sup>:

- a) **Indicaciones:**
    - i) En material de necropsia de animales domésticos o silvestres sospechosos.
    - ii) En biopsias de tejidos humanos.
  - b) **Muestra:**
    - i) Post mortem: el encéfalo de animales o de humanos.
    - ii) Ante mortem: Impronta corneal (humanos).
  - c) **Procedimiento:** La IF se hace usando como reactivo anticuerpos antirrábicos fluoresceinados.
  - d) **Resultados:** La presencia de estructuras intra celulares de tamaño variable (cuerpos de Negri) partículas (polvo antigénico) y líneas irregulares fluorescentes indican la presencia de virus.
- 2) **Anticuerpos contra el virus por ELISA.**
- a) **Indicaciones:** Determinar el estado de inmunidad de sujetos vacunados.
  - 3) **Muestra:** Suero.
  - 4) **Procedimiento:** Se usan placas sensibilizadas con antígenos del virus de la rabia. Se prueban diluciones del suero problema y se considera positivo cuando el título es igual o mayor al obtenido con un suero positivo conocido que sirve como testigo.
  - 5) **Resultados:** Se informa el título en UI/mL, considerando que un título por arriba de 0.5UI/mL indique que la persona esta inmunizada.

A continuación se describen más ampliamente las técnicas usadas para el diagnóstico de rabia.

### 1.7.2 Histopatología

Aunque es un método no específico y poco sensible para diagnosticar rabia, el examen histológico de los tejidos de la biopsia o de la autopsia es de vez en cuando útil. Cuando el tejido del cerebro de un animal infectado rabia se tiñe con una tinción



histológica, tal como hematoxilina y eosina, la evidencia del encéfalomiélitis se puede reconocer fácilmente <sup>(36)</sup>.

La evidencia histopatológica de la encéfalomiélitis de la rabia (inflamación) en tejido y meninges del cerebro incluye el siguiente <sup>(16, 47)</sup>:

- Infiltración mononuclear
- Infiltración peri vascular de linfocitos o de células polimorfonucleares
- Focos linfocíticos
- Nódulos pequeños que consisten en las células
- Cuerpos de Negri

**Cuerpos de Negri.** Aunque la mayoría de las muestras histopatológicas de la rabia ya eran reconocidas, no fue hasta 1903 que las inclusiones fueron detectadas por el Dr. Adelchi Negri. Él señaló que había identificado lo que creyó era el agente etiológico de la rabia, el cuerpo de Negri. Esto era un cuerpo redondo u oval de la inclusión observado a veces dentro del citoplasma de las neuronas de los animales infectados con rabia. El diagnóstico post/mortem, se realiza mediante la demostración de estos cuerpos de Negri en tejido cerebral mediante la tinción de Seller's <sup>(3, 17)</sup>

Los cuerpos de Negri pueden variar de tamaño a partir de la 0,25 a 27µm. Estas inclusiones se encuentran con frecuencia en las células piramidales del cuerno de Amón, en las células de Purkinje del cerebelo, y en las células de la médula y ganglio. Se pueden encontrar a veces en las glándulas salivales. Tiñéndose con Mann, Giemsa, tinción de Seller, y otros, las inclusiones de la rabia se pueden distinguir de otras inclusiones intracelulares <sup>(47, 58)</sup>.

Para diferenciar los cuerpos de Negri de los que no lo son se deben tomar en cuenta los siguientes parámetros: presencia de gránulos basofílicos internos, matriz heterogénea, poco refringentes. Mientras que algunos artefactos pueden presentar las siguientes características: ausencia de estructuras internas, matriz homogénea, muy refringentes, más

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

acidofilicos. Lo anterior es más común en muestras de humanos debido a que otras enfermedades pueden intervenir. La presencia y la concentración de los cuerpos de Negri dependen en gran parte de la etapa en curso de la enfermedad y la concentración y del virus. La examinación microscópica para los cuerpos de Negri por tinción histológica no es tan sensible ni tan específica como la IF<sup>(17)</sup>.

La técnica histológica puede detectar a cuerpos de Negri en solamente 50% de muestras positivas en contraste con la IF que detecta estos cuerpos de inclusión en el 100% de muestras. Además, las tinciones histológicas son no específicas y los resultados falso - positivos pueden ser obtenidos por personas especializadas que puede distinguir lo no específico de inclusiones específicas. Por lo tanto, debido a la sensibilidad y la posibilidad bajas de positivos falsos, los resultados de esta prueba deben confirmarse por IF<sup>(15)</sup>.

**Tinción de Seller.** Consiste en la aplicación del tejido encefálico, de la muestra fresca o refrigerada mantenida en glicerina, a un portaobjetos que se tiñe. Mientras la muestra esta todavía húmeda, se introduce en el colorante de Seller se deja reposar y se enjuaga, para luego secarla a temperatura ambiente y ser observada al microscopio. El tejido reacciona a la tinción tomando un color rojo cuando se tiñe con la fucsina y se usa azul de metileno como base. La efectividad de la prueba es del 70%. La ventaja de esta técnica es que cualquier laboratorio de diagnóstico puede montarla por ser fácil de realizarse, los resultados de la técnica son obtenidos en 10 min.<sup>(58)</sup>.

### 1.7.3 Inmunofluorescencia (IF).

La inmunofluorescencia (IF), muestra un diagnóstico rápido estableciendo pruebas positivas. Las tinciones para IF de los antígenos de rabia de biopsias de piel fueron rápidamente diagnosticadas en el 50% de los casos tempranos en el curso clínico. Esta prueba se ha venido usando por más de 40 años, y se reconoce como la más rápida y confiable de las pruebas para el uso rutinario. La prueba directa de anticuerpos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

fluorescentes (dAF) es la que se utiliza con mayor frecuencia para diagnosticar rabia en animales <sup>(10)</sup>.

El anticuerpo se dirige sobre todo contra la nucleoproteína (N) del virus. Las réplicas del virus de la rabia en el citoplasma de células infectadas pueden contener las inclusiones redondas u ovals grandes que contienen colecciones del nucleoproteína (N) o colecciones más pequeñas del antígeno que aparezcan como partículas fluorescentes <sup>(16,17)</sup>.

La prueba IF se basa en el principio de que un animal infectado por el virus de la rabia tendrá presente el antígeno de la rabia en su tejido. Debido a que el virus está presente en tejido nervioso (y no en sangre como muchos otros virus) lo ideal es probar la presencia del antígeno en el cerebro. La parte más importante de una prueba IF es marcar fluorescentemente el anticuerpo anti-rabia. Cuando el anticuerpo marcado se agrega al tejido sospechoso de rabia del cerebro, reconocerá al antígeno si está presente. El anticuerpo no fijado puede ser lavado y las áreas en donde ocurrió el reconocimiento antígeno - anticuerpo aparecerán como color verde fluorescente brillante cuando se ven con un microscopio de fluorescencia. Si el virus está ausente no habrá fluorescencia <sup>(24)</sup>. La fluorescencia se observa más opaca hacia el centro, las partículas minúsculas se les conoce como polvillo antigénico, mientras que las partículas grandes corresponden a los cuerpos de Negri <sup>(17)</sup>.

La técnica tiene como desventaja que los residuos de acetona se pueden conjugar con la glicerina lo cual podría llegar a ocultar la fluorescencia, por lo que en ocasiones se recomienda evitar la fijación con acetona. La ventaja de esta prueba es que tiene aproximadamente 98% de exactitud. Se pueden trabajar muestras autolisadas pero si el resultado es negativo debe confirmarse por otra técnica, la más recomendada es la prueba biológica. <sup>(17)</sup>

#### **1.7.4 Prueba biológica.**

La inoculación intracerebral al ratón lactante o de 21 días, por su susceptibilidad seguida de la prueba de dAF, o de la búsqueda de cuerpos de Negri, en el tejido cerebral, sigue siendo una de las pruebas más utilizadas para el diagnóstico de la rabia en el laboratorio, ya que es ligeramente más sensible. La concordancia entre ambas técnicas es de un 99% <sup>(17, 51, 58)</sup>.

Se emplea un animal sospechoso del cual la prueba de IF haya resultado negativa. Los signos clínicos de la enfermedad (parálisis, pelo hirsuto) comienzan a manifestarse después del quinto día de la inoculación. Posteriormente se sacrifica al ratón, se descerebra y se hace impronta para observarla mediante IF. La efectividad de la prueba es del 100% <sup>(58)</sup>

#### **1.7.5 Inmunohistoquímica (IHQ)**

Los métodos de IHQ para la detección de la rabia son sensibles y específicos para detectar rabia en tejido fijado en formalina tal como tejidos de la autopsia o de la biopsia. Este método es más sensible que métodos que tiñen por histopatología, tales como HE y la prueba de dFA, este procedimiento utiliza anticuerpos específicos para detectar inclusiones del virus de la rabia. La técnica utiliza un sistema de marcaje de la enzima que aumenta sensibilidad. Además, los anticuerpos monoclonales se pueden utilizar para detectar variantes del virus de la rabia <sup>(63, 69)</sup>.

Algunas de las ventajas de la IHQ sobre la IF es que puede utilizarse en tejidos fijados en formalina al 10% e incluidos en parafina, aunque lo ideal es trabajar con improntas frescas o cortes por congelación ya que los fijadores pueden desnaturizar proteínas o enmascarar los determinantes antigénicos, ocasionando que la reacción sea débil o escasa. Otra ventaja de la IHQ es que para su observación no se requiere un microscopio de epi-fluorescencia sino que se utiliza el microscopio de luz además la

duración de la reacción es permanente, lo que permite guardar las laminillas a temperatura ambiente durante años, mientras que la fluorescencia es efímera <sup>(17)</sup>.

La demostración de un antígeno viral por medio de la inmunohistoquímica incrementa en gran medida la cantidad de diagnósticos de la enfermedad. Tiene un porcentaje de 87-98% de resultados positivos con la inmunoperoxidasa y se han encontrado muchas ventajas contra la inmunofluorescencia. <sup>(3)</sup>

Recientemente se ha descrito el uso de una inmunoperoxidasa y una mezcla de tres anticuerpos monoclonales, la inmunoperoxidasa es un complejo de biotina y streptoavidina. Lo anterior está dirigido contra la nucleocápside del virus, el diagnóstico de rabia en tejido embebido en parafina se puede hacer por esta técnica. <sup>(19)</sup>

#### **1.7.6 Aislamiento celular.**

Cuando las muestras contienen una cantidad pequeña de virus de la rabia, puede ser difícil detectar el virus por métodos rutinarios. El aislamiento del virus en cultivos celulares, tales como, las células del neuroblastoma del ratón (MNA) o de células del riñón del hámster (BHK), aumenta la sensibilidad de la detección aumentando la concentración del virus como réplicas del virus en los cultivos de células. <sup>(55)</sup>

Las dos líneas celulares BHK21 fueron originalmente identificadas como los sistemas de hospederos más convenientes, aunque recientemente la línea celular de C-1300 de neuroblastoma murino ha desarrollado mayor sensibilidad <sup>(51)</sup>.

#### **1.7.7 Detección rápida inmunoenzimática de antígenos rábicos (RREID).**

El RREID (por sus siglas en inglés) ha sido concebido para el diagnóstico de la rabia por detección de la nucleocápside viral en encéfalo. Esta prueba inmunoenzimática está fundada en la inmuno captura de la nucleocápside del virus de la rabia. Los sobrenadantes de cerebro son distribuidos en los pozos de la placa sensibilizados con anticuerpos policlonales anti-nucleocápside. El revelado se efectúa por los mismos

anticuerpos ligados a peroxidasas (ELISA sandwich) esta técnica rápida no necesita equipo especializado y su sensibilidad junto con la IF depende de la buena conservación de las muestras; contrariamente a lo que se ha observado al aislamiento del virus. La RREID puede asociarse con las técnicas rápidas para estudios epidemiológicos de campo, o en países en los que no se favorecen de la colecta o autopsia de los animales <sup>(6)</sup>.

### **1.7.8 Reacción en cadena de la polimerasa.**

Con este nombre se ha descrito a la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante ciclos repetidos de síntesis dirigidos por iniciadores. El mecanismo es básicamente similar al utilizado por las células durante la replicación, mientras que la desnaturalización capacita a la enzima polimerasa a generar una copia complementaria de ADN parental a partir de desoxirribonucleótidos trifosfato [dNTPs] en solución. <sup>(69)</sup>

Los iniciadores específicos son sintetizados químicamente de modo que son complementarios a la secuencia de ADN que flanquean la secuencia de interés. Uno de los iniciadores es diseñado para alinearse a la hebra sentido y el otro a la hebra contra sentido, con su extremo 3' apuntándose el uno al otro. Los iniciadores son mezclados con una solución tamponada que contiene el ADN molde, los dNTPs, el ión magnesio divalente y la enzima polimerasa termoestable. El ADN molde de doble hebra es entonces desnaturalizado por calor a una temperatura por encima de su punto de fusión. A continuación se desciende la temperatura lo suficiente para que ahora ocurra la rehibridación entre los iniciadores y el ADN molde, pero que aún sea lo suficiente para prevenir la hibridación errónea de los iniciadores con otras secuencias de gran similitud que pueden encontrar en el genoma. La temperatura es nuevamente incrementada para favorecer la actividad sintética de la polimerasa, la cual se ha unido al extremo duplex molde / iniciador. La síntesis comienza a través de los extremos 3' hasta que la reacción es parada mediante un aumento de la temperatura hasta el punto de fusión por segunda vez. Hasta aquí se ha completado el primer ciclo de la reacción.

El segundo ciclo repite el primero con respecto al ADN original, pero la síntesis sobre las nuevas hebras ocurrirá solo hasta el final de la molécula, lo cual corresponde a al extremo 5' del cebador opuesto.

Después de un tercer ciclo de la PCR es fácil ver que la síntesis dirigida por los productos de los primeros dos ciclos terminaran en los extremos definidos de ambos cebadores y este tipo de producto se acumulara exponencialmente con subsiguientes ciclos. (8, 62)

En resumen la reacción en cadena de la polimerasa se lleva a cabo en los siguientes pasos.

- Desnaturalización.
- Alineación.
- Extensión.

*Desnaturalización.* Las temperaturas óptimas son 95 °C durante 30'' o 97 °C durante 15''.

*Alineación.* El rango de temperatura es de 20-80 °C, la concentración del iniciador es igual a 0.2µM y necesita pocos segundos. Para aumentar la especificidad en el ciclo inicial la polimerasa puede ser adicionada después del primer paso de desnaturalización durante la alineación del iniciador o una baja extensión de la temperatura junto con una alta concentración (más de 0.2µM) de dNTP's favorece una mala extensión del primer y una extensión con un mal acoplamiento del nucleótido. Se sugiere usar iniciadores grandes y solo dos temperaturas para la alineación y la extensión y otras dos para la desnaturalización separación.

*Extensión del iniciador.* La incorporación a 72 °C varía de 35 - 100 nucleótidos dependiendo del buffer, pH, sales y la naturaleza del DNA.

*Número de ciclos.* Depende de la concentración del DNA blanco. Demasiados ciclos pueden incrementar la suma y la complejidad de los productos no específicos; pocos ciclos dan poco producto <sup>(18)</sup>.

No. de molécula	No. de ciclos
50 moléculas	40-50
3X10 <sup>5</sup>	25-30

**Dificultades con la PCR.** Con alguna frecuencia se encuentran problemas incluyendo productos no detectables o una baja cosecha del producto deseado. La presencia no específica de bandas en los geles de electroforesis es debida a un mal iniciador o a una mala extensión de los iniciadores para la amplificación y mutaciones o heterogeneidad debida a mala incorporación.<sup>(35)</sup>

**Falsos Positivos.** Durante el corrimiento de la prueba pueden ocurrir contaminaciones que originen falsos positivos. Un ciclo de PCR simple produce un gran número de moléculas amplificadas que pueden contaminar potencialmente subsecuentes amplificaciones de algunas secuencias blanco. Para controlar la contaminación, la transferencia física del ADN entre los ejemplares amplificados y los controles positivos y negativos, el pipeteo debe ser realizado con mucho cuidado<sup>(33)</sup>.

Para prevenir los remanentes de las secuencias amplificadas de ADN se recomienda:

- 1) Preparar por separado las muestras en una habitación con medidas de bioseguridad;
- 2) La campana donde se estén trabajando las muestras deberá contar con una lámpara UV para eliminar posibles secuencias de ADN.
- 3) Separar los juegos de pipetas y mecanismos dispensadores, esto es, deberá usarse un juego para cada reacción.
- 4) El agua usada para las reacciones deberá esterilizarse en autoclave así como el buffer de PCR y evitar cualquier posible fuente de contaminación bacteriana que degrade el ADN.
- 5) Las puntas, los dispensadores de las pipetas y los viales también es recomendable esterilizarlos por autoclave. Los iniciadores, dNTP's y Taq polimerasa no se esterilizan en el autoclave.
- 6) Los reactivos se alicotan en el menor número de ejemplares. Todos los reactivos usados son preparados, divididos y guardados en un área que este libre de productos amplificados por PCR.
- 7) Los guantes desechables deberán cambiarse frecuentemente, ya que esto reduce las posibilidades de transferir secuencias de ADN amplificado.
- 8) Algunos tipos de tubos de muestra tienen tapas que requieren de mucha fuerza para abrirlas por lo que debe tenerse cuidado para no salpicar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

9) El depósito para las puntas de las pipetas puede ser contaminado con aerosoles que contengan ADN, por lo que deben mantenerse retiradas del área de trabajo.

Cuando sea posible se deberá hacer una mezcla previa de los reactivos a usar antes de hacer el PCR y dividirla en alícuotas. Esto minimiza la transferencia de muestra y la contaminación esporádica, además reduce la contaminación cruzada por reducción del número de oportunidades para la transferencia inadvertida de ADN.

No se recomienda usar altas concentraciones de la secuencia de ADN blanco, como sería el control positivo, esto podría conducir a una muy grande amplificación molecular.

Para prevenir riesgos se debe evitar remanentes de la secuencia en el equipo usado para la amplificación o en procesos anteriores como los geles y las cámaras en donde se corren los geles.

**Condiciones óptimas para la reacción** <sup>(35)</sup>. Para obtener una buena calidad de ADN así como una buena calidad de las bandas en los geles de agarosa y acrilamida se recomiendan lo siguiente, en cuanto a los reactivos:

**ADN blanco.** Las secuencias blanco pueden ser de menos de 100pb hasta pocas kb. Típicamente para el PCR se usa de 0.05 - 1µg, esto permite la detección de una copia simple del ADN blanco. Algunas impurezas pueden ser eliminadas o diluidas por sucesivas amplificaciones de este ADN.

**Taq polimerasa:** Se obtiene de *Thermus aquaticus* y la concentración deberá ser de 1 - 2.5 unidades/100µL de la reacción.

**Desoxirribonucleótidos (dNTP's):** La concentración de dNTP's de 20 a 200 µM por reacción de cada uno, lo cual da una óptima especificidad y fidelidad de la reacción. Los dNTP's pueden usarse a concentraciones equivalentes para minimizar la mala incorporación, lo que puede interferir en la hibridación ADN - ADN. Una concentración final mayor a 50 mM total puede inhibir la *Taq polimerasa*. Una concentración de 20 µM de cada uno de los dNTP's por cada 100 µL de reacción es suficiente para sintetizar 2.6 µg de ADN.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

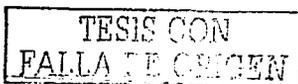
***Magnesio divalente.*** La concentración de magnesio deberá ser de 0.5–4 mM por el total de la concentración de dNTP's. La concentración de este ión afecta directamente a la temperatura de alineación del iniciador, la temperatura de fusión del ADN y la actividad enzimática. Se ha observado que una concentración de 2.5 mM es óptima para la detección de patógenos.

***Iniciadores.*** La concentración del iniciador que se recomienda es de 0.1-0.5  $\mu$ M, una concentración mayor en la reacción puede promover la formación de productos de amplificación e incrementar la formación de dímeros entre los iniciadores. De preferencia deberán tener una temperatura de alineación de 60-70 °C, una longitud de entre 18-30 nucleótidos, su localización puede o no estar cercana a la estructura de la horquilla. El par final del extremo 3' es crítica, las pares de bases son exactas y generalmente se requiere a 3' terminal para la amplificación del ADN. Con un mal acoplamiento de T en 3' terminal, aún sigue la amplificación del PCR si este corre en condiciones no tan estrictas, para eludir un mal acoplamiento en la amplificación de iniciadores, es preferible seleccionar la longitud y la localización del iniciador a lo largo del ADN blanco, tal que la temperatura de alineación permanezca alta (sobre los 70 °C). También la repetición de cadenas largas de GC o AT dentro de los iniciadores podría evitarse.

Para inhibir a las ADNasas se usa NaCl 50 mM o más de 50 mM de KCl y para estabilizar la enzima se usa 100  $\mu$ g/mL de albúmina sérica bovina.

***Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa (RT-PCR).*** <sup>(12, 28)</sup> La RT-PCR se ha usado como una poderosa herramienta de biología molecular para estudiar los ácidos ribonucleicos. Esta técnica es usada en el diagnóstico médico de virus ARN, en hematología y en oncología para detectar genes que usan capacidad de transcripción inversa. A este método se le han encontrado nuevas aplicaciones día con día.

Para realizar la técnica se extrae el ARN de diferentes muestras (por el método de extracción que se elija) y se congela a -70°C.



Consideraciones generales:

- se debe tener cuidado de no sobre secar la pastilla obtenida de la extracción,
- remover completamente el etanol ya que es un inhibidor de la PCR,
- revisar la calidad del ARN por medio de geles de agarosa,
- la transcripción es buena a 70°C que es una temperatura benéfica para no crear estructuras secundaria de ARN,
- eliminar en lo más posible las fuentes de ARNasas descontaminando materiales,
- RT-PCR es un método que detecta la expresión de un gen, no la presencia del genoma, por tanto el PCR no amplifica moléculas genómicas de ADN sino de ADNc.
- es preferible preparar por separado la mezcla de la reacción antes de poner en contacto con los iniciadores o con el ARN a temperatura ambiente,
- se recomienda mezclar por una parte los iniciadores, los DNTP's y la plantilla, y por otro lado el buffer de PCR, el magnesio y polimerasa y mezclar antes de los ciclos.

**PCR anidado.** Es un método de amplificación en dos pasos que ha sido usado para detectar el virus de la rabia en virus tipificados por inmunofluorescencia. En estudios realizados por Heaton y cols. y Walter y cols., este método fue positivo para todas las muestras positivas de rabia, en una experimentación realizada en Tailandia observando en los geles las bandas esperadas. Incluso se observaron positivas las muestras expuestas a 37°C hasta 48 hr reportadas como positivas por inmunofluorescencia directa, se reporto un título de 0.5 ng de ARN total. La sensibilidad de la técnica fue para hasta 8 pg del virus de la rabia. El uso del PCR anidado demostró ser útil para la detección del virus rábico en cerebros de animales y en tejidos de humano infectados, además demostró que la técnica puede usarse en muestras 72 hrs después de la muerte. <sup>(28)</sup>

**El PCR para diagnóstico de rabia.** Desde 1993 la PCR ha sido descrita para diagnosticar el virus de la rabia detectando desde 8 pg del virus. La PCR fue capaz de confirmar rabia en especímenes después de su diagnóstico por IF de resultados negativos. El procedimiento

incluye la transcripción inversa, la síntesis de ADNc y la amplificación, los cuales son realizados en 24hr, con este método, el RNA del virus de la rabia se puede amplificar como copias de ADNc. Nicholson reporta que cuarenta ciclos de la amplificación, pueden producir hasta 1012 veces la cantidad original de ácido nucleico en la muestra del virus <sup>(21)</sup>.

El principio básico para diagnosticar rabia por medio de PCR es la presencia del gen N, que es la región más conservada y codifica para la proteína N. Una vez que esta región es transcrita, los ARNm pueden ser un blanco para el diagnóstico molecular de rabia. <sup>(52)</sup>

Esta técnica se ha utilizado para confirmar los resultados de dFA y para detectar el virus de la rabia en las muestras de biopsias de glándula salival y de piel que contienen cantidades mínimas del virus. En Crepin, et.al., 1998 el total de ARN para un experimento fue obtenido de estas muestras por diferentes técnicas y confirmar los resultados por PCR.

Para confirmar la ausencia de contaminaciones en la PCR, se debe incluir en cada análisis un control negativo derivado de RNA celular de muestras no infectadas; y un control positivo derivado del total de RNA celular extraído de virus de rabia de la cepa CVS-11 de cultivo celular BHK infectado. <sup>(20)</sup>

**PCR en la epidemiología de la rabia.** El uso de PCR no sólo se ha limitado al diagnóstico del virus, sino que también se ha usado para el estudio de la epidemiología de este virus. <sup>(40)</sup>

Con la ayuda de esta técnica se conoció que además de los ciclos reportados tradicionalmente, se describen por primera vez otros ciclos especialmente en fauna silvestre que no habían sido descritos previamente, de este modo se publica que en la variante del perro existen dos subvariantes, México I diseminada en todo el territorio mexicano y México II, encontrada en el centro del país. Así en este ciclo, pero de fauna silvestre se encontraron un ciclo que circula en los zorros y lincees, México III, y dos ciclos en zorrillos, México IV y V que difieren en casi un 20% de su genoma de los ciclos ya conocidos, los que se encontraron en Aguascalientes y en Baja California Sur <sup>(41)</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general.**

**2.1.1. Determinar la estabilidad del genoma del virus de la rabia mediante la técnica de PCR en cerebros de ratón inoculados con el virus expuestos a temperatura ambiente.**

### **2.2. Objetivos particulares.**

**2.2.1. Estandarizar la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de rabia mediante el uso de iniciadores específicos.**

**2.2.2. Evaluar el límite mínimo de detección y la especificidad de la técnica de PCR con oligonucleótidos específicos utilizando diferentes concentraciones del virus, así como confrontándolos con otros virus como el virus de ojo azul y el virus de Aujeszky.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **3.0 HIPÓTESIS**

**El virus de la rabia por ser un virus ARN es muy susceptible a degradarse por acción de las ARNasas así como del incremento de la temperatura, por lo que si cerebros de ratón experimentalmente inoculados con el virus de la rabia son expuestos a temperatura ambiente entonces el genoma del virus perderá su estabilidad, sin embargo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) será capaz de detectarlo.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

#### 4.0 JUSTIFICACION

La inmunofluorescencia (IF) es comúnmente la más utilizada para realizar el diagnóstico de rutina para rabia, sin embargo puede dar resultados falsos negativos en casos de muestras con alto grado de degradación. Por lo que una prueba que puede ser usada en estos casos es la reacción en cadena de la polimerasa PCR.

En la literatura no se reporta si el PCR de rabia puede elaborarse con ARN obtenido de muestras degradadas o en descomposición, por lo que en esta investigación se hace una comparación entre el ARN obtenido de cerebros que permanecieron a temperatura ambiente durante 23 días y si es posible ocupar este para la PCR.

Uno de los problemas para el diagnóstico de rabia en nuestro país es que la mayoría de los casos se presentan en Estados como: Chiapas, Veracruz, Tabasco, Michoacán y Guerrero donde las temperaturas son relativamente altas y por lo tanto el material con el que se cuenta para el diagnóstico no siempre llega al laboratorio en las condiciones adecuadas para realizar la prueba de rutina que es la IF o bien la prueba de inoculación en ratón que presenta el problema de proporcionar resultados hasta después de 15 días de inocular el virus. Por lo que la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa podría resultar una buena alternativa para realizar un diagnóstico confiable, dada la sensibilidad y especificidad que se reporta para otros agentes.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 5.0 MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Obtención de los cerebros.

Los cerebros se obtuvieron de 31 ratones de la cepa Balb/c inoculados vía intracerebral con 0.03 mL de virus de rabia CVS-11. Estos animales fueron sacrificados con formol una vez que estos presentaron signos de la enfermedad (7 días aproximadamente). Se extrajeron sus cerebros, se almacenaron en tubos Eppendorf® de 1.5 mL a -70°C para evitar degradación del ARN.

Posteriormente los cerebros obtenidos se almacenaron en un recipiente cerrado y fueron expuestos a temperatura ambiente durante 384 horas (23 días):

Horas	0	24	48	72	96	144	192	240	312	360	384
Días	1	2	3	4	5	7	10	12	16	18	23

Para cada tiempo se realizó la extracción de ARN con dos cerebros de ratón inoculados (CRI) y un cerebro negativo (CRN), excepto para los dos últimos tiempos en donde solo se utilizaron CRI.

### 5.2 Controles

Para confirmar la ausencia de contaminaciones en la PCR, se incluyó en cada análisis un control negativo de muestras de cerebro no infectado; y un control positivo derivado del ARN total extraído de virus de rabia de la cepa CVS-11 <sup>(52, 55, 60)</sup> de cultivo celular además de un cerebro inoculado con esta misma cepa de virus.

### 5.3 Extracción de ARN

Para extraer el ARN de los cerebros de ratón positivo y negativo así como de la suspensión de CVS-11 se utilizó TRIzol® (GibcoBRL) según instrucciones del fabricante. En un tubo de centrifuga se homogenizó ≈ 0.1g de cerebro de ratón con 1mL de Trizol. Se adicionaron 200 µL de cloroformo GBM. El tejido se separó de la fase acuosa y se centrifugó, se adicionaron 500 µL de isopropanol GBM, las muestras se centrifugaron, el

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

botón se lavó con 1 mL etanol al 75%, Finalmente se centrifugó a 7500 rpm. El botón obtenido se resuspendió con 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O-DEPC y fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

#### 5.4 Cuantificación de ARN

El ARN obtenido fue cuantificado en  $\mu$ g/mL mediante un espectrofotómetro GeneQuant II (Pharmacia Biotech) para posteriormente sintetizar el ADNc.

#### 5.5 Síntesis de ADN complementario.

La síntesis de ADNc se llevó a cabo con los iniciadores N1 y ForN1 siguiendo los protocolos del fabricante de la transcriptasa reversa que se utilizó (Super Script H<sup>+</sup> RT, GibcoBRL). El protocolo de reacción que se utilizó fue el siguiente:

Cuadro 4: Síntesis de ADNc.

Reactivo	Cantidad
RNA	1 $\mu$ L
Iniciador N1	100 pmol
Agua DEPC	cbp 12 $\mu$ L
Hervir 2'	Pasar a hielo
DTT	1 $\mu$ L
FSB	2 $\mu$ L
dNTP's	4 $\mu$ L
Super Script	0.6 $\mu$ L
RNAsine	0.1 $\mu$ L

Incubar 1hr, 37°C → -20°C

Para obtener el ADNc con el segundo par de iniciadores (ForN1) se realizó una transcripción que difería del anterior en el uso de la M-MuLVRTasa (Gibco, BRL).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 5.6 Iniciadores

Primeramente se utilizaron un par de iniciadores publicados por Sacramento, D. y cols. 1991. Las secuencias de estos son las siguientes:

N1(+): (5'-3') TTT GAG ACT GCT CCT TTT G

N2(-): (5'-3') CCC ATA TAG CAT CCT AC

Se utilizó otro par de iniciadores para la reacción de PCR que fueron diseñados por la Dra. Susan Nadin Davis y Dra. Elizabeth Loza Rubio basándose en la secuencia completa del gen N del virus de la rabia, los iniciadores son: ForN1 y RevN1 (patente en trámite).

## 5.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación de los iniciadores N1 y N2 se llevo a cabo con las siguientes características:

Mezcla de reacción:

Cuadro 5: Protocolo de reacción de PCR para los iniciadores N1 y N2

Reactivos	Concentración
Agua	cbp 27 $\mu$ L
Buffer PCR	10X
dNTP's	10 mM
MgCl	50 mM
Iniciador N1	20 mM
Iniciador N2	20 mM
<i>Taq. polimerasa</i>	5 U/ $\mu$ L
ADNe	4.0

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Programa del termociclador:**

**Cuadro 6: Programa del termociclador para los iniciadores N1 y N2**

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1	94	1:00
	47	1:30
	72	1:30
2	94	0:30
	47	1:30
	72	1:00
3	94	0:30
	47	1:30
	72	10:00
4	4	-----

Para el segundo PCR se utilizó el ADNc que se había sintetizado con ForN1 previamente. La reacción de PCR se llevó a cabo según las siguientes condiciones (Taq Polymerase GibcoBRL):

**Cuadro 7: Protocolo de reacción de PCR para los iniciadores ForN1 y RevN1**

Reactivo	Concentración
Buffer PCR	10X
MgCl	150 mM
Iniciador ForN1	25 pmol
Iniciador RevN1	25 pmol
dNTP's	12.5 Mm
ADNc	20 µL
Agua	ebp 80µL

La amplificación con los iniciadores se llevó a cabo con el siguiente programa para el termociclador (i-cycler: Bio-Rad):

**Cuadro 7: Programa del termociclador para los iniciadores ForN1 y ForN2**

30 ciclos:	95°C	45"
	50°C	30"
	70°C	30"
1 ciclo	4°C	-----

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los dos protocolos de PCR fueron realizados por triplicado para comprobar la reproducibilidad.

Los productos de amplificación fueron analizados en geles de agarosa al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio (5µg/µL) <sup>(1)</sup>. Las bandas fueron analizadas en un transiluminador y documentadas en un analizador de imágenes EDAS 120 (Kodak).

### **5.8 Determinación del límite más bajo de detección de la PCR Para el virus de la rabia.**

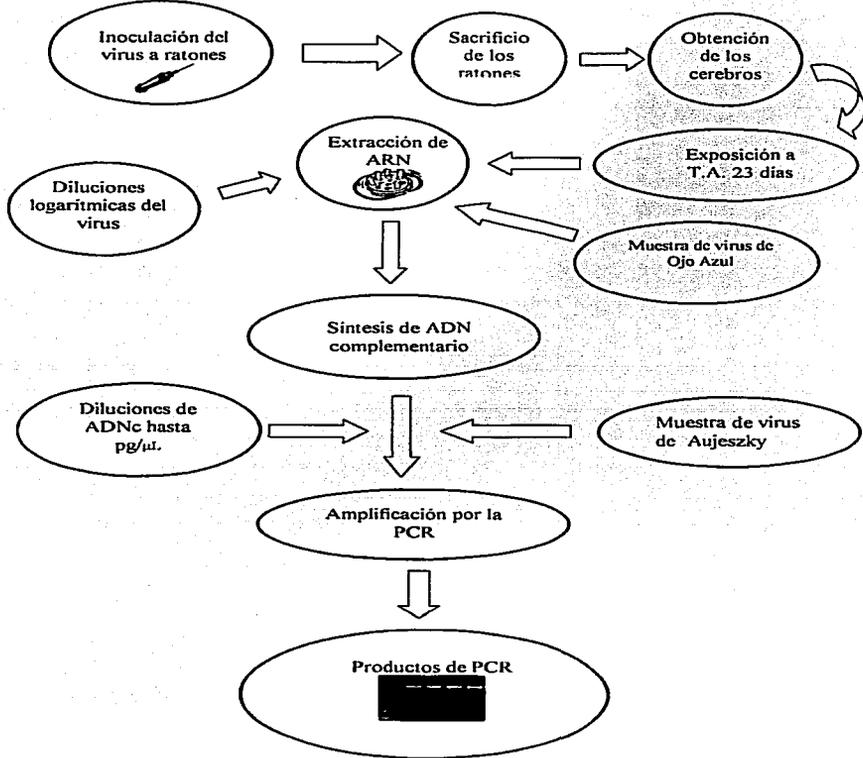
Para este punto se utilizó un control positivo conocido (cerebro de ratón inoculado con CVS-11). La concentración inicial de ADNc fue de 5 µg/µl . Posteriormente se realizaron tres diluciones de este control (0.05 µg/µL, 5.0 ng/µL y 5.0 fg/µL) para determinar la cantidad mínima de ADNc necesaria para ser detectada por la PCR en este tipo de muestra. También se realizaron diluciones logarítmicas de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$  de CVS-11 cuyo título inicial fue de  $10^3$ , las cuales fueron inoculadas en ratón vía intracerebral que fueron sacrificados al observarse signos característicos de la enfermedad. De los cerebros se extrajo ARN para ser sintetizado como ADNc y ser amplificado por PCR. Con esto se evaluó la sensibilidad de la PCR en cerebros de ratón infectados con diferentes concentraciones del virus.

### **5.9 Especificidad de la PCR para el virus de la rabia.**

Para probar la especificidad de los iniciadores utilizados, se llevo a cabo una PCR para el virus de Ojo Azul (Depto. de Virología, CENID – Microbiología) y para el virus de Aujeszky (Depto. de Virología, F.E.S. Cuautitlán). Al virus de Ojo Azul se le extrajo el ARN de igual forma que para los cerebros con el virus de la rabia, utilizando 1 mL de la suspensión del virus por cada mL de Trizol empleado. Para la síntesis de ADNc se siguió con el procedimiento referido anteriormente. Mientras que para el virus de Aujeszky se extrajo el ADN. La PCR se llevo a cabo utilizando los iniciadores ForN1 y RevN1 con el protocolo de reacción y programa de termociclado correspondiente a estos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 5.10 Diagrama de flujo



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 6.0 RESULTADOS.

### 6.1 Obtención del ARN

A partir de los cerebros positivos y negativos expuestos a temperatura ambiente (24 °C en promedio) se obtuvo el ARN con Trizol® (GibcoBRL) de tres cerebros, dos positivos y uno negativo según los tiempos mencionados en la parte de metodología. El ARN obtenido fue cuantificado en µg/mL en un espectrofotómetro (Gene Quant), del cual se obtuvieron los resultados mostrados en el Cuadro 9.

**Cuadro 9. Concentraciones de ARN de cerebros expuestos a temperatura ambiente .**

Horas	Muestra	Conc. µg/mL	Horas	Muestra	Conc. µg/mL
0	1 +	17304	144	16 +	4276.4
	2 +	6647.9		17 +	3016.1
	3 -	2440.8		18 -	3460.6
24	4 +	4044.8	192	19 +	4671.3
	5 +	7348.5		20 +	4447.3
	6 -	6138.6		21 -	4128.1
48	7 +	5091.3	240	22 +	4227.5
	8 +	7834.5		23 +	3495.9
	9 -	6721.7		24 -	5567.9
72	10 +	6174.4	312	25 +	4177.1
	11 +	4999.2		26 +	3903.7
	12 -	6797.4		27 -	6483.6
96	13 +	5258.2	360	28 +	1794.2
	14 +	7474.2		29 +	1996.1
		15 -	6912.8	384	30 +
				31 +	897.3

Con la concentración adecuada de cada uno de los ARN se llevo a cabo la síntesis de ADNc, que sirvió como plantilla para posteriormente realizar el PCR. En la Gráfica 2 se puede observar como fue disminuyendo la concentración del ARN conforme fue aumentando el tiempo.

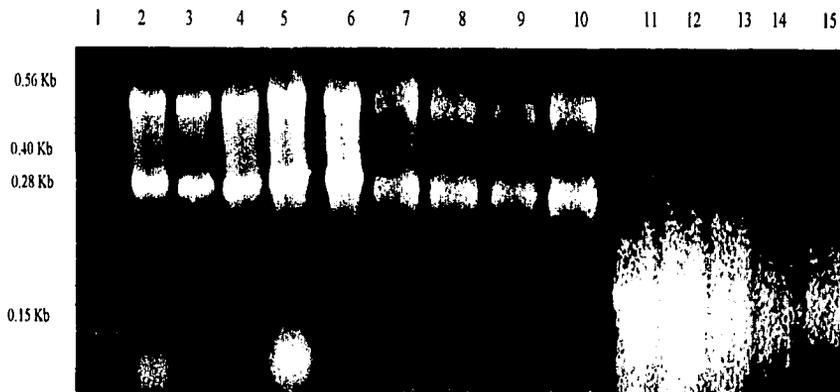
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 2. Concentración de ARN en cerebros expuestos a temperatura ambiente.



Para corroborar lo anterior, se realizó una corrida de electroforesis en geles desnaturizantes de agarosa para todas las muestras de ARN. Estos geles son necesarios porque el ARN tiende a formar estructuras secundarias y terciarias que pueden llegar a impedir la separación por electroforesis. El calor es el principal desnaturizante del ARN pero es insuficiente para la electroforesis, ya que las estructuras secundarias pueden formarse nuevamente. Por lo anterior esta electroforesis se lleva a cabo en dos pasos: la desnaturización por calor del ARN, y el uso de reactivos que mantengan las condiciones desnaturizantes <sup>(7)</sup>. En este caso se utilizó el formaldehído al 37% y formamida pura en los geles para desnaturizar el ARN (ver apéndice).

En la Figura 5 se aprecia como va disminuyendo la integridad del ARN debido a que los cerebros se encuentran a temperatura ambiente, lo que no se considera óptimo para muestras que serán utilizadas en diagnóstico. En el gel se pueden observar las bandas de 18S y 26S correspondientes a los diferentes ARN. La posición de las bandas pueden ser encontradas en un rango de 1.8-2.0 Kb para la fracción 18S y de 4.6-5.2 Kb para 28S en un marcador de pesos moleculares <sup>(7)</sup>.



**Figura 5.** Gel de agarosa al 1.5% en condiciones desnaturalizantes teñido con bromuro de etidio (5 $\mu$ g/mL) para la detección del ARN de los cerebros expuestos al medio ambiente. Línea 1: Marcador de pesos moleculares 0.16-1.77 Kb RNA Ladder (Gibco, BRL); línea 2: CVS-11, C(+); línea 3: Cerebro de ratón negativo (CNR); línea 4: 0hrs; línea 5: 24hrs; línea 6: 48hrs; línea 7: 72hrs; línea 8: 96hrs; línea 9: 144hrs; línea 10: 192hrs; línea 11: 240hrs; línea 12: 312 hrs; línea 13: 360hrs; línea 14: 384hrs; línea 15: CNR a 384 hrs.

## 6.2 Estandarización de la técnica de PCR

Para estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa se sintetizó ADNc a partir del ARN obtenido de cerebros de ratón infectados con el virus de la rabia (CRI), de suspensión del virus de la cepa CVS-11 y cerebro de ratón negativo (CRN); siendo así los dos primeros los controles positivos y el último el control negativo.

Primeramente se utilizó el par de iniciadores N1 y N2, reportados en la bibliografía como iniciadores específicos para el diagnóstico del virus por PCR <sup>(52)</sup>. Las muestras de los controles positivo y negativo se procesaron según el protocolo y el programa descrito por los autores. Sin embargo, de esta manera no se consiguieron los productos de PCR de 443 pb reportados por Sacramento, D., et.al. para estos iniciadores. Utilizando el mismo par de iniciadores se modificaron las cantidades de los reactivos, se utilizó además un termociclador con gradiente de temperaturas (i-Cycler, Bio-Rad), para buscar la temperatura de alineación más adecuada, usando ADNc de CVS-11, obteniendo como resultado que la temperatura óptima fue de 47°C ya que es donde la banda se observó más definida, mientras que anteriormente se había empleado 42° C como temperatura de alineación (Figura 6). Ya que se obtuvo este dato, se realizó el PCR con los controles siguiendo la metodología mencionada en material y métodos.

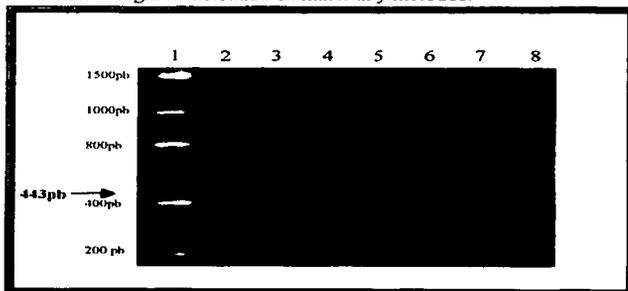
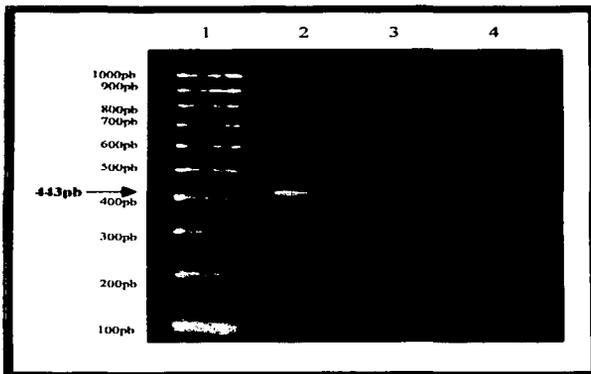


Figura 6. Producto de PCR con gradiente de temperatura para el control positivo en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (5µg/mL). Línea 1: Marcador Low Mass Ladder (Gibco, BRL); línea 2: 50°C; línea 3: 49.4°C; línea 4: 48.5°C; línea 5: 47°C; línea 6: 45°C; línea 7: 43°C; línea 8: 42°C.

En la figura 7 pueden observarse las bandas para los controles positivos de 443 pb, y no se mostró ninguna señal para el control negativo.



**Figura 7.** Producto de la primera amplificación del PCR para los iniciadores N1 y N2 en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (5µg/mL). Línea 1: Marcador de peso molecular 100 bp (Bio-Rad); línea 2: CVS; línea 3: CRI; línea 4: CRN.

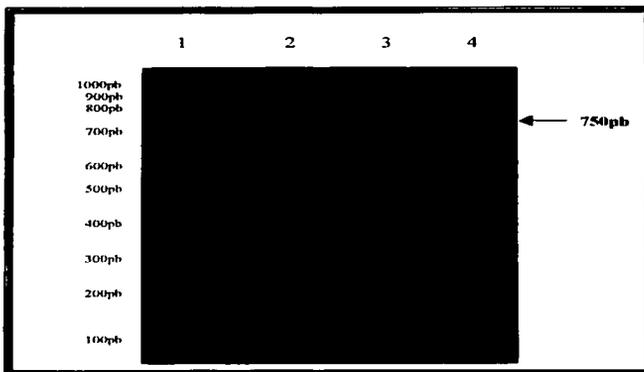
Para que la prueba fuera reproducible se hicieron dos replicas más de igual forma que la primera; sin embargo, las bandas de los controles positivos no fueron consistentes. Al realizar la tercera replica de este PCR ya no se observaron bandas para ninguna muestra lo cual significa que la prueba no tuvo reproducibilidad siguiendo este protocolo.

Al conseguir los resultados anteriores se optó por escoger un nuevo par de iniciadores. Los elegidos fueron ForN1 y RevN1, los cuales fueron secuenciados en el laboratorio a partir de la secuencia del gen N del virus de la rabia

Los protocolos para llevar a cabo la reacción, se mencionan en materiales y métodos. Al usar estos iniciadores se logró la amplificación de productos de 750 pb. Estos

TESTS CON  
FALLA DE ORIGEN

productos se corrieron en un gel de agarosa mostrando mejores resultados, en cuanto a la integridad y la calidad del ADN en comparación con los iniciadores N1 y N2 (Figura 8).



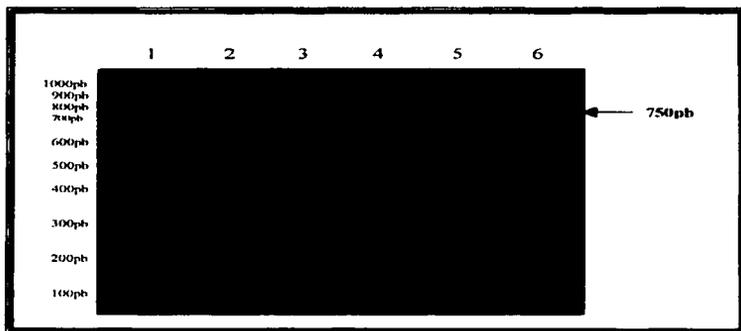
**Figura 8.** Producto de PCR para los iniciadores ForN1 y RevN1 en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (5 $\mu$ g/mL). Línea 1: Marcador de peso molecular 100 bp (Bio-Rad); línea 2: CVS; línea 3: CRI; línea 4: C(-).

Para probar la reproducibilidad de la técnica se realizó una segunda y tercera replica, obteniendo los mismos resultados, es decir bandas integras en cada reproducción realizada.

### 6.3 Especificidad de la PCR.

Para comprobar que los iniciadores fueran específicos para el virus de la rabia, se utilizaron los virus de ojo azul y el de Aujeszky, del primero se extrajo el ARN y se sintetizó el ADNc; mientras que del virus de Aujeszky se obtuvo ADN. El PCR se llevo a cabo utilizando los iniciadores ForN1 y RevN1 para lo cual se utilizaron los mismos controles positivos y negativos que en la estandarización de la PCR para el virus de la rabia.

En la Figura 9 se puede observar sólo la señal para el control positivo (750pb) y ninguna señal para los virus de Aujeszky o para el virus de Ojo Azul, lo cual implica que no hubo productos de amplificación inespecíficos.

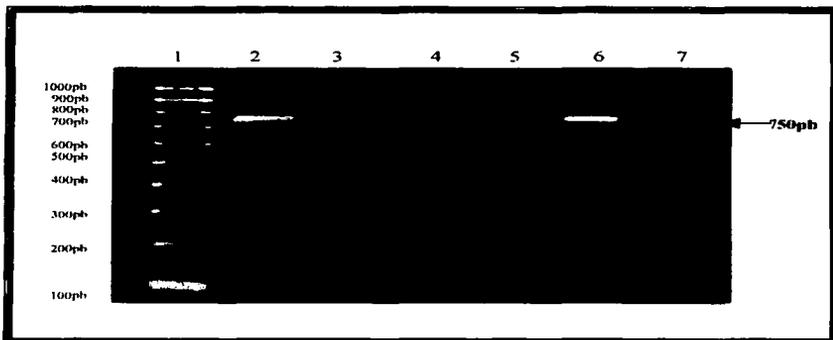


**Figura 9.** Productos de PCR para probar la especificidad en geles de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (5 $\mu$ g/mL). Línea 1: Marcador de peso molecular 100 bp (Bio-Rad); línea 2: CVS; línea 3: virus de Ojo Azul; línea 4: virus de Aujeszky; línea 5: C(-); línea 6: Agua.

#### **6.4 Determinación del límite más bajo de detección de la PCR.**

Para verificar este punto se utilizaron diluciones realizadas a partir de ADNc de cerebro de ratón inoculado que se utilizó como control positivo para la estandarización de la prueba. Este ADNc al ser amplificado por el PCR mostró la banda específica del producto para todas las diluciones desde los 5.0 $\mu$ g/ $\mu$ L hasta los 5.0 fg/ $\mu$ L, en la Figura 10 se observa que la intensidad de la banda disminuye de acuerdo a la cantidad de ADN presente en cada dilución.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

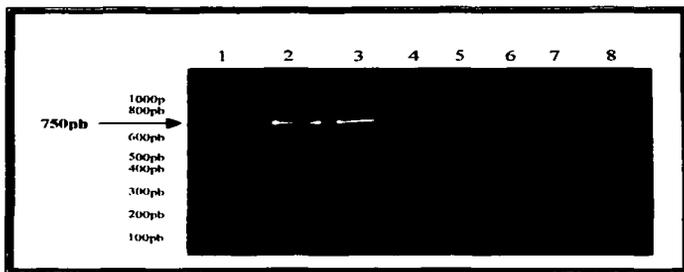


**Figura 10.** Productos de PCR para probar el limite mas bajo de detección de la prueba en geles de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (5µg/mL). Línea 1: Marcador de peso molecular 100 bp (Bio-Rad); línea 2: 5.0µg/µL; línea 3: 0.5µg/µL; línea 4: 5.0ng/µL; línea 5: 5.0fg/µL; línea 6: C(+); línea 7: C(-).

Por otra parte se realizaron diluciones logarítmicas del virus CVS-11 para inocular en ratón y posteriormente extraer el ARN a partir de los cerebros. Cabe mencionar que no se obtuvieron muestras para las diluciones de  $10^4$  y  $10^7$  debido a que los ratones murieron al siguiente día de ser inoculados por razones desconocidas, estas muertes no se atribuyen a el virus puesto que el periodo de incubación mínimo es de 6 días.

A los cerebros se les extrajo el ARN para sintetizar el ADNc que se utilizaría para la amplificación por PCR. En la Figura 11 se observan bandas de 750 pb para las diluciones de  $10^1$  y  $10^2$  lo significa que la concentración de ADN del resto de las diluciones es menor a los 5 fg/µL.

TESTE CON  
FALLA DE ORIGEN



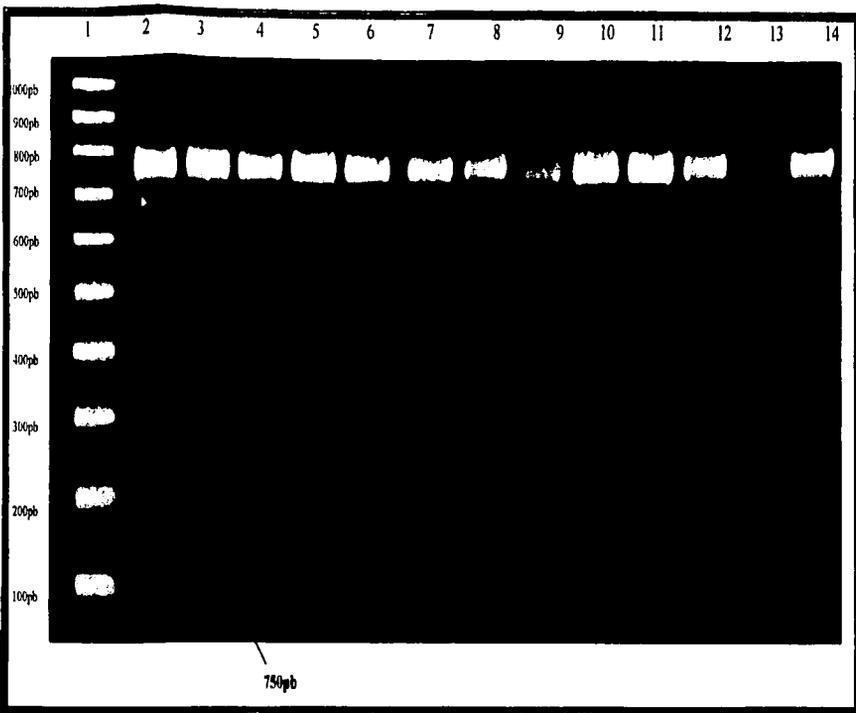
**Figura 11.** Productos de PCR para probar el limite de detección mas bajo de la técnica con diluciones de CVS inoculadas en ratón en geles de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (5µg/mL). Línea 1: Marcador de peso molecular 100 bp (Bio-Rad); línea 2: 10<sup>-1</sup>; línea 3: 10<sup>-2</sup>; línea 4: 10<sup>-3</sup>; línea 5: 10<sup>-5</sup>; línea 6: 10<sup>-6</sup>; línea 7: C(-); línea 8: C(+).

### **6.5 Determinación de la caducidad del virus.**

Con el ARN obtenido de los cerebros de ratón expuestos al medio ambiente, se sintetizó el ADN siguiendo los protocolos de estandarización, posteriormente las muestras fueron amplificadas.

Todos los productos de amplificación obtenidos mostraron bandas correspondientes al ADN íntegras y definidas en 750 pb lo cual nos indica de la presencia del virus desde las 0 hasta las 384 horas en las que los cerebros estuvieron expuestos al medio ambiente (ver Figura 12).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 12:** Productos de PCR de cerebros de ratón conservados a medio ambiente en geles de agarosa a 1.5% teñido con bromuro de etidio (5µg/mL). Línea 1: Marcador de peso molecular 100 bp (Bio-Rad); línea 2: 0hrs; línea 3: 24hrs; línea 4: 48hrs; línea 5: 72hrs; línea 6: 96 hrs; línea 7: 144hrs; línea 8: 192hrs; línea 9: 240hrs; línea 10: 312hrs; línea 11: 360hrs; línea 12: 384hrs; línea 13: C(-); línea 14: C(+).

## 7.0 DISCUSION

Si bien la rabia no ha sido de las mayores epidemias que ha sufrido el hombre si es una de las enfermedades más antiguas y recurrentes ya que a nivel mundial se encuentra como una de las 10 principales causas de muerte <sup>(35)</sup>.

A pesar de que Pasteur introdujo la vacunación contra la rabia desde hace más de 100 años, se ha seguido presentando tanto en humanos como en otras especies animales. Esta zoonosis es una enfermedad infecciosa, transmisible, de curso agudo y mortal, única por su capacidad para afectar a todos los mamíferos, ampliamente distribuida en el mundo, con una letalidad de 100%, en su transmisión interviene casi siempre la agresión de un animal enfermo <sup>(35)</sup>.

Durante más de 30 años se han hecho muchos avances en el diagnóstico del virus de la rabia. El diagnóstico histológico de los cuerpos de Negri en cerebros infectados por el virus ha sido reemplazado por la detección directa de la nucleocápside con anticuerpos fluorescentes poli y monoclonales, y es esta inmunofluorescencia la que ha sido el método de rutina para el diagnóstico de rabia. En adición, el aislamiento del virus por medio de la inoculación intracerebral en ratón (MIT, por sus siglas en inglés) o en tejido celular son técnicas que se utilizan con frecuencia para diagnosticar el agente etiológico; además de técnicas inmunoenzimáticas como el método llamado inmunodiagnóstico enzimático rápido de la rabia, cuyo fundamento es el mismo que el ELISA <sup>(6)</sup>.

Sin embargo las recientes aplicaciones de clonación y secuenciación de los genes de la rabia han permitido importantes avances en el conocimiento de la estructura y los mecanismos de este virus <sup>(60)</sup>.

En reportes que datan desde 1990 ya se utiliza la PCR como una herramienta para estudiar la biología molecular del virus, tanto para el diagnóstico como para estudiar la epidemiología del virus en cerebros de ratón inoculados <sup>(14)</sup>.

En todo el mundo se han publicado trabajos realizados con la PCR como una herramienta para el diagnóstico o para la epidemiología de la rabia debido a que la prueba es altamente sensible y específica siempre y cuando se utilicen los iniciadores adecuados.

En ocasiones se tienen muestras de tejido degradado que tienen que ser diagnosticadas, para lo cual la PCR ha demostrado ser una técnica altamente sensible. Para determinar el efecto de la degradación se ha usado RNA obtenido de tejido cerebral. Smith, et.al., 2000 realizaron un experimento con ratones inoculados con CVS-11, de los cuales se removió el tejido cerebral. un grupo de estos fue incubado a 37°C y los otros fueron puestos a 4°C. hasta por 360 horas. De esto se concluyo que para el diagnóstico de rabia la prueba con anticuerpos fluorescentes es suficiente ya que es rápida; sin embargo, en situaciones donde los ejemplares pueden estar altamente degradados, la identificación resulta difícil obteniéndose en algunos casos falsos negativos. Bajo estas condiciones de degradación que ocurren en países templados, con climas tropicales o cuando la muestra se saca de zonas de vigilancia, las pruebas de rutina no aportan buenos resultados. Por lo que la prueba adicional con mejores resultados es la RT-PCR <sup>(55)</sup>.

Los métodos para el aislamiento de ARN intacto de células o tejido usan desnaturizantes como el tiocianato de guanidina con el fin de destruir las células, solubilizar sus componentes y desnaturizar las ARNasas endógenas. El uso de este reactivo esta documentado desde 1977 y se usa a 4M, posteriormente el lisado es expuesto a CsCl debido a que la densidad del ARN en este es mucho más grande que en otros componentes celulares, por lo que en durante la centrifugación migra al fondo del tubo. La cosecha de ARN por este método es elevada aunque es muy laboriosa <sup>(53)</sup>. Por lo que como ya se ha mencionado en este estudio se utilizó el Trizol, un reactivo comercial que facilita la extracción.

El Trizol es un reactivo de una solución monobásica que contiene isotiocianato de guanidina y fenol. Actualmente, se ha popularizado el uso de este reactivo, ya que permite una extracción más fácil y rápida, sin sacrificar la calidad del producto obtenido, este

reactivo ha sido utilizado por la gran mayoría de investigadores que utilizan el ARN como plantilla para realizar posteriormente PCR con fines de diagnóstico o epidemiología del virus de la rabia <sup>(11,21,46)</sup>.

En la Figura 6, se pueden observar las bandas correspondientes a los ARN, y su degradación conforme fue avanzando el tiempo de exposición a temperatura ambiente. Las bandas que se muestran son las correspondientes a 1.8Kb y a 2.6Kb las cuales corresponden a las fracciones 18S y 28S respectivamente, sin embargo Bryant, et.al., 1998 y Sambrock, et.al., 2000 mencionan que las bandas deben aparecer entre 1.8-2.0 Kb la primera y la segunda entre 4.6-5.3Kb. Asimismo es importante señalar que en las muestras correspondientes a los últimos tiempos de conservación (240 hrs) , ya no aparecen las bandas características de 1.8 y 4.6 Kb, lo anterior se debe a que el material esta altamente degradado por acción de la temperatura, ya que las proteínas que envuelven al material genético del virus son termolábiles <sup>(59)</sup> además de las ARNasas presentes en todos los tejidos incluyendo el cerebro. Cabe mencionar que a este respecto, se utilizaron tubos para microcentrifuga libres de ARNasas por lo que no hay la intervención de ARNasas exógenas de las propias del tejido. De igual manera, este gel revela, que la carga viral así como el ARN presente en el tejido cerebral ha disminuido, por lo que si se hubieran realizado improntas para hacer un diagnóstico mediante inmunofluorescencia, (IF) seguramente los resultados no habrían sido fidedignos ya que se reporta que a los 5 días en muestras conservadas a 37°C la prueba ya no detecta la presencia viral; mientras que Heaton, et.al., 1997 y Smith, et.al., 2000 notifican que la IF detecta antígenos del virus de la rabia por períodos altos hasta de 360hr cuando el cerebro se conserva a 4°C, aunque ya se presento un alto deterioro del tejido. Cuando la incubación es llevada a cabo a 37°C sólo se detecta el antígeno hasta las 72 hrs.

En un laboratorio de diagnóstico los cerebros no siempre son recibidos en las condiciones frescas, y aunque la IF es la prueba de rutina para el diagnóstico, puede resultar en falsos negativos para muestras de alto grado de descomposición. Por lo cual el PCR puede ser una solución a este problema, ya que es capaz de detectar cantidades mínimas del virus en los casos de material ampliamente degradado. <sup>(21,55)</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Un paso crucial para la obtención de un producto de PCR con las características óptimas es la síntesis del ADNc por transcripción inversa del ARN que fue extraído del tejido, y cuantificado. El éxito de la manipulación depende de la calidad en la preparación del ARN y de la calidad de la enzima con la que se preparo el ADNc.

Se han ideado varias estrategias para realizar el RT-PCR (transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa):

1. Cuando se conocen las dos secuencias terminales de la plantilla para ser amplificada. En esta situación se puede agregar una mezcla de oligonucleótidos específicos obtenidos de la secuencia del genoma, y
2. Cuando sólo una de las secuencias esta disponible. En esta situación una segunda secuencia puede ser adicionada a la del extremo 3' o al extremo 5' del ARN. La adición a la región 3' puede presentar mayores ventajas por la adición de la región poli-A (oligo-dT).

Sin embargo se ha observado que con fin de diagnóstico es mejor emplear un oligonucleotido específico, ya que esto hace más sensible la prueba (Loza-Rubio, 2002 com. personal)

Una vez que el ADNc esta disponible, este puede ser amplificado. Lo que se facilita con la adición de los oligonucleótidos en la mezcla de PCR. <sup>(5)</sup>

El RT-PCR es un método para amplificar copias de ARN, es sensible y versátil, es usado para recuperar y clonar ARNm de 5' y 3' y para generar grandes cantidades de ADNc de muy pocas cantidades de ARNm. Adicionalmente el RT-PCR puede ser adaptado para identificar polimorfismos y mutaciones en secuencias transcritas, o cuando las cantidades de ARN son muy bajas <sup>(53)</sup>, que es el caso de esta investigación en donde se tiene ARN degradado para las muestras de los últimos tiempos de incubación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El primer paso para esta técnica es la conversión enzimática de ARN a una plantilla de ADNc de una cadena. Un oligodesoxiribonucleotido (iniciador) es hibridizado para el ARN y es entonces extendido por una ADN polimerasa dependiente del ARN para crear la copia de ADNc que será amplificada por el PCR <sup>(53)</sup>.

Como se mencionó anteriormente la transcripción reversa, es crucial para el éxito de la PCR, esto depende en gran medida de la calidad de la transcriptasa reversa que se usa para obtener el ADNc. Así que para esta investigación se probaron dos transcriptasas.

Como se menciona en material y métodos, en primera instancia se uso la Super Script II RNase H Reverse transcriptase (GibcoBRL) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este reactivo se empleó debido a que se encontró documentada como una enzima con la cual se obtenía un ADN de buena calidad <sup>(9, 25, 49)</sup>, sin embargo, con el uso de esta enzima se obtuvo un ADN, que en los geles de agarosa mostraba degradación. Cabe mencionar que los ARNs usados para estandarizar esta transcripción reversa fueron obtenidos de cerebros de ratón inoculados con virus rábico de la cepa CVS-11 y una vez extraídos fueron almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta ser usados, lo que aseguraba que el ARN que se uso estaba integro, esto se confirmo al cuantificarlo y observarlo en los geles de agarosa.

Al no obtener los resultados esperados con el uso de esta enzima, se optó por emplear otra transcriptasa reversa obtenida del virus de leucemia murina Moloney, M-MuLVRTasa (GibcoBRL), la cual también se ha documentado en la literatura, como un producto que proporciona buenos resultados para obtener ADNc integro <sup>(14, 65, 55)</sup>. El uso de esta enzima requiere ARN y un iniciador relacionado a un grupo 3'-hidroxilo. Esta enzima carece de actividad de exonucleasas 3'→5', es propensa a error, y sus constantes de  $K_m$  para los sustratos de dNTP's son altos en los rangos de la milimolaridad. Para asegurar la transcripción completa de la plantilla de ARN es esencial incluir una alta concentración de dNTP's. Se notifica que la enzima murina es mucho más conveniente para la transcripción debido a que la actividad de RNAsaH es comparativamente más baja. El alcance de la actividad máxima de esta enzima es mas baja que la de la enzima de AMV

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

(42°C y 37°C, respectivamente), que puede ser una leve desventaja en la plantilla de ARN que tiene una alta degradación de estructuras secundarias <sup>(53)</sup>.

Al observar la integridad del ADNc en los geles de agarosa se decidió que este sería el método de elección para la transcripción reversa. Ya que comparando ambos métodos de transcripción, se observó que la M-MuLVRTasa mostró mejores resultados probablemente debido que tiene una menor actividad de RNAsa, ya que la Super Script es una enzima derivada de la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar, y no tiene tantas ventajas en cuanto a la formación de estructuras secundarias del ARN <sup>(53)</sup>.

Los pasos cruciales al realizar la transcripción inversa son básicamente las temperaturas de incubación, la mezcla de los reactivos, sobre todo al adicionar la enzima, ya que esta debe mantenerse siempre a bajas temperaturas (-20 °C), para que no se desnaturalice. Además cuando las mezclas de reacción que ya tienen la plantilla de ARN son sacadas de una incubación para pasarlas a la siguiente, deben ser puestas en hielo inmediatamente para evitar que se unan las cadenas formadas, o de lugar a la formación de estructuras secundarias. Otro paso importante en la transcripción es la inactivación a 90 °C de la plantilla de ADNc obtenido.

Habiendo obtenido la plantilla de ADNc se realizó el primer intento de la PCR basándose en lo reportado por Sacramento, et.al., 1991 en donde se describe un proceso con resultados óptimos utilizando un par de iniciadores del gen N del virus de la rabia que es en el que se usa en el diagnóstico molecular por ser la región mas conservada del genoma.

El par de iniciadores que se seleccionó al inicio por su composición intrínseca, contienen iguales cantidades de G y C, en esa publicación mostraron una efectiva amplificación de un producto de 443 pb a una temperatura de alineación de 45 °C, aunque se revelaron algunas bandas inespecíficas principalmente en ejemplares altamente degenerados.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los protocolos de reacción y los programas de PCR que se usaron para el par de iniciadores N1 y N2 se describen en la metodología y fueron los mismos que usaron Sacramento y cols., 1991, pero como se observa en la Figura 7 los productos que se obtuvieron fueron muy débiles.

Con respecto a los gradientes de temperatura se tomaron las medidas pertinentes y reportadas para estandarizar un PCR. La primera regla a seguir para la optimización del PCR es que el par de iniciadores a usar sea el óptimo, esto es que amplifique la región que se esta buscando y tener una plantilla con radio óptimo. Este no debe ser tan alto ya que esto favorece la formación de dímeros de iniciador, esto ocurre también cuando hay un exceso de iniciador o el ADN esta muy diluido. Por otra parte, es importante mantener la concentración del iniciador menor de 0.5  $\mu\text{M}$  esto es 12.5 pmol de iniciador por cada 25  $\mu\text{L}$  de reacción de lo contrario se favorece la formación de los dímeros de iniciadores.

En general se recomienda usar 30 ciclos de amplificación, pero los ciclos adicionales pueden requerirse en algunos casos si la cosecha es baja. Los 30 ciclos pueden proveer una cantidad adecuada de producto para poder ser visualizado en los geles con bromuro de etidio. Mientras que se requieren de sólo 25 ciclos para obtener un producto que pueda ser visualizado en autoradiografías. <sup>(26, 27)</sup>

Para aumentar la especificidad de amplificación debe encontrarse la temperatura de disociación para cada iniciador, los laboratorios que sintetizan los iniciadores establecen una  $T_m$  aproximada, en este estudio se realizó una PCR con gradiente de temperatura que iba de 50-42°C. En el gel de la Figura 6 se observa que la temperatura óptima de alineación fue de 47 °C, una vez que se obtuvo esta temperatura se modifico el programa del termociclador agregando esta temperatura, sin embargo aun así se presento el problema de obtener una baja cosecha del producto.

Al estandarizar el PCR pueden presentarse diferentes problemas que pueden ser contrarrestados independientemente, lo primordial es verificar que los componentes se hayan establecido apropiadamente <sup>(35)</sup>, por ejemplo:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Taq polimerasa; debe verificarse que no haya caducado, que haya permanecido en congelación y al momento de realizar la reacción que se mezcle bien con los demás componentes.

Nucleótidos; como se manifestó previamente deben estar a las concentraciones adecuadas (y sobre todo verificar que la secuencia de bases sea correcta.

Buffer de PCR; se debe utilizar el que tenga las condiciones adecuadas para la polimerasa que se esta usando, es recomendable usar el buffer que regularmente viene junto con la polimerasa.

ADN blanco; debe demostrar especificidad hacia los iniciadores usados, además debe de ser lo suficientemente puro ya que cantidades mínimas de fenol o de cloroformo en la solución de ADN puede inhibir la reacción de PCR, también altas cantidades de ADN puedan inhibir la reacción debido a que se extingue la enzima.

Iniciadores; una completa ausencia de producto en los geles visualizados seguramente se debe a que se esta utilizando un par de iniciadores inadecuados para la reacción, debe tenerse la seguridad de que son altamente puros.

Agua; la calidad del agua debe ser altamente pura y libre de nucleasas.

Ciclado; el funcionamiento del termociclador deberá ser conocido perfectamente por el operador para descartar errores de manejo, por otra parte, el termociclador debe tener la misma temperatura en todos los pozos, ya que algunas veces puede suceder que los pozos de la periferia presentan una temperatura más baja que los otros.

Si el volumen de reacción es de alrededor de 100 $\mu$ L y la secuencia de iniciadores tiene una proporción mayor del 50% de GC la reacción puede no alcanzar una temperatura adecuada para desnaturalizar la plantilla. Por otra parte, también es posible que exista una

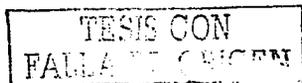
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

alta cantidad de producto específico pero los niveles de detección sean bajos cuando se usa la tinción de bromuro de etidio, por lo que es importante verificar la sensibilidad del método <sup>(27, 32, 35)</sup>.

Un problema muy común cuando se esta estandarizando una PCR es la presencia de bandas inespecíficas, las posibles razones a las que se debe este fenómeno son las siguientes: inespecificidad en los iniciadores; temperatura de alineación; ciclos extras y exceso en la cantidad de reactivos

Una PCR estandarizada puede presentar muchas ventajas, sobre todo cuando esta técnica va a ser aplicada en el diagnóstico de algún patógeno, como es caso de esta investigación, para lo cual se necesitan tener las condiciones óptimas. Las consideraciones que deben tenerse son: la concentración de la enzima no debe pasar de 5U/100µL de reacción si la concentración de la enzima es mayor se encontrarán productos no específicos; la especificidad y la fidelidad del PCR aumenta por el uso de iniciadores a bajas concentraciones; la concentración del ión de magnesio divalente, puede afectar la alineación de los iniciadores, temperaturas de disociación de las cadenas de los productos de PCR y de la plantilla de ADN, especificidad los productos, formación de dímeros de iniciadores artefacto, actividad y fidelidad de la Taq polimerasa que requiere de este ión en forma libre. Pero por otro lado, se debe de tener cuidado con productos quelantes como el EDTA en el stock de iniciador o de la plantilla de ADN y pueden disminuir la actividad óptima del magnesio. Otros componentes de los que debe estar libre la mezcla de reacción son el DMSO, KCl y el NaCl que son inhibidores de la Taq polimerasa <sup>(27)</sup>.

Además de tener todos los reactivos de reacción en condiciones adecuadas, al momento de trabajar también se tuvieron las precauciones recomendadas por Kwok, S., 1990 para evitar contaminaciones y productos no específicos de la reacción de PCR. La capacidad de la PCR para producir gran número de copias de una secuencia de cantidades mínimas de ADN necesita que se sea cuidadoso en extremo para evitar falsos positivos que pueden resultar de la contaminación entre una muestra y otra; otra causa en los productos de PCR puede ser el ADN procedente de previas amplificaciones de la misma secuencia



blanco <sup>(30)</sup>, de hecho es esto con lo que se tuvo cuidado, ya que en la campana de seguridad en la que se trabajo se manejaron sólo muestras de rabia, y los reactivos y suplementos se guardaron en la cabina y nunca fueron removidos del área en donde se llevo a cabo la técnica.

Kwork, S., 1990 también recomienda que las muestras clínicas que se van a trabajar, incluyan un control positivo que amplifique consistentemente. El control negativo debe ser bien caracterizado, ya que la extrema sensibilidad del PCR puede permitir la detección de secuencias de ácido nucleico de un ejemplar que es un control negativo para otros criterios, por lo que es recomendable incluir varios controles negativos, uno de éstos debe contener todos los reactivos excepto la muestra, que será reemplazada por agua.

Tomando en cuenta todas las recomendaciones anteriores, se realizo el PCR que dio como resultado los productos de PCR visualizados en el gel de la Figura 7. En este gel se observan los productos de 443 pb que se obtendrían con este par de iniciadores, sin embargo no fueron bandas bien definidas, lo anterior según lo descrito en las características que debe tener una buena PCR, pudo haberse debido al número de ciclos programados en el termociclador, sin embargo al cambiarlo no se obtuvieron mejores resultados. Asimismo al hacer las replicas con este mismo programa no se obtuvieron los productos de amplificación esperados, por lo cual no podía ser un protocolo usado para amplificar el ADNc obtenido de cerebros expuestos a temperatura ambiente. De este PCR deben descartarse posibles contaminaciones e inespecificidades debido a que los controles negativos derivados de las muestras de cerebros de ratón sin inocular y el agua no se observaron bandas, lo cual indica que el problema de una baja expresión no fue atribuible a los iniciadores o a contaminaciones exógenas.

En párrafos anteriores se mencionó que una alta cantidad el ADNc blanco inhibe la actividad de la Taq polimerasa, sin embargo, para los controles positivos se utilizaron alrededor de 1.5 µg de ADNc tanto para el control positivo proveniente de CVS puro como de cerebro de ratón inoculado, por lo que tampoco se puede atribuir una inhibición de esta enzima por el ADNc blanco

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Al no obtener buenos resultados con esas condiciones, se cambió de estrategia, por lo que se adoptó el protocolo publicado en Nadin-Davis, S., 1998, lo único que se modificó fue la secuencia de iniciadores. El par de iniciadores que se utilizaron fueron el ForN1 y RevN1 (patente en trámite) secuenciados en base al genoma del virus de la rabia por la Dra. Loza Rubio y por la Dra. Nadin Davis, y fueron sintetizados por los laboratorios de Invitrogen, reconstituidos y almacenados según sus instrucciones.

Un paso crucial en esta metodología es el llamado hot star a 80 °C, este paso se hace para evitar acción inespecífica de la Taq polimerasa ya que la adición de la enzima a temperatura ambiente provoca la obtención de productos inespecíficos antes de que se inicie el termociclado, en este paso del hot star la mezcla de reacción se precalienta a una temperatura específica en un lapso de tiempo predeterminado y posteriormente se adiciona la enzima sin bajar la temperatura, para después iniciar el programa del termociclador <sup>(35)</sup>. En este estudio la adición de este paso al programa fue eficiente ya que como se ve en la Figura 8 sólo se observó la banda de 750 pb. El éxito de este protocolo se demostró al hacer dos réplicas obteniendo los mismos resultados tanto de especificidad como de sensibilidad. En los controles negativos no se presentó ninguna banda y las bandas de los controles positivos provenientes del CVS y del cerebro de ratón positivo fueron definidas.

Haciendo una comparación entre el PCR llevado a cabo entre el primer protocolo y el segundo, se puede decir que hay una relación directa entre el número de ciclos y la concentración de ADN obtenido de la amplificación, ya que cuando se hace un análisis a los cinco y a los treinta ciclos en una investigación <sup>(14)</sup> se observa un aumento en el producto de PCR, pero cuando se aumentan los ciclos a más de 30 disminuye la cantidad de producto, que fue lo que ocurrió con los PCR's que se realizaron para esta investigación en donde la primera PCR se realizó con 36 ciclos para la reacción, lo que probablemente ocurrió fue que la Taq polimerasa se consumió en los primeros ciclos de la reacción y ya no hubo la suficiente extensión.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Para demostrar la especificidad de la prueba se utilizaron otros virus como controles negativos. Los criterios que se siguieron para la elección de estos virus fueron en base a las propiedades características de cada uno. El virus de ojo azul es un virus ARN de polaridad negativa sensible a los solventes lipídicos, tiene propiedades hemaglutinantes, se inactiva a 56°C; es pleomórfico, con proyecciones en la membrana, de 165nm de diámetro aproximadamente y tiene nucleocápside. Debido a que no cumple con todas las características de los *Paramixoviridae* esta clasificado como rubulavirus porcino.<sup>(57)</sup>

Por otra parte el virus de Aujeszky, llamado en su momento virus de pseudorabia, es ADN; es un herpesvirus tipo 1 de 180 nm, causa encefalopatías, afecta ovinos, caprinos, cerdos y ovinos.<sup>(45)</sup>. En el caso de esta muestra no fue necesario realizar la transcripción reversa, ya que como que se mencionó es un virus ADN, pero la PCR se llevo a cabo junto con las muestras de ADNc del virus de Ojo Azul y del virus de rabia.

En la Figura 9 los carriles que contenían el producto de PCR del virus de ojo azul y el de Aujeszky no mostraron bandas, lo cual indicó que los iniciadores son específicos para el virus de la rabia.

En documentos publicados se menciona que la sensibilidad de la técnica de PCR es del 100% <sup>(55)</sup> así que una vez que se comprobó la especificidad de los iniciadores, lo siguiente fue realizar una PCR con diluciones logarítmicas del virus de la rabia para determinar el límite más bajo de detección de la técnica. Esto se realizó basándose en publicaciones anteriores en donde se llevaron a cabo diluciones seriales del virus para determinar este límite por la PCR <sup>(22)</sup>. Además, Wacharapluesadee, S. y cols., determinaron que el límite de detección del ARN viral fue de  $10^{-7}$ , aunque utilizan un par de iniciadores diferente al de esta investigación, en la cual el límite de detección fue de  $10^{-2}$  como se observa en la Figura 11. Cabe mencionar que los ratones que fueron inoculados con las diluciones de  $10^{-4}$  y  $10^{-7}$  se murieron un día después de la inoculación lo cual no puede atribuirse al virus, ya que el tiempo que ocurre entre la inoculación y la muerte del ratón de laboratorio son de al menos 6 días. El hecho de no haberse manifestado la expresión de fragmentos del virus de la rabia en diluciones mayores a  $10^{-2}$  podría deberse a que en la

publicación citada anteriormente el ADNc se sintetiza a partir del virus diluido directamente y no es inoculado en ratones, sin embargo para el propósito de esta investigación fue mejor estandarizarlo con cerebros positivos para simular las condiciones que se dan en el diagnóstico de rutina.

Además para la determinación del límite más bajo de detección de la PCR se realizaron diluciones del ADNc sintetizado a partir del ARN obtenido de uno de los controles positivos con los que se estandarizó la PCR, los resultados se muestran en la Figura 10, en la que se observan productos de PCR para todas las concentraciones que van disminuyendo en cuanto a la intensidad de las bandas. El análisis de este gel nos da como resultado que la PCR que se estandarizó es capaz de detectar hasta 5.0fg/ $\mu$ L de ADNc lo cual concuerda con lo publicado en diferentes documentos <sup>(14, 28, 55)</sup> en donde se reporta que el PCR es capaz de detecta entre 4 y 8ng de ADNc. Aunque la banda correspondiente a los 5.0fg/ $\mu$ L es débil, es claramente visible, lo cual indica que las muestras con esta cantidad de ADNc podrán ser detectadas.

Una vez que se determinó que la prueba de PCR fue estandarizada fue llevo a cabo la PCR con las muestras de ADNc sintetizado a partir del ARN obtenido de cerebros positivos y negativos que habrían sido expuestos a temperatura ambiente.

En la Figura 12, se muestran los productos de PCR analizados. El cual se observa que aun en las muestras que permanecieron más tiempo a temperatura ambiente se observaron bandas definidas lo cual quiere decir que el ADNc sintetizado tuvo al menos una concentración de 5.0 fg/ $\mu$ L de otra manera no hubieran sido detectadas por la prueba. En el gel se observó un ADN integro hasta las 384hr que equivalen a 23 días de exposición a temperatura ambiente, por lo que se considera que la PCR ofrece un considerable aumento para detectar al virus en el tejido cerebral en estado avanzado de descomposición, esto concuerda con Haeton, et.al., 1997 que reporta haber detectado la presencia del virus en muestras incluso en el punto de licuefacción.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las muestras descompuestas tienen un efecto mínimo en la detección del PCR, ya que 5ng del ARN total pueden ser detectados por este método a varios intervalos de tiempo, la sensibilidad del método utilizado por algunos autores es de 8 pg del ARN específico. La presencia del ARN cerebral no interfiere con la detección <sup>(28, 65)</sup>.

Otra forma en como se ha demostrado la alta sensibilidad del PCR es por la prueba de ELISA en donde el RT-PCR mostró un incremento de 10 veces en la sensibilidad, y un ELISA acoplado al PCR incremento la sensibilidad 100 veces aunque dio 5 falsos positivos de 60 muestras analizadas <sup>(65, 66)</sup>.

En comparación con otras técnicas de diagnóstico el Centro Nacional de Referencia para la Rabia del Instituto Pasteur de Paris el resultado para obtener el diagnóstico de muestras recibidas ocupado para la IF es de 2 a 3 horas, el de RREID de 4 horas, el inmunobloting tardará en total dos días, al igual que el cultivo celular; mientras que la PCR tarda 6 horas desde la extracción del ARN hasta la obtención del producto amplificado <sup>(52)</sup>, en esta investigación la técnica lleva un total de 5.5 horas por muestra para llevarse a cabo.

Los resultados falsos negativos pueden ocurrir si los iniciadores usados en la RT-PCR tienen poca homología con todos los aislamientos del virus de la rabia en la secuencia blanco. En algunos casos los iniciadores fallan cuando las muestras clínicas provienen de diferentes animales <sup>(25, 26)</sup>, sin embargo los iniciadores usados en esta investigación aunque fueron específicos para el ciclo aéreo del virus, se tomó la previsión de que reconocieran otros ciclos epidemiológicos (terrestre e hipervariable) <sup>(Loza-Rubio, 2002 com. personal)</sup>.

Definitivamente la RT-PCR no es tan rápida como la IF, tal vez esta sea una de las razones por la que pocos laboratorios han adoptado esta técnica para el diagnóstico <sup>(13)</sup>, siendo más común su uso para estudios epidemiológicos <sup>(40)</sup>.

Otra característica importante que se tuvo para tener éxito es la utilización de los iniciadores que amplifiquen fragmentos pequeños, la recomendación es de utilizar iniciadores que amplifiquen hasta 800 pares de bases ya que fragmentos más grandes

pueden derivar en inespecificidad. Aún cuando se muestran tantas ventajas, la aplicación de la técnica para el diagnóstico del virus de la rabia todavía se encuentra en su etapa temprana, de hecho la aplicación de esta técnica se ha dirigido más a la investigación del genoma y no tanto al diagnóstico <sup>(43)</sup>.

El futuro de esta técnica como método de diagnóstico puede ser promisorio ya que tiene una alta especificidad y sensibilidad siempre y cuando se utilicen los reactivos e iniciadores adecuados para la reacción. Aunque es una técnica que requiere más tiempo que la IF es más específica. Otra perspectiva de la técnica es poder usar muestras clínicas como muestras de piel, saliva, así como improntas corneales, por lo que cualquier animal sospechoso de haberse contagiado de rabia podría ser diagnosticado y posteriormente ser sometido al tratamiento post exposición. La técnica permite el diagnóstico *intra vitam* de un animal atacante sin signos de rabia e iniciar de inmediato el tratamiento de las personas expuestas.

La metodología descrita en esta investigación resulta ser una buena alternativa de diagnóstico en países como el nuestro donde predominan climas templados y donde los laboratorios de diagnóstico regularmente se encuentran distantes de las zonas endémicas, por lo que la transportación de las muestras no siempre se lleva a cabo en condiciones óptimas de refrigeración ó congelación.

Una desventaja del PCR podría ser su costo ya que comparado con la técnica de IF es considerablemente más elevado; sin embargo debe evaluarse la especificidad y sensibilidad de la prueba comparada con la prueba biológica que tarda 15 días, lo cual en un caso donde se tienen falsos negativos la PCR resulta ser muy útil. El costo aproximado de la técnica utilizada en esta investigación es de \$152.35 en base a un tipo de cambio de \$9.60 por dólar, contra un costo aproximado de \$52.00 por un diagnóstico realizado por IF.

Sin embargo, esta desventaja es compensada por el hecho de que la PCR anteriormente descrita ha sido capaz de detectar falsos negativos en casos clínicos. Un caso clínico remitido a el laboratorio en donde se llevo a cabo esta investigación diagnosticado

TES CON  
FALLA DE ORIGEN

como negativo por IF y positivo por prueba biológica en el Centro Nacional de Sanidad Animal (CENASA) fue confirmado positivo por PCR utilizando los iniciadores ForN1 y RevN1, por lo que al usar esta técnica se descartaría la prueba biológica y por lo tanto el uso de animales de laboratorio y se reduce el tiempo para confirmar el resultado de 21 días a solo uno <sup>(39)</sup>, ya que en casos de vacunación post exposición el tiempo de espera puede ser la diferencia entre salvar o no una vida.

TESIS CON  
PALA DE ORIGEN

## 8.0 CONCLUSIONES.

- Se determinó la estabilidad del genoma del virus de la rabia mediante la técnica de PCR en cerebros de ratón inoculados con el virus expuestos a temperatura ambiente, concluyendo que éste es estable hasta 23 días.
- Se concluye que la reacción en cadena de la polimerasa con el uso de los iniciadores ForN1 y RevN1 tiene un límite mínimo de detección de 5 fg/ $\mu$ L. Además, mostró especificidad para el virus de la rabia al no detectar ADN de los virus de ojo azul y de Aujeszky.
- Al estandarizar la reacción en cadena de la polimerasa mostró ser una técnica de diagnóstico molecular adecuada para detectar al virus de la rabia, ya que puede ser usada como alternativa para muestras de cerebro con alto grado de degradación, corroborando así la hipótesis planteada.
- Con base en estos resultados se concluye que a pesar de la fragilidad del ARN es posible utilizarlo para llevar a cabo la PCR en cerebros positivos a rabia, que se hayan mantenido expuestos al medio ambiente sin detrimento de los resultados.
- Faltaría probar los iniciadores desarrollados por Loza-Rubio, et.al. contra virus relacionados con la rabia, así como de diferentes orígenes.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 9.0 APENDICE

### 1. AGUA DEPC

Se prepara una solución al 0.1% de dietilpirocarbonato con agua destilada y desionizada. La solución se homogeniza con agitación 1 hora a 37°C o se deja toda la noche a temperatura ambiente para liberar el CO<sub>2</sub>. Posteriormente se esteriliza por autoclave durante 15 min.

### 2. BUFFER TAE 1X

40Mm Tris-acetato

1mM EDTA

### 3. ELECTROFORESIS DE ARN EN GELES DE AGAROSA.

Preparar la siguiente mezcla:

2μL RNA

5μL Formamida

1μL Buffer MOPS 10X

2μL Formaldehído (37%)

1μL Bromuro de etidio

La mezcla se incuba 65°C por 10 min. y se pasa rápidamente a hielo. A lo anterior se le adiciona 1μL de solución de carga. Se carga el gel y se aplica un voltaje constante de 50-70V. Visualizar en un transiluminador de luz UV.

### 4. GEL AGAROSA 1.5%

1.5g Agarosa

100mL de TAE 1X

Disolver la agarosa en horno de microondas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

5. GEL AGAROSA FORMALDEHÍDO.

1.5% Agarosa GBM

10X buffer MOPS

73% Agua DEPEC

La agarosa se disuelve en microondas. Al estar a temperatura ambiente se agrega 17% de formaldehído al 37% .

6. SOLUCIÓN DE CARGA.

0.25% Azul DE bromofenol

0.25% Xilencianol

40% Glicerol

Agua destilada c.b.p. 100%

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALIÓ  
DE LA BIBLIOTECA

## 10.0 BIBLIOGRAFIA

1. Aaij, C., Brorst, P., 1972 The gel electrophoresis of DNA. *Biochem. Biophys. Acta.* 269: 192-200.
2. Arai, Y.T., Yamada, K., Kameoka, Y., Horimoto, T., Yamamoto, K., et al. 1997. Nucleoprotein gene analysis of fixed and street rabies virus variants using RT-PCR. *Arch. Virol.* 142: 1787-1796.
3. Atalay, V.S., Aleigir, G., Berkin, S. 2001. Immunohistochemical and histopathological studies of fixed rabies virus in goats. *Onderst. J. Vet. Research.* 68: 83-89.
4. Banerjee, A.K. 1987. Transcription and replication of Rhabdoviruses. *Microbiol. Rev.* 51: 66-87.
5. Baptiste, J., Edwards, D.M., Ravassard, P., et al. cDNA cloning by RT-PCR. En: Mc Pherson, M.J., Hames, B.D. eds. *PCR2: A practical approach.* Oxford University Press, New York. p: 13-21
6. Bourhy, H., Rotivel, Y. 1995. Récents développements diagnostiques et épidémiologiques concernant la rage. *Le Point Veterinaire.* 27(167): 23-38.
7. Bryant, S., Manning, L.D., 1998. Formaldehyde gel electrophoresis of total RNA. En: Rapley, R., Manning, D.L. eds. *Methods in molecular biology, Vol 86: RNA isolation and characterization protocols.* Human Press, New Jersey. p. 45, 69-72.
8. Buffery, C. 1997. Reacción en cadena de la polimerasa. En: Walker, J.M. eds. *Biología molecular y biotecnología.* 2ªed. Acribia, Barcelona. p 53-65
9. Crepin, P., Audry, L., Rotivel, Y., Gacoin, A., Caroff, C., Bourhy, H. 1998. Intravitam diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. *J.Clin.Microbiol.* 36: 1117-1121.
10. Dean, D.J. 1975. The fluorescent antibody test. En: Kaplan, M.M., Kopowsky, H. Eds. *Laboratory techniques in rabies.* WHO. Geneva. p: 73-80.
11. de Mattos, C.A., de Mattos, C.C., Smith, S.J., Miller, T.E. 1996. Genetic characterization of rabies field isolates from Venezuela. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1553-1558.
12. Dennis, H.Y. *Clinical Applications of PCR.* Human Press, USA. 1998. p: 149-157.
13. Echevarria, J.E. Avellon, A., Juste, J., Vera, M. 2001. Screening of active Lyssavirus infection in wild bat populations by viral RNA detection on oropharyngeal swabs. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3678-3683.

14. Ermine, A., Larzul, D., Ceccaldi, P.E., Guesdon, J.L. Tsiang, H. 1990. Polymerase chain reaction amplification of rabies virus nucleic acids from total mouse brain RNA. *Mol. Cell. Probes.* 4: 189-191.
15. Flores, C.R. 1991 Rabia en humanos transmitida por murciélagos vampiros en países de América latina. *Técnica Pecuaria Mexicana.* 29:25.
16. Flores, C.R. 1996. Prevención de la rabia paralítica bovina y el control de los murciélagos y vampiros. INIFAP.
17. González, S.D., Monroy, B.J. 1993. Diagnóstico de rabia. En: Valero, G. eds. *Diagnóstico veterinario, Sociedad Mexicana de Veterinarios, A.C.* p 89-98.
18. Griffin, A.M., Griffin, H.G. 1994. PCR: Amplification. En: Griffin, A.M. *PCR technology current innovations.* CRC Press, U.S.A.
19. Hamir, A.N., Moser, G., Fu, F.Z., Dietzschold, B., Rupprecht. 1995. Immunohistochemical test for rabies: identification of a diagnostically superior monoclonal antibody. *Vet. Rec.* 136:295-296
20. Heaton, R.P., Johnstone, P., McElhinney, M.L., Cowley, R., O'Sullivan, E., Whitby, E.L. 1997. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies related viruses. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2762-2766.
21. Heaton, P.R., McElhinner, L. M. Lowings, J.P. 1999. Detection and identification of rabies and rabies – related viruses using rapid – cycle PCR. *J. Virol. Methods.* 81: 63-69.
22. Heaton, P.R., Whitby, J.E., Johnstone, P., O'Sullivan, E. 1997. Rapid detection of rabies and rabies – related viruses by RT-PCR and enzyme linked immunosorbent assay. *J. Virol. Methods.* 69: 63-72.
23. Helmick, G.C., Tauxe, V.R., Vernon, A.A. 1987. Is there a risk to contacts of patients with rabies. *Rev. Infec. Dis.* 9: 511-517.
24. Hsiung, G.D. 1982. *Rhabdoviridae.* En: Hsiung, G.D. *Diagnostic Virology.* 3<sup>th</sup>, Yale University Press. U.S.A. p: 177-180.
25. Ito, M., Itou, T., Sakai, T., Santos, F.C.M., Arai, T.Y., et. al. 2001. Detection of rabies virus RNA isolated from several species of animals in Brazil by RT-PCR. *Virology.* 63: 1309-1313.
26. Ito, M., Arai, T.Y., Itou, T., Sakai, T. 2001. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. *Virology.* 284: 214-222.

27. Innis, A.M., Gelfand, H.D. 1990. Optimization of PCRs. En: Innis, A.M. eds. PCR: Protocols a guide to methods and applications. Academic Press, U.S.A. p: 3-10.
28. Kamovarín, N., Tirawatpong, T., Rattanasiwamoke, R., et. al. 1993. Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction whit nested primers. *J. Infec. Dis.* 167: 207-209.
29. Kaplan, M.M. 1973. Safety precautions in handling rabies virus. En Kaplan, M.M., Kopowsky, H. Eds. Laboratory techniques in rabies. WHO. Geneva. p 13-17.
30. Kidd, K.K., Ruano, G. 1995. Optimizing PCR. En: Mc Pherson, M.J., Hames, B.D. eds. PCR2: A practical approach. Oxford University Press, New York. p: 13-21
31. Kulonen, K. Fekadu, M., Whitfield, S., Warner, C.K. 1999. An evaluation of immunofluorescence and PCR methods for detection of rabies in archival Carnoy-Fixed, paraffin-embedded brain tissue. *J. Vet. Med.* B46: 151-155.
32. Kusec, R. 1998. Reverse transcriptase-polimerase chain reaction (RT-PCR). En: Dennis, H.Y. eds. Clinical applications of PCR. Human Press, N.Y. p: 149-157.
33. Kwok, S., Higuchi, R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature.* 18: 237-238.
34. Kwork, S. 1990. Procedures to minimize PCR-product carry-over. En: Innis, A.M. eds. PCR: Protocols a guide to methods and applications. Academic Press, U.S.A. p: 3-10.
35. Lisby, G. 1998. Application of nucleic acid amplification in clinical microbiology. En: Meltzer, S.J. eds. PCR in bioanalysis. Humana Press, New Jersey
36. Lepine, P. 1975. Histopatological diagnosis. En: Kaplan, M.M., Kopowsky, H. Eds. Laboratory techniques in rabies. WHO. Geneva. p: 56-71
37. Lopez, A.R., Miranda, P.P., Tejada, E.V., Fishbein, B.D. 1992. Outbreak of human rabies in the Peruvian jungle. *Lancet.* 339: 408-412.
38. Loza-Rubio, E., de Mattos, C.C., de Mattos, A.C., Setien, A.A. 2000. Aislamiento y caracterización molecular de un virus rábico obtenido de un murciélago no hematófago en la ciudad de México. *Vet. Mex.* 2: 147-152.
39. Loza-Rubio, E., Rojas A.E., Banda-Ruiz, V.M., Cortéz, M.B. Establecimiento de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para el diagnóstico de la rabia bovina. En: Memorias del XXVI Congreso Nacional de Buiatría. Asoc. Mex. Med. Vet. Esp. en Bovinos. México, 2002.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

40. Loza-Rubio, E., Setien, A.A., Bahloul, C., Brochier, B., et. al. 1999. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in Mexico. *Arch. Med. Res.* 30:144-149.
41. Loza-Rubio, E., Setien, A.A. 1998. Estudio de la variabilidad molecular del virus de la rabia en Mexico. En: Moreno Ch. R. ed. *Ciencia Veterinaria: Estudio de la variabilidad molecular del virus de la rabia en México.* UNAM. México. p:51-83.
42. Macfarlane, D.E., Dahle, E.C. 1993. Isolating RNA from whole blood the dawn of RNA-based diagnosis? *Nature.* 362: 186-188.
43. McColl, K.A., Gould, A.R., Selleck, P.W., Hooper, P.T., Westbury, H.A.1993. Polymerase chain reaction and other laboratory techniques in the diagnosis of long incubation rabies in Australia. *Aust. Vet. J.* 70: 84-89.
44. Metselaar, D. *Practical Virology. Medical publications Oxford.* 1982. G. B. 496p.
45. Morilla, G.A., 1985. Encuentro sobre enfermedades infecciosas del cerdo. Avances en el estudio epizootológico de la enfermedad de Aujeszky en México. En: Morilla, G.A., Correa, P. Encuentro sobre enfermedades infecciosa del cerdo. *Asoc. Mex. Vet. Esp. en Cerdos.*, p: 27-32
46. Nadin-Davis, S. 1998. Polymerase chain reaction protocols for rabies virus discrimination. *J. Virol. Methods.* 75: 1-8.
47. Nicholson, G.K.2000. Rabies. En: Zuckerman, A.J.cds. *Principles and practice of clinical virology.* 4ª ed. Wiley, London. p 583-606.
48. Nuñez, G.S. 1998. La rabia Humana una alerta epidemiológica contra la salud pública. *Informes técnicos del Instituto Nacional de Salud Pública de Colombia.* No. 4.
49. Read, J.K., Jeffery, M.J., Bangham. 1997. Aseptic meningitis and encephalitis : the role of PCR in the diagnostic laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 35: 691-696.
50. Ramírez, V.M. 1987. Los mecanismos de exposición e infección rábica en el ciclo silvestre. En: Simposio a la atención medica de las personas involucradas en un accidente de rabia. OPS-IMSS-SSA. México. p: 51-84
51. Rudd, J.R., Trimarchi, C.V. 1989. Development and evaluation of an in vitro virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 27:2522-2528.
52. Sacramento, D., Bourthy, H., Tordo, N. 1991. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Mol. Cell. Probes.* 5: 229-240.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

53. Sambrook, J. Russell, D.W. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Vol. II. 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory press, New York.
54. Smith, J., Fishbein, B., Rupprecht, E.R., Clark, K. 1991. Unexplained rabies in three immigrants in the United States. 324:205-211.
55. Smith, J. McElhinney, L.M., Heaton, R.P., Black, M.E., Lowings, P.J. 2000. Assessment of template quality by the incorporation of a internal control into a RT-PCR for the detection of a rabies and the rabies – related viruses. J. Virol. Methods 84: 107-115.
56. Steele, H.J. 1975. History of rabies. En: Baer, G. eds. History natural of rabies. p: 1-6.
57. Stephano, A., Garay, M. 1985. Síndrome de ojo azul en cerdos. En: Morilla, G.A., Correa, P. Encuentro sobre enfermedades infecciosa del cerdo. Asoc. Mex. Vet. Esp. en Cerdos., p: 1-13.
58. Tierkel, E.S. 1975. Rapid microscopic examination for Negri bodies and preparation of specimens for biological test. En: Kaplan, M.M., Kopowsky, H. Eds. Laboratory techniques in rabies. WHO. Geneva. P 73-80.
59. Tordo, N., Kouknetzoff, A. 1993. The rabies virus genome: an overview. Onderst. J. Vet. 60:263-269.
60. Tordo, N., Sacramento, D., Bouthy, H., 1996. The polymerase chain reaction technique for diagnosis, typing and epidemiological studies of rabies. En: Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowsky, H. eds. Laboratory techniques in rabies, 4th edn. W.H.O., Geneva, p. 157-169.
61. Wacharapluesadee, S., Hemachudha, T. 2001. Nucleic acid sequence based amplification in the rapid diagnosis of rabies. Lancet. 358:892-893.
62. Walker, G.M. Biología molecular y Biotecnología. 2ª ed. Acirbia, Barcelona, p:65
63. Wagner, K.E. Basic Virology. Blackwel Science. U.S.A. 1999. P 33-44.
64. Warner, K.C., Zaki, S.R., Shieh, W., Whitfield, G.S., et. al. 1999. Laboratory investigation of human deaths from vampire bat rabies in peru. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60: 502-507.
65. Whitby, J.E., Johnstone, P., Silero-Zubiri, C. 1997. Rabies virus in the decomposed brain of an ethopian wolf detected by nested reverse transcription-polymerase chain reaction. J. Wild. Dis. 33: 912-915.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

66. Whitby, J.E., Heaton, P.R., Whitby, H.E., O'Sullivan, E., Johnstone, P. 1997. Rapid detection of rabies and rabies-related viruses by RT-PCR and enzyme linked immunosorbent assay. *J. Virol. Methods* 69: 63-72.
67. Wunner, W., Larson, J.K., Dietzhold, B., Smith, L.C. 1988. The molecular biology of rabies viruses. *Rev. Infec. Dis.* 10. S771-S784.
68. [www.aventispasteur.com.mx/vacuna\\_rabia.htm](http://www.aventispasteur.com.mx/vacuna_rabia.htm).
69. [www.cdc.gov/ncidod/rabies/](http://www.cdc.gov/ncidod/rabies/)
70. [www.invdes.com.mx/suplemento/anteriores/marzo1999/htm/rabia.htm](http://www.invdes.com.mx/suplemento/anteriores/marzo1999/htm/rabia.htm)
71. [www.ops-oms.org/documentos/rabiaSem2400.pdf](http://www.ops-oms.org/documentos/rabiaSem2400.pdf)
72. [www.panaftosa.org.br/novo/download/rabia/Rabia.pdf](http://www.panaftosa.org.br/novo/download/rabia/Rabia.pdf)
73. [www.pasteur.fr/recherche/rage/OLD/oldrabia.html](http://www.pasteur.fr/recherche/rage/OLD/oldrabia.html)
74. [www.ssa.gob.mx/unidades/indrc/](http://www.ssa.gob.mx/unidades/indrc/)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN