

Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria

**Caracterización molecular del virus de la rabia en muestras
analizadas en el SENASA en el periodo 2015-2017**

Modalidad: Práctica dirigida

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico
de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Giovanna Luconi Fortis

Campus Presbítero Benjamín Núñez - Heredia


2017

APROBACION DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

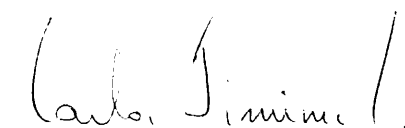
Rafael Vindas Bolaños, Ph.D.
Decano de la Facultad de Ciencias de la Salud



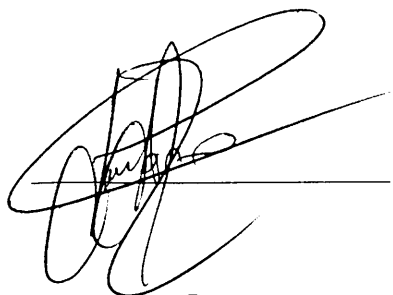
Laura Bouza Mora, M.Sc.
Subdirectora de la Escuela de Medicina Veterinaria



Carlos Jiménez Sánchez, Ph.D.
Tutor



Juan José Romero Zúñiga, Ph.D.
Lector



Bernal León Rodríguez, M.Sc.
Lector



Fecha: 2017

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas las bendiciones que me ha concedido a lo largo de este camino.

A mis papás y a mis abuelitos, ustedes son el motor de mi vida. Gracias por su amor y apoyo incondicional en cada una de las etapas de mi vida, por enseñarme a ser una guerrera y a no rendirme nunca.

A mi hermano Gino, por crecer conmigo y por ser mi compañero de tantas aventuras.

A mi novio Juan, por motivar mis sueños y por levantarme cada vez que lo necesito. Sos una de las más grandes bendiciones de mi vida.

A mi familia de internado: Caro, María y Memo, gracias por su amistad, su apoyo y un año lleno de historias que van a quedar por siempre en mi memoria y en mi corazón.

A mis amigas Caro V., Caro S. y Vicky, por acompañarme y apoyarme a lo largo de estos 7 años, por ser mis confidentes, mis cómplices... mis hermanas del alma.

Al Dr. Bernal León, por darme la oportunidad y la confianza de trabajar a su lado y por tantas valiosas enseñanzas en el transcurso de este año.

Al Dr. Carlos Jiménez, por ser mi guía en la elaboración del proyecto más importante de mi vida al día de hoy.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioseguridad del LANASEVE por su amistad, sus enseñanzas y consejos a lo largo de esta práctica.

INDICE DE CONTENIDOS

APROBACION DEL TRIBUNAL EXAMINADOR	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE CONTENIDOS	iv
INDICE DE CUADROS	v
INDICE DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	vii
RESUMEN	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Justificación.....	4
1.2.1. Importancia.....	4
1.3. Objetivos.....	6
1.3.1. Objetivo general	6
1.3.2. Objetivos específicos	6
2. METODOLOGÍA	7
2.1. Materiales y Métodos	7
2.1.1 Área de trabajo.....	7
2.1.2 Trabajo en el laboratorio.....	7
2.1.2.1 Muestras.....	7
2.1.2.2 Extracción de ARN y RT-PCR para el fragmento de 1500 pb.....	9
2.1.2.3 Purificación del ADN y reacción de secuenciación de ADN.....	11
2.1.2.4 Edición de las secuencias	12
2.1.2.5 Análisis filogenético	12
3. RESULTADOS Y DISCUSION	14
3.1 RT-PCR	14
3.2 Ensayos de optimización de la RT-PCR.....	15
3.3 Purificación del ADN y reacción de secuenciación de ADN.....	22
3.4 Secuenciación y análisis filogenético	24
4. CONCLUSIONES	28
5. REFERENCIAS	30

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Muestras positivas a rabia recibidas en el SENASA del año 2015 al mes de agosto del 2017.....	8
Cuadro 2. Reactivos OneStep de Qiagen® a utilizar para la RT-PCR de un sólo paso.....	9
Cuadro 3. Iniciadores para la RT-PCR para el gen N en el presente estudio.....	10
Cuadro 4. Protocolo para la amplificación del fragmento de ~1500 pb del gen N.....	10
Cuadro 5. Reactivos del kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems™) a utilizar para PCR de secuenciación.....	11
Cuadro 6. Parámetros de temperatura y tiempo para la reacción de secuenciación.....	12
Cuadro 7. Reactivos OneStep de Qiagen® utilizados para la RT-PCR de un solo paso.....	21

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gel de agarosa al 1% mostrando productos inespecíficos de ADN (~600 pb) en todas las muestras y únicamente dos muestras con el producto específico esperado (~1500 pb), LRBR0015-15 y LRBR1021-16.....	14
Figura 2. Gel de agarosa al 0.5% mostrando el producto específico amplificado del RT-PCR de un control positivo de rabia (~1500 pb) sometido a un gradiente de temperatura de alineamiento.....	15
Figura 3. Gel de agarosa al 1% mostrando productos específicos de ADN (~1500 pb) amplificados por RT-PCR, de un control positivo de rabia sometido a una titulación de concentración de MgCl ₂	16
Figura 4. Geles de agarosa al 1% mostrando productos específicos de ADN (~1500 pb) amplificados por RT-PCR Touchdown de muestras positivas a rabia extraídas con el kit de columnas (A) y con el método de Trizol®(B), respectivamente.	18
Figura 5. Geles de agarosa al 1% mostrando segmentos específicos de ADN (~1500 pb) amplificados por RT-PCR Touchdown de muestras positivas a rabia sometidas a una titulación de concentración de iniciadores, sentido (A), antisentido (B), y de muestra C).	20
Figura 6. Protocolo para la amplificación del fragmento de ~1500 pb del gen N.....	22
Figura 7. Geles de agarosa al 1% mostrando fragmentos de ADN específicos (~1500 pb) amplificados por RT-PCR de muestras positivas a rabia, puras (A) y diluidas 10-1(B), respectivamente.	23
Figura 8. Árbol filogenético construido con el modelo de sustitución Kimura2+G y el método de distancia con el algoritmo “Maximum Likelihood”, con un valor bootstrap de 1000 repeticiones.	26
Figura 9. Mapa de Costa Rica dividido en 7 regiones con la distribución de los brotes de rabia incluidos en el presente estudio. Los brotes señalados con color rojo representan las muestras secuenciadas.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

Gen N: Nucleoproteína

LANASEVE: Laboratorio Nacional de Servicio Veterinarios

mM: milimolar

pb: pares de bases

RABV: Virus de la Rabia Clásica

RT-PCR: Reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa reversa

SENASA: Servicio Nacional de Salud Animal

T_m: Temperatura optima de alineamiento

U/μl: Unidad por microlitro

μl: microlitro

μM: micromolar

RESUMEN

La rabia es una enfermedad infecciosa y zoonótica causada por un virus neurotrópico del género *Lyssavirus*. Su transmisión se da principalmente mediante mordeduras de mamíferos carnívoros o quirópteros. Esta zoonosis causa una encefalomielitis, usualmente fatal, por lo que se considera una de las amenazas más importantes para la salud pública a nivel mundial.

En América Latina ha disminuido considerablemente el número de casos asociados a rabia canina; sin embargo, las variantes de rabia silvestre continúan presentando un riesgo, siendo los quirópteros hematófagos los transmisores principales en los casos humanos de la región. En cuanto a Costa Rica, la enfermedad se da principalmente en ganado, siendo los murciélagos el reservorio y principal vector que mantiene el virus endémico en el país.

Actualmente no se conoce con exactitud la situación de Costa Rica en cuanto a rabia silvestre, ya que no fue sino hasta el 2016 que se empezaron a realizar tipificaciones de los virus involucrados en los brotes. Tal como se esperaba, la mayoría de los casos analizados fueron transmitidos por *Desmodus rotundus*, con excepción de uno de ellos que estaba asociado a una variante viral presente en *Tadarida brasiliensis*. Este último fue el primer caso asociado a esta especie en el país, por lo que dejó una gran interrogante acerca de la diversidad genética de los virus de rabia presentes en Costa Rica.

En la presente práctica dirigida se efectuó la caracterización molecular del virus de la rabia en muestras analizadas en el SENASA entre los años 2015 y 2017. Se realizó una reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) para amplificar el gen de la nucleoproteína (N); sin embargo, debido a la obtención de múltiples productos inespecíficos se procedió a optimizar el ensayo. Para esto se modificó el método de extracción de ARN, así

como la temperatura de alineamiento de los cebadores (T_m), la concentración de $MgCl_2$, las concentraciones de cebadores y ARN de las muestras, y las condiciones del ciclaje.

A pesar de que mejoró considerablemente la sensibilidad del ensayo, no se pudo eliminar la amplificación de productos inespecíficos, por lo que se purificó el ADN directamente del gel de electroforesis para proceder con la secuenciación. Se obtuvieron 12 secuencias, no obstante, únicamente seis de ellas se pudieron ensamblar y comparar con la secuencia de referencia.

Mediante un análisis filogenético, se determinó que todas las secuencias estaban relacionadas a cepas originarias de *D. rotundus*, y que además provenían de un ancestro en común. De esta manera se demostró que *D. rotundus* continúa siendo el principal reservorio y vector de la rabia silvestre en el país, infectando primordialmente bovinos.

ABSTRACT

Rabies is an infectious and zoonotic disease caused by a neurotropic virus from the *Lyssavirus* genus. It is mainly transmitted by bites, either from carnivore mammals or bats. This zoonosis causes an encephalomyelitis that is usually fatal, so it is considered one of the most important threats for public health worldwide.

In Latin America the number of reported cases of canine rabies has decreased significantly, however, wild rabies variants continue to represent a risk in the area, being hematophagous bats the main transmitters of human cases in the region. In Costa Rica the disease mainly affects cattle, where bats are the major reservoir and vector, keeping the virus endemic in the country.

There is not much information about the current situation of Costa Rica regarding wild rabies, as it wasn't until 2016 that they started sequencing the viruses involved in the outbreaks. Just as expected, the majority of the analyzed cases were transmitted by *Desmodus rotundus*, however, one of them was associated to a viral variant present in *Tadarida brasiliensis*. This was the first report of rabies transmitted by this species in Costa Rica, which left many unanswered questions about the genetic diversity of rabies virus present in the country.

This internship intended to carry out the molecular characterization of the rabies virus in samples analyzed by SENASA in the period from 2015 to 2017. An RT-PCR was performed for the amplification of the nucleoprotein gene (N); nevertheless, multiple non-specific products were obtained, so it was necessary to perform an optimization of the assay. Some modifications were done to accomplish this, such as the extraction method, primers melting temperature (T_m), $MgCl_2$ concentration, primers and RNA concentration and cycling conditions.

Although the sensitivity of the assay improved, the amplification of the non-specific products couldn't be eliminated, so DNA was purified directly from the electrophoresis gel to proceed with sequencing. Twelve sequences were obtained, however, only six of them were assembled and compared to the reference sequence.

Additionally, it was determined by a phylogenetic analysis that all the strains originated from *D. rotundus* and came from a common ancestor. These results show that *D. rotundus* continues to be the major reservoir and vector of wild rabies in the country, infecting cattle primarily.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La rabia es una enfermedad infecciosa y zoonótica causada por un virus neurotrópico del género *Lyssavirus* (Vargas & Sancho 1990; Silva et al. 2013; WHO 2016). Se caracteriza por afectar a todas las especies de mamíferos, incluyendo humanos (Orlowska et al. 2008), y causar una encefalomiелitis que usualmente es fatal (Jackson 2013; Schatz et al. 2013; Vigilato et al. 2013), convirtiéndola en una de las amenazas más importantes para la salud pública (Fooks et al. 2014).

El virus de la rabia (RABV) se encuentra a menudo en la saliva de los animales infectados, por lo que, comúnmente, su transmisión se da por medio de mordeduras (Vargas & Sancho 1990; WHO 2007), ya sea por parte de mamíferos carnívoros o quirópteros (Vigilato et al. 2013). Otras rutas de transmisión incluyen: inhalación de aerosoles contaminados con RABV, manipulación de carcasas infectadas, contaminación de una herida abierta o membrana mucosa con saliva o tejido nervioso infectado (Wertheim et al. 2009; Hemachudha et al. 2013), e incluso se ha reportado la infección a través de trasplantes de órganos (Mani & Madhusudana 2013; Zhou et al., 2016).

Entre los métodos que se utilizan actualmente para la detección de la rabia se encuentran la inmunofluorescencia directa (IFD), la inoculación en ratones (MIT), aislamiento en cultivo celular (RTCIT), examen histopatológico, reconocimiento de epítomos específicos con anticuerpos monoclonales (MAbs) y la reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR).

La IFD es el método más utilizado hoy en día y es considerado el diagnóstico de referencia por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE) y la Organización Mundial de

la Salud (OMS) (Vieira 2007; Mani & Madhusudana, 2013; Johnson et al. 2014). La RT-PCR y MAbs, además de diagnosticar el virus, permiten identificar la variante viral involucrada; sin embargo, debido a la gran diversidad de linajes virales en la actualidad, a veces no es posible establecer la identificación antigénica del virus. La RT-PCR permite obtener información más precisa del genoma viral, ya que los amplicones generados en el ensayo pueden secuenciarse para su posterior caracterización y análisis filogenético, permitiendo entonces estudios epidemiológicos más completos (Vieira 2007).

Los lyssavirus tienen un genoma ARN no segmentado que codifica cinco estructuras proteicas: nucleoproteína (N), glicoproteína (G), fosfoproteína (P), proteína matriz (M) y la polimerasa (L) (Wunner & Conzelmann 2013; Yamaoka et al. 2017). Basado en la secuencia nucleotídica de la proteína N, el género lyssavirus se ha dividido en siete genotipos: virus de la Rabia clásico (RABV) (genotipo 1), virus de Lagos (genotipo 2), virus Mokola (genotipo 3), virus Duvenhage (genotipo 4), Lyssavirus Europeo (EBLV) tipo 1 y tipo 2 (genotipo 5 y 6 respectivamente) y Lyssavirus Australiano (ABLV) (genotipo 7) (Vieira 2007; Orłowska et al. 2008).

En América Latina y el Caribe hay múltiples variantes antigénicas (AgV) del genotipo 1, entre las cuales se incluyen AgV1 y AgV2 asociadas a caninos (rabia canina), así como AgV3 y AgV4 asociadas a murciélagos hematófagos y no hematófagos (Vigilato et al. 2013). Sin embargo, gracias al Programa Regional de Control de Rabia Canina puesto en marcha en 1983 y coordinado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), el número de casos relacionados con rabia canina ha disminuido en más de un 90%, y ha sido erradicada en varios países de la región (OPS 2013; Vigilato et al. 2013). Por otro lado, respecto a las variantes asociadas a murciélagos, se sabe que el vampiro *Desmodus rotundus* es el principal reservorio

y vector en la región (Loza-Rubio et al. 2005; da Rosa et al. 2006; Escobar et al. 2015; Hutter et al. 2016).

En Costa Rica, en 1981, el Ministerio de Agricultura y Ganadería estableció un programa de vigilancia y control nacional de la rabia en los animales con signos neurológicos, que hoy en día se mantiene e incluye ganado bovino, equinos, pequeños rumiantes, cerdos, perros, gatos y animales silvestres. Una vez confirmado el diagnóstico de rabia por medio de los laboratorios del Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA), se deben iniciar las medidas de mitigación correspondientes. Estas medidas consisten en informar y coordinar con el Ministerio de Salud, quien a su vez comunica a la población local de la presencia del virus, y vacunar a las personas que estuvieron en contacto con animales enfermos; por su parte el SENASA, establece la vacunación del ganado susceptible con el propósito de controlar el brote (Hutter et al. 2016).

En el año 2016 se publicó el primer análisis epidemiológico comprensivo de rabia bovina en Costa Rica, el cual incluyó datos de 1985-2014, y demostró que la enfermedad se da principalmente en ganado, siendo los murciélagos el reservorio y principal vector que mantiene el virus endémico en el país. Según Hutter y colaboradores (2016), en el periodo transcurrido entre 1987 y 2014 se registraron cuatro casos de rabia en caninos. En 1987 ocurrieron dos casos en Guanacaste que se presume eran de origen canino, pero se consideraron importados desde Nicaragua. En 1999 se diagnosticó un caso en Alajuela que se cree fue causado por *D. rotundus*, mientras que el último se presentó en el 2014 en Puntarenas, siendo el único que ha sido caracterizado molecularmente, que fue originado por una variante transmitida por *D. rotundus*. Mientras que en humanos, los últimos reportes incluyen dos casos en la zona sur del país en el año 2001 (Badilla et al. 2003) y dos en el 2014, de los cuales uno se presentó nuevamente en la zona sur originado por una cepa presente en quirópteros, y el último, fue una niña de un caso

importado de Nicaragua, causado por carnívoros. En cuanto a la rabia en bovinos, en el periodo comprendido entre los años 1985 y 2014 se constató un total de 78 brotes, y se documentaron 723 animales muertos (Hutter et al. 2016). En 2014 se estableció, por primera vez en Costa Rica, un brote de rabia causado por un virus adaptado a *Tadarida brasiliensis*, un murciélago insectívoro, que se reporta comúnmente transmitiendo el virus de la rabia en otras partes de América (Hutter et al. 2016).

1.2. Justificación

1.2.1. Importancia

La rabia es la décima causa infecciosa de muerte en humanos a nivel global, cobrando un estimado de 59000 vidas anualmente (WHO 2007; WHO 2016), por lo que aún hoy se mantiene como una de las amenazas más importantes para la salud pública (Fooks et al. 2014). Afecta, predominantemente, a las personas y animales que habitan en las zonas rurales de los países en vías de desarrollo, siendo el continente africano y el asiático los más perjudicados (WHO 2007; Fooks et al. 2014).

La escasez de vigilancia epidemiológica representa uno de los mayores problemas, ya que lleva a la ausencia de datos certeros respecto a la incidencia mundial de la enfermedad, así como estimados imprecisos del impacto económico real. Por estas razones, no existe evidencia sólida de la situación actual y la necesidad de acción no se percibe a nivel de los gobiernos, quienes se encargan de la toma de decisiones (Léchenne et al. 2016).

Como se mencionó anteriormente, en América Latina los casos asociados a la rabia canina han disminuido significativamente; sin embargo, la reducción en la incidencia de la enfermedad, junto con la aparición de otras prioridades sanitarias, han provocado un desinterés

institucional y de recursos hacia el programa regional (OPS 2013). Por otra parte, las variantes de la rabia silvestre continúan presentando un riesgo en la región, especialmente serio en las zonas tropicales y subtropicales donde la vida silvestre abunda, y en áreas donde las condiciones de vida implican un riesgo constante de contacto entre especies que transmiten la enfermedad y los seres humanos (Calderón et al. 2016). Desde el año 2000, los murciélagos hematófagos han sido la causa principal de rabia en humanos en Latinoamérica y el Caribe. Se reporta que en el periodo comprendido entre los años 2010 y 2012 hubo un aumento del 5.2% en casos de rabia humana transmitida por murciélagos (Vigilato et al. 2013; Calderón et al. 2016).

En Costa Rica, los casos en humanos son sumamente esporádicos, y en cuanto a la rabia canina, el último caso documentado fue en el año 1987 (Badilla et al. 2003), por lo cual esta variante se puede considerar erradicada en el país. A pesar de esto, las autoridades de salud deben mantenerse alerta ante la posibilidad de una transmisión cruzada entre especies, ya que los últimos tres casos humanos reportados en el país fueron causados por una ardilla y un gato, especies que los servicios de salud pública no consideraban como posibles amenazas (Hutter et al. 2016).

En la actualidad no se sabe a ciencia exacta cual es la situación de Costa Rica en cuanto a la rabia silvestre, ya que no fue hasta que se realizó el primer estudio epidemiológico de rabia bovina en el 2016 que se empezaron a realizar las tipificaciones de los virus involucrados en los brotes. Hasta ese momento se creía que el único vector de rabia silvestre presente en el país era *D. rotundus*; sin embargo, al detectar que uno de los brotes estaba asociado con *T. brasiliensis* surge la interrogante acerca de la diversidad genética de virus de rabia presentes en el país.

A pesar de las mejoras respecto al control de la rabia en Costa Rica, debido a la letalidad que caracteriza al virus, aún debe considerarse como un problema serio (Ruiz & Briones 2010).

Por esto se deben realizar más estudios de tipo epidemiológico y filogenético que permitan conocer las variantes genéticas presentes en nuestro medio, y una mayor comprensión de la dinámica de propagación de la rabia, tanto en murciélagos como en otros animales silvestres. De esta manera se podrán implementar programas de prevención y control, adoptando las medidas adecuadas de acuerdo al origen y comportamiento de la enfermedad en el entorno.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

1.3.1.1 Adquirir experiencia y fortalecer los conocimientos teórico-prácticos de las técnicas moleculares, con el fin de caracterizar cepas del virus de la rabia.

1.3.2. Objetivos específicos

1.3.2.1. Adquirir destrezas y competencias en la metodología de la reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) en muestras positivas a rabia.

1.3.2.2. Reforzar las habilidades para la ejecución de electroforesis para evaluar la amplificación de fragmentos de ADN, así como para la secuenciación del virus.

1.3.2.3. Obtener experiencia en la interpretación de la información generada por programas informáticos especializados, como en el caso de la edición de las secuencias y el análisis filogenético del virus.

1.3.2.4. Fortalecer y actualizar el conocimiento respecto a la situación actual de la rabia en nuestro país.

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales y Métodos

2.1.1 Área de trabajo

El presente trabajo consistió en efectuar una práctica dirigida en el Laboratorio de Bioseguridad del LANASEVE (Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios) en el SENASA, la cual tuvo una duración de aproximadamente siete meses.

2.1.2 Trabajo en el laboratorio

2.1.2.1 Muestras

Para este estudio se utilizaron 20 muestras de cerebro positivas a rabia por inmunofluorescencia, las cuales fueron recibidas en el Laboratorio de Bioseguridad del LANASEVE en el periodo comprendido entre el año 2015 y el 2017 (mes de agosto) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Muestras positivas a rabia recibidas en el SENASA del año 2015 al mes de agosto del 2017.

Protocolo	Región	Provincia	Cantón	Fecha	Especie
LRBR0015-15	Brunca	Puntarenas	Coto Brus	09/01/15	Bovino
LSE0376-15	Central Sur	San José	Puriscal	30/03/15	Bovino
LSE0711-15	Brunca	Puntarenas	Buenos Aires	26/05/15	Bovino
LSE1098-15	Central Metropolitana	Alajuela	Upala	29/07/15	Bovino
LRHN1416-15	Huetar Norte	Alajuela	Upala	14/08/15	Bovino
LSE1167-15	Huetar Norte	Alajuela	Upala	26/08/15	Bovino
LSE1179-15	Huetar Norte	Alajuela	Upala	24/08/15	Bovino
LSE1192-15	Pacífico Central	Alajuela	San Mateo	26/08/15	Bovino
LSE1250-15	Huetar Norte	Alajuela	Upala	11/09/15	Bovino
LRBR1053-15	Brunca	Puntarenas	Osa	03/11/15	Bovino
LRHN2140-15	Huetar Norte	Alajuela	San Carlos	14/12/15	Bovino
LRBR0192-16	Brunca	Puntarenas	Corredores	13/02/16	Bovino
LRBR0499-16	Brunca	Puntarenas	Golfito	22/04/16	Bovino
LRBR0895-16	Brunca	Puntarenas	Coto Brus	11/08/16	Bovino
LRBR0925-16	Brunca	Puntarenas	Coto Brus	23/08/16	Equino
LRBR0967-16	Brunca	Puntarenas	Coto Brus	30/08/16	Bubalino
LRBR1021-16	Brunca	Puntarenas	Coto Brus	12/09/16	Bovino
LSE1250-16	Pacífico Central	Puntarenas	Parrita	16/09/16	Bovino
LRBR0745-17	Brunca	Puntarenas	Coto Brus	21/08/17	Bovino
LRBR0803-17	Brunca	Puntarenas	Coto Brus	31/08/17	Bovino

Con el fin de confirmar que las muestras en cuestión contenían el material genético del virus, se les realizó una RT-PCR que amplifica un fragmento de 248 pb del gen de la nucleoproteína, la cual es utilizada en el SENASA para el diagnóstico de RABV, y una RT-PCR de 1500 pb para la caracterización molecular del virus.

2.1.2.2 Extracción de ARN y RT-PCR para el fragmento de 1500 pb

Para la extracción del ARN se utilizó el kit comercial de columnas DNeasy de Qiagen®, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se generó una secuencia cADN por medio de RT-PCR en un volumen total de reacción de 12,5 µl usando el kit OneStep RT-PCR de Qiagen® según se detalla en el Cuadro 2; así mismo, se enlistan los iniciadores utilizados en el Cuadro 3, y el protocolo a seguir para la amplificación del fragmento en el Cuadro 4.

Cuadro 2. Reactivos OneStep de Qiagen® a utilizar para la RT-PCR de un sólo paso.

Reactivo	Conc. Stock	Conc. trab.	Volumen 12,5 µl	
			10 µl	+ 2,5 µl ARN
Agua DEPC	--	--		4,625
Buffer OneStep	5X	1X		2,5
dNTPs	10 mM	0,4 mM		0,5
Primer 1-20F	20 µM	0,5 µM		0,3125
Primer 304R	20 µM	0,5 µM		0,3125
RNase Inhibitor	4 U/µl	0,4 U/µl		1,25
OneStep Enzyme	25X	1X		0,5
Muestra ARN	--	--		2,5

Cuadro 3. Iniciadores para la RT-PCR para el gen N en el presente estudio.

Iniciadores	Dirección	Secuencia
RAB20	Sentido	5'-ACGCTTAACAACAARATCARAG-3'
RAB304	Antisentido	5'-TTGACGAAGATCTTGCTCAT-3'

Cuadro 4. Protocolo para la amplificación del fragmento de ~1500 pb del gen N.

Temperatura	Tiempo
45 °C	30 min
95 °C	15 min
94 °C	10 s
53 °C	45 s
68 °C	90 s
68 °C	10 min
4 °C	∞

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer TBE 1X, y para la visualización de las bandas de ADN se utilizó el colorante GelRedTM (Biotium). Los productos de las muestras sometidas al RT-PCR se corrieron por aproximadamente 40 minutos a 125 V, junto con los marcadores de peso molecular de 100 pb (FermentasTM). Para comprobar la amplificación se observó en un fotodocumentador con luz U.V., en espera de la presencia de una banda nítida de ~1500 pb.

2.1.2.3 Purificación del ADN y reacción de secuenciación de ADN

La purificación del ADN de las muestras se realizó a partir del gel, cortando la banda de interés y utilizando el kit QIAquick Gel Extraction.

La reacción de secuenciación se llevó a cabo con el kit comercial BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems™) según se detalla en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Reactivos del kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems™) a utilizar para PCR de secuenciación.

Reactivo	Conc. Stock	Conc. trab.	Volumen 20 µl	
			10 µl	+ 10 µl ADN
Agua DEPC	--	--	4,28	
Ready Reaction Premix	2,5X	0,4X	3.2	
Sequencing Buffer	5X	0,6X	2.4	
Primer	20 µM	0,12 µM	0.12	
Muestra ADN	--	--	10	

El programa de secuenciación constó de 30 ciclos con una rampa de 1°C/segundo entre cada temperatura (Cuadro 6).

Cuadro 6. Parámetros de temperatura y tiempo para la reacción de secuenciación.

Temperatura	Tiempo
96°C	1 min
96°C	10 s
50°C	5 s
60°C	4 min

Se obtuvieron las secuencias por medio de un analizador genético ABI 3130 (Applied Biosystems™) mediante electroforesis capilar, la cual se llevó a cabo en capilares de 80 cm y 50 cm, utilizando polímero POP 7® (Applied Biosystems).

2.1.2.4 Edición de las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron revisadas a través del programa Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems™), para luego ser ensambladas y comparadas con la secuencia de referencia mediante el programa SeqScape® Software v2.6 (Applied Biosystems™). Asimismo, se realizó un análisis BLAST para corroborar las secuencias de rabia en el GenBank/DDBJ/EMBL con al menos 90% de similitud con las variantes virales obtenidas.

2.1.2.5 Análisis filogenético

Las secuencias se alinearon junto con las secuencias de este mismo gen obtenidas en GenBank/DDBJ/EMBL, utilizando el método CLUSTAL/W del programa BioEdit 7.2.6.1 (Hall 2011), y se eliminaron las secuencias no informativas.

Posteriormente, se utilizó el programa MEGA 7.0 (Kumar et al. 2016), para determinar el mejor modelo de sustitución que se ajustaba a las secuencias utilizadas, el cual en este caso fue Kimura2+G. El árbol filogenético fue construido con el mismo programa utilizando el método de distancia con el algoritmo “Maximum Likelihood”, con un valor *bootstrap* de 1000 repeticiones, y usando como grupo externo el Lyssavirus australiano (ABLV).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 RT-PCR

Bajo las condiciones mencionadas anteriormente, se obtuvieron productos de amplificación inespecíficos de aproximadamente 600 pb en todas las muestras, mientras que el fragmento de interés se logró amplificar únicamente en dos de ellas (Figura 1).

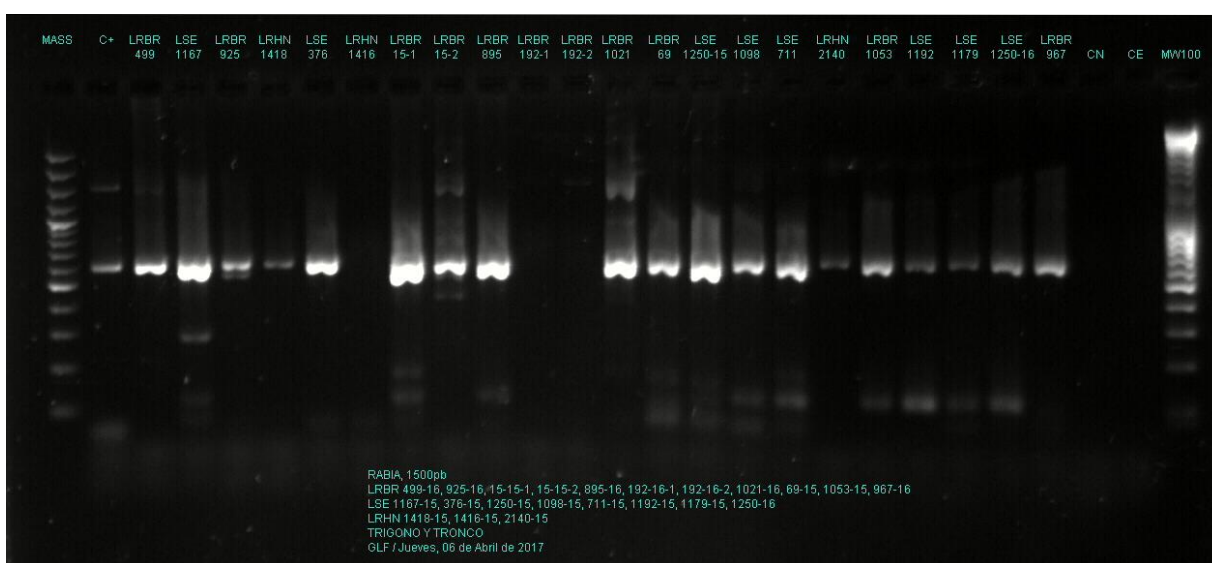


Figura 1. Gel de agarosa al 1% mostrando productos inespecíficos de ADN (~600 pb) en todas las muestras y únicamente dos muestras con el producto específico esperado (~1500 pb), LRBR0015-15 y LRBR1021-16.

Estos resultados permitieron establecer que las condiciones de extracción del ARN y de amplificación utilizadas no eran las ideales, por lo que se procedió a optimizar el protocolo mediante modificación del procedimiento de extracción de ARN, cambio de la temperatura de alineamiento de los cebadores, variación en la concentración de $MgCl_2$, estandarización de las concentraciones de cebadores y ARN de las muestras, y cambios en las condiciones del ciclaje (Roux, 2009).

3.2 Ensayos de optimización de la RT-PCR

Entre las condiciones de ciclaje, el parámetro más importante es la temperatura óptima de alineamiento (T_m), ya que una estimación incorrecta de la misma puede llevar a un alineamiento inadecuado y a la amplificación de productos inespecíficos (Korbie & Mattick 2008). Por medio de la herramienta OligoCalc (Kibbe 2007) se calculó que la T_m ideal para los iniciadores utilizados es de 59°C. A la vez, se tomó un control positivo y se realizó un ensayo de gradiente de temperatura de alineamiento, en el cual se experimentó con un rango de 57°C a 62°C. Se observó una única banda tenue a nivel de ~1500 pb al emplear una temperatura de alineamiento de 59°C (Figura 2), confirmando entonces el resultado obtenido por medio de OligoCalc.

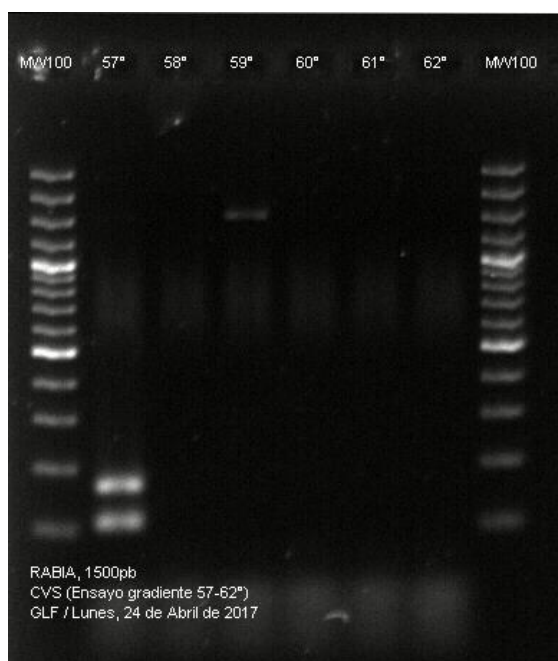


Figura 2. Gel de agarosa al 0.5% mostrando el producto específico amplificado del RT-PCR de un control positivo de rabia (~1500 pb) sometido a un gradiente de temperatura de alineamiento.

El $MgCl_2$ es un cofactor esencial de la polimerasa en la reacción de amplificación del ADN. El buffer incluido en el kit utilizado tiene una concentración de 12.5mM de $MgCl_2$ (2.5 mM por reacción), lo cual suele ser suficiente para una reacción típica de PCR. Debido a su función como catalizador, al aumentar su concentración mejora el rendimiento del PCR; sin embargo, concentraciones muy altas de este reactivo podrían también disminuir la especificidad de la polimerasa resultando en la amplificación de productos inespecíficos (Lorenz 2012; Erlich, 2015). Se realizó una titulación de $MgCl_2$, bajo las condiciones de alineamiento del ensayo anterior.

La banda de mayor nitidez fue observada al aumentar la concentración del $MgCl_2$ en la reacción de 2.5mM a 3mM. En este ensayo la sensibilidad del RT-PCR mostró un aumento, reflejado en la intensidad de la fluorescencia de la banda, sin embargo se continúan obteniendo también productos inespecíficos a un nivel de 600 y 1000 pb aproximadamente (Figura 3).



Figura 3. Gel de agarosa al 1% mostrando productos específicos de ADN (~1500 pb) amplificados por RT-PCR, de un control positivo de rabia sometido a una titulación de concentración de $MgCl_2$.

Debido a los resultados anteriores se procedió a realizar un PCR *Touchdown* (PCR-TD), que es un método desarrollado para optimizar PCRs de una manera simple y rápida, mejorando la especificidad, la sensibilidad y el rendimiento de los mismos (Korbie & Mattick 2008). Esta metodología se lleva a cabo bajo condiciones de ciclaje que favorecen inherentemente la amplificación del amplicón de interés, excluyendo fragmentos inespecíficos y la formación de dímeros (Roux 2009).

La técnica consta de dos fases, la primera inicia con una temperatura de alineamiento mayor a la T_m proyectada, para luego ir disminuyendo progresivamente a una temperatura más permisiva en el curso de 10-15 ciclos. La segunda fase consiste en utilizar la última temperatura de alineamiento de la primera fase durante 20-25 ciclos (Korbie & Mattick 2008; Roux 2009).

En este caso la primera etapa inició con una temperatura de alineamiento de 68°C, para ir disminuyéndola hasta llegar a 59°C en un curso de diez ciclos; mientras que la segunda fase constó de 30 ciclos con una temperatura de alineamiento de 59°. Adicionalmente se extrajeron las muestras nuevamente con el método de Trizol[®] (Rio et al. 2010), para así realizar una comparación entre los resultados obtenidos de un TD-PCR de estos nuevos extractos y los extraídos anteriormente con el método de columnas.

Como se puede observar en la Figura 4, la sensibilidad del ensayo aumentó en ambos grupos de extractos, y a pesar de que se continúan amplificando productos inespecíficos a la altura de 600 pb, la intensidad de la banda de estos es un poco menor.

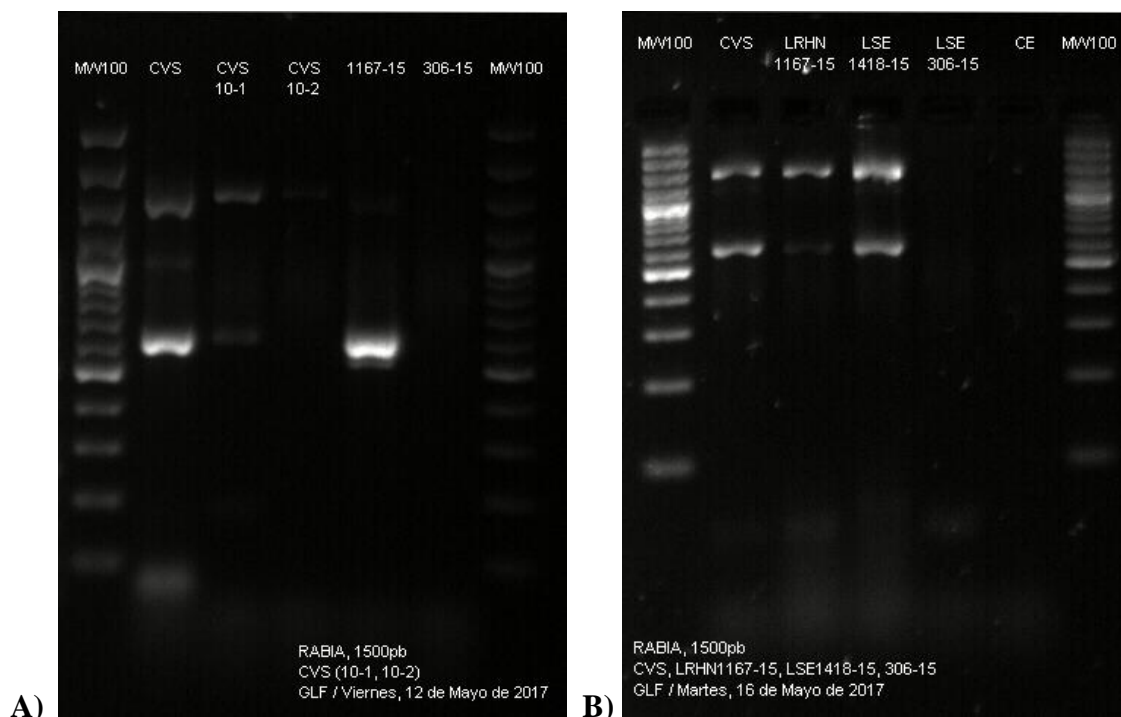


Figura 4. Geles de agarosa al 1% mostrando productos específicos de ADN (~1500 pb) amplificados por RT-PCR Touchdown de muestras positivas a rabia extraídas con el kit de columnas (A) y con el método de Trizol® (B), respectivamente.

En un PCR las primeras etapas de alineamiento y amplificación son las más críticas para obtener el producto deseado, ya que las altas temperaturas son menos permisivas a la formación de uniones inespecíficas. Por lo tanto, en el caso de un PCR-TD, aunque eventualmente la temperatura va disminuyendo, la naturaleza exponencial del procedimiento permite que el fragmento de interés sea más competitivo, reduciendo o inclusive eliminando productos inespecíficos.

Con respecto a las metodologías de extracción utilizadas, las bandas con mayor nitidez e intensidad fueron las de los extractos obtenidos con Trizol® (Figura 4b). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Marston y sus colaboradores (2013), quienes comprobaron que la concentración de ARN posterior a la extracción con Trizol® es mayor a la obtenida por

medio del kit de columnas. Según Karp, Isaac e Ingram (1998) las membranas de sílica de las columnas tienen una capacidad determinada para los ácidos nucleicos que pueden adherirse a ella, por lo que hay una posibilidad de que la membrana se haya saturado. Además, a diferencia del procedimiento con Trizol, esta metodología no cuenta con una fase de separación como tal, por lo que si se satura la membrana, sería tanto de ARN como de ADN, impidiendo eluir la misma cantidad de ARN que se obtiene por medio del Trizol®.

La relación entre la concentración de iniciadores y la cantidad de muestra utilizada en la reacción se considera un parámetro muy importante a tomar en cuenta para mejorar la especificidad de una reacción (Korbie & Mattick 2008; Lorenz 2012). Para determinar la proporción ideal se realizaron titulaciones de concentración de ambos parámetros. En cuanto a los iniciadores, las bandas se observaron mejor al disminuir la concentración del iniciador sentido de 0,5 μM a 0,4 μM (Figura 5a), mientras que la concentración del iniciador antisentido debe mantenerse sin alteraciones, ya que se obtuvo una banda de alta intensidad utilizando la concentración de 0.5 μM (Figura 5b). Por otro lado, como se puede observar en la figura 5c, las bandas visualizadas en la electroforesis en gel al nivel de ~ 1500 pb fueron más intensas al aumentar la concentración de muestra de 2.5 μl a 3,5 μl .

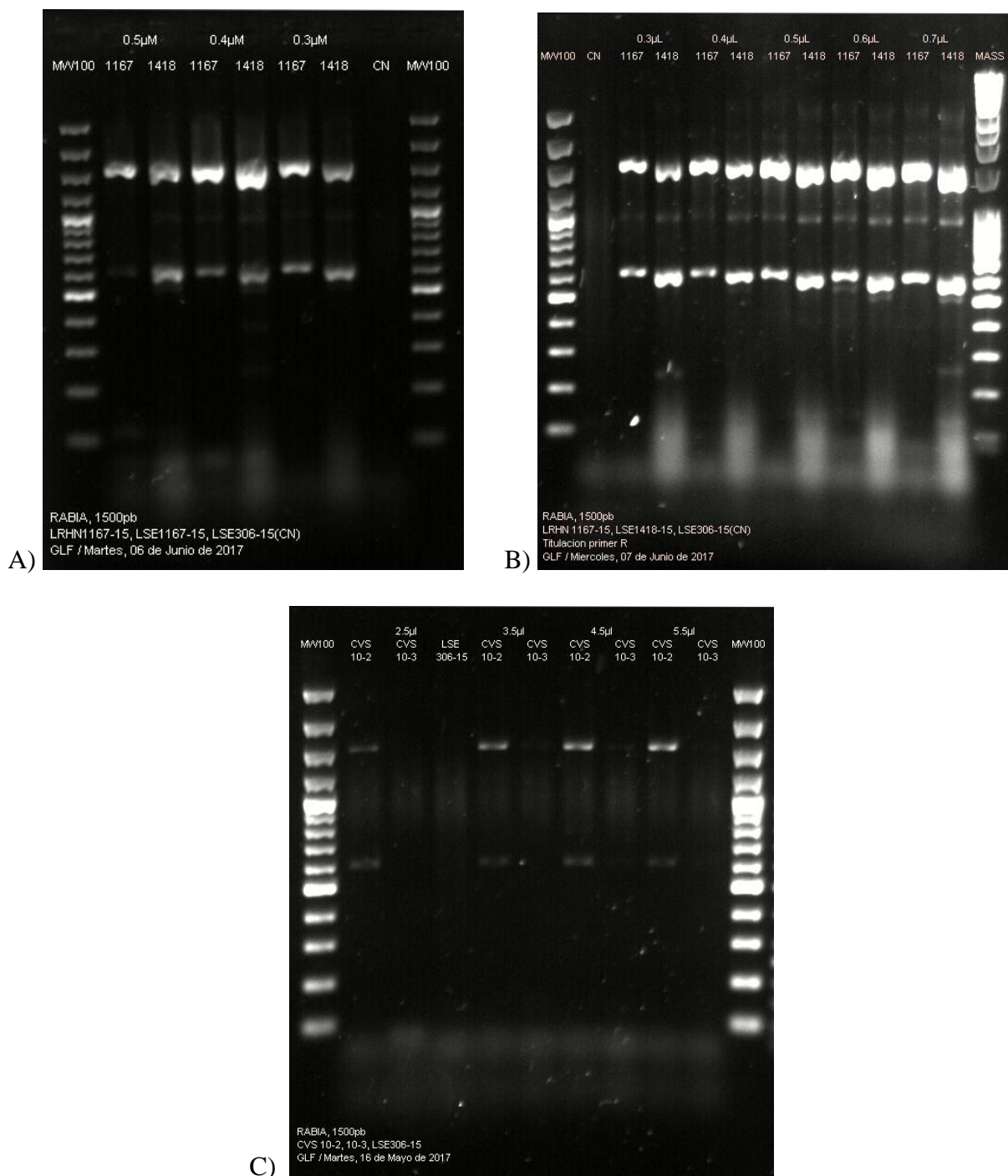


Figura 5. Geles de agarosa al 1% mostrando segmentos específicos de ADN (~1500 pb) amplificados por RT-PCR Touchdown de muestras positivas a rabia sometidas a una titulación de concentración de iniciadores, sentido (A), antisentido (B), y de muestra C).

La sensibilidad del procedimiento mejoró considerablemente, ya que la nitidez de las bandas observadas en el gel es mucho mayor, sin embargo se continúan amplificando productos inespecíficos. Esto último se le atribuye al hecho de que uno de los iniciadores (sentido) utilizados es degenerado, lo cual puede reducir sustancialmente la especificidad del PCR. Este tiene dos posiciones con más de una opción de base, ambas identificadas con la letra R, lo cual indica que podría codificar tanto una A como una G (Cornish-Bowden 1985; Johnson 2010). Por lo tanto hay una posibilidad de que ese iniciador se esté uniendo a otra sección del fragmento en cuestión, generando entonces esa banda de aproximadamente 600 pb. El protocolo final optimizado se detalla en el Cuadro 7 y la Figura 6.

Cuadro 7. Reactivos OneStep de Qiagen® utilizados para la RT-PCR de un solo paso.

Reactivo	Conc. Stock	Conc. trab.	Volumen 12,5 µl	
			10 µl	+ 3,5 µl ARN
Agua DEPC	--	--		3,4375
Buffer OneStep	5X	1X		2,5
dNTPs	10 mM	0,4 mM		0,5
MgCl	25 mM	0,5 µM		0,25
Primer 1-20F	20 µM	0,4 µM		0,25
Primer 304R	20 µM	0,5 µM		0,3125
RNase Inhibitor	4 U/µl	0,4 U/µl		1,25
OneStep RT-PCR Enzyme	25X	1X		0,5
Muestra ARN	--	--		3,5

Temperatura	Tiempo	
45 °C	30 min	
94 °C	15 min	
94 °C	45 s	} 10 ciclos (-1° /
68 °C	45 s	
72 °C	90 s	
94 °C	45 s	} 30 ciclos
59 °C	45 s	
72 °C	90 s	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

Figura 6. Protocolo para la amplificación del fragmento de ~1500 pb del gen N.

3.3 Purificación del ADN y reacción de secuenciación de ADN

De las 20 muestras amplificadas con el RT-PCR-TD optimizado, sólo cuatro mostraron bandas lo suficientemente intensas para proceder con su purificación (Figura 7A). Se repitió el procedimiento con las demás muestras diluyéndolas 10^{-1} , y ocho de ellas aumentaron su fluorescencia (Figura 7B). Se procedió a purificar las 12 bandas para su posterior secuenciación. La banda al nivel de ~1500 pb se logró observar en todas ellas; sin embargo, la intensidad de las bandas fue muy variable. Esto puede asociarse al proceso de degradación del ARN, ya que tanto los tejidos como las extracciones de los mismos se congelaron y descongelaron varias veces

para la realización de los diferentes ensayos descritos anteriormente, comprometiendo así la integridad del ARN (Strand et al. 2007; Thompson et al. 2007).

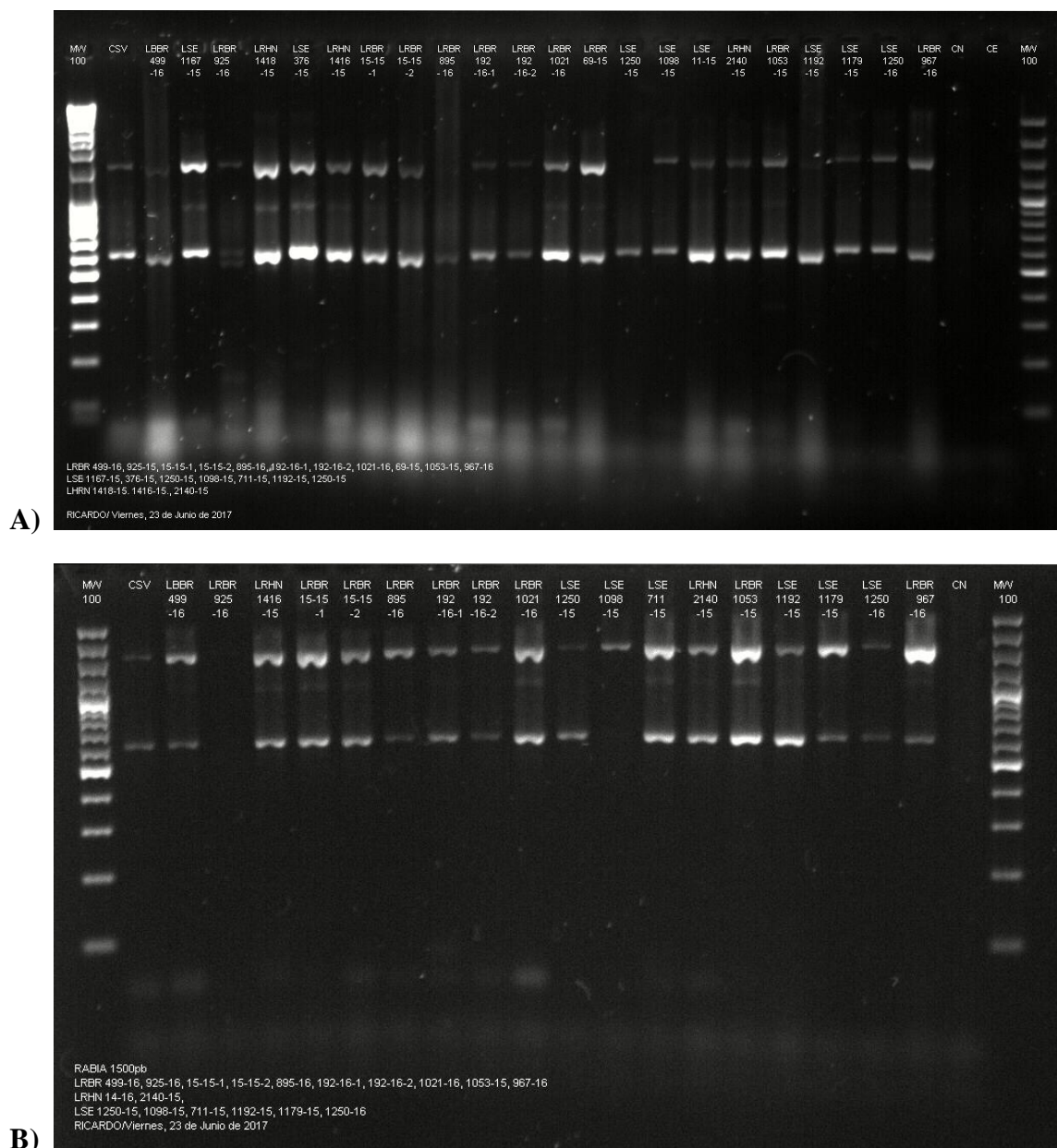


Figura 7. Geles de agarosa al 1% mostrando fragmentos de ADN específicos (~1500 pb) amplificados por RT-PCR de muestras positivas a rabia, puras (A) y diluidas 10-1(B), respectivamente.

3.4 Secuenciación y análisis filogenético

Únicamente seis de las 12 secuencias obtenidas pudieron ser ensambladas y comparadas con la secuencia de referencia. El kit utilizado para la purificación del ADN es un método de columnas, al igual que el kit utilizado inicialmente en la extracción, por lo que existe la posibilidad de que se haya dado el mismo problema, provocando la recuperación insuficiente de material e imposibilitando una correcta secuenciación. El tamaño de las secuencias obtenidas varió de 1343 a 1356 nucleótidos, y al someterlas a un análisis BLAST se confirmó su homología con el gen N del virus de la rabia, todas identificadas como variantes asociadas con *D. rotundus*. Se utilizaron 103 secuencias en total para el análisis filogenético, de las cuales 34 son muestras de Costa Rica que datan desde el año 2004 hasta el presente.

En el árbol filogenético construido (Figura 8) se puede ver como todas las muestras secuenciadas se agruparon en un mismo *cluster*, es decir, provienen de un ancestro en común. De acuerdo al mapa (Figura 8), todas ellas pertenecen a la región Brunca, a excepción de la LSE0376-15 que pertenece a la región Central Sur, es decir, entre 130 y 170 km de distancia de las demás.

Debido a la ecología del murciélago, se esperaba que las muestras que presentan grandes parentescos pudieran pertenecer a una misma región, ya que estos animales forman colonias, y al ser especies no migratorias, se mueven no más de 20 km para alimentarse (Greenhall 1983; Martins et al. 2009). Sin embargo, una vez que los machos juveniles maduran sexualmente son expulsados de sus colonias natales por parte del macho dominante; de igual manera existe evidencia de que en ocasiones las hembras adultas pueden migrar a otras colonias cercanas (Martins et al. 2007; Martins et al. 2009).

Esto quiere decir que hay una posibilidad de que si estos individuos se infectan, al salir de sus colonias pueden transmitir el virus a otros murciélagos, permitiéndole a este desplazarse geográficamente a través del tiempo. Además, como el gen N posee regiones con secuencias altamente conservadas, no cambia mucho su conformación a través de la evolución del virus (Cherian et al. 2015).

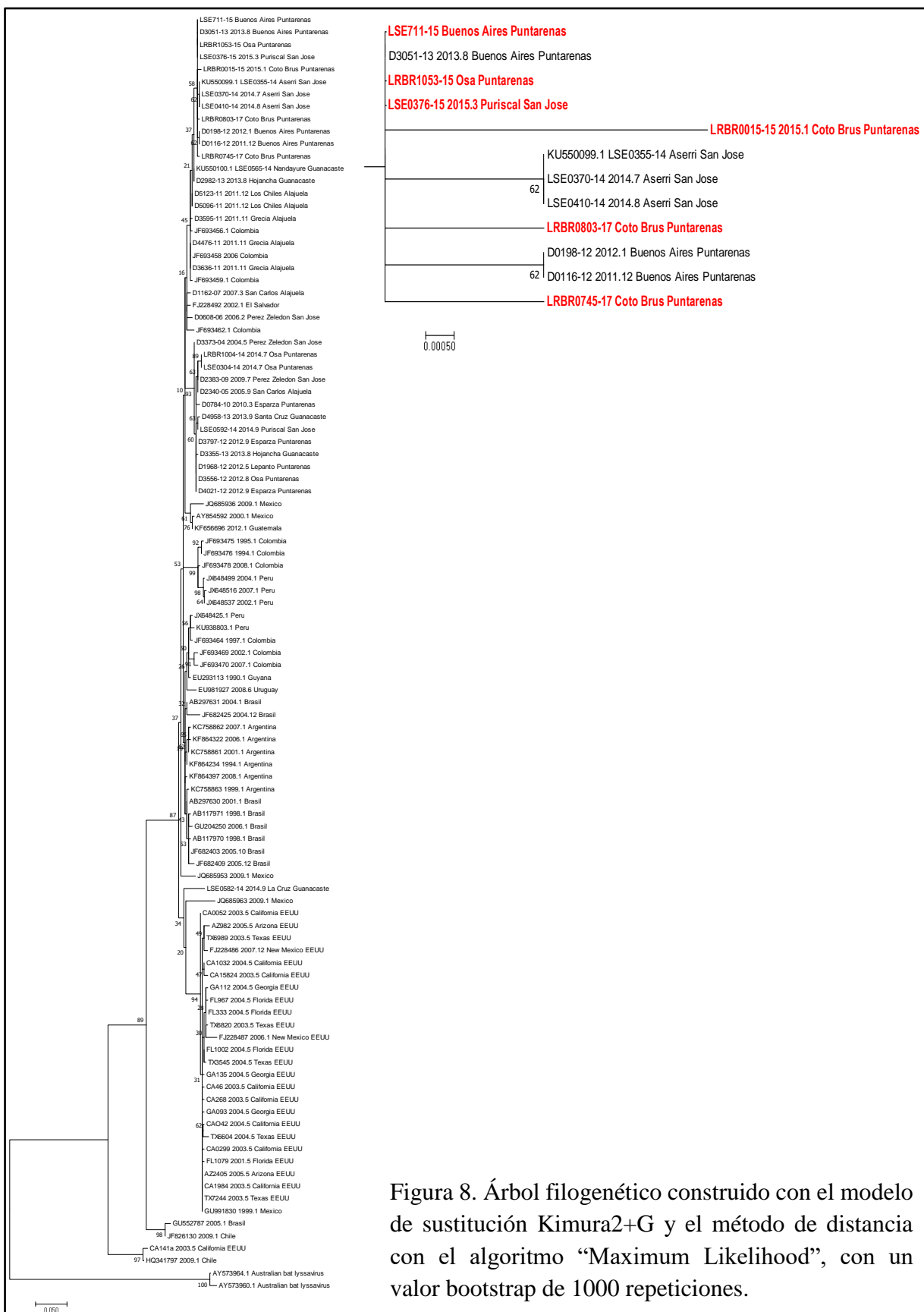


Figura 8. Árbol filogenético construido con el modelo de sustitución Kimura2+G y el método de distancia con el algoritmo “Maximum Likelihood”, con un valor bootstrap de 1000 repeticiones.



Figura 9. Mapa de Costa Rica dividido en 7 regiones con la distribución de los brotes de rabia incluidos en el presente estudio. Los brotes señalados con color rojo representan las muestras secuenciadas.

4. CONCLUSIONES

1. Se adquirió experiencia y se fortalecieron los conocimientos teórico-prácticos de las técnicas moleculares mediante la caracterización de las cepas del virus de la rabia.
2. Se obtuvieron destrezas y competencias en la metodología de la RT-PCR mediante la optimización del protocolo para la amplificación del fragmento que codifica el gen N del virus de la rabia. El método de extracción con Trizol[®] permite obtener una mayor cantidad y calidad de ARN en muestras positivas al virus de la rabia, posibilitando obtener mejores resultados a la hora de realizar una RT-PCR del fragmento que codifica la nucleoproteína. La temperatura óptima de alineamiento en una RT-PCR de acuerdo a los iniciadores utilizados en este estudio es de 59°C, sin embargo, al ser uno de ellos degenerado, se debe recurrir al método *Touchdown* para aumentar la sensibilidad y especificidad del ensayo. Asimismo, se debe aumentar la concentración de MgCl₂ y ARN, y disminuir la concentración del iniciador sentido. Para continuar con la optimización del ensayo y aumentar su especificidad es necesario diseñar iniciadores nuevos, disminuyendo así la probabilidad de que se amplifiquen productos inespecíficos, y consecuentemente simplificando el proceso de secuenciación de la muestra.
3. Se reforzaron habilidades para la ejecución de electroforesis y la evaluación de la amplificación de fragmentos de ADN, así como para la secuenciación de los mismos.
4. Se obtuvo experiencia en la interpretación de la información generada por programas informáticos especializados, como en el caso de la edición de secuencias y del análisis filogenético del gen N. En este estudio, el análisis determinó que las muestras secuenciadas están relacionadas a cepas originarias de *D. rotundus*, las cuales además se agrupan en un mismo cluster suponiendo un ancestro en común.

5. Se obtuvo información actualizada respecto a la situación actual de la rabia en Costa Rica, ya que los resultados del análisis filogenético demuestran que *D. rotundus* continúa siendo el principal reservorio y vector de la rabia silvestre en el país, infectando primordialmente bovinos. Es crucial que cada caso que se confirme como positivo a rabia sea también analizado filogenéticamente, de manera que se pueda conocer con exactitud cuáles son las variantes virales presentes en el país, su origen y la relación que puede haber entre ellas.

5. REFERENCIAS

- Badilla, X., Pérez-Herra, V., Quirós, L., Morice, A., Jiménez, E., Sáenz, E., Salazar, F., Fernández, R., Orciari, L., Yager, P., Whitfield, S. & Rupprecht, C.E. 2003. Human Rabies: A Reemerging Disease in Costa Rica?. *Emerg. Infect. Dis.* Vol 9(6): 721-723. doi: 10.3201/eid0906.020632.
- Calderón, A., Guzman, C., Salazar-Bravo, J., Figueiredo, L.T. & Mattar, S. 2016. Viral Zoonoses That Fly with Bats : A Review. *MANTER: Journal of Parasite Biodiversity.* Vol 7(6): 1–11. doi: 10.13014/K2BG2KWF.
- Cherian, S., Singh, R., Singh, K.P., Manjunatha Reddy, G.B., Anjaneya, Ravi Kumar, G.V.P.P.S. & Singh, R.P. 2015. Phylogenetic analysis of Indian rabies virus isolates targeting the complete glycoprotein gene. *Infect. Genet. Evol.* Vol 36: 333–338. doi: 10.1016/j.meegid.2015.09.024.
- Cornish-Bowden, A. 1985. Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984. *Nucleic Acids Res.* Vol 13(9): 3021–3030.
- Da Rosa, E.S.T., Kotait, I., Barbosa, T.F.S., Carrieri, M.L., Brandão, P.E., Pinheiro, A.S., Begot, A.L., Wada, M.Y., Oliveira, R.C., Grisard, E.C., Ferreira, M., da Silva Lima, R.J., Montebello, L., Medeiros, D.B.A., Sousa, R.C.M., Bensabath, G., Carmo, E.H. & Vasconcelos, P.F.C. 2006. Bat-transmitted Human Rabies Outbreaks, Brazilian Amazon. *Emerg. Infect. Dis.* Vol 12(8): 1197-1202. doi: 10.3201/eid1208.050929.
- Erlich, H. 2015. *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification.* 246 p. Stockton Press. N.Y., USA.
- Escobar, L.E., Peterson, A.T., Favi, M., Yung, V. & Medina-Vogel, G. 2015. Bat-borne Rabies in Latin America. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* Vol 57(1): 63-72. doi: 10.1590/S0036-46652015000100009.
- Fooks, A.R., Banyard, A.C., Horton, D.L., Johnson, N., McElhinney, L.M. & Jackson, A.C. 2014. Current Status of Rabies and Prospects for Elimination. *The Lancet.* Vol 384(9951): 1389-1399. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62707-5.
- Greenhall A.M., Joermann, G. & Schmidt, U. 1983. *Desmodus rotundus.* *Mammalian Species.* Vol 202: 1-6. doi: 10.1093/mspecies/202.1a
- Hemachudha, T., Ugolini, G., Wacharapluesadee, S., Sungkarat, W., Shuangshoti, S. & Laothamatas, J. 2013. Human Rabies: Neuropathogenesis, Diagnosis, and Management. *Lancet. Neurol.* Vol 12: 498–513. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70038-3.
- Hutter, S.E., Brugger, K., Sancho, V.H., González, R., Aguilar, O., León, B., Tichy, A., Firth, C.L. & Rubel, F. 2016. Rabies in Costa Rica: Documentation of the Surveillance Program and the Endemic Situation from 1985 to 2014. *Vector-Borne Zoonot.* Vol 16(5): 334-341. doi: 10.1089/vbz.2015.1906.
- Jackson, A.C. (ed). 2013. *Rabies: Scientific Basis of the Disease and its Management.* 3rd Ed. Elsevier. MB, Canada.

- Johnson, A.D. 2010. An extended IUPAC nomenclature code for polymorphic nucleic acids. *Bioinformatics*. Vol 26(10): 1386-1389. doi: 10.1093/bioinformatics/btq098
- Johnson, N., Aréchiga-Ceballos, N. & Aguilar-Setien, A. 2014. Vampire Bat Rabies: Ecology, Epidemiology and Control. *Viruses*. Vol 6: 1911-1928. doi: 10.3390/v6051911.
- Karp, A., Isaac, P.G. & Ingram, D.S. 1998. Isolation of Nucleic Acids Using Silica-Gel Based Membranes: Methods Based on the Use of QIAmp Spin Columns. In: Karp, A., Isaac, P.G. & Ingram, D.S. (eds.) *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Springer, Dordrecht. p. 59-63.
- Kibbe, W.A. 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acid Res.* Vol 35: 43-46. doi: 10.1093/nar/gkm234.
- Korbie, D.J. & Mattick, J.S. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat. Protoc.* Vol 3(9): 1452-1456. doi: 10.1038/nprot.2008.133.
- Kumar S., Stecher, G. & Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* Vol 33(7): 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Hall, T. 2011. BioEdit: An Important Software for Molecular Biology. *GERF Bulletin of Biosciences*. Vol 2(1): 60-61.
- Léchenne, M., Naïssengar, K., Lepelletier, A., Alfaroukh, I.O., Bourhy, H., Zinsstag, J. & Dacheux, L. 2016. Validation of a Rapid Rabies Diagnostic Tool for Field Surveillance in Developing Countries. *PLoS Negl. Trop. Dis.* Vol 10(10):e0005010. doi: 10.1371/journal.pntd.0005010.
- Lorenz, T.C. 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J. Vis. Exp.* Vol 63: e3998. doi:10.3791/3998.
- Loza-Rubio, E., Rojas-Anaya, E., Banda-Ruiz, V.M., Nadin-Davis, S.A. & Cortez-Garcia, B. 2005. Detection of Multiple Strains of Rabies Virus RNA using primers designed to target Mexican Mexican Vampire Bat Variants. *Epidemiol. Infect.* Vol 133: 927-934. doi: 10.1017/S095026880500405X.
- Mani, R. S. & Madhusudana, S.N. 2013. Laboratory Diagnosis of Human Rabies: Recent Advances. *The Scientific World Journal*. Vol 2013: 1–10. doi: 10.1155/2013/569712.
- Martins, F.M., Meyer, D., Ditchfield, A.D. & Morgante, J.M. 2007. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* Vol 45: 372-378. doi: 10.1111/j.1439-0469.2007.00419.x.
- Martins, F.M., Templeton, A.R., Pavan, A.CO., Kohlbach, B.C. & Morgante, J.S. 2009. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): Marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. *BMC Evol Biol.* Vol 9: 294-307. doi: 10.1186/1471-2148-9-294.
- OPS. 2013. Plan de Acción para la Eliminación de la Rabia Humana transmitida por Perros p. 20-28. In 14ª Reunión de Directores de los Programas Nacionales de Control de Rabia en América Latina (REDIPRA). Ago. 20-22. Lima, Perú.

- Orlowska, A., Smreczak, M., Trebas, P. & Zmudzinski, J.F. 2008. Comparison of real-time PCR and heminested RT-PCR methods in the detection of rabies virus infection in bats and terrestrial animals. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. Vol 52: 313-318.
- Vieira, L. F. 2007. Caracterização Molecular de Virus da Raiva (Lyssavirus – Rhabdoviridae) Isolados de Espécimes Clínicos de Morcegos Hematófagos *Desmodus rotundus* no Norte e Noroeste Fluminense. Tesis de Maestría, Universidade Estadual do Norte Fluminense, RJ, Brasil.
- Rio, D.C., Ares Jr., M., Hannon, G.J. & Nilsen, T.W. 2010. Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harb. Protoc.* Vol 6: 1-3. doi: 10.1101/pdb.prot5439.
- Roux, K.H. 2009. Optimization and Troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harb. Protoc.* Vol 4(4): 1-6. doi: 10.1101/pdb.ip66.
- Ruiz, M. & Briones, C. 2010. Rabies in Latin America. *Neurological Research*. Vol 32(3): 272-277. doi: 10.1179/016164110X12645013284257.
- Schatz, J., Fooks, A.R., McElhinney, L., Horton, D., Echevarria, J., Vázquez-Moron, S., Kooi, E.A., Rasmussen, T.B., Muller, T. & Freuling, M. 2013. Bat Rabies Surveillance in Europe. *Zoonoses Public Hlth*. Vol 60(1): 22-34. doi: 10.1111/zph.12002.
- Silva, S.R., Katz, I.S.S., Mori, E., Carnieli Jr., P., Vieira, L.F.P., Batista, H.B.C.R., Chaves, L.B. & Scheffer, K.C. 2013. Biotechnology advances: A Perspective on the Diagnosis and Research of Rabies Virus. *Biologicals*. Vol 41(4): 217-223. doi: 10.1016/j.biologicals.2013.04.002.
- Strand, C., Enell, J., Hedenfalk, I., & Fernö, M. 2007. RNA quality in frozen breast cancer samples and the influence on gene expression analysis--a comparison of three evaluation methods using microcapillary electrophoresis traces. *BMC Mol. Biol.* Vol 8(1): 38. doi: 10.1186/1471-2199-8-38.
- Thompson, K. L., Pine, P.S., Rosenzweig, B., Turpaz, Y., & Retief, J. 2007. Characterization of the effect of sample quality on high density oligonucleotide microarray data using progressively degraded rat liver RNA. *BMC Biotechnol.* Vol 7: 57. doi: 10.1186/1472-6750-7-57.
- Vargas, L. & Sancho, V.H. 1990. Rabia Parálitica Bovina en el Valle de la Estrella: Descripción y Análisis de un Brote. *Ciencias Veterinarias*. Vol 12(1): 29-35.
- Vigilato, M.A.N., Clavijo, A., Knobl, T., Silva, H.M.T., Cosivi, O., Schneider, M.C., Leanes, L.F., Belotto, A.J. & Espinal, M.A. 2013. Progress Towards Eliminating Canine Rabies: Policies and Perspectives from Latin America and the Caribbean. *Philos. T. Roy. Soc. B*. 368 (1623): 20120143. doi: 10.1098/rstb.2012.0143.
- Wertheim H.F.L., Nguyen, T.Q., Nguyen, K.A.T., de Jong, M.D., Taylor, W.R.J., Le, T.V., Nguyen, H.H., Nguyen, H.T.H, Farrar, J, Horby, P. & Nguyen, H.D. 2009. Furious Rabies After an Atypical Exposure. *PLoS Med.* Vol 6(3): e1000044. doi:10.1371/journal.pmed.1000044.
- WHO. 2007. Rabies and Envenomings: A Neglected Public Health Issue. Geneva.
- WHO. 2016. 10 facts on rabies. *Weekly Epidemiological Record*. Vol 91(43): 515-516.

- Wunner, W. H & Conzelmann, K. 2013. Rabies virus. In: Jackson A. C. (Ed.). RABIES 3ra ed. Academic Press, London. p. 17-60.
- Yamaoka, S., Okada, K., Ito, N., Okadera, K., Mitake, H., Nakagawa, K. & Sugiyama, M. 2017. Defect of Rabies Virus Phosphoprotein in its Interferon-Antagonist Activity Negatively Affects Viral Replication in Muscle Cells. *J. Vet. Med. Sci.* Vol 79(8): 1394-1397. doi: 10.1292/jvms.17-0054.
- Zhou, H., Zhu, W., Zeng, J, He, J., Liu, K., Li, Y., Zhou, S., Mu, D., Zhang, K., Yu, P., Li, Z., Zhang, M., Chen, X., Guo, C. & Yu, H. 2016. Probable Rabies Virus Transmission through Organ Transplantation, China, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* Vol 22(8): 1348-1352. doi: 10.3201/eid2208.151993.