

Proudly a CDC and NIH-DRM compliant BSL-3 facility commissioned by Merrick Mexico since August 2023.
Un instalación BSL-3 orgullosamente CDC y NIH-DRM certificada por Merrick México desde agosto 2023.



Perspectivas para el diagnóstico de rabia

3ras Jornadas de RABIA-UAQ
Sept 29, 2023



Dr. Christian A. García-Sepúlveda

Laboratorio de Genómica Viral y Humana BSL-3
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Acceso universal y enajenación pública del conocimiento

Presentación disponible en nuestro sitio web.

Licencia Creative Commons Attribution 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

Libertad de compartir, copiar, adaptar, remezclar, transformar, desarrollar y redistribuir el material en cualquier medio o formato, incluso comercialmente, siempre y cuando se cite la fuente como *“Laboratorio de Genómica Viral y Humana, Facultad de Medicina UASLP”*.



www.genomica.uaslp.mx

Rabia: La enfermedad

La rabia es una encefalitis viral zoonótica prevenible por vacunación.

Prácticamente 100% mortalidad tras aparición de síntomas.

Presente en más de 150 países.

95% de los casos en Asia y África, el 40% son niños < 15 años.

Los perros son la principal causa de rabia humana (99% de las transmisiones de rabia a humanos).

A nivel mundial, la rabia tiene un costo estimado de 8.600 millones USD anuales.

La rabia es una enfermedad tropical desatendida (NTD) que afecta predominantemente a poblaciones marginadas, pobres y vulnerables.



Filogenética y taxonomía

Familia *Rhabdoviridae*, subfamilia *Alpharhabdovirinae*.

2 géneros: *Vesiculovirus* (virus de la estomatitis vesicular) y *Lyssavirus* (rabia).

Además del *Lyssavirus* de la rabia (RABLV), el Comité Internacional en Taxonomía Viral (ICTV) reconoce a otras 16 especies de *Lyssavirus*.

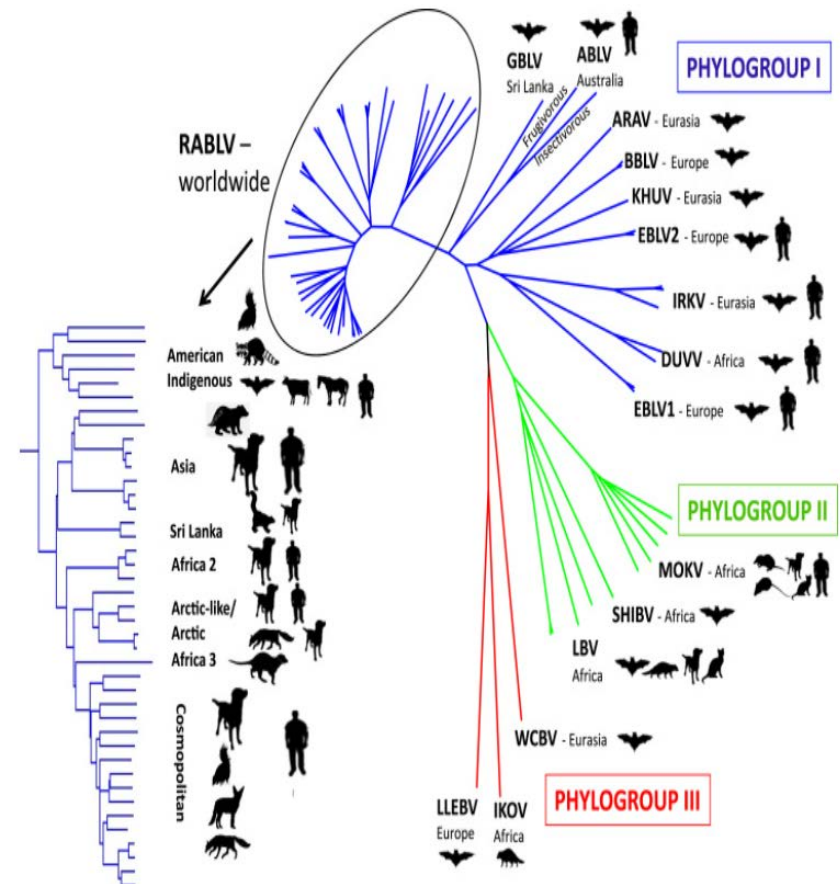
Pendiente Kotalahti (KBLV) y Matlo (MBLV).

Lyssavirus se divide en 5 St, 7 Gt (gen de la proteína N o G) y 3 filogrupos.

Filogrupo I: RABLV, European BLV1 y BLV2, Duvehage y Australian BLV.

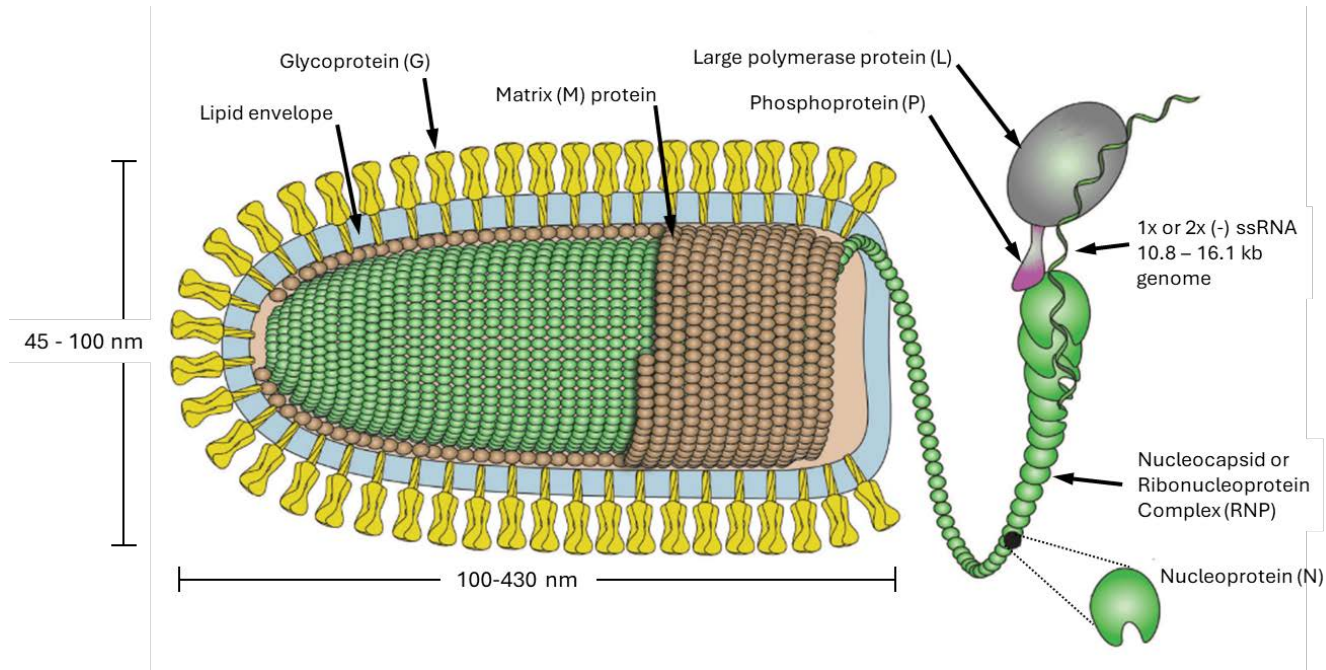
Filogrupo II: Mokola, Shimoni BLV y Lagos BLV..

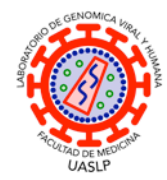
Filogrupo III: West Causasian BLV, Ikoma y Lleida BLV.



Virología

Rhabdovirus son un gran grupo de virus envueltos (o no) de RNA con forma de bala, que pueden infectar a mamíferos, reptiles, peces, artrópodos y plantas.





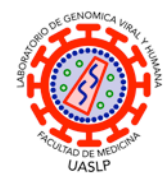
Rabia: Importancia del diagnóstico virológico

Las herramientas de diagnóstico actuales no adecuadas para detectar la infección por rabia antes de manifestaciones clínicas.

Presunción clínica difícil a menos de que exista hidrofobia, aerofobia o antecedentes de agresión animal.

La rabia humana se puede confirmar intravital y post mortem a través de técnicas diagnósticas que detectan:

- virus completos,
- antígenos virales
- ácidos nucleicos en tejidos infectados (cerebro, piel o saliva).

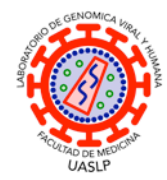


Rabia: Importancia del diagnóstico virológico

Sólo se puede hacer un diagnóstico fiable de la rabia basándose en exámenes de laboratorio de muestras recogidas de animales sospechosos.

Sin datos de pruebas diagnósticas no es posible establecer políticas de control de la rabia.

Estos datos también son necesarios para evaluar el impacto de las medidas de control sobre la enfermedad y adaptar las políticas de salud humana y veterinaria a la situación de la rabia.



Diagnóstico virológico

Diagnóstico de rabia en animales realizado en cerebro post-mortem.

Identificación de antígenos o ácidos nucleicos virales o anticuerpos contra el virus.

El estándar de oro sigue siendo (tristemente) el ensayo de detección de anticuerpos fluorescentes (FAT, DFA o IFD) o más recientemente empleando el ensayo inmunoquímico directo rápido (DRIT).

En la mayoría de los laboratorios, la IFD se utiliza como la prueba primaria más importante.

La prueba de infección por cultivo de tejidos de la rabia (RTCIT) o la prueba de inoculación en ratón (MIT) se utiliza como procedimiento confirmatorio.

Los ensayos de RT-PCR recientemente adoptados como técnica diagnóstica, complementando a ensayos IFD requeridos por legislación.

Inmunofluorescencia directa (IFD, FAT, dFAT o DFA)

Requiere de biopsia (intravital/post-mortem) de cerebro.

Anticuerpos marcados con fluorocromo para detección de antígenos virales.

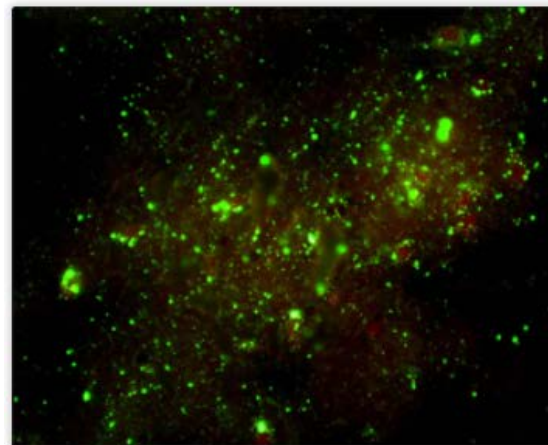
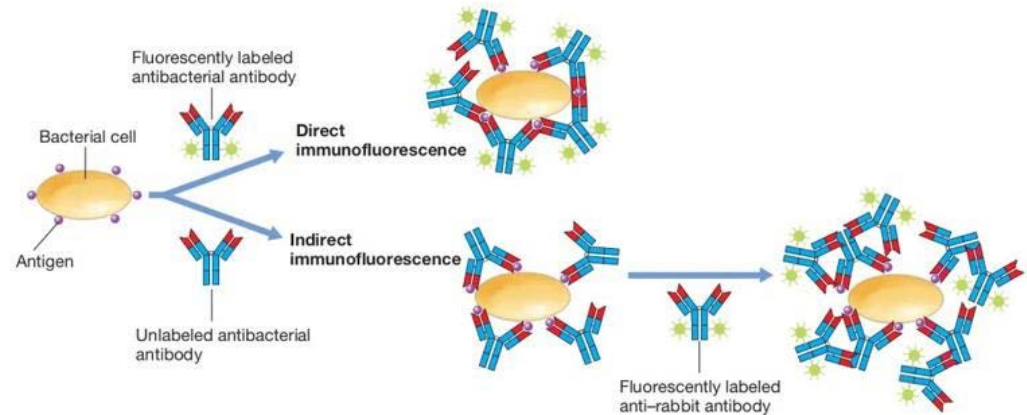
Generalmente dirigidos contra nucleoproteína viral.

Rápida.

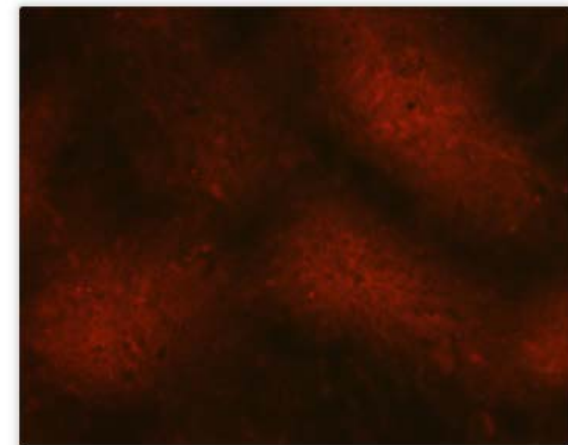
Alta especificidad.

Baja sensibilidad.

Estándar de oro.



Positive dFA



Negative dFA

RTCIT es mas sensible(92.5%) y la RT-PCR más específica (92.3%) que la IFD.

Direct, Rapid Immunohistochemical Test (DRIT)

Desarrollado en 2000 en los CDCs.

Versión simplificada del ensayo diagnóstico inmunohistoquímico de complejos avidina-biotina.

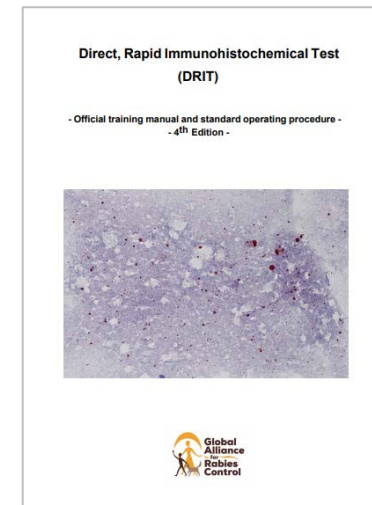
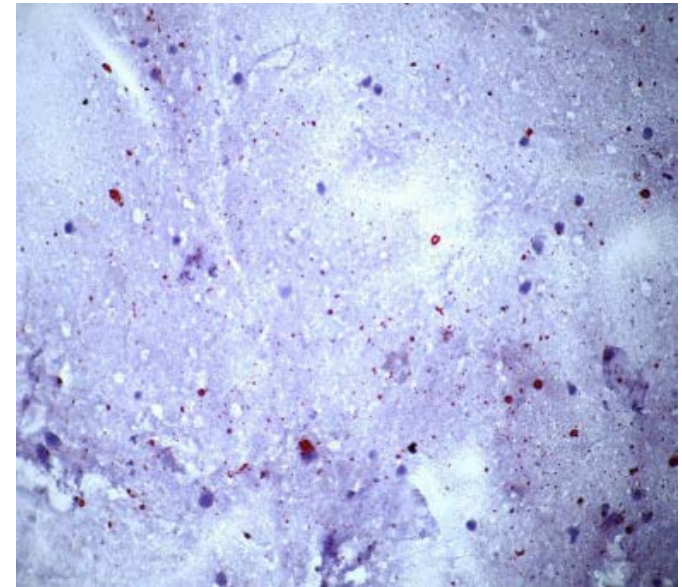
Rápido (1 hora), barato y fácil de interpretar (vs IFD).

Utiliza anticuerpos mono / policlonales acoplados a biotina.

Requiere de impresión (no corte) de cerebro en laminilla (al igual que IFD).

La estreptavidina acoplada a una enzima cataliza formación de precipitado de color rojo antígeno viral en la presencia de H_2O_2 y un cromógeno (AEC).

No requiere de microscopio de epifluorescencia.



Global Alliance for Rabies Control

Official training manual and standard operating procedure. Coetzer A, 2017. 4th Edition

Rabies Tissue Culture Infection Tests (RTCIT o VICC)

Propagación in vitro de aislado viral de muestra de cerebro animal en una línea celular de neuroblastoma (Neuro-2a, ATCC® CCL-131TM empleada en VICC o neuroblastoma murino (MNA) CCL-13 RTCIT).

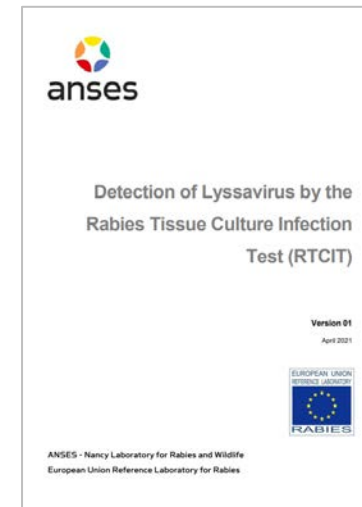
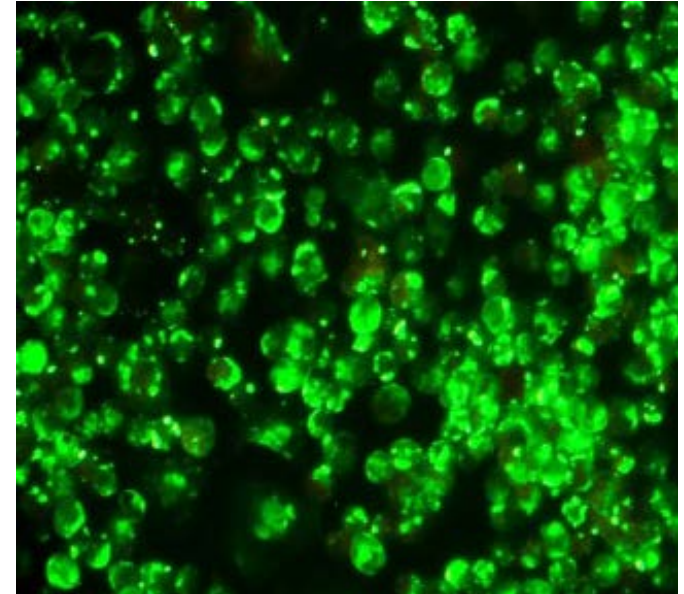
Breve incubación, alternativa ética a MIT, puede tardar hasta 12 días.

La infección in vitro de la línea celular neuroblástica produce inclusiones que pueden visualizarse con anticuerpo FITC conjugado.

Imagen semejante a IFD “verde manzana”.

Requiere de microscopio de epifluorescencia.

Sensibilidad de VICC es 100%, espec 99.7%, ppv de 98.9%, npv de 100% y precision de 98%. Tras 96 hrs.



Mouse Innoculation Test (MIT)

Inoculación intracerebral de cerebro sospechoso en 5 a 10 ratones lactantes (3-4 semanas).

Prueba confirmatoria realizada en InDRE Mexico.

Todos casos humanos y algunos animales.

Tarda 28 días, pero puede brindar resultados al 8vo día.

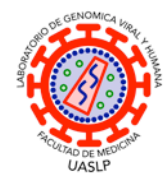
Cerebro, saliva, glándulas salivales, cuero cabelludo y LCR.

IFD en cerebro de ratones muertos (d5, 7, 9 y 11).

Ensayo caro, lento, baja tecnología y que produce mucho virus para investigaciones de cepas.

Menos controversia ética con RTCIT o VICC.





RT-PCR

Ensayos pan-lyssavirales para fines diagnósticos rutinarios para detectar a una amplia gama de especies Lyssavirales incluyendo las raras.

Al menos cinco paneles internacionales para la detección de todos los Lyssavirus conocidos.

Ensayos recomendados por la OMS y OMSA.

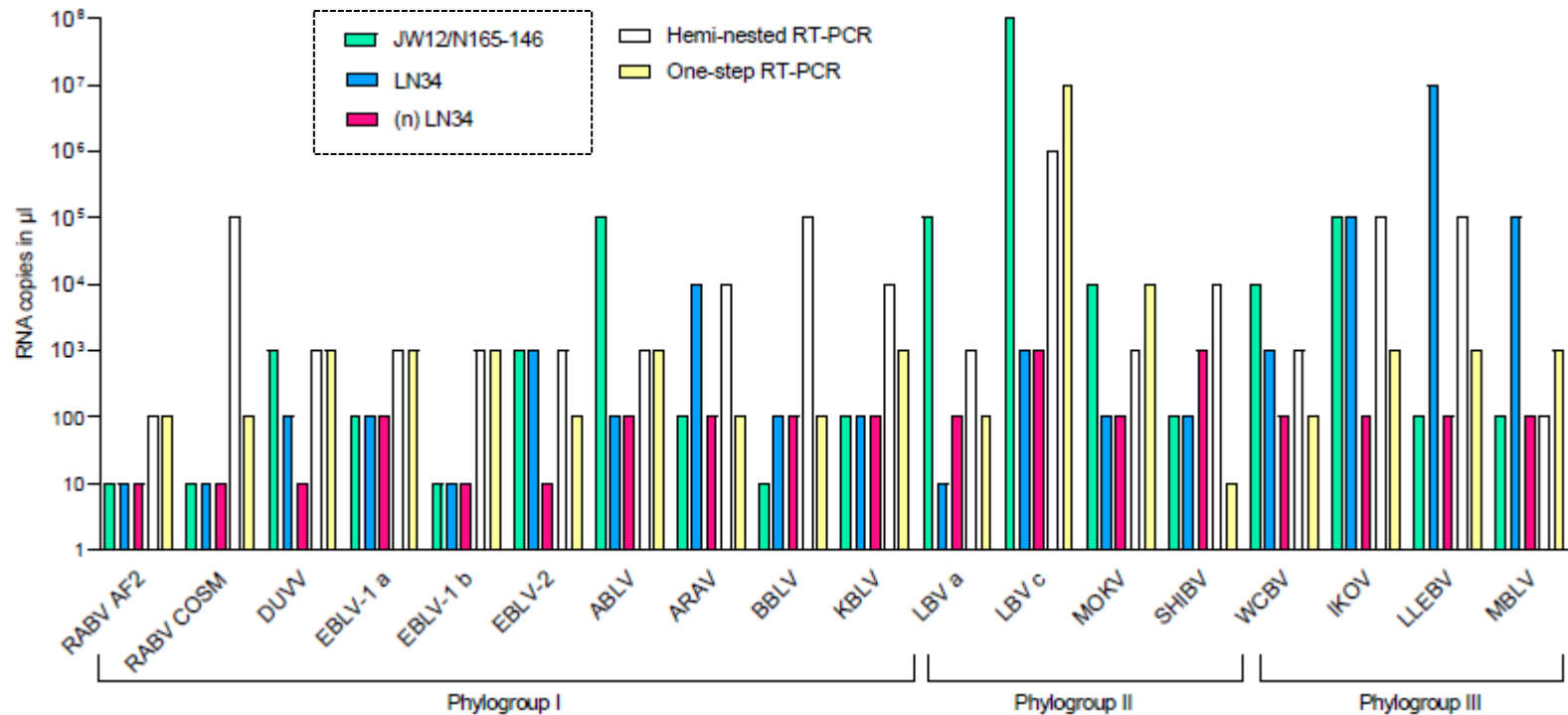
- Ensayo RT-PCR en tiempo real LN34
- Ensayo RT-PCR en tiempo real JW12/N165-146
- Ensayo RT-PCR semi-anidado Heaton et al.
- Ensayo RT-PCR de un solo paso.
- Ensayo mejorado LN34 para incrementar complementariedad de oligos.

Laboratory Techniques in Rabies—Volume 2, 5th ed.; World Health Organization: Rupprecht, CE, Geneva, Switzerland, 2018.

Heminested PCR Assay for Detection of Six Genotypes of Rabies and Rabies-Related Viruses. Heaton PR, J. Clin. Microbiol. 1997, 35, 2762–2766



Límite de detección (LoD) de los ensayos RT-PCR contra 18 especies Lyssavirales.



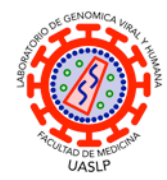
Los ensayos RT-PCR basados en sondas poseen mayor sensibilidad, reproducibilidad y especificidad y menos post-procesamiento y tiempo total.

Nuevo conjunto de primers capaces de amplificar a todas las especies Lyssavirales conocidas.

Incrementaron inclusividad de todas las especies pertenecientes a filogrupos I (de 83% a 100%) y del filogrupo III (de 0% a 100%), sin modificar la de filogrupo II (100%).

Name	S/As	Sequence (5' to 3')	Length (nt)	T _m (°C)
FW1	S	ACGCTTAACAACMARATCAAAGAA	24	56.6–59.2
FW2	S	ACGCTTAACAACAAAATCADARAAG	25	55.7–58.6
FW3	S	ACGCTTAACGACAAAAHCAGARAAG	25	59.1–62.0
FW4	S	ACGCTTAACAGCTAAAAACYAGAAG	25	57.9–60.3
FW5	S	ACGCTTAACARCAAAATCTTATAAG	25	54.7–56.5
REV1	As	Same as original (LN34 REV) [26]	25	51.5–62.2
REV2	As	CTGGATATTTGTAYTCATAYTGATC	25	52.0–54.9
REV3	As	CAGGATATTTATATTCATACTGGTC	25	52.9
Probe1	S	Same as original (LN34 probe) [26]	17	48.7–51.6
Probe2	S	Same as original (LN34lago probe) [26]	17	45.8

S: sense, As: antisense. Data were generated by primer3 in Geneious Prime® 2022.1.1 (Biomatters, Auckland, New Zealand).



Vigilancia epidemiológica de la rabia y otros Lyssavirus

Un sistema de vigilancia epidemiológica robusto basado en estrategias diagnósticas precisas y comprensivas contribuye a definir el riesgo, la frecuencia y el impacto de infecciones por Lyssavirus en regiones endémicas.

Permite monitorear el progreso de los programas de control.

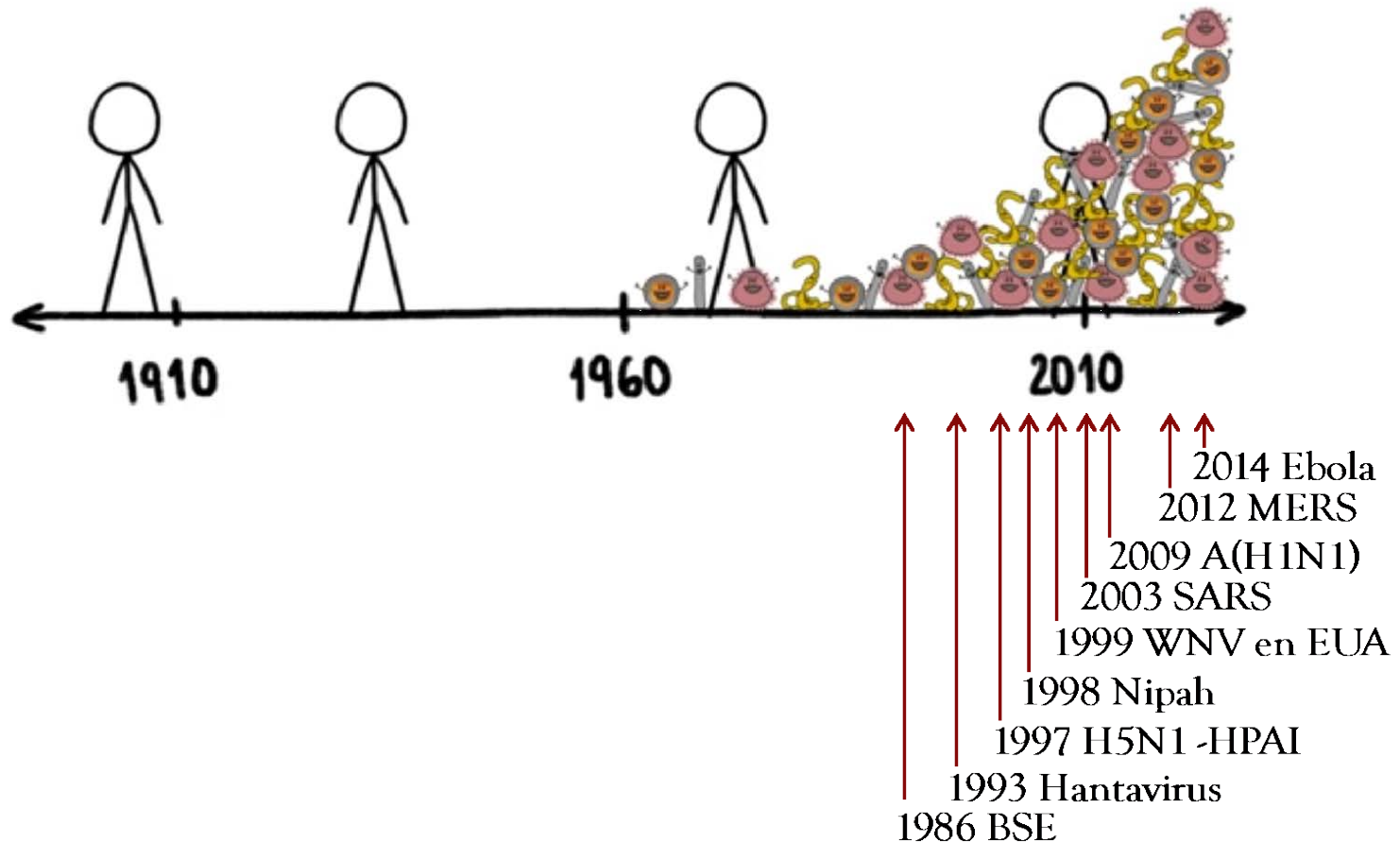
Permite la detección oportuna de casos importados en zonas libre-de-rabia.

Permite evaluar la carga de Lyssavirus presentes en animales silvestres de la región.

RABV y otros lyssavirus son patógenos multi-hospedero con ciclos de transmisión establecidos en varias especies de mamíferos, con distintos nichos ecológicos y geográficos.

Enfermedades Infecciosas Emergentes (EIDs)

Aquellas cuya incidencia se ha incrementado en los últimos 20 años y cuya incidencia no se piensa disminuirá en el futuro.



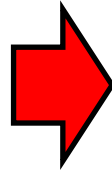
Dinámica de transmisión

PULL - La destrucción de hábitats obliga a reservorios a buscar alimentos y hospedaje en asentamientos humanos.

Hendravirus (HeV) en Australia, 1994.

Primer zoonosis asociada a murciélagos en documentarse.

Ocasiona distrés respiratorio y encefalitis.

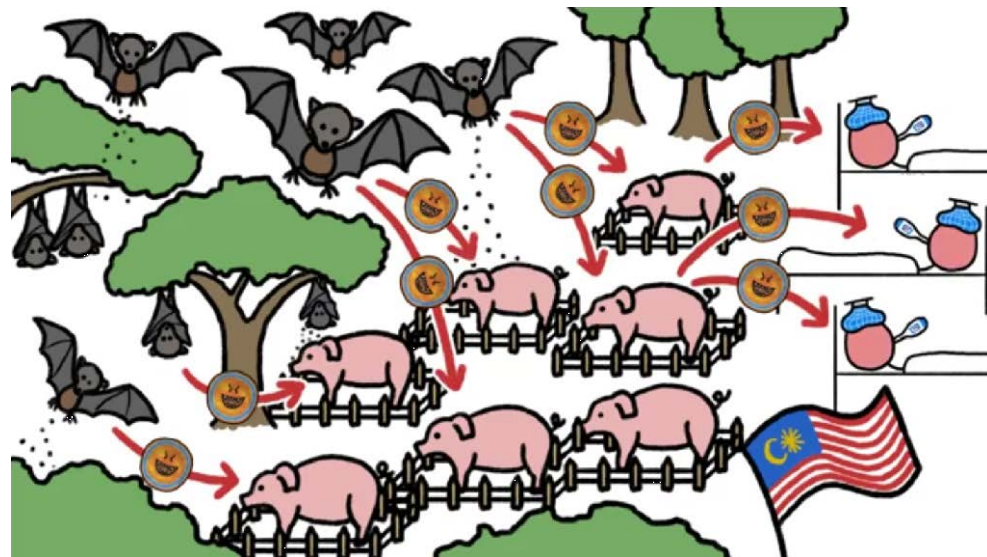


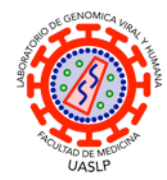
PUSH - La explotación de recursos naturales lleva a humanos a invadir hábitats.

Nipahvirus (NiV) en Malasia, 1999.

Segunda zoonosis asociada a murciélagos.

Ocasiona distres respiratorio y encefalitis.





Vigilancia epidemiológica de Lyssavirus silvestres

Los Lyssavirus (fuera de RABV) han co-evolucionado con un hospedero específico (una o dos especies de murciélagos por especie viral).

Distribución geográfica de los Lyssavirus depende de la de su hospedero.

Eventos de “spill-over” hacia mamíferos no-voladores son raros, no existen reportes de transmisión o establecimiento de infecciones en mamíferos terrestres.

A pesar del bajo riesgo de eventos “spill-over”, no deben ser considerados de nulo riesgo para la salud humana y animal.

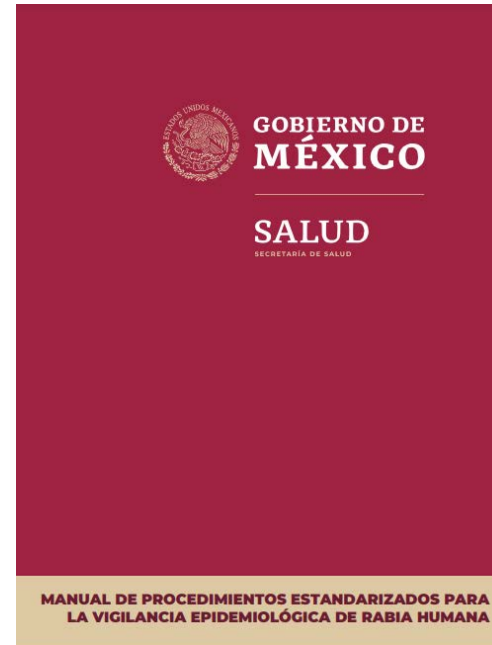
Es indispensable minimizar la posibilidad de que los eventos “spill-over” que involucren a otros Lyssavirus se propaguen, causando brotes, epidemias y posibles pandemias.

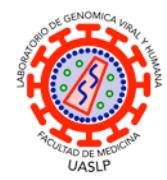
Es necesario contar con ensayos rápidos y comprensivos (que abarquen a todos los Lyssavirus) para monitorear la distribución y frecuencia de Lyssavirus en reservorios animales al igual que para detectar eventos de “spill-over”.

Referencias internacionales

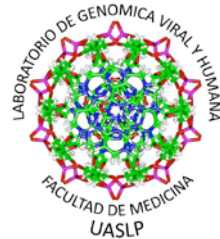


Referencias nacionales





Red de Vigilancia de Patógenos Virales Emergentes (RVPVE)



Christian García-Sepúlveda — Laboratorio de Genómica Viral & Humana, Medicina UASLP
Daniel Noyola y Andreu Comas Garcia — Laboratorio de Virología, Medicina UASLP
Juan Carlos Cuevas Tello — Grupo de Bioinformática, Ingeniería UASLP
Ignacio Amezcua Osorio — Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria de San Luis Potosí.
Rafael Arguello Astorga — Instituto de Ciencia, Torreón, Coahuila. México

Samuel Mora Andrade — Patógenos Virales Emergentes en Murciélagos. SLP, México
Sandra Guerra-Palomares — Genómica de la región *vif-vpr* de HIV. SLP, México
Pedro Hernández-Sánchez — Genómica de la región *pol* de HIV. SLP, México
Diana Alvarado-Hernández — Inmunogenética de CMV. SLP, México
Daniel Hernández-Ramírez — Inmunogenética de HIV/SIDA. SLP, México
Hugo I. Contreras-Treviño — Influenzavirus pre-pandémicos. SLP, México
Ernestina Godoy-Lozano — Influenzavirus A(H1N1) 2009. SLP, México
Bunga Diela — Genómica de HBV, Universitas Padjadjaran, School of Medicine. Bandung, Indonesia.
Laura Arguello-Sánchez — Genómica de HLA primates, INECOL, Veracruz, México

www.genomica.uaslp.mx



GenomicaUASLP.



GenomicaUASLP



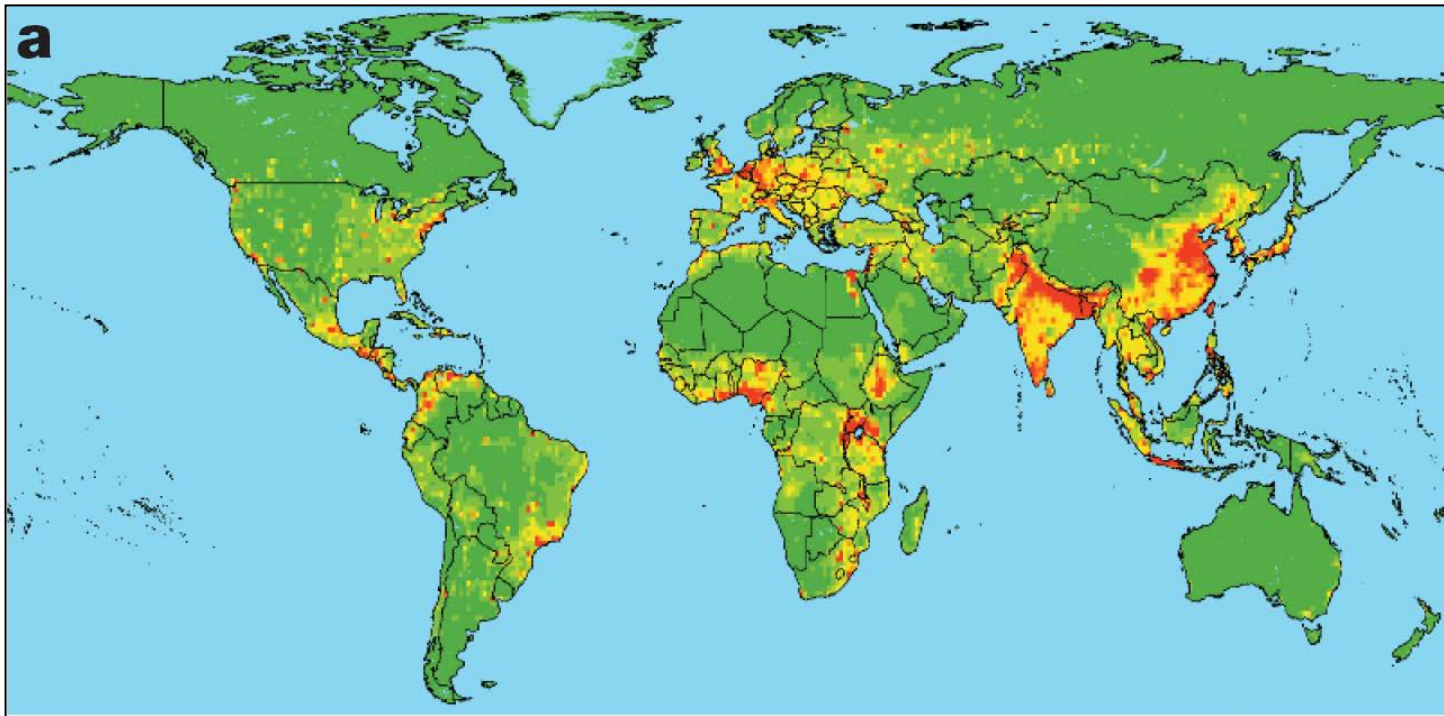
Distributed through a Creative Commons Attribution (BY) license granting the licensee the right to copy, distribute, display and make derivative works based on this document, including commercial use, as long as they credit the author as "Laboratorio de Genómica Viral y Humana, Facultad de Medicina UASLP".

Red de Vigilancia de Patógenos Virales Emergentes (RVPVE)

Fuera de la rabia, no sabemos mucho acerca de EIDs en murciélagos Mexicanos.

Fuera de brotes, es raro encontrar casos humanos de EIDs

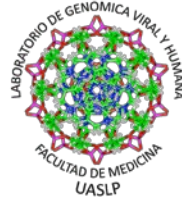
RVPVE busca establecer un análisis del riesgo sanitario que representan EIDs en murciélagos.



Hot Spots: global distribution of relative risk of an EID event caused by zoonotic pathogens from wildlife, (Jones Nature, 2008).

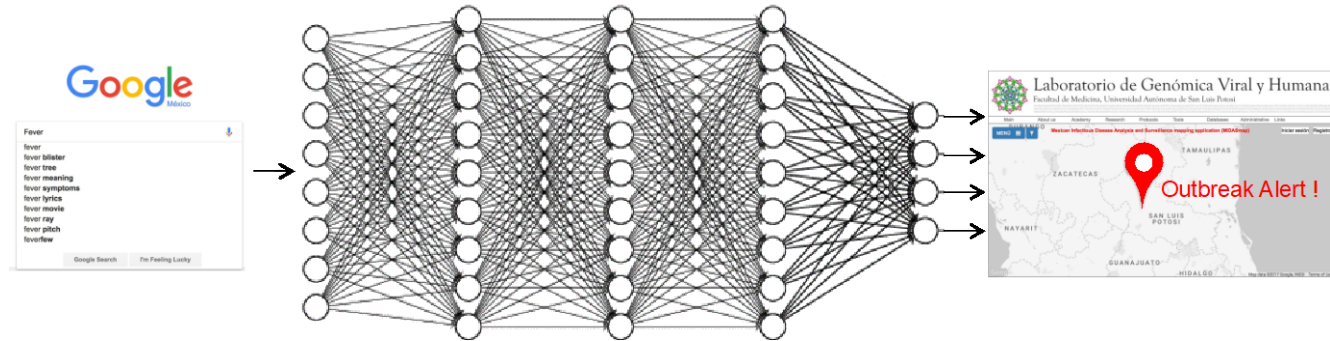
Red de Vigilancia de Patógenos Virales Emergentes (RVPVE)

Cinco instituciones de competencias complementarias.



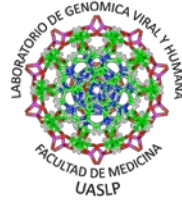
Centro de Investigación
Aplicada en Ambiente y Salud
CIAAS-CIACYT UASLP

- Laboratorio de Contención Biológica (BSL3) y técnicas moleculares.
- MIDASmap, Algoritmos de inteligencia artificial y PEDROapp.
- Captura, referencia y taxonomía de murciélagos y roedores.
- Caracterización genómica de aislados virales comercialización de patentes.
- Comunidad Rural Centinela.



Red de Vigilancia de Patógenos Virales Emergentes (RVPVE)

Cinco instituciones de competencias complementarias.



Centro de Investigación
Aplicada en Ambiente y Salud
CIAAS-CIACYT UASLP

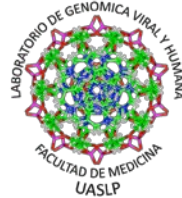
- Laboratorio de Contención Biológica (BSL3) y técnicas moleculares.
- MIDASmap, Algoritmos de inteligencia artificial y PEDROapp.
- Captura, referencia y taxonomía de murciélagos y roedores.
- Caracterización genómica de aislados virales comercialización de patentes.
- Comunidad Rural Centinela.



[ets/detail/rabies](#)

Red de Vigilancia de Patógenos Virales Emergentes (RVPVE)

Cinco instituciones de competencias complementarias.



Centro de Investigación
Aplicada en Ambiente y Salud
CIAAS-CIACYT UASLP

- Laboratorio de Contención Biológica (BSL3) y técnicas moleculares.
- MIDASmap, Algoritmos de inteligencia artificial y PEDROapp.
- Captura, referencia y taxonomía de murciélagos y roedores.
- Caracterización genómica de aislados virales comercialización de patentes.
- Comunidad Rural Centinela.

Información georeferenciada del sitio de muestreo, meteorológica y fase lunar.

Información taxonómica, sexado, estado de salud, edad reproductiva del murciélago.

Características morfométricas, muestreo y cosecha de órganos y documentación fotográfica.

FORMATO DE CAPTURA
Colección Mexicana de Murciélagos y Patógenos Exóticos
Laboratorio de Genómica Viral y Humana,
Facultad de Medicina, UASLP (Versión 2 Español; 20 Ene, 2016)

A001
ID ESPECIMEN:

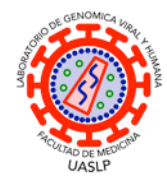
Sitio:
Fecha: dd / mm / aa Hora: hh / mm
Localidad: Municipio: Estado:
Lat: Long: Alt: Fase lunar:
Temp (°C): Viento (m/s): Baro (mmHg): Animales domésticos presentes:
Sitio de captura: ☐ Silvestre ☐ Rural ☐ Suburbano ☐ Urbano

Especimen:
Nombre común: Género y especie:
Sexo: ☐ ♂ ☐ ♀ Status reproductivo: ☐ Pre-juvenil ☐ Juvenil ☐ Adulto ☐ Embarazo
Estado de salud: ☐ Sano ☐ Lesionado ☐ Ectoparásitos ☐ Muerto
Alimentación: ☐ Hematófago ☐ Insectívoro ☐ Frugívoro ☐ Carnívoro ☐ Polin/Nectarívoro
Motivo de captura: ☐ Captura/liberación ☐ Necropsia ☐ Carcasa museo ☐ Marcaje/anillado
Modalidad de captura: ☐ Red niebla ☐ Trampa harpa ☐ Red manual ☐ Recolección del suelo

Morfometría:
Peso (grs):
Envergadura (cm):
Longitud cefalo-caudal (mm):
Longitud fronto-occipital (mm):
Longitud orejas (mm):
Longitud radial (mm):
Longitud pulgar (mm):
Longitud tibial (mm):
Longitud pie (mm):
Longitud cola (mm):

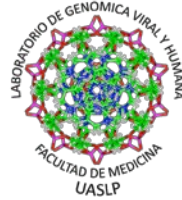
Muestras:
Hisopo oral: ☐
Hisopo rectal: ☐
Suero: ☐
Corazón: ☐
Pulmón Der: ☐
Pulmón Izq: ☐
Hígado: ☐
Bazo: ☐
Riñones: ☐
Intestino: ☐
Cerebro: ☐

Fotografías:
Antero-posterior: ☐
Postero-anterior: ☐
Detalle facial: ☐
Dientes: ☐
Orejas: ☐
Ala derecha: ☐
Ala izquierda: ☐
Memb. intermembral: ☐
Cola: ☐
Genitales: ☐
Tálón: ☐
Otro: ☐



Red de Vigilancia de Patógenos Virales Emergentes (RVPVE)

Cinco instituciones de competencias complementarias.

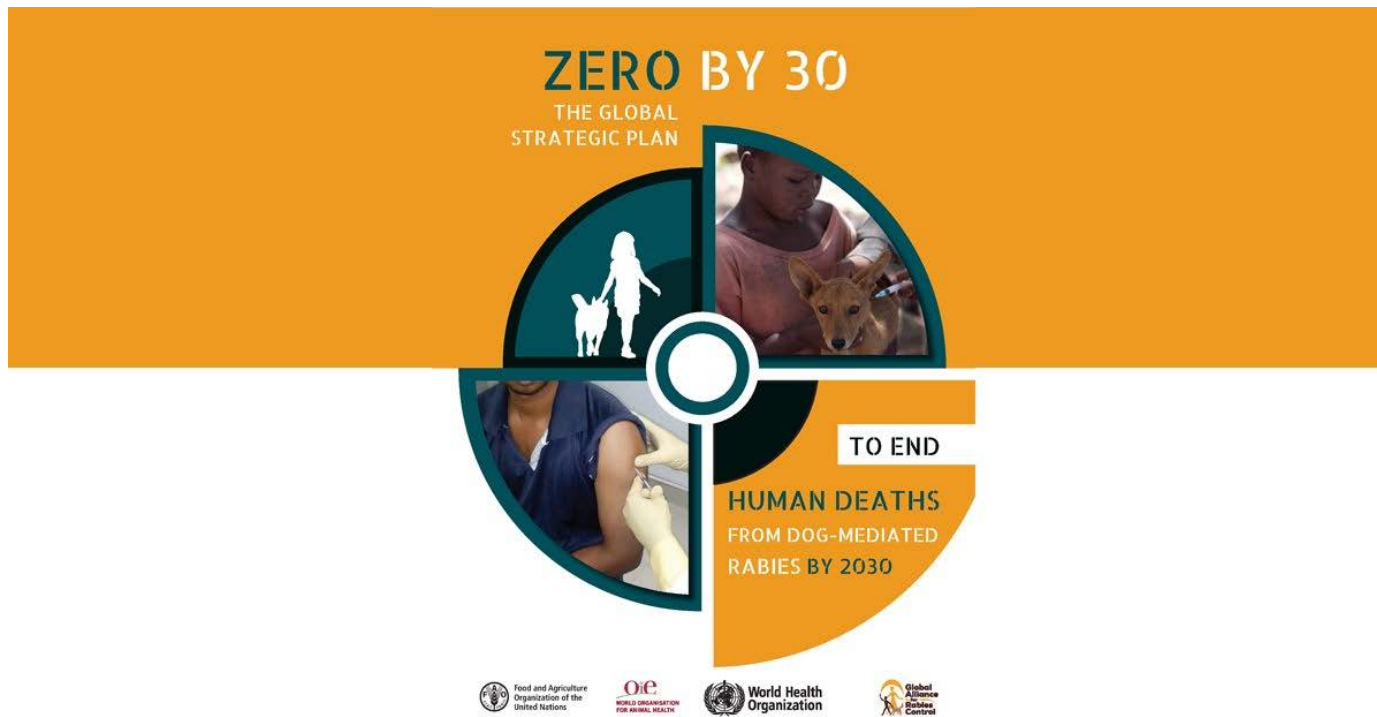


- **Laboratorio de Contención Biológica (BSL3) y técnicas moleculares.**
- MIDASmap, Algoritmos de inteligencia artificial y PEDROapp.
- Captura, referencia y taxonomía de murciélagos y roedores.
- Caracterización genómica de aislados virales comercialización de patentes.
- Comunidad Rural Centinela.



Conclusión

El desarrollo e implementación de mejores estrategias de diagnóstico virológico y de vigilancia epidemiológica para la rabia (y otros Lyssavirus) es reconocida como una actividad prioritaria del programa **ZeroBy30** del Plan Estratégico Mundial para la erradicación de muertes humanas por rabia.



World Health Organization; Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Organisation for Animal Health; Global Alliance for Rabies Control. Zero by 30: The Global Strategic Plan to End Human Deaths from Dog-Mediated Rabies by 2030: United Against Rabies Collaboration: First Annual Progress Report: Global Strategic Plan to End Human Deaths from Dog-Mediated Rabies by 2030; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2019..

RVPVE

Red de Vigilancia de Patógenos Virales Emergentes



CEFPE - SLP



CIAAS - CIACYT



Christian García-Sepúlveda — Laboratorio de Genómica Viral & Humana, Medicina UASLP

Sandra Guerra-Palomares — Laboratorio de Genómica Viral & Humana, Medicina UASLP

Andreu Comas Garcia — Departamento de Microbiología, Medicina UASLP

Mauricio Comas Garcia — Laboratorio de Microscopía de Alta Resolución, CICSAB Ciencias UASLP

Guillermo Espinosa Reyes — Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud) (CIAAS), Medicina UASLP

Fernando Díaz-Barriga Martínez — Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud) (CIAAS), Medicina UASLP

Juan Carlos Cuevas Tello — Grupo de Bioinformática, Ingeniería UASLP

Ignacio Amezcua Osorio — Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria de San Luis Potosí.

Dulce Ma. Hernández Piña — Lab manager, LGVH UASLP

J. Manuel Mendoza Méndez — Hantavirus americanos, LGVH UASLP