

Diagnóstico de Rabia y caracterización de variantes virales.



Instituto de
Salud Pública
Ministerio de Salud

Gobierno de Chile

VERONICA YUNG PEREDO
SECCION RABIA
INSTITUTO DE SALUD PUBLICA DE CHILE



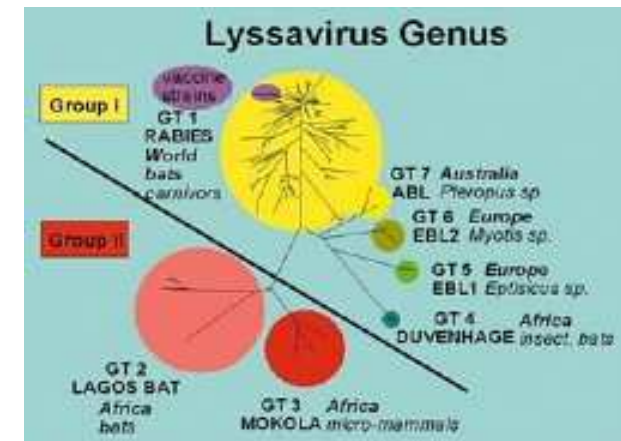
Clasificación

Orden Mononegavirales

□ Familia *Rhabdoviridae* Género: *Lyssavirus*

A las especies del género *Lyssavirus* inicialmente se las conocía como serotipos, actualmente como genotipos:

1. Virus de la rabia (RABV) (Rabia clásica) distribuido en Continente Americano
2. Murciélago de Lagos (LBV) 1956
3. Mokola (MOKV) 1968
4. Duvenhage de murciélago (DUVV) 1970
5. Lyssavirus tipo 1 de murciélagos europeos (EBLV-1) 1992
6. Lyssavirus tipo 2 de murciélagos europeos (EBLV-2) 1995
7. Lyssavirus de murciélagos australianos (ABLV) 1996



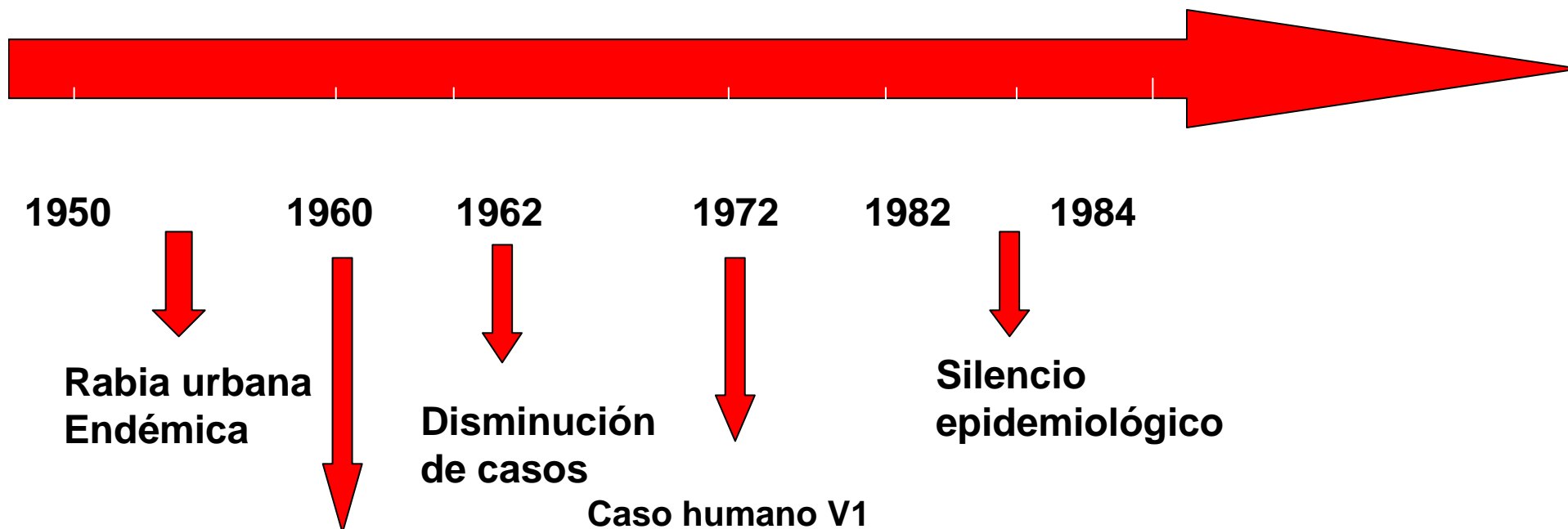
4 Nuevos genotipos del genero Lyssavirus descritos en Eurasia

8. Aravan 1991
9. Khujand Central 2001
10. Irkut 2002
11. Virus de murciélago occidental caucásico (WCBV) 2002

ICTV = International Committee on Taxonomy of Viruses (www.ictvonline.org/)



Rabia en Chile



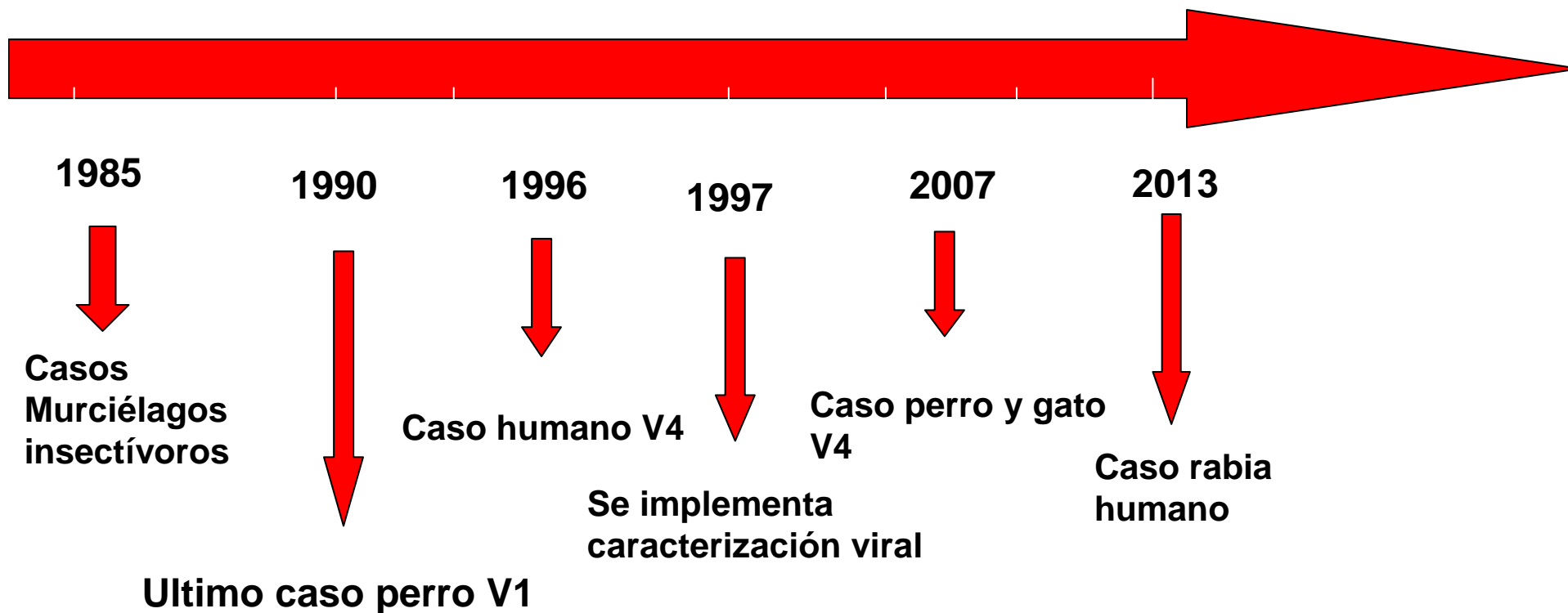
Instauración de un programa de control y prevención de la rabia en el país



- 1- Reducir la población canina**
- 2- Inmunizar masivamente a los perros**
- 3- Aumentar la cobertura del diagnóstico de rabia**



Rabia en Chile





Situación de la Rabia en Chile

En los últimos años la situación epidemiológica de la Rabia se presenta como una endemia en **murciélagos insectívoros** con un promedio de **80 a 100** casos positivos anuales, lo que implica que estos quirópteros son un riesgo real en la transmisión de la rabia para el hombre y los animales.



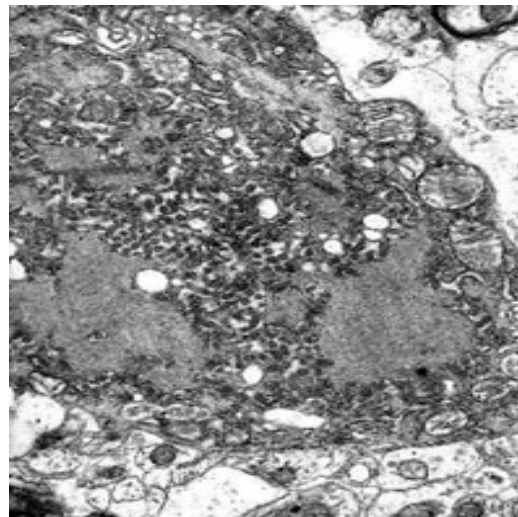
Diagnóstico de Rabia



Permite definir la conducta clínica a seguir con las personas expuestas.

Es una herramienta fundamental para la toma de decisiones en el programa control de focos y de prevención.

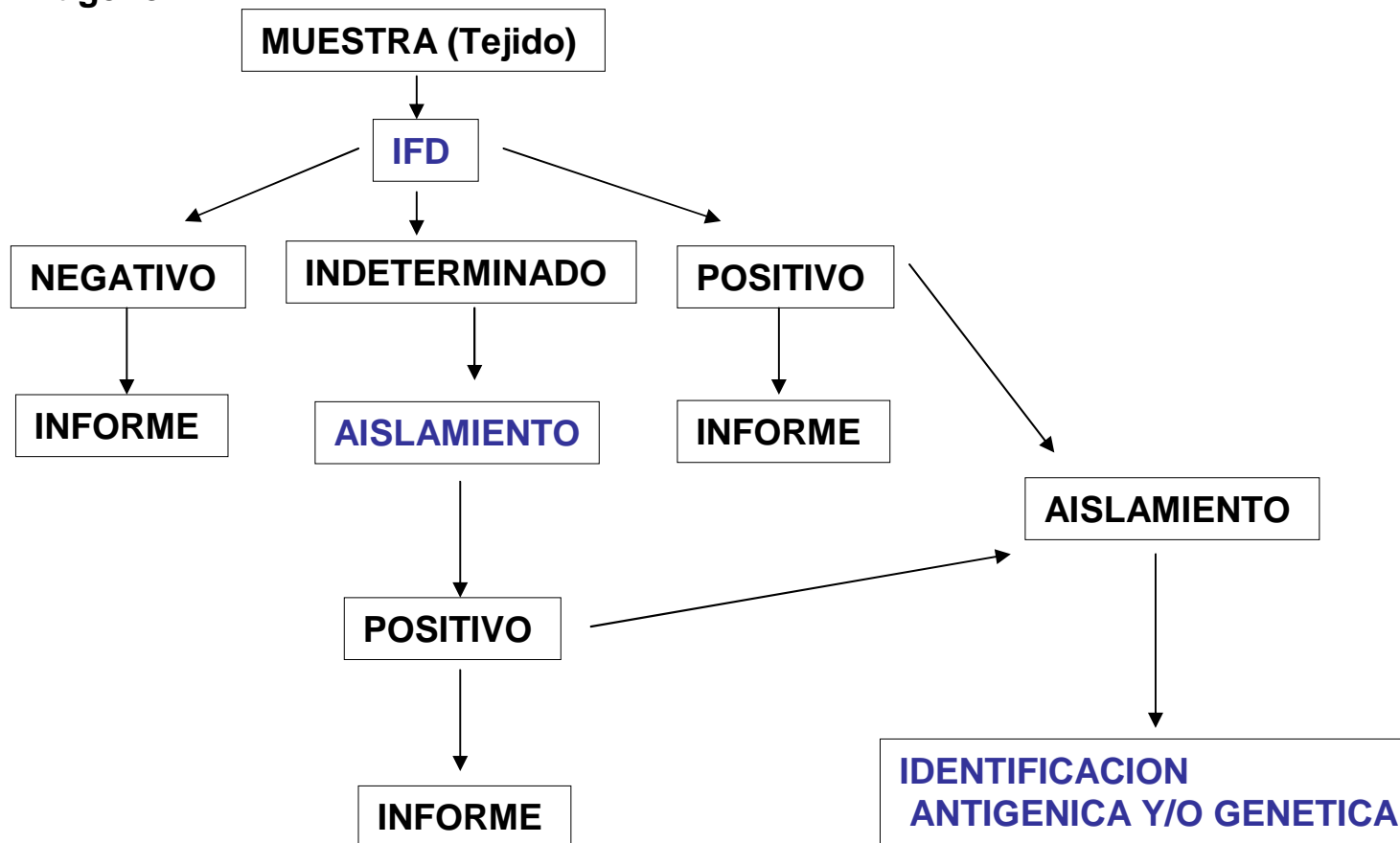
Aporta los antecedentes de la situación epidemiológica de la enfermedad.





ALGORITMO DIAGNOSTICO DE INFECCION POR VIRUS RABICO

1.- Detección de Antígeno

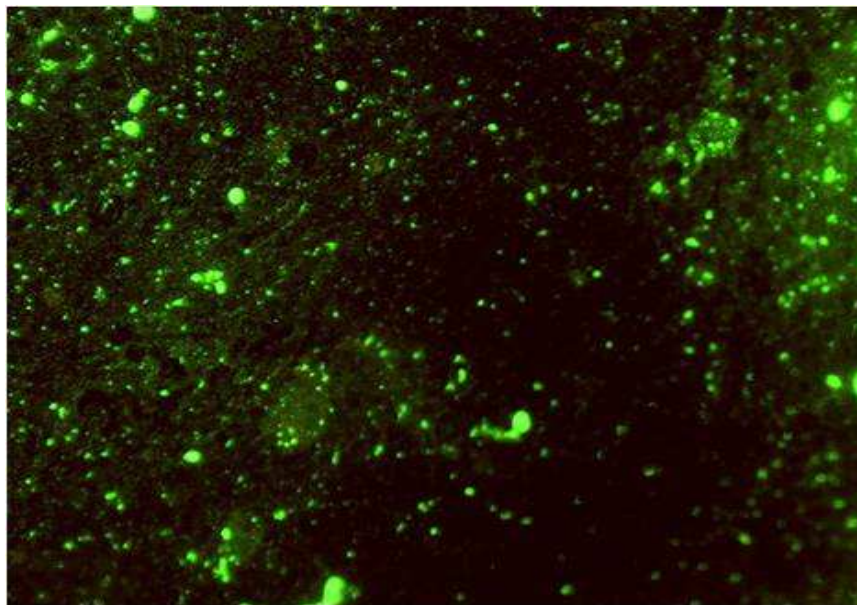




Detección de Antígeno viral.

Técnica de Inmunofluorescencia Directa (IFD) *Técnica rápida de alta sensibilidad y especificidad.*

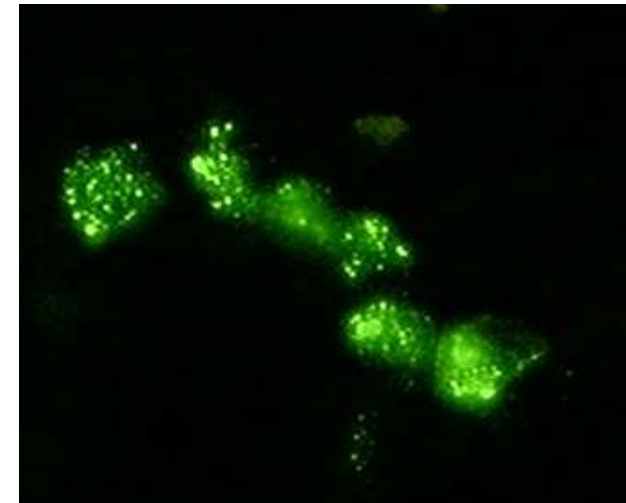
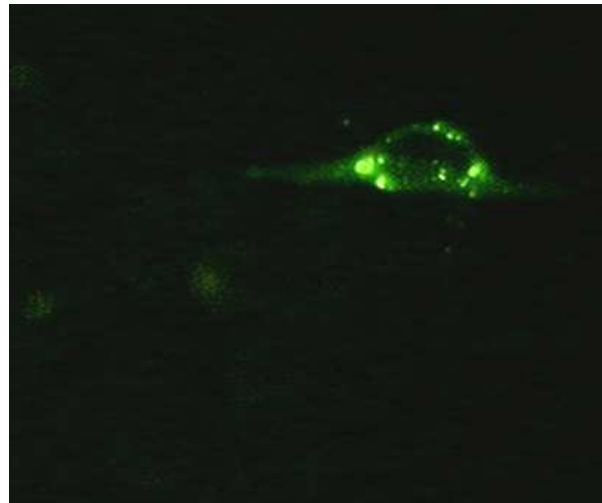
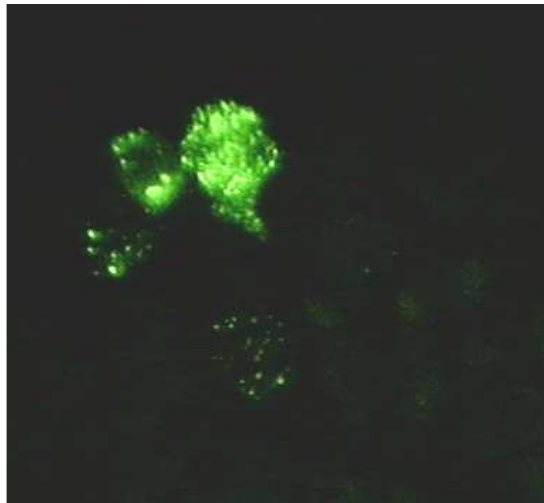
Aislamiento de virus rábico. *Se realiza en ratones lactantes. Permite realizar el aislamiento (21 días) y confirmación por IFD*





2.- Detección de Anticuerpos Antirrábicos

Inhibición de focos fluorescentes RIFFT. *Cuantificación de anticuerpos neutralizantes.*





Identificación de la variante viral

Tipificación Antigénica: Anticuerpos monoclonales

Tipificación Genética: Secuenciamiento genético

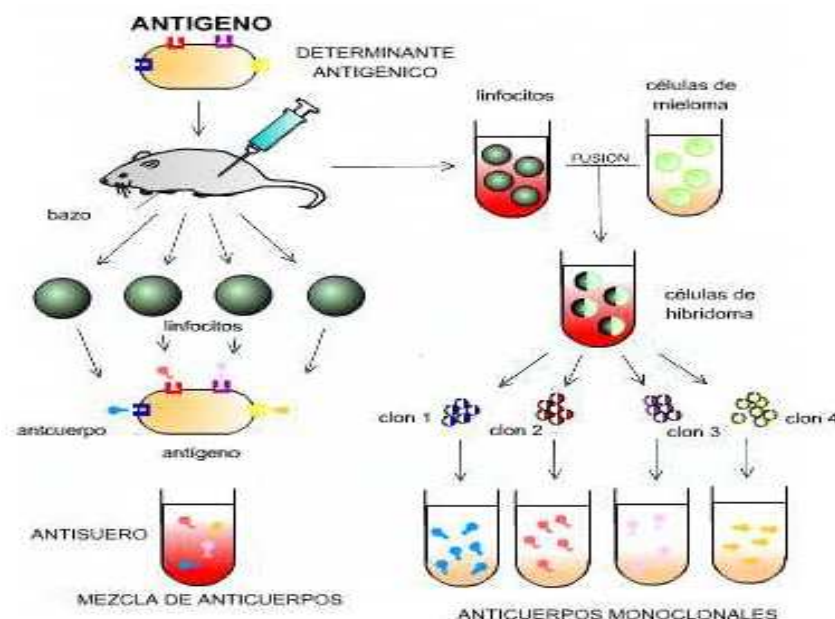




Tipificación Antigénica de virus rábico

Panel de 8 Anticuerpos monoclonales que reaccionan con epitopes específicos de la nucleoproteína.

Las **variantes antigénicas** definidas dentro del genotipo 1 han permitido determinar que existe una asociación específica de la variante con el reservorio natural del virus.



Panel de Identificación de Anticuerpos Monoclonales

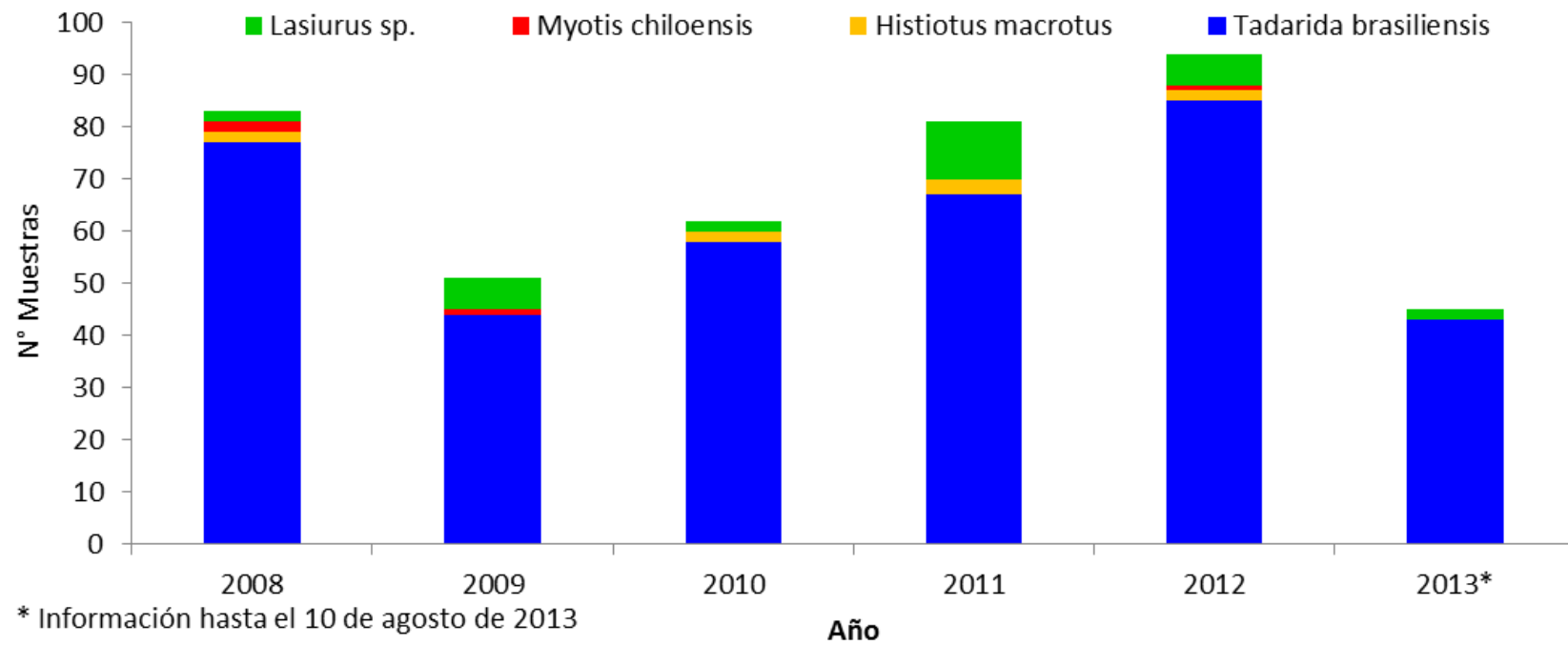


	C ₁	C ₄	C ₉	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₅	C ₁₈	C ₁₉	AgV
CVS/ERA	+	+	+	+	+	+	+	+	Lab.
Perro	+	+	+	+	+	+	-	+	V 1
Perro	+	+	-	+	+	+	-	+	V 2
Vampiro	-	+	+	+	+	-	-	+	V 3
T.brasiliensis	-	+	+	+	+	-	-	-	V 4
Vampiro	-	+	V	+	+	V	-	V	V 5
L. cinereus	v	+	+	+	+	-	-	-	V 6
Zorro	+	+	+	-	+	+	-	+	V 7
Zorrillo	-	+	+	+	+	+	+	+	V 8
T.bras. Mex.	+	+	+	+	+	-	-	-	V9





Figura 5: Muestras con resultado positivo para virus rabia según especie, por año.
Chile 2008 - 2013*



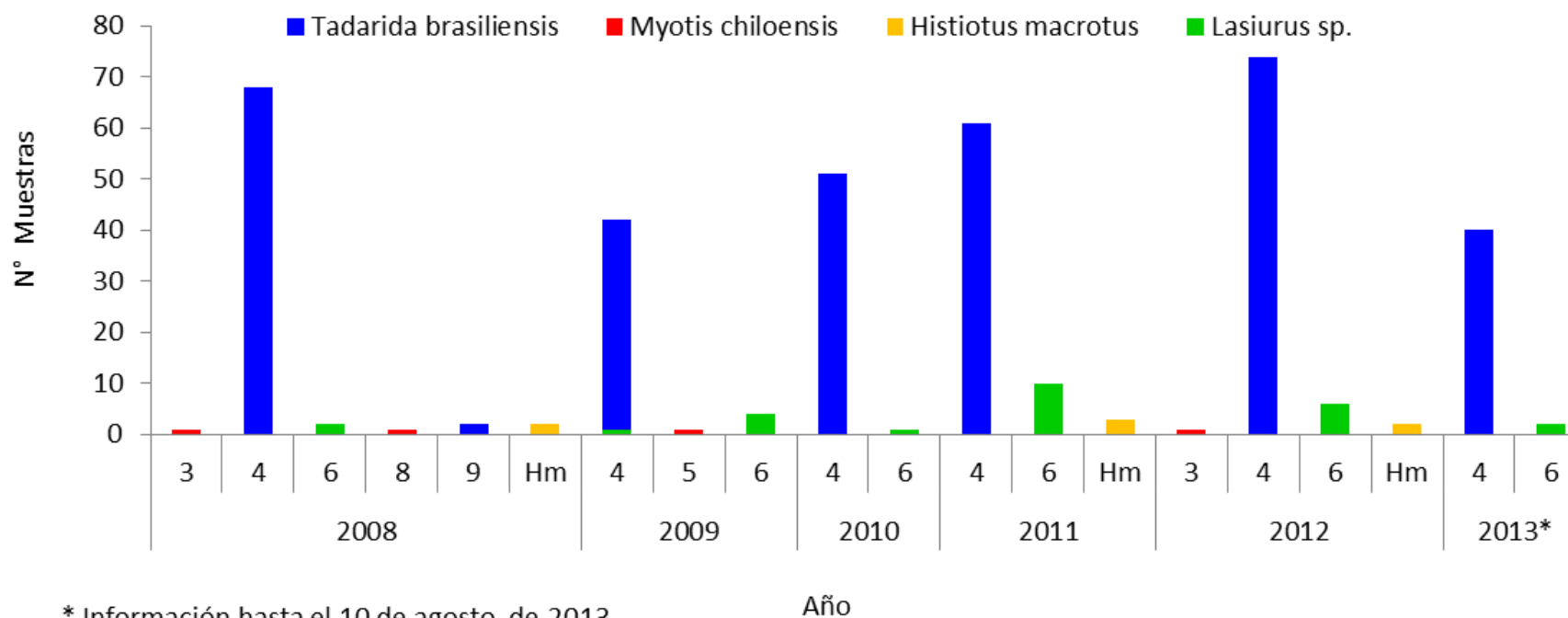
* Información hasta el 10 de agosto de 2013

Año
Sección Rabia
Instituto de Salud Pública de Chile





Figura 6: Tipificación antigénica de las muestras con resultado positivo para virus rabia, según especie y año. Chile 2008 - 2013*



* Información hasta el 10 de agosto de 2013

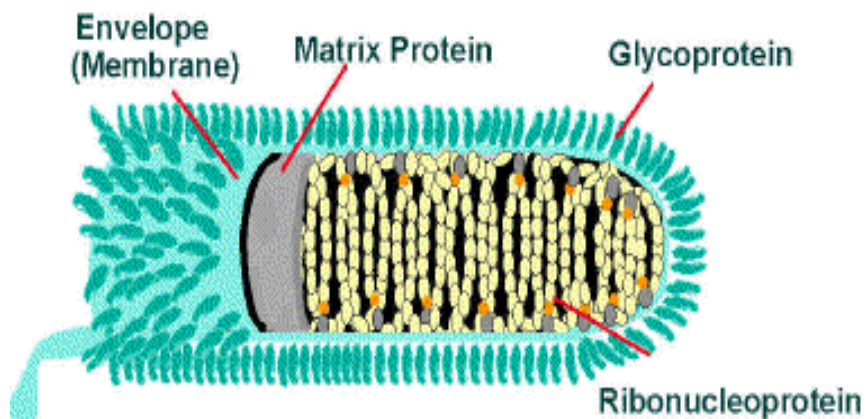
Sección Rabia





Tipificación Genética de virus rábico

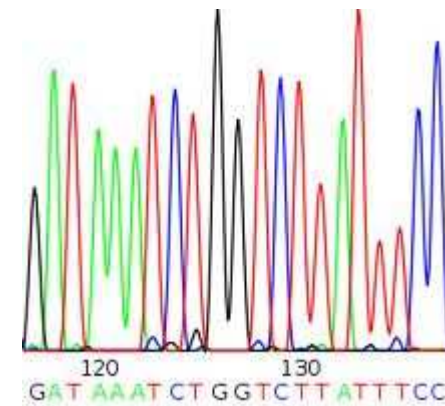
Secuenciamiento de gen de la nucleoproteína para determinar la variabilidad genética de los virus según reservorio.





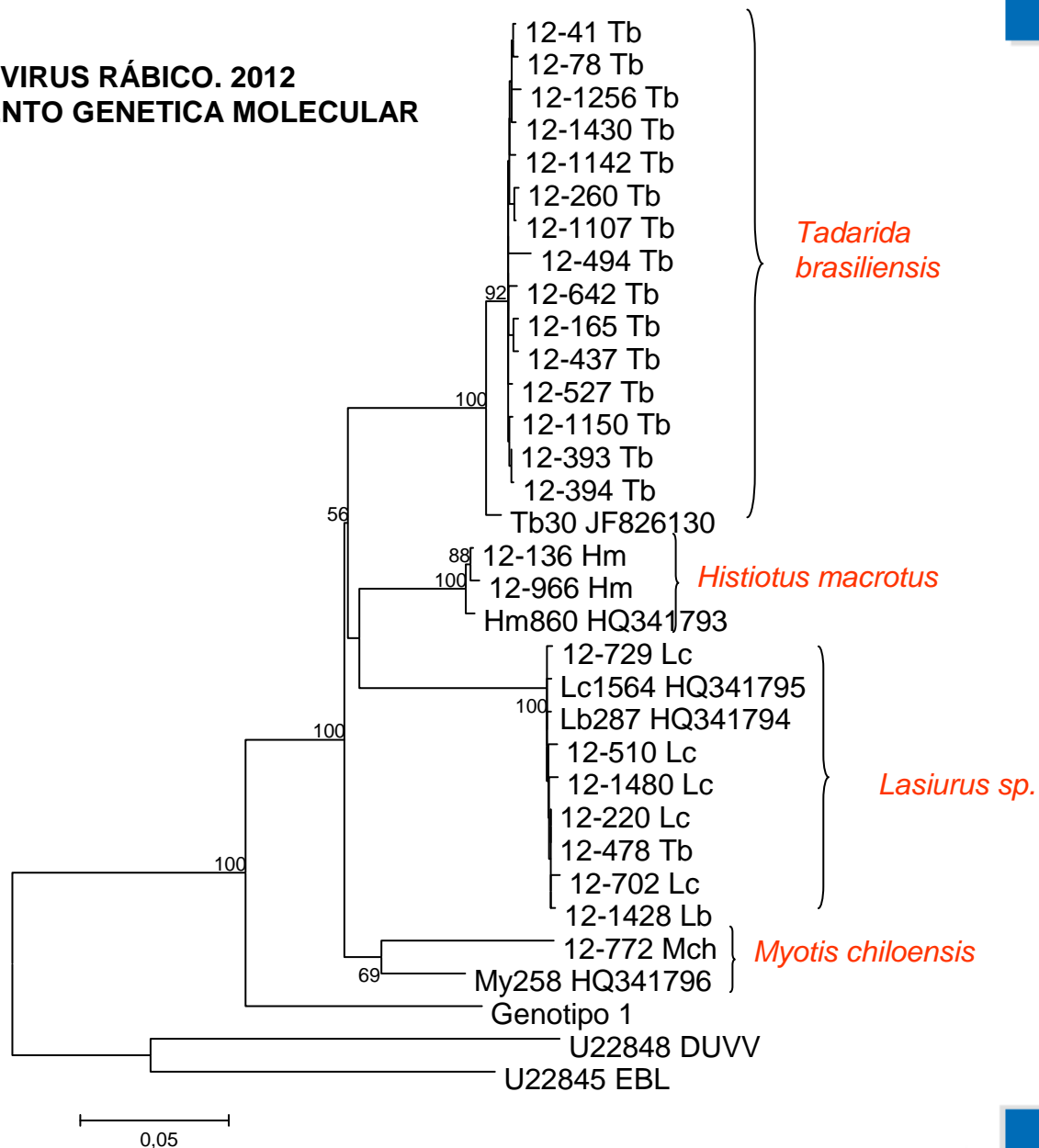
Caracterización Genética

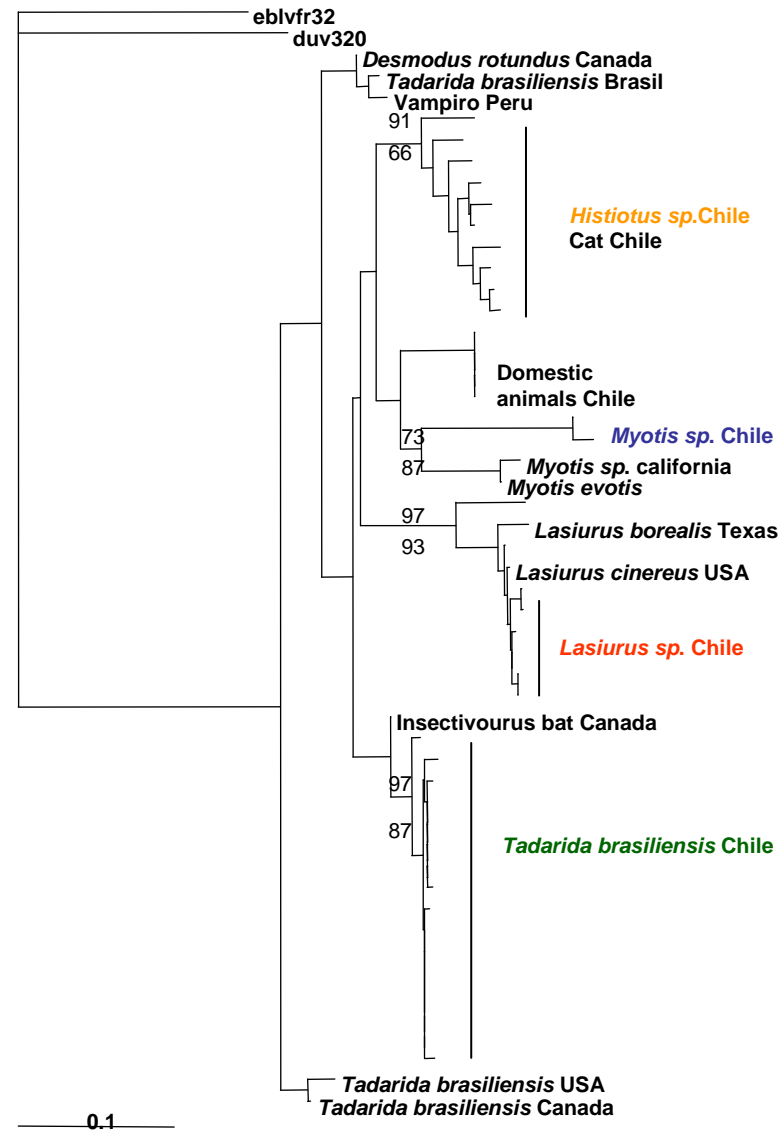
- Extracción de RNA de tejido infectado
- Transcripción reversa del RNA
- Amplificación del DNAc por Reacción de Polimerasa en Cadena
- Secuenciación de DNA por PCR (1500pb)
- Análisis de las secuencias por programas computacionales





TIPIFICACION GENETICA. VIRUS RÁBICO. 2012
SECCION RABIA. SUBDEPARTAMENTO GENETICA MOLECULAR





Genetic and antigenic typing of rabies virus in Chile. Yung V, Favi M, Fernández J. Arch Virol. 2002 Nov; 147(11):2197-205.



Análisis filogenéticos



En Chile permitió :

-Identificar 4 variantes genéticas involucradas en ciclos de circulación viral independientes.

-Confirmar la aparición de una nueva variante viral circulando en murciélagos *Histiotus* sp. con un nuevo patrón antigénico para el virus rábico.

-Revelan complejos patrones epidemiológicos caracterizados por la presencia de ciclos endémicos y diversos patrones de interacción interespecie.





Implementación de la **técnica Inhibición de Focos Fluorescentes (RIFFT)**.

- Desde el año 2005 la Sección Rabia del Instituto de Salud Pública participa en el test de proficiencia realizado por la Agencia Nacional de Seguridad Sanitaria (ANSES, Francia) cuenta con aprobación de este test, siendo el primer laboratorio de America Latina autorizado para este fin.

-Desde el año 2011 la sección rabia del ISP participa en una prueba de interlaboratorios en las técnicas de IFD y tipificación viral por secuenciamiento genético, con resultados satisfactorios.



Diagnóstico de rabia en humanos.



Muestras antemortem (anticuerpos, antígeno y ácidos nucleídos)

Muestra	Condiciones de envío	Técnica	Detección	Frecuencia
Suero	Refrigerada 4°C	RIFFT	Anticuerpos	2 veces por semana
LCR	Refrigerada 4°C	RIFFT RT-PCR Nested	Anticuerpos Ácidos nucleicos	2 veces por semana
Saliva	Congelada-20°C	RT-PCR Nested	Ácidos nucleicos	diariamente por 3 días
Biopsia nuca	Congelada-20°C	IFD RT-PCR Nested	Antígeno Ácidos nucleicos	1 vez por semana

Muestras postmortem (antígeno y ácidos nucleídos)

Corteza cerebral

Cuerpo calloso

Cerebelo

Médula espinal





Caso de Rabia Humana 1996

- Afectó a un niño de 7 años en la VI Región
- Sin antecedentes de mordeduras o contacto con animales sospechosos
- Ingreso al hospital el 13 febrero 1996
- Fallece 26 de Febrero 1996



Resultados de Laboratorio



o MUESTRA	Título de Ac.(IFI)	
o Suero 1 (11 días)	1:625	
o Suero 2 (25 días)	1:15.625	
o LCR (25 días)	1: 125	
o N.Corteza cerebral	Negativo	
o N. Cuerpo calloso	Negativo	Imunofluorescencia
o N. Cerebelo	Positivo	Directa
o Muestra de piel	Positivo	

La caracterización antigénica con anticuerpos monoclonales se identificó como variante 4 (origen *Tadarida brasiliensis*) realizada por el INPPAZ en el mes de mayo de 1996.



Caso Rabia Humana 2013

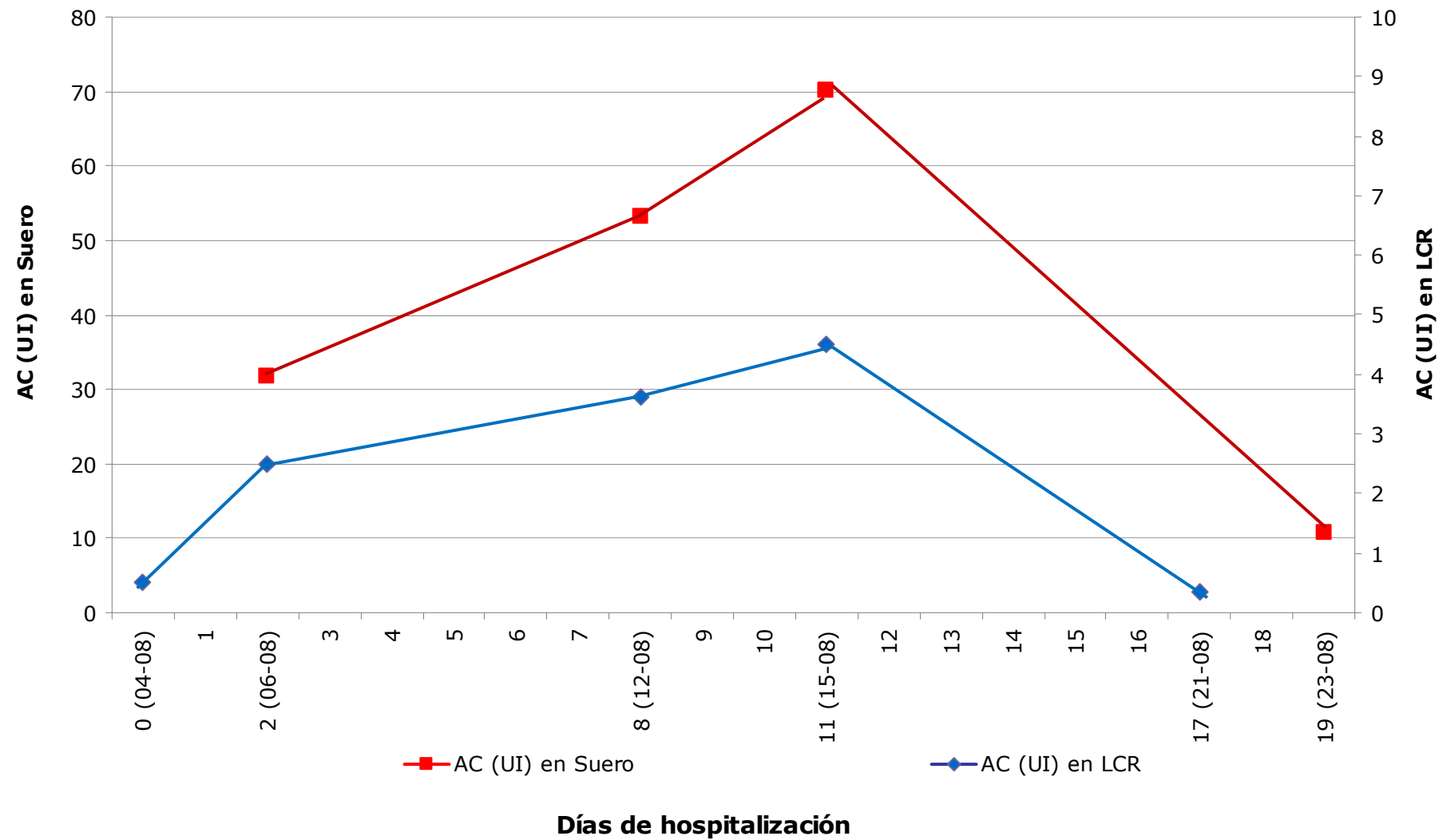
Resultados de laboratorio



Fecha toma muestra	Tipo Muestra	RIFFT (UI)	IFD	RT-PCR
04/08/2013	LCR	0,5		
06/08/2013	SUERO	31,7		
06/08/2013	LCR	2,5		negativo
07/08/2013	Biopsia de piel		negativo	negativo
12/08/2013	SUERO	53,27		
12/08/2013	LCR	3,62		negativo
9-10-11 y 12-08-2013	Saliva (4 mtras)		negativo	negativo
13/08/2013	Biopsia de piel		negativo	negativo
15/08/2013	SUERO	70,2		
15/08/2013	LCR	4,5		negativo
15/08/2013	Biopsia de piel		negativo	negativo
15-08-2013 (3 mtras)	Saliva (3 mtras)			negativo
17-08-2013 (3 mtras)	Saliva (3 mtras)			negativo
21/08/2013	LCR	0,36		negativo
21/08/2013	Biopsia de Piel		negativo	negativo
21/08/2013	Saliva (3)			negativo
23/08/2013	SUERO	10,7		



Niveles de anticuerpos anti virus rábico en LCR y Suero por días de hospitalización.



Resultados CDC

26/08/2013



-Anticuerpos neutralizantes para virus rábico fueron detectados en 3 muestras de LCR, por la técnica de Inhibición de focos fluorescentes (RIFFT).

-Anticuerpos IgG e IgM fueron detectados en 3 muestras de LCR, por la técnica de Inmunofluorescencia.

Lo cual es **consistente con infección por virus rábico**, diagnosticado por ISP .

No se detectó antígeno rábico por Inmunofluorescencia Directa ni ácido nucleico de virus rábico por hemi-nested RT-PCR en biopsia de nuca.

No se detectó amplicones específicos en muestras de saliva por nested RT-PCR con múltiples partidores, hasta la fecha.



Conclusiones



La existencia de casos de rabia en murciélagos constituye un riesgo real de rabia en humanos y animales domésticos.

Esta enfermedad debe ser incluida en el **diagnóstico diferencial** de las encefalitis aguda.

La especie *Tadarida brasiliensis* es el reservorio mas importante en Chile, aun cuando existen otras especies de murciélagos involucrados.

El patrón epidemiológico de la rabia en Chile, se caracteriza por una endemia en murciélagos.

La Sección Rabia del ISP es el laboratorio que realiza el diagnostico de la enfermedad y caracterización de las variantes virales





**Instituto de
Salud Pública**
Ministerio de Salud

Gobierno de Chile