

# Análisis filogenético del virus de la rabia en mamíferos reportados en Colombia entre 1994 y 2008

## *Phylogenetic analysis of rabies virus in mammals reported in Colombia between 1994 and 2008*

Fecha recepción: 6 de mayo de 2015  
Fecha Aprobación: 28 de junio de 2015

Alfonso Calderón-Rangel<sup>1</sup>, Virginia Consuelo Rodríguez-Rodríguez<sup>2</sup>,  
Camilo Antonio Guzmán-Teran<sup>3</sup>

### Resumen

La rabia es una zoonosis viral de distribución mundial que afecta el sistema nervioso central; epidemiológicamente, por su forma de transmisión se ha clasificado en dos categorías: la forma urbana, asociada a caninos y felinos, y la selvática, a murciélagos hematófagos. En Colombia se aisló en 1968 el primer virus rábico, del murciélago vampiro (*Desmodus rotundus*), y desde entonces la población se ha visto afectada históricamente por brotes urbanos y selváticos. El objetivo de este trabajo fue analizar 19 secuencias parciales de la proteína N de la nucleocápside del virus de la rabia reportadas en Colombia y depositadas en el GenBank entre 1994 y 2008, para establecer su relación filogenética. El árbol filogenético mostró 4 grupos monofiléticos. Epidemiológicamente se presentan dos formas de transmisión del virus (ciclo urbano y selvático), con implicaciones en salud pública, por lo que se hace necesario implementar medidas de prevención y control que disminuyan el impacto sobre la población humana.

**Palabras clave:** Biología computacional, Filogenia, *Lyssavirus*, Virus de la rabia, Zoonosis.

### Abstract

Rabies is a viral zoonosis distributed worldwide that affects the central nervous system. Epidemiologically, due to the form of transmission rabies has been classified into two categories: urban form, associated with canine and feline, and sylvatic, involving vampire bats. In Colombia, the first rabies virus was isolated in 1968 from the vampire bat (*Desmodus rotundus*), and since then the population has been historically affected by urban and jungle outbreaks. The objective of this study was to analyze 19 partial sequences of nucleocapsid protein N of rabies virus reported in Colombia, and deposited in GenBank between 1994 and 2008, to establish their phylogenetic relationships. The phylogeny showed four monophyletic groups. Epidemiologically, two forms of transmission of the virus (urban and sylvatic cycle) are present, with implications for public health. Therefore, it is necessary to implement prevention and control measures to reduce the impact of the zoonosis on the human population.

**Keywords:** Computational Biology, *Lyssavirus*, Phylogeny, Zoonosis.

1 M. Sc. Universidad de Córdoba (Montería – Córdoba, Colombia). [acalderonr@correo.unicordoba.edu.co](mailto:acalderonr@correo.unicordoba.edu.co).

2 M. Sc. Universidad de Córdoba (Montería – Córdoba, Colombia). [vrodiguez@correo.unicordoba.edu.co](mailto:vrodiguez@correo.unicordoba.edu.co).

3 M. Sc. Universidad de Córdoba (Montería – Córdoba, Colombia). [cguzman@correo.unicordoba.edu.co](mailto:cguzman@correo.unicordoba.edu.co).

## Introducción

La rabia es una infección viral que afecta el sistema nervioso central (SNC) en humanos y animales, ocasionando encefalitis aguda fatal (1); se produce en todo el mundo, excepto en la Antártida, y la mayor mortalidad en humanos se presenta en Asia, África y América Latina, donde no se dispone de programas obligatorios de vacunación en los animales, y en muchos casos la profilaxis posterior a la exposición no está disponible (2). El agente etiológico es un virus neurotrópico, en forma de bala, envuelto, perteneciente a la familia *Rhabdoviridae*, género *Lyssavirus*, y su genoma es ARN, de cadena sencilla, no segmentado, de polaridad negativa, compuesto por cerca de 12.000 nucleótidos que codifican para cinco proteínas estructurales: N, P, M, G y L (3).

Los análisis filogenéticos de la relación virus-hospedero sugieren que los 15 *Lyssavirus* conocidos, probablemente, se originaron en murciélagos, y se pueden dividir en filogrupos. El filogrupo I comprende el virus de la rabia clásica (RABV) y la mayoría de *Lyssavirus*, de murciélagos; mientras que el virus de murciélago Lagos (LBV) y el virus de murciélago Shimoni (SHIBV) forman el filogrupo II (4, 5).

Los estudios evolutivos sobre *Lyssavirus* han tendido a centrarse en la proteína N, una proteína estructural conservada, y en la proteína G, que contiene los dominios responsables del reconocimiento del receptor y fusión con la membrana de la célula hospedera (4).

El análisis filogenético es un proceso de estimación de la historia de la evolución de un conjunto de genes, especies, taxa u otros. El objetivo fue construir un árbol filogenético que representa la mejor de las hipótesis de la filogenia real. Existen cuatro métodos principales para construcción de árboles: método del vecino más cercano (NJ), máxima parsimonia (MP), de máxima verosimilitud (ML) y la inferencia bayesiana (BI) (6,7). Las secuencias de ácidos nucleicos son almacenadas en diversas bases de datos, y existen diversas aplicaciones de software para analizarlos.

En el presente trabajo se obtuvieron 19 secuencias parciales de la proteína N de la nucleocápside del virus de la rabia, en formato fasta del GenBank; este formato fasta está basado en un texto para la

representación de secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de péptidos, en los cuales los nucleótidos o aminoácidos se representan usando códigos de una sola letra; el formato también permite nombres de secuencias y comentarios de las secuencias. La simplicidad del formato fasta hace que sea fácil de manipular y analizar las secuencias, utilizando distintos programas informáticos.

La alineación de secuencias múltiples consiste en un alineamiento de tres o más secuencias de ADN, ARN o secuencias de proteínas; es una forma de organizar las secuencias en columnas sucesivas para identificar regiones homólogas. La homología entre las proteínas y el ADN o ARN se puede establecer sobre la base de similitud de las secuencias; pero esta similitud tiene que tener una relación evolutiva por la cual las secuencias comparten un linaje y son descendientes de un ancestro común. Por lo tanto, nos muestra que los residuos son fundamentales y también nos ayuda a identificar homólogos distantes con mayor confianza que la podría establecer la alineación de secuencias pares (8).

El modelo de sustitución óptima, codifica una hipótesis acerca de las tasas relativas de mutación en varios sitios a lo largo de los genes o secuencias de aminoácidos que se están estudiando (6, 9). En su forma más simple, los modelos de sustitución tienen por objeto corregir las diferencias en los tipos de transiciones y transversiones en las secuencias de los nucleótidos. El uso de modelos de sustitución son necesarios por el hecho de que la distancia genética entre dos secuencias aumenta linealmente solo por un corto tiempo, después, las dos secuencias divergen una de la otra (10). El objetivo del presente trabajo fue analizar 19 secuencias parciales de la proteína N de la nucleocápside del virus de la rabia, reportadas en Colombia entre 1994 y 2008, depositadas en el GenBank, para establecer sus relaciones filogenéticas.

## Materiales y Métodos

Se obtuvieron 19 secuencias genómicas parciales de la proteína N de la nucleocápside del virus de la rabia, reportadas en Colombia entre 1994 y 2008 y disponibles en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). El número de acceso de las secuencias en el Genbank, origen, hospedero y año se presentan en la Tabla I. Para proporcionar

la raíz a los diferentes árboles filogenéticos propuestos se incluyó la secuencia de un virus de murciélago europeo (EBLV-2), con número de acceso en GenBank U22846 (11).

Las 20 secuencias fueron editadas en fragmentos de 264 bp, utilizando el bloc de notas como editor de texto, y este formato se convirtió en un archivo fasta; enseguida se hizo la alineación de las secuencias mediante el software Mega

versión 4.0 (12); estos alineamientos se usaron visualmente para hacer análisis comparativo de los codones de inicio y de terminación. La elección del modelo de sustitución de los nucleótidos que mejor se ajustó a los datos se determinó con el software MrModeltest versión 2.3 (13). El análisis filogenético se realizó utilizando MEGA v 4.0 (12). La comprobación del grado de saturación para el gen N de la proteína de la nucleocápside del virus de la rabia se efectuó mediante el software Dambe (14).

**Tabla I.** Números de acceso en GenBank de las secuencias de la nucleoproteína de la cápside del virus de la rabia usadas para el análisis filogenético.

N.º	GenBank	Origen	Hospedero	Año
1	JF693476	Humano	<i>Desmodus rotundus</i>	1994
2	JF693471	Gato	<i>Desmodus rotundus</i>	1994
3	JF693453	Canino	<i>Canis. lupus familiaris</i>	1995
4	JF693475	Humano	<i>Desmodus rotundus</i>	1995
5	JF693465	Bovino	<i>Desmodus rotundus</i>	1997
6	JF693463	Bovino	<i>Desmodus rotundus</i>	1997
7	JF693467	Bovino	<i>Desmodus rotundus</i>	1997
8	JF693464	Gato	<i>Desmodus rotundus</i>	1997
9	JF693455	Humano	<i>Canis. lupus familiaris</i>	2000
10	JF693469	Equino	<i>Desmodus rotundus</i>	2002
11	JF693468	Bovino	<i>Desmodus rotundus</i>	2003
12	JF693466	Bovino	<i>Desmodus rotundus</i>	2006
13	JF693474	Gato	<i>Desmodus rotundus</i>	2006
14	JF693470	Humano	<i>Desmodus rotundus</i>	2007
15	JF693457	Humano	<i>Desmodus rotundus</i>	2008
16	JF693456	Humano	<i>Desmodus rotundus</i>	2008
17	JF693458	Gato	<i>Desmodus rotundus</i>	2008
18	JF693460	Humano	<i>Desmodus rotundus</i>	2008
19	JF693478	Humano	<i>Desmodus rotundus</i>	2008

Fuente: GenBank

## Resultados y Discusión

En la Fig. 1 se presenta el árbol filogenético, obtenido mediante el software Mega 4.0, usando NJ como modelo de sustitución, y como marcador molecular las distintas secuencias de la proteína de la nucleocápside del virus de la rabia, de las 19 secuencias reportadas en Colombia entre 1994 y 2008, y en la Fig. 2 se muestra la comprobación del grado de saturación del modelo del marcador

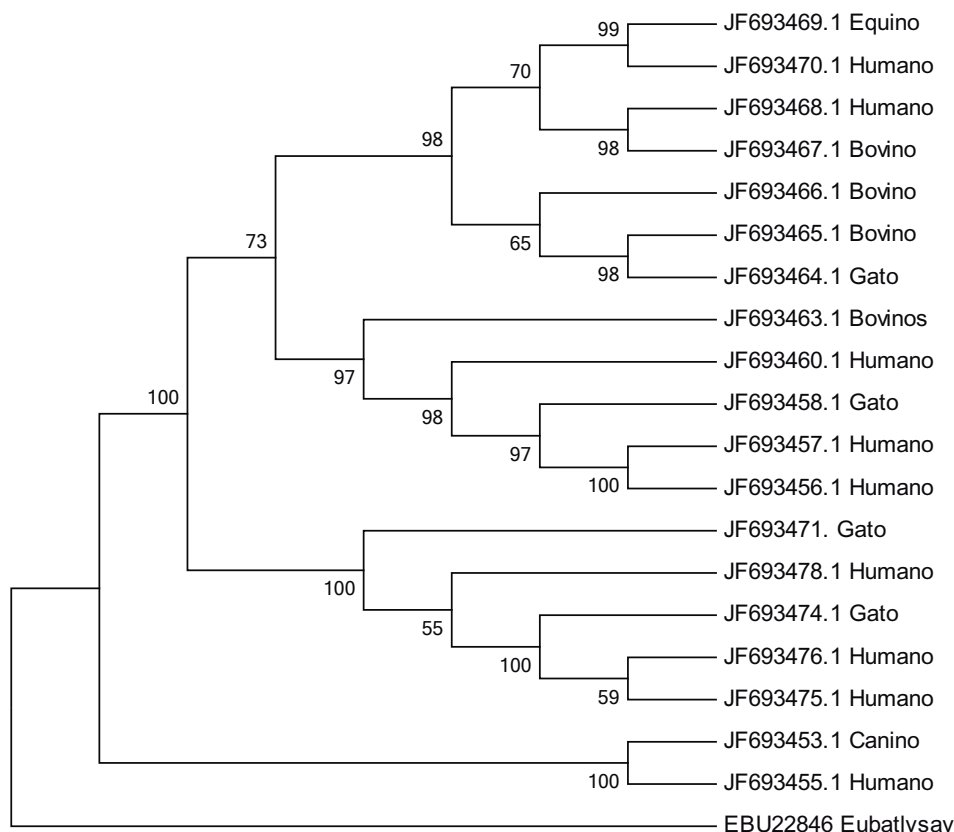
de la proteína N de la nucleocápside, mediante el software Dambe.

Se generó un árbol filogenético mediante el algoritmo de NJ y se enraizó con el grupo externo EBU22846, usando como marcador molecular secuencias de la proteína N de la nucleocápside del virus de la rabia (Fig. 1). El árbol mostró 4 clados monofiléticos procedentes de un mismo ancestro. El clado más basal integrado por los

taxones JF693455.1 Humano y JF693451.3 Canino presentó el grado máximo de similaridad (100%); lo que sugiere que la misma cepa del RABV afectó 2 especies distintas de mamíferos (humano-canino), relacionadas con la rabia urbana.

El segundo clado está conformado por los taxones JF693471 Gato y JF693475.1 Humano; el grado de

similaridad entre ellos es del 100%, sin embargo, la similaridad más interna entre los taxones JF693476.1 Humano y JF693475.1 Humano es del 59%; en este clado se ubican las cepas que generan infección en las especies gatos y humanos, en las que se incrimina un único vector (*D. rotundus*), lo que constituye casos de rabia por ciclo silvestre o selvático.



**Figura 1.** Filogenia del virus de la rabia, obtenida con Mega 4.0, usando NJ como modelo de sustitución, y como marcador molecular las distintas secuencias de la nucleocápside del virus de la rabia reportadas en Colombia entre 1994 y 2008.

El tercer clado, de JF693463.1 Bovino hasta JF693456.1 Humano, y el cuarto clado, conformado por los taxones JF693469.1 Equino hasta JF693467.1 Bovino, presentan entre sí una similaridad media (73%), pero cada subgrupo monofilético presenta una alta similaridad (98%); el tercer clado infecta tres especies (bovino-humano-gato), y el cuarto clado presenta infección en equino-humano-bovino; estos dos clados tienen al *D. rotundus* (Tabla I) como vector común, presentándose casos de rabia por ciclo silvestre.

El análisis de las 19 secuencias de la proteína N del virus rábico muestra subtipos diferentes; las secuencias JF693455.1 y JF693470.1, obtenidas de humanos, difieren en un 27% con respecto a su ancestro común más cercano; esta diferencia sugiere que se trata de subtipos o genotipos distintos. Por otro lado, el árbol muestra que las secuencias obtenidas de gato y humano en tres clados se ubican en ramas muy cercanas, sugiriendo que están muy relacionadas, lo cual podría indicar el probable rol de los gatos en

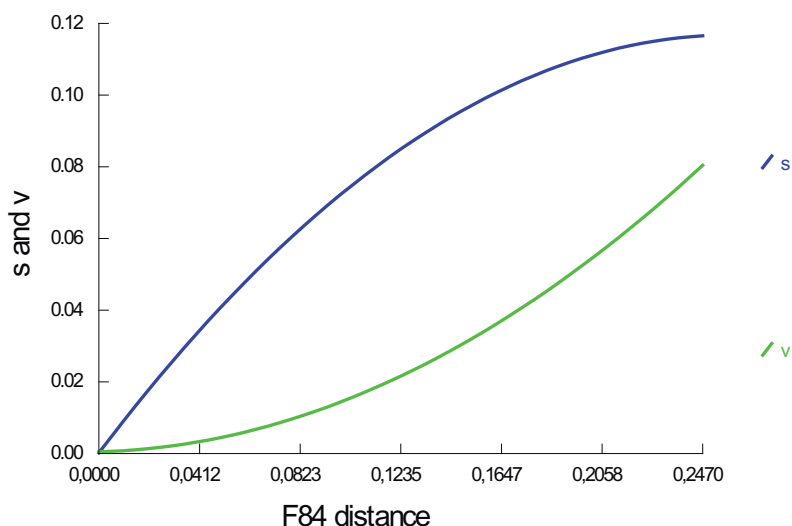
la transmisión de rabia a los humanos por ciclo selvático en las ciudades.

Empleando marcadores de secuencias de la proteína G y un fragmento de la proteína L, obtenidos de muestras de brotes del virus de la rabia en el Caribe colombiano y de brotes ocurridos en el departamento de Arauca y la región central del país, se determinó que el árbol filogenético reconstruido presentó tres grupos distintos del virus de la rabia: la variante genética I, del virus aislado de Arauca y la región central –estos virus están aparentemente extintos en Colombia–; la variante genética II, de aislados del Caribe, y el tercer grupo de virus, aislados de dos murciélagos insectívoros. Este hallazgo fue el primero que asoció esta especie de murciélagos con la transmisión a caninos y humanos, demostrando que vectores no sospechosos (*M. molossus* y *E. brasiliensis*) podrían ser una amenaza para la salud pública (15).

La validación de la proteína N de la nucleocápside del virus de la rabia, tomada como modelo del marcador (Fig. 2), comprobó la validez de este al encontrar que al aumentar las transiciones

aumentan las transversiones, y que el modelo no está saturado, por lo cual es aún vigente este marcador.

Se puede afirmar que el virus de la rabia, en algún momento de su evolución, se segregó en dos categorías o ciclos: el virus urbano y el virus silvestre; lo que constituye la teoría de la co-divergencia; igual situación ocurre en otras áreas geográficas donde coexisten estos dos ciclos (16, 17, 18, 19) o uno de estos ciclos (ciclo urbano) ha sido erradicado por las medidas de prevención y control; los casos urbanos declinaron significativamente por las campañas de vacunación masivas de reservorios (caninos-felinos). El éxito de las campañas de vacunación permitió erradicar los casos de rabia urbana, sin embargo, la forma silvestre de rabia pasó a manifestarse de manera más frecuente, y el virus se adoptó a reservorios distintos a los vampiros, como el *T. brasiliensis*, siendo el reservorio más importante en los centros urbanos y rurales de Chile (20). Se ha afirmado que el virus de la rabia en *D. rotundus* y en *T. brasiliensis* tienen un antepasado común que está circulando en los vampiros y en los quirópteros con cola (19, 21, 22).



**Figura 2.** Comprobación del grado de saturación del modelo del marcador de la proteína N de la nucleocápside (transiciones y transversiones vs. distancias genéticas) mediante el software Dambe.

En Colombia, la situación de la rabia fue compleja durante el período 1994-2002 (23), porque se presentaron diversos brotes (urbana y silvestre),

con casos fatales en humanos; por ejemplo, en el 2004 se informó en el Chocó de un brote de rabia, con infección y muerte en cuatro humanos,

producida por la variante antigénica 3, específica del ciclo silvestre (23). En el 2008, en Santander de Quilichao (Cauca) se presentaron dos casos humanos fatales de rabia, en los que se aisló la variante antigénica 3 (24), y en Santa Marta se presentó un brote de rabia urbana con cuatro casos fatales en humanos y 28 caninos, donde la variante antigénica 1 fue aislada, indicando que los virus transmitidos conservaron origen canino o ciclo urbano (25), y en Floridablanca (Santander), en un paciente joven, el diagnóstico de necropsia fue de panencefalitis aguda grave necrosante de etiología viral, donde la tipificación mostró la variante antigénica 3, cuyo reservorio principal es el *D. rotundus* (26). Todos estos casos muestran la coexistencia de los ciclos urbano y silvestre en distintas regiones de Colombia.

El Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), en el informe de sanidad animal del 2010 (27), reportó que se diagnosticaron 140 casos en la especie bovina; en 116 casos se aisló la variante 3 (ciclo silvestre); en 18 casos, la variante 5 (reservorios de murciélagos), y en un foco, la variante 1 (ciclo urbano), y en 4 casos se desconoce la variante. En el 2012 se reportaron 133 casos de rabia, pero se desconocen sus variantes antigénicas, y hasta junio del 2013 se han reportado 84 casos de rabia bovina (ciclo silvestre).

Entre las causas de que se sigan presentando casos urbanos y silvestres están las reformas del Estado colombiano, que desmontó entidades del orden nacional encargadas de implementar políticas de prevención y control, delegando estas responsabilidades a los entes territoriales, que no han sido eficientes (28, 29); así, la implementación de la vacunación masiva en caninos se ejecutó después de la presentación de casos fatales (25), o se implementó la vacunación en forma masiva en un solo vector (caninos), dejando de lado otros vectores, como los gatos, causantes de la transmisión (24). El ciclo silvestre se sigue presentado por la poca eficiencia en los programas de control de vectores (captura con red y aplicación de un anticoagulante) y por la falta de vacunación masiva de hospederos finales (equinos, bovinos).

## Conclusión

El análisis filogenético es cada vez más usado en la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas virales, en especial de las causadas

por virus ARN, debido a la rápida mutación, que genera nuevos genotipos que difieren en su patogenicidad, reservorios, ciclos epidemiológicos y distribución geográfica; además, mediante el análisis filogenético se pueden establecer las rutas de migración de los agentes infecciosos de una región, país o continente a otro continente, país o región. Se demostró que existen genotipos distintos de cepas que afectan a humanos, y, también, que los genotipos obtenidos de aislados procedentes de gatos y humanos son muy similares, indicando que el gato está jugando un rol importante en la transición del ciclo selvático en humanos que viven en centros urbanos.

## Referencias

- (1) Beltrán FJ, Dohmen FG, Del Pietro H, Cisterna DM. Diagnosis and molecular typing of rabies virus in samples stored in inadequate conditions. *J Infect Dev Ctries*, 2014; 8(8): 1016-1021.
- (2) Knobel DI, Cleaveland S, Coleman PG, Fèvre EM, Meltzer MI, Miranda ME, et al. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull World Health Organ*, 2005; 83:360-368.
- (3) **Johnson N, Aréchiga CN, Aguilar SA.** Vampire bat rabies: ecology, epidemiology and control. *Viruses*, 2014; 6(5): 1911-1928.
- (4) Badrane H, Bahloul C, Perrin P, Tordo N. Evidence of two *Lyssavirus* phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *J Virol*, 2001; 75: 3268-3276.
- (5) Kuzmin IV, Mayer AE, Niezgodna M, Markotter W, Agwanda B, Breiman RF, et al. Shimoni bat virus, a new representative of the *Lyssavirus* genus. *Virus Res*, 2010; 149: 197-210.
- (6) Zima J, Macholán M, Munclinger P, Piálek J. *Genetické metody v zoologii Karolinum 2004*. UK.
- (7) Vallo P. Basic phylogenetic methods, proceedings of the 4th international summer school on computational biology: Statistical methods for genetic and molecular data, Brno, 2008: 72-82.
- (8) Lesk, A. M. *Introduction to genomics*. 2007. Oxford University Press, Oxford.

- (9) Posada D, Crandall KA. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 1998; 14(9): 817-818.
- (10) Martínková N. Tutorial in phylogenetic analyses, proceedings of the 4<sup>th</sup> international summer school on computational biology: Statistical methods for genetic and molecular data, Brno, 2008: 92-106.
- (11) Condori CRE, Streicker GD, Cabezas SC, Velasco VA. Enzootic and epizootic rabies associated with vampire bats, Perú. *Emerg Infect Dis*, 2013; 19(9): 1063-1069.
- (12) MEGA 4.0. 2007. Molecular evolutionary genetics analysis software version 4.0. Center of evolutionary functional genomics diodesign institute, Arizona State University.
- (13) MrModeltest 2.3. 2004. Evolutionary biology center, Uppsala University.
- (14) Dambe. 2000. Data analysis in molecular biology. Kluwer Academic Publisher.
- (15) Páez A, Núñez C, García C, Boshell J. Molecular epidemiology of rabies epizootics in Colombia: evidence for human and dog rabies associated with bats. *J. Gen Virol*, 2003; 84: 796-802.
- (16) Carnieli P, De Oliveira FW, Castilho JC, Novaes OR, Macedo CI, Durymanova E, *et al.* Characterization of *rabies virus* isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. *Virus Research*, 2008; 131(1): 33-46.
- (17) García AF, Holgado JW, Aguilar AEG, Quispe FMM. IFD para la detección del virus de la rabia en murciélagos del distrito de Huanipaca, Abancay. *SITUA*, 2004; 13(2): 5-9.
- (18) Nad SA, Dav IN, Muldoon ISF, Wandelera AI. Molecular epidemiological analysis of the incursion of the raccoon strain of rabies virus into Canada. *Epidemiol. Infect*, 2006; 134: 534-547.
- (19) Cliquet F, Robardet E, Must K, Laine M, Peik K, PME, *et al.* Elimination rabies in Estonia. *PLoS NEGL Trop Dis*, 2012; 6(2): e1535:1-17.
- (20) Núñez SF, Favi CMU, Urcelay VS, Sepúlveda CA, Fábrega GF. *Rabia silvestre en murciélagos insectívoros en Chile*. *Bol Oficina Sanit Panam*, 1987; 103(2): 140-145.
- (21) Velasco VA, Orciari LA, Juárez IV, Gómez SM, Padilla MI, Flisser A, *et al.* Molecular diversity of rabies viruses associated with bats in Mexico and other countries of the Americas. *J Clin Microbiol*, 2006; 44(5): 1697-1710.
- (22) David D, Jacobson B, Smith JS, Stram Y. Molecular epidemiology of rabies virus isolates from Israel and other middle- and near-eastern countries. *J Clin Microbiol*, 2000; 38(2): 755-762.
- (23) Valderrama J, García I, Figueroa G, Rico E, Sanabria J, Rocha N, *et al.* Brotes de rabia humana transmitida por vampiros en los municipios de Bajo y Alto Baudó, departamento del Chocó, Colombia 2004-2005. *Biomédica*, 2006; 26: 387-96.
- (24) Páez A, Polo L, Heredia D, Núñez C, Rodríguez M, Agúdelo C, *et al.* Brote de rabia humana transmitida por gato en el municipio de Santander de Quilichao, Colombia, 2008. *Rev. Salud pública*, 2009; 11(6): 931-943.
- (25) Páez A, Rey G, Agudelo C, Dulce A, Parra E, Díaz GH, *et al.* Brote de rabia urbana transmitida por perros en el distrito de Santa Marta, Colombia, 2006-2008. *Biomédica*, 2009; 29: 424-436.
- (26) Badillo R, Mantilla JC, Pradilla G. Encefalitis rábica humana por mordedura de murciélago en un área urbana de Colombia. *Biomédica*, 2009; 29: 191-203.
- (27) Instituto Colombiano Agropecuario. (ICA). Sanidad Animal Informe del 2010. (Fecha de acceso 11 de febrero de 2015). Disponible en: <http://www.ica.gov.co/getattachment/5822cada-667f-4541-8b86-c0258be04b64/2010.aspx>
- (28) Pening JP. Evaluación del proceso de descentralización en Colombia. *Economía y Desarrollo*, 2003; 2(1): 123-149.
- (29) Ramírez BMR. Las reformas del Estado y la administración pública en América Latina y los intentos de aplicación del New Public Management. *Estudios Políticos*, 2009; 34:115-141.