



# Propagación regional y perspectivas filogenéticas sobre la transmisión del virus de la rabia en el ganado bovino del sur de Ecuador

## Regional spread and phylogenetic perspectives on rabies virus transmission in cattle in southern Ecuador

### Autores

<sup>1</sup>Jorge Rodrigo Espinoza Samaniego   
✉ joespinozasa@uide.edu.ec

<sup>1</sup>Edilberto Chacón Marcheco   
✉ edilberto.chacon@utc.edu.ec

<sup>2</sup>Luis Alfredo Mena Miño   
✉ luismenamino@hotmail.com

<sup>3</sup>Rubén Alexander Maldonado Orbe   
✉ ruben.maldonado@uisek.edu.ec

<sup>1</sup>Universidad Técnica de Cotopaxi, Maestría en Ciencias Veterinarias, Unidad Académica de Posgrado, Latacunga, Cotopaxi, Ecuador.

<sup>2</sup>Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD), Sanidad <sup>3</sup>Animal, Quito, Pichincha, Ecuador.

<sup>3</sup>Universidad Internacional SEK-UISEK, Facultad de Ciencias de la Salud, Enfermedades Desatendidas, Emergentes, Ecoepidemiología y Biodiversidad (GIEED), Biomedicina Experimental y Aplicada (GIBEA), Quito, Pichincha, Ecuador.

**Citación sugerida:** Espinoza Samaniego, J. R., Chacón Marcheco, E., Mena Miño, L. A., Maldonado Orbe, R. A. (2025). Propagación regional y perspectivas filogenéticas sobre la transmisión del virus de la rabia en el ganado bovino del sur de Ecuador. *La Técnica*, 15(2), 103-111. DOI: <https://doi.org/10.33936/latecnica.v15i2.7321>

Recibido: Febrero 26, 2025

Aceptado: Octubre 10, 2025

Publicado: Noviembre 01, 2025

### Resumen

La enfermedad de la rabia es una zoonosis letal que tiene un impacto en humanos como en animales. Para entender la evolución y la epidemiología de la enfermedad, es fundamental su caracterización a nivel molecular. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue realizar la caracterización molecular de los aislamientos del virus obtenidos a partir de tejido cerebral bovino en la Zona 7 de Ecuador, con el propósito de brindar información útil que contribuya al fortalecimiento de los programas nacionales de vigilancia y control. El estudio incluyó en las provincias de Zamora Chinchipe, Loja y El Oro, durante el período 2015-2020, en el cual fueron analizadas 26 muestras positivas mediante inmunofluorescencia directa y cultivo en células BHK-21, confirmándose la presencia del virus de la rabia. El análisis filogenético reveló que los aislados de Ecuador se distribuyeron en clados específicos, con vínculos evidentes entre las variantes históricas y las aisladas en las provincias de Loja y Zamora Chinchipe. Por otra parte, los aislados de El Oro mostraron una menor diversidad genética, lo que podría indicar que los modelos de transmisión a nivel local fueron más limitados. Loja y Zamora Chinchipe tuvieron un rol fundamental en la diseminación del virus, probablemente debido a las condiciones ecológicas que benefician a los murciélagos hematófagos. Asimismo, la diversidad genética que se ha observado resalta lo crucial de la vigilancia genómica que permita detectar mutaciones genéticas que podrían afectar la efectividad de las vacunas y los métodos de control existentes. Este estudio destaca la relevancia de establecer políticas sanitarias que se alineen con los patrones de distribución local del virus y enfatiza el empleo sustancial de herramientas moleculares y filogenéticas para la vigilancia epidemiológica. La información generada contribuirá al fortalecimiento de programas de control más efectivos, orientados a reducir el impacto de esta enfermedad en la región mejorando los programas de vigilancia y control.

**Palabras clave:** rabia, caracterización molecular, análisis filogenético, Ecuador, vigilancia epidemiológica.

### Abstract

Rabies is a lethal zoonosis that impacts both humans and animals. To understand the evolution and epidemiology of the disease, its molecular characterization is essential. Therefore, the objective of this study was to perform the molecular characterization of virus isolates obtained from bovine brain tissue in Zone 7 of Ecuador, with the aim of providing useful information that contributes to strengthening national surveillance and control programs. This study included cases in the provinces of Zamora Chinchipe, Loja, and El Oro during the period 2015-2020. Twenty-six positive samples were analyzed by direct immunofluorescence and culture in BHK-21 cells, confirming the presence of the rabies virus. Phylogenetic analysis revealed that isolates from Ecuador are distributed in specific clades, with evident links between historical variants and those isolated in the provinces of Loja and Zamora Chinchipe. On the other hand, the isolates from El Oro showed less genetic diversity, which could indicate that local transmission models are more limited. Loja and Zamora Chinchipe play a fundamental role in the dissemination of the virus, likely due to ecological conditions that benefit blood-sucking bats. Furthermore, the observed genetic diversity highlights the importance of genomic surveillance, which allows for the detection of genetic mutations that could affect the effectiveness of existing vaccines and control methods. This study highlights the importance of establishing health policies that align with local distribution patterns of the virus and emphasizes the substantial use of molecular and phylogenetic tools for epidemiological surveillance. The information generated will contribute to the strengthening of more effective control programs, aimed at reducing the impact of this disease in the region by improving surveillance and control programs.

**Keywords:** rabies, molecular characterization, phylogenetic analysis, Ecuador, epidemiological surveillance.



## Introducción

El virus de la rabia (RABV), un miembro del género *Lyssavirus* dentro de la familia Rhabdoviridae, es un patógeno zoonótico responsable de la rabia, una enfermedad neurológica mortal que afecta a los mamíferos, entre ellos el ser humano. Con una longitud de aproximadamente 200 nm y un ancho de cerca de 80 nm, el virus tiene una morfología parecida a la bala. Su genoma es de ARN en cadena negativa y codifica cinco proteínas estructurales: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glicoproteína (G), y ARN polimerasa dependiente de ARN (L) (Holmes y Holmes, 2023; Parija, 2023). La nucleoproteína, entre otras, tiene un rol esencial en la transcripción y replicación y se ha utilizado previamente en investigaciones de tipificación molecular y análisis filogenéticos para aclarar la dinámica evolutiva del RABV (Omodo et al., 2020; Nadal et al., 2022; Schreiber y Fachinetto, 2022).

La rabia es una zoonosis viral que representa un grave problema de salud pública y tiene un fuerte impacto económico a nivel mundial (World Organization for Animal Health (WOAH), 2023). Cada año, más de 55.000 personas mueren a causa de esta enfermedad, de las cuales el 40% son niños menores de 15 años, frecuentemente mordidos por animales sospechosos de estar infectados (Khairullah et al., 2023; Wallace y Muller, 2024). La rabia silvestre puede generar brotes de rabia urbana que afectan directamente a las personas, ya que se produce un contacto con animales infectados en el entorno, lo que contribuye a la propagación de esta enfermedad (Ortiz et al., 2017). Cuando surgen los signos clínicos, las opciones de tratamiento fueron muy escasas y la letalidad se aproximó al 100%. Pese a que hay vacunas eficaces, para muchas personas en condiciones de riesgo sigue siendo un reto acceder a ellas (Scheffer et al., 2014).

A nivel mundial, organizaciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) han implementado estrategias que han permitido controlar y, en algunos casos, erradicar la rabia en determinados países. Esto se debe a que, al tratarse de una zoonosis, su control tiene un impacto directo en la salud humana (Ortiz et al., 2017). En Ecuador, el monitoreo de esta enfermedad está a cargo de dos instituciones principales: la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosario-Agrocalidad adscrita al Ministerio de Agricultura, que lidera el programa oficial de prevención y control de la rabia parálitica bovina en el sector agropecuario, y el Ministerio de Salud Pública, en colaboración con el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), que maneja el control de zoonosis bajo lineamientos como el NOM-011-SSA2-1993. Agrocalidad, como Agencia de Regulación y Control, realiza diagnósticos de rabia parálitica bovina mediante técnicas como inmunofluorescencia directa, aislamiento viral y

pruebas moleculares desde 2014. Sin embargo, aun ante estos esfuerzos, la alta prevalencia de rabia silvestre en el país ha dificultado la obtención de datos específicos sobre las variantes del virus que circulan en las regiones de mayor incidencia, como la región Amazónica. La caracterización molecular del virus y el análisis de la relación entre brotes permitirían identificar las variantes presentes y establecer estrategias más efectivas dentro del programa nacional, con el objetivo de controlar la enfermedad y, a largo plazo, erradicarla. Esto es importante, ya que esta enfermedad ha ocasionado pérdidas económicas significativas en el sector ganadero (Ortiz et al., 2017).

La Zona 7 del Ecuador, incluye las provincias de Zamora Chinchipe, Loja y El Oro, en las cuales se reporta una alta incidencia de rabia silvestre, donde las características demográficas y geográficas constituyen un ambiente propicio para el murciélago hematófago, el cual es el vector principal de la enfermedad (Ortiz et al., 2017). Entre 2015 y 2020, en el país se registraron 263 casos positivos de rabia silvestre, lo que resalta la necesidad de detectar los reservorios que intervienen en la propagación de esta enfermedad y de implementar acciones para evitar rebrotes posteriores (Vizcaino et al., 2016; Ortiz et al., 2017). Pese a los esfuerzos realizados, resulta importante entender la relación genética entre los brotes que se han registrado. Además, la falta de datos moleculares que permitan caracterizar al virus en esta región, limita las capacidades de vigilancia epidemiológica y control de brotes.

Por ello el objetivo de esta investigación fue caracterizar molecularmente aislamientos del virus obtenidos a partir de tejido cerebral bovino de casos positivos de la Zona 7 del Ecuador, con el fin de establecer relaciones filogenéticas en esta región proporcionando información valiosa que permita fortalecer los programas nacionales de vigilancia y control.

## Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en la Zona 7 del Ecuador, conformada por las provincias de Zamora Chinchipe, Loja y El Oro, a partir de aislados del virus de la rabia detectados durante el período 2015-2020.

## Diseño del estudio y recolección de datos

La rabia es una enfermedad de notificación obligatoria en Ecuador, lo que exige el reporte de casos sospechosos y brotes en animales de producción. Según las directrices nacionales, se investigan los casos con síntomas neurológicos, como cambios repentinos en el comportamiento o parálisis progresiva. En este sentido, técnicos de campo de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosario-Agrocalidad recolectaron muestras de cerebro bovino provenientes de predios afectados, como parte de las directrices establecidas para la vigilancia rutinaria y

emergente. Con el fin de garantizar el diagnóstico preciso de esta enfermedad, se priorizaron muestras de tallo cerebral y cerebelo debido a su alta utilidad diagnóstica.

Se transportaron las muestras en tubos de polipropileno estériles a través de protocolos de cadena de frío (entre 2 y 8 °C) para prevenir que tanto el tejido como el material genético del virus se degradaran. Al llegar a los laboratorios de Agrocalidad, se realizaron pruebas diagnósticas para confirmar la presencia del agente viral. Después, las muestras fueron almacenadas en congelación (-20 °C) para análisis posteriores o para ser utilizadas material de referencia post-confirmación. Los datos relacionados con los casos de rabia, incluyendo la ubicación geográfica, la fecha de recolección y los resultados diagnósticos, fueron registrados en bases de datos nacionales correspondientes al periodo 2015-2020.

### Selección de muestras

Se utilizó la prueba de inmunofluorescencia directa (IFD) para el diagnóstico de muestras de rabia, durante el periodo 2015-2020, siguiendo las directrices del Manual de Pruebas Diagnósticas y Vacunas para Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (WOAH, 2023). Las muestras fueron evaluadas mediante criterios que comprendían la inspección visual del tejido con el fin de descartar autólisis, la confirmación de la integridad anatómica del encéfalo (presencia de bulbo raquídeo o hipocampo), el control de la temperatura del almacenamiento y la ausencia de contaminación externa.

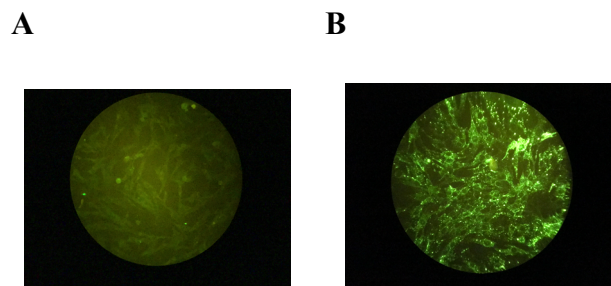
Durante este periodo, 263 muestras de tejido cerebral procedentes de la zona 7 del Ecuador fueron registradas como positivas y reportadas en el Sistema de Información Zoonosaria del Ecuador (SIZSE). A partir de estas muestras se evaluaron inicialmente 136 al cumplir con los criterios para realizar aislamiento viral y pruebas moleculares. De este grupo, se eligieron 46 muestras tomando en cuenta aspectos técnicos como la calidad de conservación, características anatómicas, detección de antígeno viral e importancia epidemiológica.

### Aislamiento del virus de rabia

La línea celular de riñón de hámster neonato (BHK-21) fue utilizada para aislar el virus de la rabia. Previo al aislamiento del virus, las muestras fueron confirmadas mediante inmunofluorescencia directa (IFD), técnica que permitió evidenciar la presencia de proteínas virales características del virus de la rabia. Después, el virus fue aislado por medio de cultivo celular, lo cual se demostró a través de partículas virales fluorescentes observadas en las células en cultivo (figura 1).

El material obtenido de los cultivos celulares fue almacenado a -80 °C para preservar su viabilidad durante el desarrollo de las pruebas posteriores. Este enfoque aseguró la calidad y estabilidad del virus aislado, lo cual fue crucial el estudio molecular y para la construcción de bancos de virus destinados a investigaciones futuras.

La eficacia del cultivo en células BHK-21 y su análisis mediante IFD fue respaldada por estudios previos, que han demostrado la utilidad de esta línea celular para el aislamiento y diagnóstico del virus de la rabia, empleándola también en el análisis de cortes de cerebro humano para confirmar la infección viral (Qin et al., 2019; Wardhani et al., 2021; Harsha et al., 2022; Markbordee et al., 2024). Los resultados del presente estudio refuerzan esta evidencia, destacando la sensibilidad y especificidad de las células BHK-21 como modelo in vitro para el aislamiento del virus.



**Figura 1.** Aislamiento del virus de la rabia en células BHK-21. Las células BHK-21 fueron infectadas con aislados virales obtenidos de tejido cerebral bovino y analizadas mediante la prueba de anticuerpos fluorescentes directos (IFD). A. Control negativo: células no infectadas sin evidencia de fluorescencia, indicando la ausencia de proteínas del virus de la rabia. B. Muestras positivas: células infectadas que presentan focos de fluorescencia verde brillante, característicos de la presencia de proteínas virales específicas del virus de la rabia.

### RT-PCR, electroforesis y secuenciación

Se utilizó el kit de SuperScript IV First-Strand cDNA Synthesis para sintetizar ADN complementario (cDNA), y se utilizó el reactivo TRIzol (Thermo Fisher Scientific™) para extraer ARN total de las células infectadas. El gen de la nucleoproteína (N) se amplificó utilizando los cebadores JW12 (5'-ACGCTTAACAACAARATCARAG-3') y P784 (5'-CCTCAAAGTTCTTGTGGAAGA-3'), reportados para el virus de rabia (Fernandes et al., 2020; Dettinger et al., 2022; Claassen et al., 2023). Las condiciones de PCR incluyeron 30 ciclos de desnaturalización, alineamiento y elongación, y los amplicones se visualizaron en geles de agarosa al 2%, teñidos con SafeView. Con el fin de garantizar datos de calidad, las muestras fueron secuenciadas en ambas direcciones utilizando la técnica Sanger (Macrogen, Corea del Sur).

### Análisis filogenético

Se compiló un conjunto de datos de secuencias del gen de la nucleoproteína, que incluyó tanto los aislamientos ecuatorianos como secuencias de países vecinos disponibles en GenBank. Estos países fueron: Brasil (MN103483), Colombia (JF693463), Ecuador (MF467498, MF467497, HM368179, MF467501, MF467504) y Perú (KU938717) con el objetivo de realizar una comparación entre las secuencias. El genoma del virus de la rabia se utilizó como secuencia de referencia (NC 001542),

mientras que el virus de murciélagos europeo (Eblvf, U22845), un lyssavirus no relacionado con la rabia, se utilizó como el outgroup.

Se incluyeron metadatos, como el año y la ubicación del aislamiento, cuando estaban disponibles. Las secuencias se alinearon utilizando MAFFT (v7.407\_1) (Kato y Standley, 2013), y se eliminaron regiones conservadas pero con divergencias o sitios mal alineados utilizando la herramienta Gblocks (Castresana, 2000; Talavera y Castresana, 2007). Para el análisis filogenético se utilizó el método estadístico de máxima verosimilitud (MV), mientras que el modelo de Tamura-Nei con distribución gamma (TN+F+G2), fue identificado mediante la herramienta Model Finder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) como el mejor para estimar las distancias genéticas. El soporte de los clados, se construyó utilizando el software IQ-TREE (v1.6.12) (Nguyen et al., 2015) con 10.000 réplicas de bootstrap (Hoang et al., 2018). Se empleó FigTree (v1.4.4) e iTOL (Letunic y Bork, 2024) para la visualización y anotación del árbol.

**Resultados y discusión**

**Casos de rabia bovina en el sur de Ecuador entre 2015-2020**

Durante el período 2015-2020, un total de 263 casos de rabia bovina fueron confirmados por Agrocalidad correspondientes a las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe. La distribución de los casos bovinos de 2015 a 2020 entre diferentes provincias se presenta en la figura 1. El mayor número de casos confirmados se presentó en Zamora Chinchipe (189 casos; 71,86%), seguido de Loja (70 casos; 26,62%) y El Oro (cuatro casos; 1,52%). Estos resultados coincidieron con estudios previos. Cárdenas (2022), señaló que Zamora Chinchipe fue una de las provincias con mayor incidencia de casos de rabia en bovinos debido a sus condiciones ambientales favorables para la proliferación del virus. De manera similar, se ha reportado entre 2010 y 2018 en Loja 67 casos positivos de rabia bovina a partir de 127 muestras analizadas (Briceño-Loaiza & Alegría-Morán, 2019), lo que subrayó la importancia epidemiológica de esta provincia. Por otro lado, los resultados de este estudio confirmaron que la provincia de El Oro presentó una menor incidencia, en concordancia con el registro histórico de solo cuatro casos positivos reportados en el mismo periodo (Briceño-Loaiza y Alegría-Morán, 2019; Cárdenas, 2022).

**Detección de antígenos virales, amplificación de ARN viral y aislamiento de virus**

Para caracterizar el virus de la rabia, se recolectaron muestras de cerebro de bovinos de la zona de alta incidencia del Ecuador que es la zona 7. La tabla 1 resume los resultados de la detección del antígeno del virus, el aislamiento del virus, la amplificación del ARN viral y la secuenciación de muestras.

Se detectó antígeno viral en las 46 muestras seleccionadas, de las cuales 26 presentaron efecto citopático mediante cultivo celular, lo que indicó la presencia de virus viable. Además, en estas mismas muestras se confirmó la presencia de ARN viral mediante RT-PCR confirmando la detección del virus de rabia. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

**Tabla 1.** Muestras positivas de rabia bovina en la Zona 7 en Ecuador.

Año	Provincia	Muestras IFD positivas*	Muestras idóneas	Aislamiento viral	RT-PCR positivas	Muestras secuenciadas
2015	El Oro	0	0	0	0	0
	Loja	1	1	1	1	1
	Zamora Chinchipe	10	7	4	4	4
2016	El Oro	0	0	0	0	0
	Loja	3	3	2	1	1
	Zamora Chinchipe	18	11	5	2	2
2017	El Oro	2	2	2	2	2
	Loja	9	6	1	1	1
	Zamora Chinchipe	45	24	6	3	3
2018	El Oro	1	0	0	0	0
	Loja	35	15	4	2	2
	Zamora Chinchipe	88	37	10	2	2
2019	El Oro	1	0	0	0	0
	Loja	13	8	3	2	2
	Zamora Chinchipe	26	13	4	2	2
2020	El Oro	0	0	0	0	0
	Loja	4	3	1	1	1
	Zamora Chinchipe	7	6	3	3	3
<b>Total</b>		263	136	46	26	26

\*Fuente: Base de datos de notificación de enfermedades de Agrocalidad.

**Distribución de los aislados del virus de la rabia**

La tabla 2 resume la distribución geográfica de los 26 aislamientos del virus de rabia obtenidos en las provincias de Zamora Chinchipe, Loja y El Oro entre los años 2015 y 2020. Los resultados mostraron a Zamora Chinchipe como la provincia con el mayor número de casos, incluyendo 16 aislados a partir de las muestras del periodo de estudio. Zamora Chinchipe presentó condiciones geográficas y climáticas que favorecieron el desarrollo de murciélagos hematófagos, como *Desmodus rotundus*. Esto puede ser un elemento a favor de la presencia de



la enfermedad (Fornace et al., 2013; Meske et al., 2021). Por otra parte, en la provincia de Loja se obtuvieron ocho aislados, esta provincia presentó un incremento de casos notable en el año 2018. Este aumento podría estar relacionado con el fortalecimiento de las actividades agropecuarias en zonas rurales, lo que podría suponer un factor de exposición del ganado a los vectores del virus (Soler-Tovar y Escobar, 2025). En contraste, El Oro solo reportó dos casos aislados en 2017 y uno en cada uno de los años 2018 y 2019, lo cual indicó una menor incidencia.

Geográficamente, las coordenadas latitudinales y longitudinales revelaron una agrupación de casos en áreas rurales, donde las interacciones entre el ganado y los vectores del virus fueron más frecuentes debido a la ausencia de barreras físicas, prácticas tradicionales de manejo pecuario y cercanía con hábitats naturales (Nahata et al., 2021). Estos hallazgos subrayaron la necesidad de implementar estrategias de control enfocadas en estas regiones específicas y periodos de mayor incidencia, especialmente en Zamora Chinchipe, para mitigar el impacto de la rabia en las zonas endémicas.

**Tabla 2.** Aislamientos del virus de la rabia bovina de la zona 7 de Ecuador (2015-2020) con sus correspondientes coordenadas geográficas.

Aislado	Año	Mes	Provincia	Latitud	Longitud
Aislado 1	2015	Julio	Zamora Chinchipe	-4.55	-79.13
Aislado 2	2015	Marzo	Zamora Chinchipe	-3.89	-78.81
Aislado 3	2015	Septiembre	Zamora Chinchipe	-3.71	-78.73
Aislado 4	2015	Julio	Loja	-4.36	-79.39
Aislado 5	2015	Junio	Zamora Chinchipe	-4.03	-78.89
Aislado 6	2016	Febrero	Loja	-4.40	-79.51
Aislado 7	2016	Octubre	Zamora Chinchipe	-3.54	-78.66
Aislado 8	2016	Abril	Zamora Chinchipe	-4.02	-78.65
Aislado 9	2017	Septiembre	Zamora Chinchipe	-4.76	-79.05
Aislado 10	2017	Abril	Zamora Chinchipe	-3.80	-78.76
Aislado 11	2017	Octubre	Loja	-3.66	-79.38
Aislado 12	2017	Abril	Zamora Chinchipe	-3.90	-78.85
Aislado 13	2017	Marzo	El Oro	-3.65	-79.71
Aislado 14	2017	Septiembre	El Oro	-3.49	-79.77
Aislado 15	2018	Enero	Loja	-3.85	-79.19
Aislado 16	2018	Noviembre	Loja	-3.93	-79.21
Aislado 17	2018	Octubre	Zamora Chinchipe	-3.98	-79.02
Aislado 18	2018	Marzo	Zamora Chinchipe	-3.60	-78.93
Aislado 19	2019	Enero	Loja	-3.92	-79.23
Aislado 20	2019	Mayo	Loja	-4.41	-79.45
Aislado 21	2019	Abril	Zamora Chinchipe	-3.72	-78.80
Aislado 22	2019	Mayo	Zamora Chinchipe	-3.90	-78.83
Aislado 23	2020	Marzo	Zamora Chinchipe	-3.70	-78.71
Aislado 24	2020	Febrero	Zamora Chinchipe	-4.02	-78.82
Aislado 25	2020	Julio	Zamora Chinchipe	-3.60	-78.90
Aislado 26	2020	Agosto	Loja	-3.73	-79.26

**Nota:** Se enumeran los aislamientos por año, mes y ubicación, lo que proporciona una descripción general completa de las muestras virales recolectadas. La información sobre el lugar y la fecha de muestreo, correspondientes a la muerte del animal, se extrajo de la base de datos de notificación de enfermedades de la rabia de Agrocalidad.

## Identificación molecular

El análisis molecular de las 26 muestras de tejido cerebral bovino de las provincias de Zamora Chinchipe, Loja y El Oro correspondieron a la nucleoproteína del virus de rabia. Los resultados del BLAST mostraron un 98,48% de similitud con la secuencia de referencia del gen de la nucleoproteína del virus de la rabia, lo que confirmó el reconocimiento del agente infeccioso. Estos resultados coincidieron con estudios previos, en los que se observó un 98,75% de similitud entre variantes del virus de la rabia vinculadas con murciélagos europeos y detectadas en casos de rabia canina (Mantari et al., 2019). Esto destacó la necesidad de estudiar la evolución del virus en distintos hospedadores y áreas geográficas.

La similitud notable entre las secuencias sugirió que el virus tuvo un alto nivel de conservación genética en la zona analizada, lo cual podría ayudar a establecer estrategias de diagnóstico y control. Además, Mantari et al. (2019) han reportado que la variabilidad genética del virus tuvo el potencial de afectar la eficacia de las vacunas, así como la transmisión y la patogénesis, lo cual representa un factor relevante a considerar.

Además, la caracterización molecular permitió inferir rutas de transmisión específicas y patrones de dispersión del virus. En este contexto, las ligeras divergencias genéticas encontradas podrían estar asociadas con adaptaciones locales del virus a su hospedador principal o a las condiciones ecológicas de la zona (Cai et al., 2022; Li et al., 2023; Durrant et al., 2024). Esto reforzó la necesidad de realizar un monitoreo continuo del genoma viral para identificar cambios que pudieran comprometer los esfuerzos de vacunación y control en la región. Asimismo, los resultados obtenidos resaltaron la importancia de utilizar herramientas moleculares no solo para confirmar diagnósticos, sino también para avanzar en el entendimiento de la epidemiología y evolución del virus de la rabia en áreas endémicas (Manjunatha et al., 2023; Islam et al., 2025), alineándose con recomendaciones internacionales para el control de esta zoonosis.

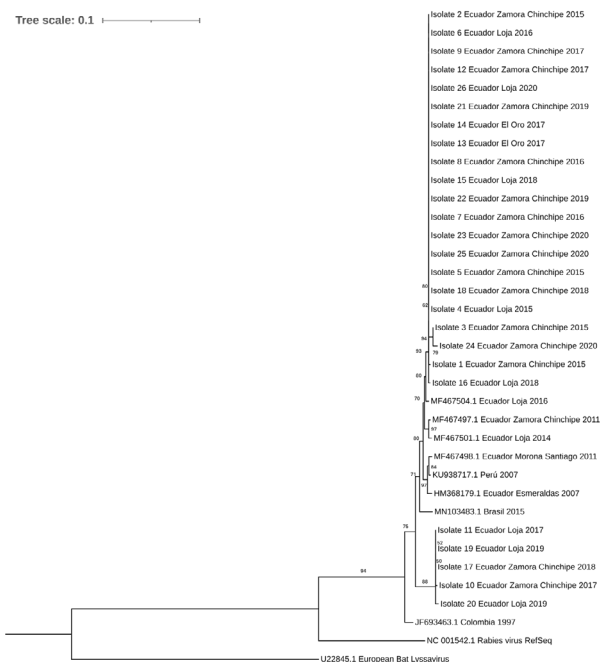
## Análisis filogenético

Mediante el análisis filogenético, se pudo observar las conexiones evolutivas que existían entre las secuencias de referencia internacionales y los aislados locales, además del genoma de referencia del virus de la rabia. El árbol filogenético (figura 2) reveló una agrupación nítida de los aislados ecuatorianos en múltiples clados claramente delimitados, lo cual se ve respaldado por los valores de bootstrap (bootstrap > 70 en los clados principales), que aseguraron la solidez de las relaciones filogenéticas.

Los aislados de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe tuvieron una fuerte relación con otros aislados en Ecuador que han sido caracterizados previamente, como los de Loja (MF467501.1 y MF467504.1) y Morona Santiago (MF467498.1). Además, se estableció una diferencia evidente con las secuencias de referencia a nivel internacional, como las de Brasil (MN103483.1) y Colombia (JF693463.1). Esto indicó que los linajes circulantes



en Ecuador han experimentado una evolución a nivel local, con un posible intercambio genético restringido entre los países vecinos.



**Figura 2.** Árbol filogenético del virus de la rabia basado en el gen de la nucleoproteína. El análisis incluyó 26 aislados de tejido cerebral bovino provenientes de la Zona 7 del Ecuador (provincias de Zamora Chinchipe, Loja y El Oro) recolectados entre 2015 y 2020, junto con secuencias de referencia de Ecuador, países vecinos (Perú, Colombia y Brasil) y el genoma de referencia del virus de la rabia. La secuencia del virus europeo de murciélago (European Bat Lyssavirus, U22845.1) se utilizó como outgroup.

Los aislados de Loja y Zamora Chinchipe se agruparon con secuencias históricas de Loja y Morona Santiago, lo que indicó una continuidad en la circulación de linajes específicos en estas regiones. Por otro lado, en otras zonas de América Latina se ha informado que la diversidad genética del virus de la rabia ha sido influenciada por las adaptaciones locales y por la interacción entre especies hospedadoras (Mantari et al., 2019; Meganck y Baric, 2021; Rupprecht et al., 2023). De acuerdo con Escobar et al. (2023), las variantes relacionadas con los murciélagos tuvieron una mayor estabilidad genética, lo que podría explicar la agrupación de los aislados ecuatorianos en clados bien definidos.

La agrupación de los aislados de Zamora Chinchipe y Loja en clados específicos sugirió que estas provincias fueron puntos

clave para la circulación y perpetuación del virus en la Zona 7. Esto puede estar asociado a factores ecológicos, como la alta actividad de murciélagos hematófagos (*D. rotundus*), y la proximidad entre granjas en estas regiones (Castelo-Branco et al., 2023; Briceño-Loaiza et al., 2024). En Ecuador existe una prevalencia de ataques de *D. rotundus* del 69% en granjas, mientras que en ataques bovinos se reporta una prevalencia del 24%. Además, se ha reportado que, del total de murciélagos capturados, el 93% han sido identificados como *D. rotundus*, y no se han encontrado infecciones por el virus de la rabia en el 30% de los ejemplares analizados (Orlando et al., 2019). Información que se considera útil para mejorar la vigilancia y el control de la transmisión de la rabia en la región.

Por otra parte, la diversidad más baja que se ha observado en los aislados de El Oro podría ser resultado de un contacto reducido entre las poblaciones de ganado y los vectores del virus, como sucede en áreas con una densidad inferior de murciélagos hematófagos o menos interacción con ecosistemas silvestres (Bárceñas-Reyes et al., 2019). Aunque los aislados ecuatorianos fueron muy parecidos, las diferencias genéticas entre clados pueden tener un impacto en la efectividad de las tácticas de vacunación que se basan en cepas particulares. Estos resultados enfatizaron en la importancia de fortalecer programas de la vigilancia molecular para la detección de variaciones genéticas que tengan el potencial de afectar la epidemiología del virus o poner en riesgo los programas de control vigentes.

**Conclusión**

El presente análisis ofrece una perspectiva completa acerca de la caracterización molecular y filogenética del virus de la rabia en bovinos localizados en la Zona 7 ecuatoriana, lo cual tiene un impacto significativo en términos de salud pública y del control de esta zoonosis. Se observa una mayor prevalencia y complejidad evolutiva en las provincias de Zamora Chinchipe y Loja, según los descubrimientos, que subrayan la diversidad genética del virus en las tres provincias: El Oro, Zamora Chinchipe y Loja.

El análisis filogenético muestra que las variantes en circulación en la Zona 7 están estrechamente relacionadas con las históricas de Ecuador, lo cual indica que el virus sigue circulando a nivel local siendo importante implementar medidas para controlar y vigilar a los murciélagos hematófagos como principales portadores de la enfermedad. Asimismo, la semejanza genética de los aislados con la secuencia de referencia global del virus de rabia, sumada a las discrepancias vistas entre clados, enfatiza la importancia de mantener un monitoreo molecular permanente para detectar posibles mutaciones que puedan tener un impacto en la efectividad de las vacunas y estrategias de vigilancia y control vigentes.

Zamora Chinchipe y Loja se perfilan como zonas fundamentales para la propagación del virus, mientras que El Oro tiene una incidencia más baja, posiblemente a causa de factores ecológicos y por el contacto con murciélagos hematófagos. Estos patrones de distribución geográfica resaltan la importancia de intensificar el monitoreo epidemiológico en Zamora Chinchipe y Loja, además de determinar los factores concretos que restringen la incidencia en El Oro. Asimismo, los datos adquiridos ayudan a comprender mejor la epidemiología de la rabia en el área, lo que brinda información fundamental para diseñar estrategias de control particulares.

El uso de cultivos celulares y el uso de pruebas moleculares son herramientas que contribuyen a una mejor comprensión de la epidemiología del virus en regiones endémicas. Los datos generados no solo fortalecen los esfuerzos nacionales para controlar la rabia en el ganado, sino que también brindan información valiosa para la creación de programas de vacunación eficaces centrados en puntos calientes.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de interés en la presente publicación en ninguna de sus fases.

#### Referencias bibliográficas

- Bárcenas-Reyes, I., Nieves-Martínez, D. P., Cuador-Gil, J. Q., Loza-Rubio, E., González-Ruiz, S., Cantó-Alarcón, G. J. and Milián-Suazo, F. (2019). Spatiotemporal analysis of rabies in cattle in central Mexico. *Geospatial Health*, 14(2). <https://doi.org/10.4081/gh.2019.805>
- Briceño-Loaiza, C. y Alegría-Morán, R. (2019). Distribución espacio-temporal de la rabia animal durante el periodo 2010 al 2018, en la provincia de Loja, Ecuador. *Revista Científica y de Opinión CRIALZH*, 2(1), 153-163.
- Briceño-Loaiza, C., Fernández-Sanhueza, B., Benavides-Silva, C., Jimenez, J. Y., Rubio, A. V., Ábalos, P. and Alegría-Morán, R. A. (2024). Spatial clusters, temporal behavior, and risk factors analysis of rabies in livestock in Ecuador. *Preventive Veterinary Medicine*, 226, 106188. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2024.106188>
- Cai, M., Liu, H., Jiang, F., Sun, Y., Wang, W., An, Y., Zhang, M., Li, X., Liu, D., Li, Y., Yu, Y., Huang, W. and Wang, Y. (2022). Analysis of the evolution, infectivity and antigenicity of circulating rabies virus strains. *Emerging Microbes & Infections*, 11(1), 1474-1487. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2078742>
- Cárdenas, V. M. (2022). *Áreas de riesgo futuro de dispersión del virus de la rabia con el uso de modelos de distribución de especies de murciélagos vectores*. Quito: UCE. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/28503>
- Castelo-Branco, D. S. C. M., Nobre, J. A., Souza, P. R. H., Diógenes, E. M., Guedes, G. M. M., Mesquita, F. P., Souza, P. F. N., Rocha, M. F. G., Sidrim, J. J. C., Cordeiro, R. A. and Montenegro, R. C. (2023). Role of Brazilian bats in the epidemiological cycle of potentially zoonotic pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 177, 106032. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106032>
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17(4), 540-552. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. (2011). *NOM-011-SSA2-2011 Para la prevención y control de la rabia humana y en los perros y gatos*.
- Claassen, D. D., Odendaal, L., Sabeta, C. T., Fosgate, G. T., Mohale, D. K., Williams, J. H. and Clift, S. J. (2023). Diagnostic sensitivity and specificity of immunohistochemistry for the detection of rabies virus in domestic and wild animals in South Africa. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 35(3), 236-245. <https://doi.org/10.1177/10406387231154537>
- Dettinger, L., Gigante, C. M., Sellard, M., Seiders, M., Patel, P., Orciari, L. A., Yager, P., Lute, J., Regec, A., Li, Y. and Xia, D. (2022). Detection of apparent early rabies infection by LN34 Pan-Lyssavirus Real-Time RT-PCR assay in Pennsylvania. *Viruses*, 14(9), 1845. <https://doi.org/10.3390/v14091845>
- Durrant, R., Cobbold, C. A., Brunner, K., Campbell, K., Dushoff, J., Ferguson, E. A., Jaswant, G., Lugelo, A., Lushasi, K., Sikana, L. and Hampson, K. (2024). Examining the molecular clock hypothesis for the contemporary evolution of the rabies virus. *PLOS Pathogens*, 20(11), e1012740. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012740>
- Escobar, L. E., Velasco-Villa, A., Satheshkumar, P. S., Nakazawa, Y. and Van de Vuurst, P. (2023). Revealing the complexity of vampire bat rabies" spillover transmission". *Infectious Diseases of Poverty*, 12(01), 102-110.
- Fernandes, M. E. S., Carnieli, P., Gregório, A. N. F., Kawai, J. G. C., Oliveira, R. N., Almeida, L. L., Rosa, J. C. A., Ferreira, J. C., Traverso, S. D., Roehle, P. M. and Batista, H. B. C. R. (2020). Phylogenetic analysis of rabies viruses isolated from cattle in southern Brazil. *Virus Genes*, 56(2), 209-216. <https://doi.org/10.1007/s11262-020-01730-y>
- Fornace, K., Liverani, M., Rushton, J. and Coker, R. (2013). Effects of land-use changes and agricultural practices on the emergence and reemergence of human viral diseases. *Viral infections and global change*, 133-149. <https://doi.org/10.1002/9781118297469.ch8>
- Harsha, P. K., Ranganayaki, S., Yale, G., Dey, G., Mangalparthi, K. K., Yarlagadda, A., Chandrasekhar Sagar, B. K., Mahadevan, A., Srinivas Bharath, M. M. and Mani, R. S. (2022). Mitochondrial dysfunction in rabies virus-



- infected human and canine brains. *Neurochemical Research*, 47(6), 1610-1636. <https://doi.org/10.1007/s11064-022-03556-6>
- Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., and Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 518-522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
- Holmes, E. C. and Harvey, E. H. (2023). *The diversity, evolution and emergence of rabies virus in the Americas. In history of rabies in the Americas: From the pre-columbian to the present, Vol. Insights to specific cross-cutting aspects of the disease in the Americas* (pp. 43-59). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-25052-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-031-25052-1_3)
- Islam, M. M., Naeem, A., Mshelbwala, P. P., Dutta, P., Hassan, M. M., K. Elfadl, A., Kodama, C., Zughair, S. M., Farag, E. and Bansal, D. (2025). Epidemiology, transmission dynamics, risk factors, and future directions of rabies in the Arabian Peninsula using one health approach: a review. *European Journal of Public Health*, 35(Supplement\_1), i14-i22. <https://doi.org/10.1093/eurpub/ckae164>
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A. and Jermini, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14(6), 587-589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Katoh, K. and Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple sequence alignment software Version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Khairullah, A., Kurniawan, S., Hasib, A., Silaen, O., Widodo, A., Effendi, M., Ramandinianto, S., Moses, I., Riwu, K. and Yanestria, S. (2023). Tracking lethal threat: In-depth review of rabies. *Open Veterinary Journal*, 13(11), 1385. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2023.v13.i11.1>
- Letunic, I. and Bork, P. (2024). Interactive tree of life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W78-W82. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae268>
- Li, G., Chen, X., Li, X., Liang, Y., Li, X., Liang, W., Yan, Z., Wang, Y., Wang, Y., Luo, J., Guo, X.-F. and Zhu, X.-T. (2023). Analyzing the evolution and host adaptation of the rabies virus from the perspective of codon usage Bias. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2023/4667253>
- Manjunatha, K. G., Chandrasaha, C., Akshay, S. D., Sannejal, A. D., Vittal, R., Kavitha, G., Goh, K. W., Isloor, S and Devegowda, D. (2023). Comprehensive update on rabies: A neglected zoonotic disease of public health concern. *Progress In Microbes & Molecular Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.36877/pmmb.a0000385>
- Mantari Torpoco, C. R., Berrocal Huallpa, A. M., Espinoza-Culupú, A. O. and López-Ingunza, R. L. (2019). Molecular characterization of the rabies virus' nucleoprotein in dogs from Arequipa, Peru. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 36(1), 46-53. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2019.361.3938>
- Markbordee, B., Cabic, A. G. B., Iamohbhar, N., Shiwa-Sudo, N., Kimitsuki, K., Espino, M. J. M., Nacion, L. B., Manalo, D. L., Inoue, S. and Park, C. H. (2024). Histopathological and immunohistochemical examination of the brains of rabid dogs in the Philippines. *Journal of Veterinary Medical Science*, 86(12), 0224-0249. <https://doi.org/10.1292/jvms.24-0249>
- Meganck, R. M. and Baric, R. S. (2021). Developing therapeutic approaches for twenty-first-century emerging infectious viral diseases. *Nature Medicine*, 27(3), 401-410. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01282-0>
- Meske, M., Fanelli, A., Rocha, F., Awada, L., Soto, P. C., Mapiitse, N. and Tizzani, P. (2021). Evolution of rabies in South America and inter-species dynamics (2009-2018). *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 6(2), 98. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed6020098>
- Nadal, D., Hampson, K., Lembo, T., Rodrigues, R., Vanak, A. T. and Cleaveland, S. (2022). Where rabies is not a disease. Bridging healthworlds to improve mutual understanding and prevention of rabies. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.867266>
- Nahata, K. D., Bollen, N., Gill, M. S., Layan, M., Bourhy, H., Dellicour, S. and Baele, G. (2021). On the use of phylogeographic inference to infer the dispersal history of rabies virus: a review study. *Viruses*, 13(8), 1628. <https://doi.org/10.3390/v13081628>
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A. and Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268-274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

- Omodo, M., Ar Gouilh, M., Mwiine, F. N., Okurut, A. R. A., Nantima, N., Namatovu, A., Nakanjako, M. F., Isingoma, E., Arinaitwe, E., Esau, M., Kyazze, S., Bahati, M., Mayanja, F., Bagonza, P., Urri, R. A., Lovincer, M. N., Nabatta, E., Kidega, E., Ayebazibwe, C., Nakanjako, G., Sserugga, J., Ndumu, D. B., Mwebw, R., Mugabi, K., Gonzalez, J.-P. and Sekamatte, M. (2020). Rabies in Uganda: rabies knowledge, attitude and practice and molecular characterization of circulating virus strains. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4934-y>
- Orlando, S. A., Panchana, V. F., Calderón, J. L., Muñoz, O. S., Campos, D. N., Torres-Lasso, P. R., Arcos, F. J. and Quentin, E. (2019). Risk factors associated with attacks of hematophagous bats (*Desmodus rotundus*) on cattle in Ecuador. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 19(6), 407-413. <https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2247>
- Ortiz, I., Burbano, A., Villarreal, V., Santiana, I., Vargas, J. y Vizcaíno Cabezas, D. (2017). Manual de procedimientos para la prevención y control de rabia bovina en Ecuador -Programa Nacional Sanitario de Prevención y Control de Rabia Bovina.
- Parija, S. C. (2023). Introduction to viruses. In: Textbook of microbiology and immunology (pp. 687-713). *Springer Nature Singapore*. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-3315-8\\_48](https://doi.org/10.1007/978-981-19-3315-8_48)
- Qin, S., Volokhov, D., Rodionova, E., Wirblich, C., Schnell, M. J., Chizhikov, V. and Dabrazhynetskaya, A. (2019). A new recombinant rabies virus expressing a green fluorescent protein: A novel and fast approach to quantify virus neutralizing antibodies. *Biologicals*, 59, 56-61. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.03.002>
- Rupprecht, C. E., Mshelbwala, P. P., Reeves, R. G. and Kuzmin, I. V. (2023). Rabies in a postpandemic world: resilient reservoirs, redoubtable riposte, recurrent roadblocks, and resolute recidivism. *Animal Diseases*, 3(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s44149-023-00078-8>
- Scheffer, K. C., Iamamoto, K., Asano, K. M., Mori, E., Estevez Garcia, A. I., Achkar, S. M. y Fahl, W. O. (2014). Murciélagos hematófagos como reservorios de la rabia. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31, 302-309.
- Schreiber, M. D. S. and Fachinnetto, J. M. (2022). Phylogenetic relationship of rabies virus (*Rabies lyssavirus*) in two different host species. Research Square, <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2207887/v1>
- Soler-Tovar, D. and Escobar, L. E. (2025). Rabies transmitted from vampires to cattle: An overview. *PloS one*, 20(1), e0317214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0317214>
- Talavera, G. and Castresana, J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology*, 56(4), 564-577. <https://doi.org/10.1080/10635150701472164>
- Vizcaíno Cabezas, D., Vargas Estrella, J., Yáñez Ortiz, I., Burbano Enríquez, A., Villarreal Benavides, V., Santiana Jara, I. y Espinosa Salme, C. (2016). *Manual de procedimientos para la prevención y control de rabia bovina en el Ecuador* (Issue 593).
- Wallace, R. M. and Muller, T. (2024). Challenges and opportunities for the next miles in global rabies control. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, Special Edition, 74-82. <https://doi.org/10.20506/rst.SE.3561>
- Wardhani, S. W., Wongsakul, B., Kasantikul, T., Piewbang, C. and Techangamsuwan, S. (2021). Molecular and pathological investigations of selected viral neuropathogens in rabies-negative brains of cats and dogs revealed neurotropism of carnivore Protospirivirus-1. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.710701>
- World Organization for Animal Health (WOAH). (2023). *Chapter 3.1.18 – Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses)*. [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/)

#### Declaración de contribución a la autoría según CRediT

**Jorge Rodrigo Espinoza Samaniego:** conceptualización, metodología, investigación, análisis formal, redacción-borrador original, redacción-revisión y edición. **Edilberto Chacón Marcheco:** conceptualización, metodología, análisis formal, redacción-borrador original, redacción-revisión y edición. **Luis Alfredo Mena Miño:** metodología, análisis formal, redacción-borrador original, redacción-revisión y edición. **Rubén Alexander Maldonado Orbe:** metodología, análisis formal, redacción-borrador original, redacción-revisión y edición.

