



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

IDENTIFICACION DEL VIRUS DE LA RABIA  
MEDIANTE LA TECNICA DE ANTICUERPOS  
FLUORESCENTES EN CORTES DE PIEL DE  
CANINOS INFECTADOS EN FORMA NATURAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLGO

P R E S E N T A :

PEDRO MEJIA SANCHEZ

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1987



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

I.-	INTRODUCCION .....	1
II.-	ANTECEDENTES .....	2
	2.1 Propiedades del virus .....	2
	2.2 Patogenia .....	3
	2.3 Historia clínica .....	5
	2.4 Naturaleza de las lesiones .....	6
	2.5 Distribución de lesiones en el SNC ....	9
	2.6 Diagnóstico .....	9
	2.7 Tratamiento .....	11
	2.8 Prevención .....	11
	2.9 Inmunización profiláctica .....	12
III.-	OBJETIVOS .....	13
IV.-	MATERIAL Y METODOS .....	17
	4.1 Material Biológico y su Preparación ..	17
	4.1.1 Conjugado .....	17
	4.1.2 Suspensión de cerebro de ratón normal (CNR) e infectado (CVS) .	20
	4.1.3 Tratamiento de la muestra (Téc-- nica directa de anticuerpos fluo rescentes) .....	21
	4.1.4 Material de laboratorio .....	23
	4.1.5 Soluciones y reactivos .....	24
V.-	RESULTADOS .....	27
VI.-	DISCUSION .....	33
VII.-	CONCLUSIONES .....	39
VIII.-	ANEXO .....	40
IX.-	BIBLIOGRAFIA .....	42

## I. INTRODUCCION

Existen pocas enfermedades que causan tanto temor como la rabia, debido a que todos los seres humanos pueden estar expuestos a ella, ya que, ésta es una enfermedad ---- infecciosa, aguda y mortal. Afecta principalmente al Sistema Nervioso Central (SNC), y por lo general, el virus entra al organismo por mordedura de un animal rabioso --- (31 y 34).

Los animales susceptibles a la rabia pertenecen a todas las especies de sangre caliente y muestran una sensibilidad bastante variada ante la infección, pudiendose diferenciar los muy sensibles; carnívoros de la fauna silvestre, gatos y bovinos; los medianamente sensibles, perros, caballos y primates; y los poco sensibles, el hombre (26).

La enfermedad y su carácter contagioso, así como el pe-ligro de la mordedura de los perros hidrófobos, eran con-cidos ya desde Aristóteles y Demócrito: pero hasta 1880 - se creía en la posibilidad de su desarrollo espontáneo, y se admitía que podría provocarla los alimentos demasiado calientes, la privación de agua para beber, la falta de - satisfacer el instinto de reproducción y las excitaciones nerviosas intensas. Celsus, describe una relación entre - la hidrofobia en el hombre y la rabia en los animales -- (3, 26, 50 y 61).

Pasteur, en 1884 fue el primero en modificar la patoge-nesidad del virus, haciendo una serie de pases intracerebrales en conejos y realiza en 1885, la primera vacuna---ción en el niño Joseph Maister, con un virus atenuado por la desecación de la médula espinal, durante 14 días y em-

pleando inyecciones en días sucesivos durante 15 a 20 --- días con el virus (3, 53 y 61). En 1903, Negri descubre - los cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, en células nerviosas de humanos y animales infectados con virus rábico (23 y 53).

En 1930, Hoyt y Jungeblis fueron los primeros en aislar el virus en ratones blancos, siendo hasta la fecha el método más comunmente usado para aislamiento de virus --- (27).

En 1960, Kaplan y colaboradores demostraron la presencia del antígeno rábico en células de riñon de "Hamster", mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes (19 y 38).

De acuerdo a las circunstancias actuales que existen - en México, el método de los anticuerpos fluorescentes es el recomendable para hacer el diagnóstico de rabia, corroborando con el diagnóstico de la identificación de cuerpos de inclusión de Negri y/o inoculación en ratones lactantes (21).

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 PROPIEDADES DEL VIRUS

El virus rábico, pertenece al grupo de los Rabdovirus, dentro de la familia Rabdoviridae, y la especie -- Lyssavirus. (17)

Son virus dotados de envoltura, con forma de bala y se caracteriza por un genoma de RNA de una sola cadena, presenta simetría helicoidal, cuya superficie está cubierta de proyecciones (peplómeros), de 75 a 80 nm de ancho - por unos 180 nm de largo, tiene la propiedad de hemaglutinar glóbulos rojos de ganso (28 y 39). Es sensible a los -- solventes de las grasas (solución de jabón, éter, cloro-- formo y acetona), a las temperaturas de pasteurización y

y a la luz ultravioleta, el etanol al 45-70%, a los preparados yodados y a los compuestos de amonio cuaternario -- (28 y 36); El ácido nucleico es fácilmente inactivado por la  $\beta$ -propiolactona. Resisten a la desecación, así como a la estabilidad relativa a un pH entre 3 y 11 (35).

Posee dos antígenos principales, uno interno de composición nucleoproteínica y otro de composición glicoproteínica sobre la envoltura (30).

Actualmente, se conocen dos tipos de cepas rábicas: -- una cepa denominada "Cepa de virus de calle", que es aislada en animales infectados naturalmente, y la cepa a la que pertenece el CVS (Challenge Virus Strain), llamadas - cepas fijas o de laboratorio, las cuales fueron adaptadas al tejido cerebral (3 y 35).

La enfermedad, se puede presentar en todos los climas y países del mundo, afectando a un gran número de especies animales. Siendo el perro, el animal con mayor incidencia en rabia. En nuestro país, en 1984, se reportaron 9 274 casos de rabia en perros, de un total de 10 346 casos reportados en diferentes tipos de animales. Como se puede observar en la gráfica No. 1 y 2, así como en la tabla No. 1. Se ha erradicado en algunos países como: Gran Bretaña, Australia y Japón (23, 30, 40, 41 y 49).

## 2.2 PATOGENIA

Las vías de entrada en el huésped afectado, son principalmente por mordida, a través de una solución de continuidad, aunque puede atravesar las membranas de las mucosas respiratorias y las del tubo digestivo (18), pero nunca transpasa la piel intacta. La transmisión aérea no es mecanismo común, aunque es posible en circunstancias excepcionales; por ejemplo, en las cuevas donde se alojan grandes cantidades de murciélagos portadores, en el labo-

ratorio al estar trabajando con cerebros de animales infectados con el virus de la rabia o al realizar los cortes de piel en dichos animales (12).

El virus tarda 15 minutos en penetrar en las células de los sistemas de cultivo tisular y después, ya no es posible neutralizar con el antisuero específico (37).

En el organismo, el virus se difunde en sentido centripeto, sobre todo por el sistema nervioso, pero también puede hacerlo por vía hemática cuando se inyectan grandes cantidades (15). El virus se multiplica en el músculo o tejido conjuntivo y se propaga a través del endoneurio de las células de Schwann o lemnocitos, hasta el Sistema Nervioso Central (SNC), en sentido centripeto, a una velocidad de 3 mm por hora. Al llegar al cerebro avanza a las glándulas salivales por la inervación, continuando por todos los nervios periféricos, de tal manera que el virus puede hallarse en SNC y periférico, como en otros tejidos (13, 29 y 33).

Entre las distintas cepas de virus rábico, se observa pronunciadas diferencias en cuanto a la capacidad infectante. Las cepas de laboratorio de virus fijo, que se usan en la producción de vacunas o en las distintas técnicas de investigación, poseen escasa patogenicidad cuando se inoculan en pequeñas dosis en animales de laboratorio, así como las demás especies de sangre caliente (35).

El virus de calle, en cambio, se debe manipular con precaución, sobre todo en presencia de saliva, la cual contiene gran cantidad de virus, siendo prudente considerar que toda herida contaminada con virus de calle, puede ser muy peligrosa (3 y 35).

El período de incubación que se define como, el tiempo que transcurre desde la penetración del virus rábico -

en el organismo humano o animal, hasta la aparición de -- los primeros signos de la enfermedad, es muy variable. De pende de la cantidad de virus que se inocula y del lugar del organismo en que se encuentre la puerta de entrada. - En el hombre es de 1 a 3 meses, en el perro de 3 a 8 sema nas, en el gato y bovino de 2 a 4 semanas y en el zorro - de 25 a 30 días. Estas diferencias entre el hombre y los animales dificultan el diagnóstico, lo que provoca el re- conocimiento detenido de los animales que hayan podido es tar expuestos al contagio (31 y 62).

### 2.3 HISTORIA CLINICA

Como podemos encontrar en las primeras referen--- cias de rabia canina, una de las manifestaciones clínicas de la enfermedad es el cambio de comportamiento. Se des cribe que el animal se torna "loco" y muerde al hombre -- causandole la enfermedad y posteriormente la muerte. Sin embargo, la fase furiosa no es la única forma clínica de presentación, ya que, clínicamente se reportan dos formas de presentación: la furiosa y la muda. La rabia furiosa - se refiere a los animales donde hay una fase de excita--- ción predominante y la rabia muda se refiere a aquella en que la fase excitativa es extremadamente corta o ausente y la enfermedad progresa rápidamente a una fase paráliti- ca (44).

El curso clínico de la enfermedad en perros puede dividirse en tres fases: en la fase prodrómica, que usual mente dura de dos a tres días, el animal muestra cambios en la conducta. Durante ésta fase puede haber fiebre lige ra, dilatación de pupilas y disminución ligera del reflejo corneal (29). Fase excitativa, usualmente dura de uno a siete días, es más fácilmente reconocible por sus signos agresivos típicos, sin embargo, en ocasiones llega a ser tan corta que no se observa. El perro rabioso en ésta fa-

se, se encuentra irritable, nervioso é inquieto. Responde exageradamente a los estímulos visuales y sonoros, observándose: excitabilidad, fotofobia e hiperestesia. Puede haber alotrofagia y tendencia a morder objetos fijos y móviles. En la mayoría de los casos hay dificultad para deglutir y cambios en el ladrído, debido a la parálisis de los músculos laríngeos y de la deglución, causando sialorrea. En los estados finales, se presentan convulsiones e incoordinación muscular, así como una mirada fija, distante y ausente (29 y 43). Si el animal no muere durante uno de los ataques convulsivos, entra en la fase paralítica, durante el cual la enfermedad progresa de una incoordinación muscular y una parálisis de todo el cuerpo, seguida de coma y muerte (29, 45 y 62).

El curso clínico de la enfermedad en general, incluyendo la fase prodrómica, tiene una duración de hasta diez días (45 y 62).

#### 2.4 NATURALEZA DE LAS LESIONES

La rabia puede causar la muerte con ausencia de cambios morfológicos y mínimos cambios histológicos. Los reportes indican que las lesiones más comunes se encuentran en el encéfalo y son sumamente variables, pudiendo ser muy sutiles e indiscernibles, a no ser por necrosis temprana de neuronas (57) o excesivamente severas con gran reacción celular (52).

En general, se ha descrito que el virus rábico -- produce: Polioencefalomielitis severa (24), encefalomielitis no supurativa (34 y 57) y meningoencefalomielitis aguda no supurativa (44 y 59).

## 2.4.1 ALTERACIONES EN VASOS SANGUINEOS

### a) Infiltración leucocitaria perivascular en encéfalo.

Se compone de varios tipos de células: -- linfocitos, neutrófilos. células plasmáticas, monocitos e histiocitos (52, 57 y 59). Se reporta que la infiltración --- leucocitaria perivascular se encuentra alrededor de pequeños vasos, principalmente arteriolas (52).

### b) Hemorragias

Puede observarse hemorragias anulares limitadas esencialmente a los espacios perivasculares, especialmente en los vasos con infiltración leucocitaria perivascular (52).

### c) Lesiones de la neuroglia

Gliosis: "Babes" fue el primer investigador que describió los acúmulos de células de la microglia (nódulos de Babes) (24, 34 y 59). los cuales son focos formados por células de la microglia que están fagocitando neuronas muertas o en fase de degeneración. Esta gliosis puede ser focal o difusa y consiste en la reacción con movilización y proliferación de células gliales alrededor de neuronas y/o de vasos sanguíneos afectados. Las reacciones -- gliales pueden variar considerablemente de tamaño y en cantidad (24, 34, 52 y 59).

### d) Lesiones en las neuronas

#### 1.- Satelitosis

Es un acúmulo de células gliales alrededor de las neuronas en fase de degeneración (24, 34 y 37). No se reporta la frecuencia con que puede observarse este

cambio.

## 2.- Neurofagia (Nódulos de Babes)

Como ya mencionamos, éste cambio consiste en la fagocitosis por parte de la microglia de neuronas muertas o degeneradas (57 y 59). Siendo uno de los cambios presentes, pero no muy comunmente reportados (52 y 60).

## 3.- Cromatolisis (tigrolisis)

Se reporta que las neuronas pueden -- mostrar ligeros cambios regresivos (picnosis y tigrolisis) los cuales pueden estar fuera de proporción en relación a la extensión e intensidad de la reacción inflamatoria ---- (24 y 52).

## 4.- Hipertrofia de las neurofibrillas --- neuronales.

Ramón y Cajal (51), reportan que es -- una lesión precoz constante y específica que se puede poner en evidencia utilizando tinciones de impregnación ar-- géntica.

## 5.- Cuerpos de inclusión intracitoplasmá-- ticos (Cuerpos de Negri)

Los cuerpos de Negri, son estructuras intracitoplásmicas eosinofílicas que muestran una estructu-- ra interna basófila y finamente granular. Se le observa -- principalmente en neuronas y ocasionalmente en células de la neuroglia (46 y 52). Estas inclusiones pueden estar en el cuerpo celular (pericarion) o en las prolongaciones neuro-- nales (neurópilo). El cuerpo de Negri corresponde al sitio de replicación viral dentro de las células.

Los cuerpos de Negri, pueden no encontrarse en muestras de animales sacrificados al inicio de los primeros signos y observados con microscópio óptico -- (34 y 57). En los casos confirmados de rabia, el porcentaje de encéfalos con cuerpos de Negri varía entre 66% y 93% (1).

#### e) Meningitis

Se ha reportado una leve meningitis en perros jóvenes con rabia (42 y 52). Los infiltrados submeningeos están compuestos de los mismos elementos celulares -- que se observan en los infiltrados perivasculares (linfocitos, macrófagos y ocasionalmente células plásmáticas) (52).

### 2.5 DISTRIBUCION DE LESIONES EN EL SNC

Se reporta que la distribución de lesiones en el -- SNC va a estar determinada por la vía de inoculación del -- virus rábico (24 y 47).

En general, se reporta que la sustancia gris es la más afectada, siendo los sitios más comunes: cerebro rostral (cerebro anterior) y cerebro medio; corteza cerebral e hipocampo, sustancia negra, núcleo rojo, la materia gris periacueductal, el globo pálido y el tálamo. Cerebro caudal (cerebro posterior): piso del cuarto ventrículo, puente y médula oblonga. Médula espinal: las astas ventrales y dorsales, siendo la reacción más marcada en las astas del lado correspondiente al de la mordida. Hipotálamo (24, 60 y 47).

### 2.6 DIAGNOSTICO

Debido a que los síntomas de la rabia son similares a los de otras encefalitis, es necesario realizar el diagnóstico mediante una técnica de laboratorio que ofrezca condiciones óptimas de precisión, rapidez y economía --

(63), apoyándose en un diagnóstico clínico donde se sitúen datos precisos de epizootiología, género de vida y destino del animal, duración de los síntomas, historia clínica, vacunación, antecedentes de mordedura, etc. Como es el caso de la investigación microscópica de los cuerpos de Negri - (Diagnóstico histopatológico), que consiste en el simple examen del tejido encefálico mediante la técnica de tinción de Sella (38). En la actualidad, la prueba más exacta rápida y sencilla para el diagnóstico de rabia es la de los anticuerpos fluorescentes, y consiste en marcar anticuerpos con un fluorocromo, durante la técnica, se deja que el anticuerpo marcado reaccione con el antígeno específico, posteriormente se observa el resultado de la reacción con microscopio de fluorescencia (20, 38 y 39). Esto se hace generalmente, con preparaciones de cerebro. Sin embargo, ésta prueba también se utiliza sobre preparaciones congeladas de piel, donde se detecta el antígeno rábico. Experiencias realizadas en ratones inoculados, con virus de origen bovino, felino o canino, demostraron la presencia del antígeno, que parece localizarse en los elementos neurales de la piel, el cual se manifiesta en la cara o en el cuello en los animales un día y ocasionalmente hasta cuatro días, antes de la aparición de los síntomas clínicos (4, 37 y 51).

La inoculación intracerebral al ratón lactante o de 21 días de edad (por su gran susceptibilidad seguida de la prueba de anticuerpos fluorescentes y de la investigación microscópica de los corpúsculos de Negri, en el tejido cerebral), sigue siendo una de las pruebas más utilizadas para el diagnóstico de la rabia en el laboratorio y se debe de emplear siempre que un animal sospechoso haya mordido a una persona y la prueba de anticuerpos fluorescentes haya sido negativa (33 y 35).

## 2.7 TRATAMIENTO

Una vez mordida la persona se lavará la herida con sumo cuidado y durante varios minutos, con sales de amonio cuaternario o detergente, si es una mordedura en la cabeza aplicar suero hiperinmune o gama-globulinas específicas al rededor de la herida (23, 29, 40 y 62). Los desinfectantes de amonio cuaternario a la dilución de 1:500, el alcohol al 45-70%, la solución de jabón al 1% y las soluciones de yodo al 5-7% inactivan al virus rábico en un minuto o menos (36). En el caso de los animales, no existe un tratamiento específico, una vez que se ha desarrollado la enfermedad - (23, 29, 40 y 62).

## 2.8 PREVENCIÓN

Desde la época de Pasteur, se han desarrollado diferentes productos biológicos (vacunas), como forma de prevención de la rabia. Actualmente, existen vacunas inactivadas y de virus vivo modificado elaborados tanto en animales, como en cultivo de tejidos. Entre ellas están; la vacuna Fuenzalida, elaborada en cerebro de ratón lactante e inactivada con rayos ultravioleta, y las vacunas de virus vivo modificado, elaboradas en cultivo de tejido con la cepa ERA, Phillips-Roxane y Acatlán (V-319). Además, existen las vacunas elaboradas en embrión de pollo y las vacunas elaboradas en embrión de pato. Las cepas Flury y Kelev de virus rábico adaptadas y modificadas en embrión de pollo, se utilizan para fabricar las vacunas antirrábicas -- destinadas a la inmunización profiláctica de los perros. -- Mientras que la vacuna antirrábica elaborada en embrión de pato, consiste en una preparación liofilizada que contiene tejido de embrión de pato y virus rábico inactivado con --  $\beta$ -propiolactona; la vacuna se prepara con la cepa Pietman Moore (PM) de virus rábico. Por otro lado, se preparan va-

cunas en células diploides humanas para una mejor protección del hombre. Esta se prepara, en cultivo tisular de células diploides humanas (cepa WI-38). Esta vacuna administrada en una sola inyección antes de la exposición al virus de calle, ha protegido a simios en experimentos repetidos (3, 26 y 47). Con las vacunas de tejido tisular se trata sobre todo de conseguir un producto más inocuo y mucho más inmunogénico que las vacunas antirrábicas hoy disponibles, lo que permitirá proteger mejor al hombre con una pauta de inmunización mucho más reducida. La edad recomendada para aplicar la vacuna en los animales es de 4 meses de edad y revacunación anual (11, 48 y 62).

## 2.9 INMUNIZACION PROFILACTICA

Las personas que trabajan con virus rábico en los laboratorios, los veterinarios, los criadores de perros, etc., deben estar protegidos mediante una inmunización preventiva consistente en tres inyecciones de una vacuna antirrábica de suficiente actividad antigénica. Las inyecciones se administran a intervalos de 5 a 7 días. Para comprobar la presencia de anticuerpos neutralizantes del virus, se tomará una muestra de suero, un mes después de administrada la última dosis; y se realizará la prueba de seroneutralización, para encontrar la concentración de anticuerpos. El título protector de la vacuna es 1:625, teniendo refuerzos a intervalos de uno a tres años (2 y 62).

### III. OBJETIVOS

1.- Identificar el virus rábico mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes en cortes de piel de caninos infectados en forma natural.

2.- Establecer una comparación entre los resultados -- del diagnóstico de inmunofluorescencia (anticuerpos fluorescentes) en los cortes de piel y tejido encefálico.

Tabla No.1.

- 14 -

## RABIA EN MEXICO POR ESTADOS EN DIFERENTES ESPECIES. 1984

ESTADO	PERRO	GATO	SILVESTRES	BOVINO*	HUMANO	TOTAL
Aguascalientes	47	3	6			56
Baja Calif. N.			3			3
Baja Calif. S.	31	1	8			40
Coahuila	356	17	24		2	399
Colima	10	3	3			16
Chiapas	187	2			3	192
Chihuahua	29		2			31
Distrito Federal	462	16	4			482
Durango	182	7	6			195
Guanajuato	1,165	11	26		3	1,205
Guerrero	359	2	14		8	383
Hidalgo	437	10	13		1	461
Jalisco	174	12	68			254
México	1,804	47	158		7	2,016
Michoacan	755	13	9		1	778
Morelos	273	9	9		5	296
Nayarit	61	4	5		2	72
Nuevo León	47	1	8			56
Oaxaca	101	2	2		5	110
Puebla	614	2	3		9	628
Querétaro	185	3	6		3	197
Quintana Roo	1					1
San Luis Potosí	178	26	16		3	223
Sinaloa	360	15	7		3	385
Sonora	76		5			81
Tabasco	207	4	4			215
Tamaulipas	154		2		3	159
Tlaxcala	281	1	2			284
Veracruz	377	6	8			391
Yucatán	202	5	4			211
Zacatecas	159		6			165
<b>T O T A L</b>	<b>9,274</b>	<b>222</b>	<b>431</b>	<b>361</b>	<b>58</b>	<b>10,345</b>

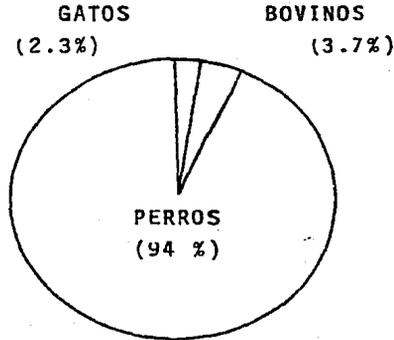
\*No se tienen los datos por Estados.

GRAFICA No. 1.

RABIA EN MEXICO - ANIMALES DOMESTICOS Y DE GRANJA

En 1984, México reportó un marcado incremento en el número de reportes de rabia en perros 9 274, - comparado con los 3 176, en 1983. El gran incremento de casos de rabia diagnosticados, en México en 1984, (de 3 487 casos a 10 346) corresponden - en gran parte a perros.

RABIA - MEXICO  
DOMESTICO Y DE GRANJA



GRAFICA No. 2.

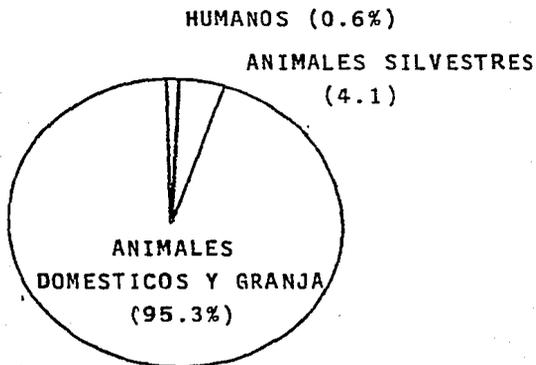
LA RABIA EN MEXICO -- SUMARIO

México, notificó 10 346 casos de rabia en 1984, un aumento marcado comparado con los 3 487 casos el año anterior. A diferencia con los Estados -- Unidos y Canadá, donde los animales silvestres -- representan el problema principal, la mayoría de los casos en México fueron perros.

Casos Notificados

Animales Silvestres	431
Animales Domésticos y de Granja	9 857
Humanos	<u>58</u>
TOTAL	10 346

LA RABIA - MEXICO



## IV. MATERIAL Y METODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO Y SU PREPARACION

#### 4.1.1 CONJUGADO

Parte I.- Se preparó en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), con jugado de anticuerpos fluorescentes para el diagnóstico de rabia específicamente, de la siguiente manera:

1.- El antisuero usado para producir conjugado, fue suero antirrábico de equino. Este es producido mediante la inoculación repetida, por vía muscular, de una suspensión de tejido cerebral de ratón (virus rábico fijo) de 21 días, el cual ha sido previamente inoculado de rabia.

2.- Se sangran los caballos, se obtiene el suero y se titula por seroneutralización en ratones lactantes, mediante la inoculación intracerebral (0.03-ml). Esto se hace para ver si tiene la seguridad requerida de anticuerpos.

3.- Sabiendo que se tiene un título adecuado de anticuerpo en el suero de 1:78 000. Se coloca - el suero en un vaso de precipitados a 4°C con una solución saturada de sulfato de amonio en relación 2:1, por espacio de 15 minutos.

4.- Dejar en agitación constante a 4°C durante 2 horas. El precipitado que se obtiene, tiene - todas las gama-globulinas con trazas de albúmina.

5.- Centrifugar a 3 000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

6.- Decantar el sobrenadante y disolver el precipitado en 15 ml de solución salina fosfatada (SSF)..

7.- Repetir los pasos anteriores con el precipitado por dos ocasiones.

8.- Centrifugar a 3 000 rpm durante diez minutos a 4°C.

9.- Decantar el sobrenadante y disolver el precipitado en 15 ml de buffer salino de boratos pH = 7.8.

10.- Transferir a un tubo de diálisis.

11.- Dializar en una solución de boratos salino en refrigeración (4°C), durante 24 horas, cambiando la solución salina frecuentemente (por lo menos cada 4 horas).

12.- Determinar si el dializado -- contiene sulfato de amonio cada dos o tres horas, después de un cambio de solución salina.

a) A una pequeña cantidad -- del dializado se le añade un volumen igual de cloruro de bario saturado.

b) Si aparece un precipitado se continúa la diálisis.

c) Si no aparece precipitado, la globulina es satisfactoria para la determinación de -- proteína y la conjugación.

13.- Se retira la globulina del tubo de diálisis y se centrifuga a 3 400 rpm, durante 15 minutos a 4°C, desechando el sedimento.

#### Parte II.- Determinación de proteína (44 y 58)

Se hacen diluciones dobles de -- las globulinas en solución buffer de fosfatos (PBS), 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, y se mide en el espectrofotómetro a 280 nm, utilizando como blanco solución salina. La determinación de la proteína se hace de acuerdo con la siguien-

te fórmula:

$$\text{mg de proteína/ml} = \frac{\text{Densidad óptica (D.O)} \times \text{Dilución}}{1.5}$$

o mediante la reacción de Biuret, trazando una curva patrón con albúmina y midiendo a 545 nm.

### Parte III.- Conjugación

1.- Ajustar a 10 mg de proteína/mililitro. Para ello, se necesita de 0.025 a 0.033 mg de isotiocianato de fluoresceína por miligramo de proteína.

2.- La conjugación se hace a 4°C agregando primero la proteína, después la solución salina, por último el amortiguador de carbonatos.

3.- Se dejan dos mililitros de buffer de carbonatos para diluir la fluoresceína. Esta, primero se disuelve con un mililitro de buffer de carbonatos y se agrega gota a gota a la proteína en el espacio de 15 minutos, en agitación constante. Al final se debe lavar el vaso de precipitados en el que se pasó la fluoresceína con el otro mililitro de buffer y se le agrega lentamente a la proteína.

4.- Dejar en agitación constante y lenta durante 24 horas a 4°C.

5.- Centrifugar a 3 400 rpm, durante 15 minutos a 4°C y eliminar precipitados.

6.- Pasar el conjugado a través de una columna de Sephadex G-25 en PBS, PH 7.2, el conjugado debe pasar en el espacio de 1½ a 2 horas. Recolectando en tubos viales de 3 ml eliminando los más diluidos a simple vista.

7.- El conjugado se pasa a un tubo de diálisis y se dializa en PBS pH = 7.2, en refrigeración (4°C) por espacio de 48 horas, realizando de 2 a 3 cambios durante 24 horas.

8.- Centrifugar a 3 400 rpm durante 15 minutos a 4°C, para eliminar bacterias y grumos.

9.- Añadir azida de sodio al -- 0.5%, para llegar a una concentración final de 0.025%, o merthiolate 1:10 000.

10.- Titulación del conjugado:

a) Se hacen diluciones dobles en PBS pH = 7.2.

b) Se mezcla por separado en suspensión de CVS y Cerebro Normal de Ratón (CNR), teniendo el antígeno y haciendo impresiones positivas con -- CVS o virus de calle (Técnica de Anticuerpos Fluorescentes).

c) Se dan grados de fluorescencia de +, ++ y +++, dependiendo de la intensidad de la misma, utilizando un conjugado de referencia.

d) Se considera el título del conjugado, la última dilución que da una brillantez de +++.

11.- Se realiza la dilución final del conjugado de acuerdo a lo obtenido anteriormente. El título adecuado y que se utilizó fue de 1:16.

12.- Se liofiliza y se almacena a -20°C.

#### 4.1.2 SUSPENSIÓN DE CEREBRO DE RATÓN NORMAL (CNR) E INFECTADO (CVS). (44).

Se hizo suspensión de cerebro de ratón normal y de ratones infectados con la cepa CVS (virus de rabia fijo). De la siguiente manera:

1.- Suspensión de Cerebro Normal de Ratón

a) Se colectan cerebros de ratón normal de 21 días.

b) Se pesan y se diluyen en un medio nutritivo BAPS al 20%. (ver anexo).

c) Se licua con un homogenizador.

d) Se guarda en viales con 0.8 ml y se congelan.

2.- Suspensión de Cerebro de Ratón Infectado.

a) Se prepara de la misma manera. Utilizando encéfalos de ratones jóvenes, inoculando 0.03 ml de una suspensión (1:100 al 1:1 000), de virus rábico fijo, de la cepa CVS con título de  $10^7$ .

b) Se colectan los cerebros cuando el ratón está moribundo.

c) Se pesan y diluyen en un medio nutritivo BAPS al 20%. (ver anexo)

d) Se licua con un homogenizador, se guardan en viales con 0.8 ml.

e) Se realizan diluciones desde  $10^2$  hasta  $10^7$ , inoculandolas en ratón de 21 días (Técnica de seroneutralización), para determinar el título. Título de aceptación  $10^7$ .

4.1.3 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA (TECNICA DIRECTA - DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES).

El material para estudio fue proporcionado por el Centro antirrábico de Culhuacán, D. F., de la Secretaría de Salud Pública. Se colectaron 57 muestras de perros, los cuales fallecieron con un cuadro clínico sugestible a rabia, de estos se tomaron cortes de piel de la región orbicular de los labios y de tejido cerebral.

A las muestras de piel se les realizó cortes de 5 micrómetros de grosor por congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ , a ni-

vel de folículo piloso, en forma transversal.

Posteriormente, se elaboraron impresiones de los cortes de piel y del tejido cerebral, por duplicado, a las cuales se les aplicó la técnica directa de anticuerpos fluorescentes:

1.- Después de realizar las impresiones por duplicado, se secan al aire.

2.- Se colocan en una cubeta de Coplin o en otro recipiente adecuado, se cubren con acetona fría, manteniéndolas 10 minutos en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

3.- Una vez fijadas se secan al aire.

4.- Las improntas se delimitan en el portaobjetos con un lápiz marcador.

5.- Una de las zonas del frotis por impresión delimitadas con el lápiz marcador, se tiñe, vertiendo encima una gota de conjugado diluido en suspensión de cerebro normal.

6.- La otra impresión se colorea de la misma manera con conjugado diluido en suspensión de encéfalo de ratón infectado.

7.- Los portaobjetos se colocan en una caja húmeda, mojando el papel que tiene la tapa.

8.- Se coloca en una estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 30 minutos. Con éste procedimiento, se obtiene humedad suficiente para que no se seque el conjugado.

9.- Se lavan las preparaciones, sumergiéndolas en solución salina amortiguadora de fosfatos  $\text{pH} = 7.4$  durante 5 minutos.

10.- Posteriormente, se enjuagan con agua destilada durante 5 minutos.

11.- Se secan al aire.

12.- Se observan las impresiones en un microscopio de fluorescencia. En este caso se utilizó un microscopio

cópio, marca Zeiss, con objetivo de 40/1.30 y un ocular - de 10X.

Una laminilla testigo, hecha con cerebro de - ratón infectado de virus callejero, preparada de la misma manera descrita anteriormente, se incluyó en cada grupo - de laminillas. Además, se incluyó un testigo negativo de corte de piel. Esquema No.1.

#### 4.1.4 MATERIAL DE LABORATORIO

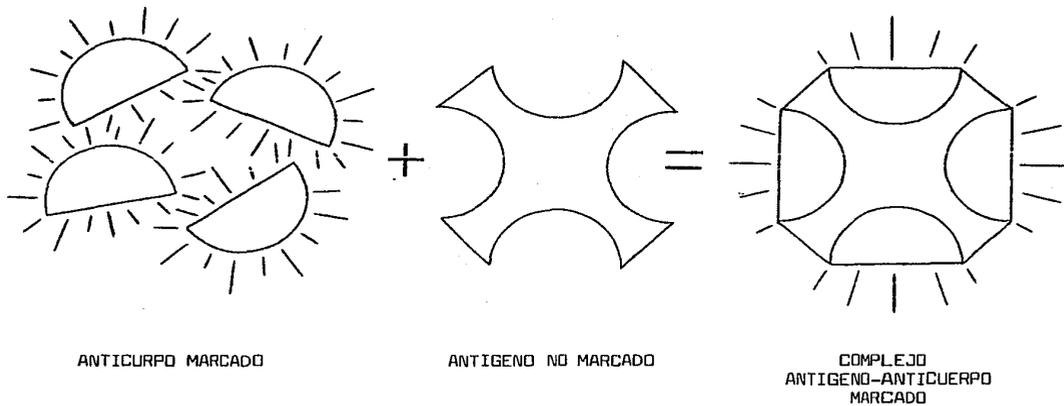
- 1.- Pipetas
- 2.- Tubos de ensaye
- 3.- Vasos de Copli
- 4.- Cajas de Petri
- 5.- Vasos de precipitado
- 6.- Mortero Ten Broek
- 7.- Tubo de diálisis
- 8.- Baño María
- 9.- Incubadora
- 10.- Microscópio de luz ultravioleta
- 11.- Ultracentrífuga
- 12.- Refrigerador
- 13.- Congelador
- 14.- Estuche de Necrópsias
- 15.- Columna de separación
- 16.- Balanza analítica
- 17.- Jeringas para insulina
- 18.- Portaobjetos
- 19.- Cámara húmeda
- 20.- Criostato (aparato para realizar cortes de piel)
- 21.- Espectrofotómetro

#### 4.1.5 SOLUCIONES Y REACTIVOS

- 1.- Acetona
- 2.- Agua destilada
- 3.- Solución saturada de sulfato de amonio  
pH = 8
- 4.- Cloruro de bario al 0.5%
- 5.- Azida de sodio al 0.5%
- 6.- Propilenglicol
- 7.- Sephadex G-25
- 8.- Solución de Cloruro de sodio al 0.85%
- 9.- Solución Buffer Fosfatos-Salino (PBS),  
pH = 7.2 y 7.6
- 10.- Solución amortiguadora de boratos salina  
pH = 7.8
- 11.- Solución amortiguadora de carbonatos  
pH = 9.5-9.8
- 12.- Solución fosfatada de albúmina bovina sé  
rica fracción V (BAPS)
- 13.- Reactivo Biuret
- 14.- Isotiocianato de Fluoresceína

ESQUEMA No. 1.

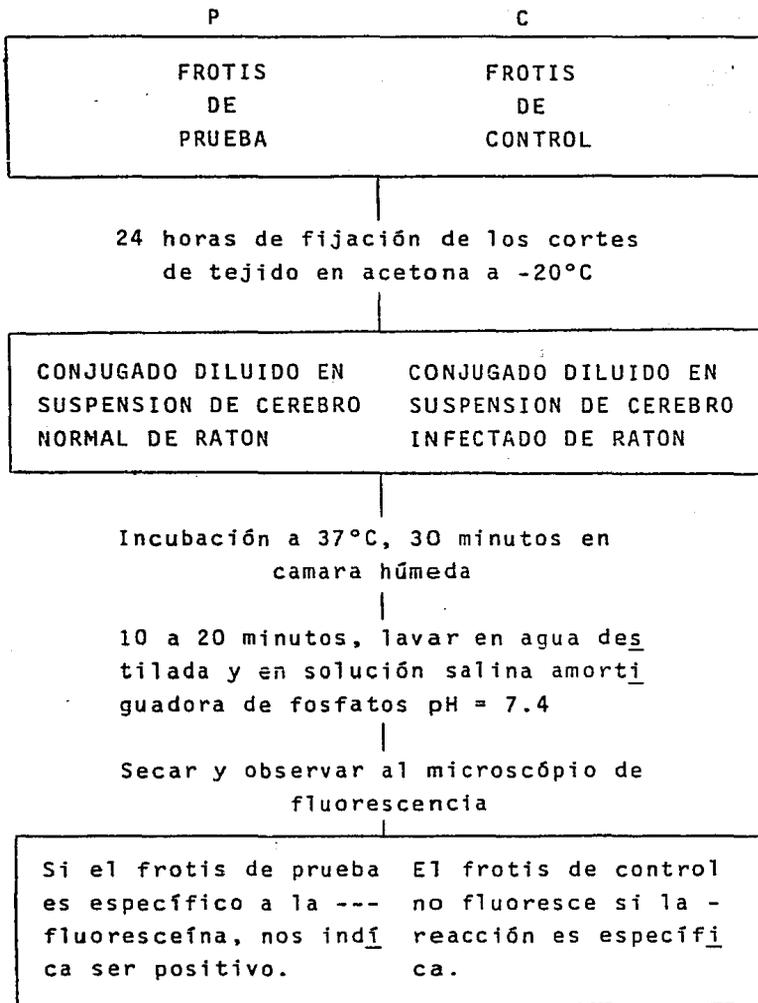
METODO DIRECTO DE OBSERVACION DEL ANTIGENO RABICO



Representación esquemática de la reacción entre el virus rábico no marcado (antígeno) y el anticuerpo marcado con fluoresceína, con formación de un complejo antígeno-anticuerpo marcado con fluoresceína.

ESQUEMA No. 2

PRUEBA DE LOS ANTICUERPOS  
FLUORESCENTES DE LA RABIA. METODO DIRECTO



## V. RESULTADOS

Se logró observar la unión antígeno-anticuerpo en las células de las impresiones que fueron hechas con tejido nervioso de la región orbicular de los labios, a nivel de folículo piloso y de tejido cerebral. Ver gráfica 3 y 4.

La unión antígeno-anticuerpo se logró identificar mediante la observación del tejido en forma de puntos muy brillantes de color verde; en el caso de las impresiones hechas a nivel de folículo piloso, se observó, además de los puntos brillantes, una coloración verde alrededor de la parte externa del folículo piloso. En otras ocasiones, también se observó una especie de polvo fino de la misma coloración, tomándolo como positivo.

De acuerdo con Coons (58), únicamente se podrá afirmar que el resultado es positivo, cuando se observa coloración en la impresión de prueba (P) y cuando no se le observa en la impresión de control (C). Ver esquema No. 2. Debido a que la suspensión de prueba, contiene únicamente cerebro de ratón normal, el anticuerpo antirrábico marcado, queda libre para colorear el antígeno de rabia si existe en el frotis. Mientras que la suspensión de control, contiene antígeno de rabia, lo cual indica que el anticuerpo antirrábico marcado estará absorbido y en consecuencia, no podrá colorear ningún virus rábico que pueda estar en el frotis presente. Por consiguiente, en éste frotis no deberá aparecer coloración alguna. Así, la prueba ofrece un medio de demostrar la especificidad de la coloración, ya que, ésta deberá ser inhibida por la presencia del antígeno de rabia en la dilución conjugada (C) y al examinar una laminilla testigo negativa.

Por otro lado, se deberá preparar una laminilla positi

va de control. Esta conteniendo frotis por impresión de tejido cerebral infectado de rabia y realizandole la técnica directa de anticuerpos fluorescentes. Observandola al mismo tiempo que las laminillas de nuestras muestras problema y el testigo negativo.

De los 57 casos trabajados, 57 resultaron positivos en las impresiones de tejido cerebral, o sea el 100%. Ver la tabla No. 2 y la gráfica No. 4.

En los cortes de piel, 47 fueron positivos al virus de la rabia, ver gráfica No. 3, siendo un 83% el promedio total de casos positivos en las impresiones de piel, ver gráfica No. 4. Teniendo un total de 10 casos que se observaron negativos en los cortes de piel. Ver tabla No. 2.

TABLA No. 2

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL DIAGNOSTICO DE RABIA EN LOS --  
CORTES DE PIEL Y TEJIDO CEREBRAL. TECNICA DIRECTA DE ANTI  
CUERPOS FLUORESCENTES.

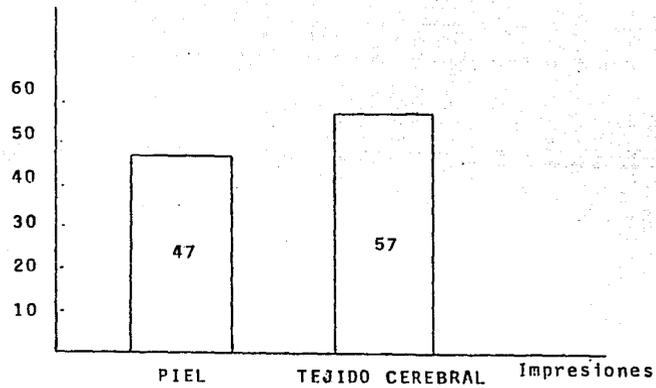
ANIMAL	TEJIDO CEREBRAL	CORTES DE PIEL
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	+	+
10	+	+
11	+	+
12	+	+
13	+	+
14	+	-
15	+	+
16	+	-
17	+	+
18	+	+
19	+	+
20	+	+
21	+	+
22	+	+
23		+
24	+	+
25	+	+
26	+	-
27	+	+

Continua --

ANIMAL	TEJIDO CEREBRAL	CORTES DE PIEL
28	+	+
29	+	+
30	+	+
31	+	+
32	+	+
33	+	+
34	+	+
35	+	+
36	+	+
37	+	+
38	+	+
39	+	+
40	+	+
41	+	-
42	+	+
43	+	+
44	+	-
45	+	-
46	+	+
47	+	+
48	+	-
49	+	+
50	+	+
51	+	+
52	+	-
53	+	+
54	+	-
55	+	+
56	+	-
57	+	+
TOTAL	57 (+)	47 (+)
	0 (-)	10 (-)

GRAFICA No. 3.

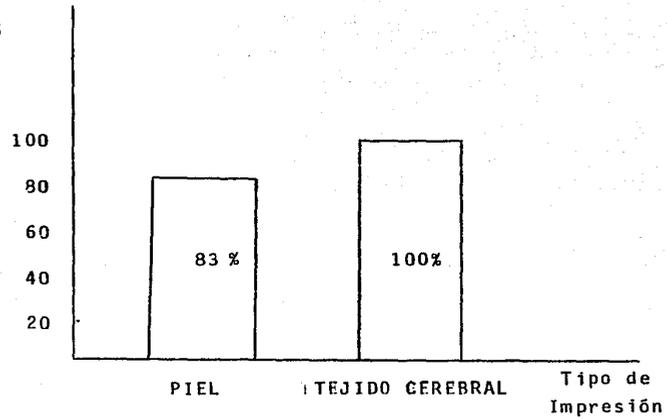
NUMERO DE CASOS  
POSITIVOS A  
RABIA



Número de casos positivos al virus de la rabia en los cortes de piel y tejido cerebral.

GRAFICA No. 4.

PORCIENTO DE CASOS  
POSITIVOS A RABIA



Porcentaje de casos positivos al virus de la rabia observados en la prueba de anticuerpos fluorescentes, en los cortes de piel y tejido cerebral.

## VI. DISCUSION

La aplicación de la técnica de anticuerpos fluorescentes ha permitido encontrar antígeno, es decir, virus en tejidos donde no se ha señalado su presencia.

En la microscopía fluorescente de las laminillas del tejido cerebral; de los 57 casos trabajados, el 100% resultó positivo al virus de la rabia. Ver tabla No. 2.

La detección del virus de la rabia en biopsias de piel indica que el estudio es muy factible para el diagnóstico de rabia. De los 57 casos analizados, 47 resultaron ser positivos al virus de la rabia por la técnica de anticuerpos fluorescentes. Siendo un 83%, el promedio total de casos positivos en piel. Ver gráfica No. 4.

Estos resultados obtenidos, son similares a los encontrados por otros investigadores, como Coons (58), al realizar el diagnóstico de rabia por inmunofluorescencia en impresiones de tejido cerebral, y Blendin (4 y 7), al trabajar con secciones congeladas de piel de ratones y zorros. Encontraron que el diagnóstico de rabia en tejido cerebral tiene una confiabilidad de casi el 100%. Mientras que en los cortes de piel se obtuvo un 100% de positividad en ratones que fueron inoculados por vía intracerebral con cepas de diferentes animales. Ver tabla No. 3. Y un 90.4% y 94% respectivamente, de dos experimentos realizados en cortes de piel de zorros. Ver tabla No. 3 y 4. Todo esto se hizo en animales que manifestaron los síntomas de la enfermedad.

El no haber tenido mayor eficiencia en nuestras muestras de piel, pudo deberse a que el virus no se encontra-

ba distribuido sobre la zona de la piel.

En algunas muestras de biopsia de piel, las cuales se habian diagnosticado como positivas en tejido cerebral, - unicamente se encontraron pequeñas cantidades de material fluorescente. Esto parece indicar que el virus no estaba distribuido uniformemente en el tejido nervioso de la --- piel, y que puede estar presente en grandes concentra---- ciones en un área y ausente en otras. Esto fue demostrado por el hecho de que algunas veces las laminillas de una - área de los cortes de piel a nivel de folículo piloso, -- mostró poco o ninguna coloración, mientras que la otra la minilla hecha de otra región de la misma muestra de piel, mostró considerable cantidad de antígenos presentes.

Sin embargo, los resultados nos indican que el antígeno de virus rábico, es factible de identificar en los cor tes de piel, lo que en consecuencia, nos dá una alternati va de diagnóstico en los casos en que el tejido cerebral se encuentre en descomposición. O simplemente, cuando el tejido no pueda utilizarse para el diagnóstico de rabia. Además, se puede identificar el antígeno viral, cuando el animal esté manifestando los síntomas de la enfermedad.

La técnica de anticuerpos fluorescentes tiene la venta ja de proporcionar un resultado rápido y específico. El - tiempo que se requiere para el examen de cualquier lamini lla, es mas o menos de 3 horas y si se tiene destreza, en un tiempo más corto. También, es más breve cuando el ---- virus está presente en las zonas nerviosas de la piel, -- pues el resultado se puede dar después de ver algunos cam pos. Esta rapidez de tiempo, que se logra por el método, - de anticuerpos fluorescentes, no la tiene ningún otro mé- todo de diagnóstico.

A pesar de la sencillez propia de la prueba de anti---

cuerpos fluorescentes, sus resultados dependen, en gran parte, del grado de exactitud con que se hayan llevado, y muchas veces, ésta prueba puede fallar por falta de experiencia del operador o porque el virus haya sido inactivado en su traslado para la prueba de diagnóstico, sino se guardan las debidas precauciones. Para ello, es de suma importancia complementar el diagnóstico de rabia con las demás técnicas que existen, como la prueba biológica, los Corpúsculos de Negri, las impresiones de córnea, etc. Ver gráfica No. 5. Y así, combatir la enfermedad más rápidamente al realizar un diagnóstico adecuado, tratando de -- eliminar el alto porcentaje de rabia en México, principalmente causada por perros y en un momento dado intentar -- erradicarla. Ver tabla No. 1 y gráfica No. 1 y 2.

TABLA No. 3

RESULTADOS OBTENIDOS POR BLENDEN DE LA TECNICA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES EN SECCIONES CONGELADAS DE PIEL E IMPRONTAS DE CEREBRO, EN RATONES INOCULADOS INTRACEREBRALMENTE CON VIRUS - RABICO Y QUE MANIFESTARON SIGNOS CLINICOS.

ORIGEN DEL VIRUS	PROPORCION DE RESULTADOS POSITIVOS	
	TECNICA DIRECTA DE A. F. EN PIEL	TECNICA DIRECTA DE A. F. EN CEREBRO
Bovino	6/6	6/6
Felino	7/7	7/7
Canino	9/9	9/9

100% de efectividad en cortes de piel.

TABLA No. 4

EXAMEN DE LOS RESULTADOS DE BLENDEN POR INMUNOFLUORESCENCIA  
EN CORTES DE PIEL E IMPRESIONES DE TEJIDO CEREBRAL EN ZORROS

PRIMER EXPERIMENTO

MUESTRA	No. DE CASOS POSITIVOS	No. DE CASOS NEGATIVOS	TOTAL DE CASOS
Cerebro	225	0	225
Piel	212	13	225

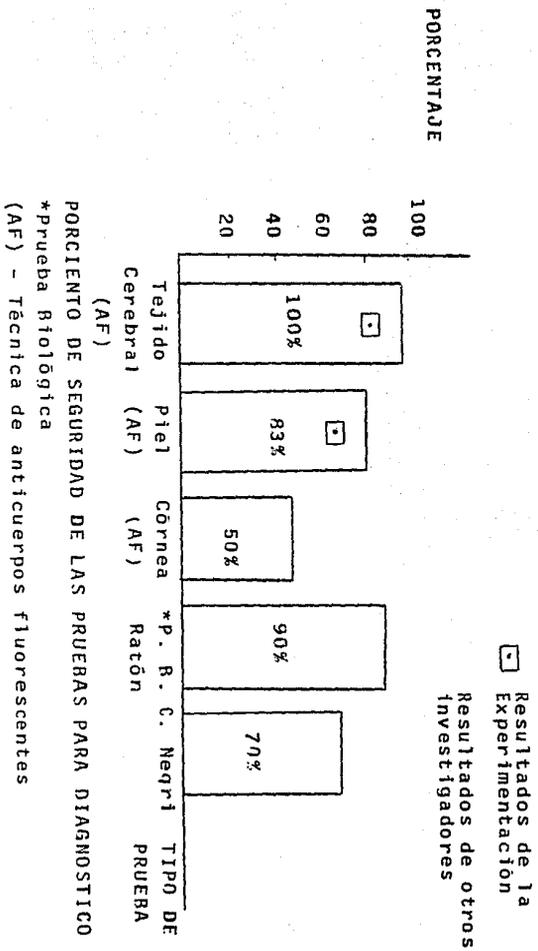
94% de efectividad en cortes de piel.

SEGUNDO EXPERIMENTO

MUESTRA	No. DE CASOS POSITIVOS	No. DE CASOS NEGATIVOS	TOTAL DE CASOS
Cerebro	135	0	135
Piel	122	13	135

90.4% de efectividad en cortes de piel.

GRAFICA No. 5.



## VII. CONCLUSIONES

1.- Se logró identificar el virus rábico mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes en cortes de piel de caninos infectados en forma natural.

2.- De los 57 casos trabajados; el 100% resultó ser positivo al virus de la rabia en tejido cerebral y el 83% en los cortes de piel.

3.- El identificar el virus rábico en los cortes de piel, nos da una alternativa de diagnóstico en los casos en que no se pueda utilizar el tejido cerebral, complementándolo con los demás métodos de diagnóstico.

4.- Es factible, aplicar la técnica en cortes de piel de animales vivos que ya manifiesten los síntomas de la enfermedad.

## VIII. ANEXO

### PREPARACION DE REACTIVOS

#### 1.- SOLUCION SALINA FISIOLÓGICA (0.85%)

Cloruro de sodio ..... 8.5 g  
Agua destilada ..... 1 000 ml

#### 2.- AMORTIGUADOR DE BORATOS pH = 7.8

Acido bórico ..... 6.184 g  
Tetraborato de sodio .. 9.536 g  
Cloruro de sodio ..... 4.384 g  
Agua destilada ..... 1 000 ml

#### 3.- SOLUCION AMORTIGUADORA SALINA DE BORATOS

Solución salina fisiológica al 0.85%.. 95 partes  
Solución amortiguadora de boratos ... 5 partes

#### 4.- AMORTIGUADOR DE FOSFATOS SALINO (PBS)

Preparar 18 litros de solución salina al 0.85%  
Agregar a esos 18 litros de solución salina --  
4.08 g de fosfato monopotásico anhidro y ----  
26.2 g de fosfato dipotásico anhidro.

#### 5.- SOLUCION NEUTRA SATURADA DE SULFATO DE AMONIO

Sulfato de amonio ..... 78 g  
Agua destilada ..... 100 ml  
Ajustar a pH = 7 con hidróxido de sodio 0.1 N  
a temperatura ambiente.

#### 6.- CLORURO DE BARIO (0.5%)

Cloruro de bario ..... 0.5 g  
Agua destilada ..... 100 ml

- 7.- AZIDA DE SODIO (0.5%)  
Azida de sodio ..... 0.5 g  
Agua destilada ..... 100 ml
- 8.- AMORTIGUADOR DE CARBONATOS pH = 9.5-9.8  
Bicarbonato de sodio ... 2.1 g  
Carbonato de sodio ..... 2.65 g  
Agua destilada cbp ..... 100 ml
- 9.- SOLUCION ESTANDAR DE ALBUMINA BOVINA F-V  
Albúmina bovina ..... 10 mg  
Agua destilada ..... 1 000 ml
- 10.- SOLUCION DE ALBUMINA BOVINA FOSFATADA (BAPS)  
Preparar un litro de PBS (ver hoja anterior)  
Disolver 5 ml de antibióticos (1560 UI de es--  
treptomicina por mililitro más 500 UI de penicilina  
por mililitro) en 900 ml de PBS.  
Agregar 100 ml de albúmina bovina Fracción V -  
al 7.5% (previamente filtrada por membrana de  
0.22 micras).
- 11.- REACTIVO DE BIURET  
Sulfato de cobre pentahidratado..... 1.5 g  
Tartrato doble de sodio y potasio .. 6.0 g  
Hidróxido de sodio al 10% ..... 300 ml  
Agua destilada cbp ..... 1 000 ml

## IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Atanasiu, P: Animal Inoculation and the Negri body. The Natural History, 396-397, (1976).
- 2.- Atanasiu, P: Datos nuevos sobre la prevención contra la rabia humana antes y después de la exposición. --- Salud Pública de México, 21, 3: 331-340, (1979).
- 3.- Avila, David: Estudio de la patogénia de la rabia en perros infectados naturalmente. Tesis FMVZ. Universidad de Guadalajara, (1982).
- 4.- Blenden, D. C.: Identification of rabies virus antigen in the skin of foxes. Abl. Vet. Med. B, 27, 698--704, (1980).
- 5.- Blenden,, D. C.: Rabies in the Domestic Cat. Veterinary Medicine. 56, 9, 339-341, (1980).
- 6.- Blenden, D. C.: Rabies information exchange No. 2. - Recovery of a dog, from an experimental infection, -- (1980).
- 7.- Blenden, D. C.: Immunofluorescent staining for rabies antigen in the skin of infected animals. Nigerian Veterinary Journal. 29, 2. 33-39, (1980).
- 8.- Blenden, D. C.: The effect of post-exposure treatment on detection of rabies antigen in the skin of mice -- experimentally inoculated with street and fixes ---- strains of rabies virus. Nigerian Veterinary Journal. 9, 2, 43-46, (1980).
- 9.- Blenden, D. C.: Diagnosis of rabies by immunofluorescent staining of frozen sections of skin. JAVMA. 161,

- 11, 1495-1501, (1980).
- 10.- Blenden, D. C: Non fatal rabies in the dog. JAVMA, -  
179, 3 265, (1981).
- 11.- Blenden, D. C.: Rabies in a litter of skunks predic-  
ted and diagnosed by skin biopsy. JAVMA, 179, 8, --  
789-791, (1980).
- 12.- Constantine, D. G.: Rabies transmission by nonbite  
route. Publ. Hlth. Rep., 77, 287, (1962).
- 13.- Constantine, D. G.: Transmission experimental bat,  
rabies. Responses of certain carnivora to rabies vi-  
rus isolated from infected by the nonbite route. ---  
A. J. Vet. Res. 27, 13, 15, (1966).
- 14.- Coulon, P. et al.: Molecular basis of rabies virus -  
virulence. II identification of a site on the CVS --  
glycoprotein associated with virulence J. Gen. Virol  
64, 693-696, (1983).
- 15.- Dean, D. J.: Rabies, Bull. Org. Mond. Santé-Bull. --  
World Health Organ. 29, 803, (1976).
- 16.- Doolittle, R. F. et al.: Homology Between the glyco-  
proteins of vesicular stomatitis virus and rabies vi-  
rus. J. Virol., 43, 4, 361-364, (1982).
- 17.- Fenner, D.: Clasificación et nomenclature des viru--  
ses. Annual of Microbiology (Ins. Pasteur), 123, 323  
332, (1976).
- 18.- Fischman, H. R. and Wards, F. E.: Epidemiology of ra-  
bies. Amer. J. Epidem. 88, 132, (1968).
- 19.- Fundenberg, Hugh, et al.: Inmunología Clínica. Ma---  
nual Moderno, México, (1982).

- 20.- Goldwasser, R. A., Kissling, R. E.: Fluorescent antibody technique for rabies diagnosis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 219-223, (1958).
- 21.- Goldwasser, R. A., Kissling, R. E.: Fluorescent antibody staining of rabies virus antigens in the salivary glands of rabid animals. Bull. World Health Organ 20, 579-588, (1959).
- 22.- González, S. D.: Diagnóstico de rabia. Boletín de Información Pecuaria, 1, 15, 1-4, (1980).
- 23.- Hagan, W. A.: Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. Prensa Médica Mexicana, 1, 689-705, (1975).
- 24.- Hearnar, J. E. and pierce, M.: Bram abscess in a dog Vet. Med. Small An. Clin. 71, 785-793, (1976).
- 25.- Holloway, Brian P. et al.: Nucleotide sequence and most 1a protein intection of rabies leader DNA, --- J. Virol. 50, 3; 777-778, (1984)
- 26.- Horstall, Frank et al.: Viral and Rickettsial infections of man. Lippincot Company. USA, (1965).
- 27.- Hoyt, A. and Jungeblut, C. W.: Experimental rabies - in white mice and attempted Chemotheraby. J. Infect. Dis. 47, 418, (1930).
- 28.- Hummeler, K. and Koprowski, H. Investigating the rabies virus. Nature. (lond.), 221; 418, (1969).
- 29.- Hutyra, Marek et al.: Patología y Terapèutica especial de los animales domésticos. Labor, Mèxico,(1980)
- 30.- Jawetz, E. et al.: Manual de Microbiología Médica. Manual Moderno, Mèxico; 689-703, (1973).

- 31.- Johnson, H. N.: The virus neutralization index test in mice, Chpter 8 in laboratory technique in rabies. World Health Organization. 23, 3rd. Edition, Switzerland; 94-97, (1973).
- 32.- Johnson, P.: Enhancement of Fluorescent Antibody --- Staining of viral antigens in formalin-fixes ti-----ssues by tripsyn digestion. J. Inf. Dis., 140, 5; --- 758-764, (1979).
- 33.- Joyce Blanck I.: El maravilloso mundo de los perros. ED. Porrúa. México, 1-38, (1974).
- 34.- Jubb, K. and Kennedy, P. C.: Patología de los animales domésticos. 1a. Edición. Ed. Labor, Barcelona, - España, 485-493, (1973).
- 35.- Kaplan, Martín et al.: Técnicas de Laboratorio. OMS (Organización Mundial de la Salud). Suiza, (1976).
- 36.- Kaplan, M., and Koprowski, H.: Técnicas de Laboratorio. Bull. Org. Mond. Santé-Bull. OMS (Wld. Hlth --d Org), 34; 293, (1966).
- 37.- Kaplan, M. et al.: Effect of Polyions on the Infectivity of Rabies Virus in Tissue Culture; Construction of a Single-Cycle Growth curve. J. Virol., 1, 145, - (1967).
- 38.- Kaplan, M.: Demostration of rabies virus in Tissue -- culture. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98, 223, (1960).
- 39.- Kawai, A. et al.: Production of spikeless particles of the rabies virus under conditions of low pH. ---- Virology. 108, 2; 267-276, (1981).
- 40.- Kennelt Quist.: Zoonosis relacionadas a perros y ga-

- tos. Cuadriservicio de Purina. Vol. 4, 2-4, (1980).
- 41.- Koprowsky, H.: Latent or dormant viral infection. Am. N. Y. Academic. Scientific, 54, 962-976, (1952).
- 42.- Lewis, V. et al.: Limitations of deteriorated tissue rabies diagnosis. Health Laboratory Science., 11, 1, - 8-12, (1974).
- 43.- Lopez, B. y Hernández, E.: Pruebas de potencia para vacunas antirrábicas de virus vivo modificado de origen de cultivo celular. Tec. Pec. México. 29, 105, (1975).
- 44.- Lépine, P.: Diagnóstico histopatológico, La rabia. Técnica de laboratorio. Editado por Kaplan, M. y Koprowski, H., 58-66, 3a. Ed. OMS, Ginebra, (1976).
- 45.- Malaga, H. et al.: Epidemiología de la rabia canina. - Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. OMS, --- Washington, EUA, 405-413, (1976).
- 46.- Matsumoto, S. Electron Microscopy of Central Nervous System Infection. The Natural History Rabies, Edited by Baer, G., 217-233. Academic. Press. London-New York (1975).
- 47.- Murphy, F. A.: Morphogenesis of Rabies virus. The ---- Natural History of Rabies, Edited by Baer, G., 45-59. Academic. Press. London-New York, (1975).
- 48.- National Association of State Public Health Veterinarians. Comedium of Animal rabies vaccine. JAVMA, 184, 1, 14-17, (1984).
- 49.- Noguera: Los perros, Ed. Noguera, S. A. Barcelona, 274-286, (1970).
- 50.- OMS-OPS: Centro Panamericano de Zoonosis. Primer Semi-

nario sobre rabia para las Américas. Argentina, (1967).

- 51.- Percy, D. H. et al.: Pathogenesis of canine herpesvirus encephalitis. Am. J. Vet. Res. 31; 1, 145-156, --- (1970),
- 52.- Perl, D. P.: The Pathology of rabies in the Central -- Nervous System, The Natural History of Rabies. Edited by Baer G. 235-269. Academica. Press, New York- London (1975).
- 53.- Prier, James: Basical Medical Virology. Williams and - Wilkins Company. USA. (1966).
- 54.- Reid, Frances et al: Increased immunofluorescent ----- staining of rabies infected formalin fixes brain ti--- ssue after pepsin and tripsyn digestion. J. Clin. Mic. 18, 4, 968-971, (1983)
- 55.- Rossette, R.: Bat rabies in Alberta (1972-1982). Can. Vet. Journal. 26, 2; 242-244, (1985).
- 56.- Rossette, R.: Clinical observations on rabies in domes- tic animals, report of 144 cases. Chinesse Journal of Vet. Med. 83, 9; 2, (1985).
- 57.- Smith, H. A., Jones, T. C. and Hunt, R. D.: Veterinary Pathology, 4th Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, 353-356, (1972)..
- 58.- Técnicas de Anticuerpos Fluorescentes. Procedimiento - para la conjugación de globulina con isotiocianato de fluoresceína, Técnica 4-6. Organización Panamericana - de la Salud. (1962).

- 59.- Thiery, G.: Histopathologie de la rage chez diverses -  
especies animales de l'ouest africain. Rev. Elev. Med.  
Vet. Paytrop. 13; 259-278, (1960).
- 60.- Tierkel, E. S.: Canine Rabies. The Natural History of  
Rabies. Edited by Baer, G. 123-136. Academic Press. --  
London-New York, (1975).
- 61.- Vilchis, V.: Epidemiología de la rabia en México. Sa--  
lud Pública de México. 16, 3; 407-418, (1981).
- 62.- Voigh A., Kleiner, F. D.: Zoonosis. Editado por Acri--  
bia Zaragoza; 150, 252-256, (1975).
- 63.- Wiktor, T. J. et al.: Antigenic properties of rabies -  
virus components. J. Immunol. 110; 269-276, (1973).