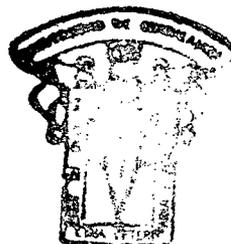


# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



OFICINA DE  
DIFUSIÓN CIENTÍFICA

Estudio Comparativo de Cinco Técnicas de Laboratorio  
para el Diagnóstico de Rabia

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

Rafael Escalante Martínez

GUADALAJARA, JALISCO. - 1978

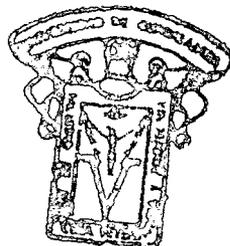
A mis padres, con profundo agradecimiento, les dedico este trabajo, que representa la culminación de los esfuerzos realizados para que yo tuviera una preparación profesional.

A mi tía Elvira, que me brindó su apoyo siempre que lo necesité, le dedico, sinceramente agradecido, ésta mi tesis profesional.

Agradezco a mi asesor, M.V.Z. Hiram Osiris González  
Candelas, los valiosos consejos y orientación brin-  
dados para el desarrollo de éste trabajo.

Al personal del laboratorio de patología ani-  
mal de Tlaquepaque, Jalisco, le expreso mi gra-  
titud por las facilidades que me prestaron pa-  
ra el desarrollo del presente trabajo. Al  
igual que a la S.A.R.H. por la donación de los  
conjugados para rabia.

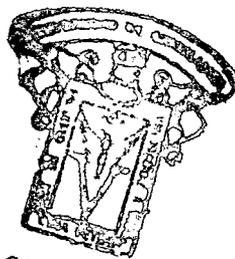
A los maestros de la Facultad, gracias  
por haberme transmitido los conociemien-  
tos que habrán de ser la base de mi de-  
senvolvimiento como profesionista.



OFICINA DE  
RELACIONES EXTERNAS

## INDICE.

Introducción	1
Material	3
Métodos	4
Resultados	10
Discusión	15
Conclusiones	21
Resumen	22
Referencias bibliográficas	23



OFICINA DE  
ESTUDIOS CIENTÍFICOS

## INTRODUCCION.

La rabia es una enfermedad enzootica y zoonotica en los indices de morbilidad son iguales a los de mortalidad en el hombre (1)(34)(37). En los últimos quince años, desde enero de 1963 hasta agosto de 1977, han muerto 975 personas por la rabia dentro del territorio nacional, las últimas 42 el año pasado (hasta agosto) (14)(15)(16)(17)(18).

En la República mexicana durante el quinquenio 1968-1972, se hicieron un total de 10,732 diagnósticos de rabia, de los cuales 7,664 lo fueron clínicamente, y sólo 3,068 en el laboratorio (19).

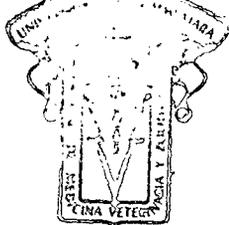
Las pérdidas económicas por muerte de ganado bovino equino, asnal y mular durante el año de 1977, ascienden a \$ 350'000,000.00, de los cuales, \$ 20'000,000.00 se perdieron en el estado de Jalisco (25). Deben considerarse además los riesgos médicos por complicaciones de diverso grado en las personas sometidas a tratamiento preventivo, las pérdidas en horas/hombre, los gastos que origina su prevención y la pérdida de vidas humanas (no evaluables) (1)(20)(43).

Estos datos señalan la importancia que debe darse al diagnóstico de laboratorio para detectar el virus de la rabia. Existen varias técnicas para tal finalidad, algunas más confiables que otras, con variantes en cuan

to al tiempo, material y personal necesarios. Las técnicas evaluadas en la presente comparación son: inmunofluorescencia, inoculación intracerebral a ratones, Seller's, Wilhite modificado por Schleifstein y hematoxilina-eosina por inclusión en parafina. Salvo la técnica de Seller's y la de Wilhite, las restantes no son de uso exclusivo para el diagnóstico de rabia.

En este trabajo se pretende señalar una prioridad expresada en porcentaje, respecto a la efectividad de las técnicas, considerando además, el tiempo, material y grado de capacitación del personal que las trabaja; se hace también una determinación aproximada del costo por muestra procesada, incluyendo únicamente el material biológico, reactivos y colorantes necesarios.





## MATERIAL.

### Biológico:

- OFICINA DE  
DIFUSION CIENTIFICA
- 100 encéfalos de animales positivos a rabia, de los cuales 68 son de canino, 25 de bovino y 7 de felino.
  - 600 ratones suizos (blancos) de 15 días de edad, recién destetados.
  - 20 encéfalos de caninos no sospechosos de rabia.
  - 1 juego de conjugados para rabia (CVS y SCN).

### Reactivos y colorantes:

Los necesarios para las técnicas de inmunofluorescencia, inoculación intracerebral a ratones, Sella's, Wilhite modificado por Schleifstein y hematoxilina-eosina por inclusión en parafina.

### Varios:

Material de cristalería, instrumental y aparatos de laboratorio necesarios para el desarrollo de las técnicas antes mencionadas.

## MÉTODOS.

Fueron utilizados encéfalos que previamente resultaron positivos a rabia por la técnica de inmunofluorescencia, la cual fué tomada como prueba patrón; de dichos encéfalos se trabajó con el hipocampo, cerebelo y corteza cerebral, en ese orden de prioridad, que es el idóneo para localizar el virus rábico (3)(6)(22)(23)(36).

Como testigos negativos fueron empleados encéfalos de caninos no sospechosos de rabia; 1 por cada 5 positivos, procesándose al igual que éstos, por cada una de las cinco técnicas.

Se inocularon 5 ratones por cada caso positivo y cada testigo negativo. La presencia del virus rábico en ellos fue comprobada mediante la inmunofluorescencia una vez que morían. Cuando presentaban signos clínicos avanzados de la enfermedad, fueron sacrificados con cloroformo (inhulado) para evitar los efectos de la autólisis que se produciría si murieran fuera del horario de trabajo.

Los encéfalos se procesaron por las siguientes técnicas:

4.



OFICINA DE  
RECEPCION CIENTÍFICA

Inmunofluorescencia (I.F.):

Fijar en acetona por 10 minutos la impronta, sacar al aire y añadir los conjugados; incubar 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Secar y enjuagar con solución salina buferada pH 7.6 (empleando el chorro de una pizeta), secar al aire (23)(24)(26)(27). Observar con objetivo 10x.

Inoculación intracerebral a ratones (I.I.C.):

En un mortero se emulsiona tejido cerebral sospechoso al 10% en agua estéril y se añade penicilina y estreptomycin. Centrifugar e inocular 0.02 a 0.03 cc. del sobrenadante en un punto situado sobre la línea media del cráneo, a la altura del arco cigomático con una jeringa de tuberculina y aguja número 27 corta (3)(6)(23). Observarlos diariamente.

Seller's (S.):

Consta de dos soluciones madre, que son:

A azul de metileno 2gm., metanol 100 cc.

B fuchsina básica 4gm., metanol 100 cc.

Se mezclan en la siguiente proporción:

Solución madre A 15 cc.

Solución madre B 2-4 cc.

Metanol 25 cc.

Refrigerar la mezcla (o las soluciones madre por separado) durante 6 meses antes de usarla. Para teñir, se hace una impronta del material sospechoso y se sumerge en el colorante durante 15 segundos; enjuagar con agua corriente, secar al aire (6)(9)(23) y observar con objetivo de 100x.

Wilhite (W.):

Consta de dos soluciones:

1 fuchsina básica	1.8gm.
azul de metileno	1.0gm.
glicerina Q.P.	100 cc.
metanol	100 cc.

2 solución acuosa de hidróxido de potasio al 1 x 40,000.

Deben conservarse en refrigeración y mezclarse poco antes de usarla, en la forma siguiente: 1-2 gotas de solución número 1 por cada 2 cc. de solución número 2.

Se toma una pequeña porción de tejido y se coloca entre dos portaobjetos, haciendo presión con ellos. Debe quedar una capa de tejido a manera



OFICINA DE  
DIFUSION CIENTIFICA

de frotis sanguíneo, se fija en metanol por 5 minutos, lavar con agua corriente; cubrir el tejido con el colorante y aplicar calor lento y bajo con un mechero Bunsen. Esperar hasta que suceda un ligero desprendimiento de vapores (sin llegar a la ebullición), dejar actuar el colorante por 3 minutos y lavar con agua corriente, secar al aire (3) y observar con objetivo 100x.

Hematoxilina-eosina por inclusión en parafina (H-E):

El tejido sospechoso fijado en formol se incluye en parafina por medio del histoquinete, proceso que se lleva 18 horas. Los bloques de parafina con el tejido incluido se cortan con el microtomo y se montan en un portaobjetos, para teñirlo como sigue:

Xilol, 3 minutos.

Alcoholes: absoluto; de 96°; al 75%; al 50%.

Agua destilada. 3 a 5 minutos por paso.

Hematoxilina de Harris, 7 a 10 minutos.

Alcohol ácido, 3 a 5 segundos.

Lavar con agua corriente hasta que vire el color de púrpura hacia el azul.

Dar un baño de solución saturada de carbonato de litio.

Eosina, 7 a 10 minutos.

Dos cambios de alcohol de 96°, dos de alcohol absoluto; 3 a 5 minutos en cada paso.

Xilol, dos cambios por 3 a 5 minutos en cada uno; montar en bálsamo del Canada (11)(28)(31) y hacer la observación con objetivos 10x, 40x y 100x.

Los parámetros observados para declarar positiva una muestra, estuvieron regidos por lo siguiente:

I.F.

Presencia de pequeñas partículas (como la punta de un alfiler) de color verde-amarillento muy brillantes, con la particularidad de que titilan. El conjunto semeja partículas de polvo brillante (3)(12)(13)(23)(24).

I.I.C.

Aparición de los siguientes síntomas aproximadamente al 10° día posterior a la inoculación; paño hirsuto, lordosis, incoordinación y parálisis del tren posterior, deshidratación, postración y muerte. Esta sobreviene de 1 a 3 días

después de aparecer los síntomas, los cuales se acentúan conforme se desarrolla la enfermedad (3)(4)(6)(23).

S.

Presencia de corpúsculos de Negri, los cuales se distinguen por lo siguiente: son intracitoplasmáticos, de forma redondeada y tamaño variable, el color es rojo magenta a rojo cereza, con una estructura granular interna que se distribuye en la periferia y el centro, agrupándose algunas veces en forma de mórula de color negro o azul negro (3)(6)(21)(23)(38).

W.

Presencia del corpúsculo de Negri, que aparece de la misma forma y color que en la tinción de Seller's, pero de un tamaño mayor (3)(38).

H-E

Observación de una degeneración turbia y picnosis neuronal, formación de halo perineuronal, satelitosis, neuronofagia, gliosis (nódulos de Babes), infiltración leucocitaria (monocítica) y formación de nódulos perivasculares (3)(6)(22)(29)(38).

9.



OFICINA DE  
EDICIÓN CIENTÍFICA

## RESULTADOS.

El total de casos positivos y negativos por cada técnica, así como el porcentaje obtenido con ellas, quedan expresados con el cuadro 1.

CUADRO 1

Total y/o porcentaje de positivos y negativos por técnica.

	I.F.	I.I.C.	S.	W.	H-E
+	100	100	83	83	76
-	0	0	17	17	24

En el cuadro 2 se muestra el número de casos positivos y negativos por cada especie y en cada técnica.

CUADRO 2

Total de positivos y negativos por técnica y por especie.

Técnica Especie	I.F.		I.I.C.		S.		W.		H-E	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Ganinos	68	0	68	0	60	0	60	0	53	15
Bovinos	25	0	25	0	21	4	21	4	21	4
Felinos	7	0	7	0	2	5	2	5	2	5
Totales	100	0	100	0	83	17	83	17	76	24



Los resultados del cuadro 2 se encuentran expresados en porcentajes dentro del cuadro 3.

CUADRO 3

Porcentaje de positivos y negativos por técnica y por especie.

OFICINA DE  
DIFUSION CIENTIFICA

Técnica Especie	I.F.		I.I.C.		S.		W.		H-E	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Caninos	100	0	100	0	88.2	11.8	88.2	11.8	77.9	22.1
Bovinos	100	0	100	0	84.0	16.0	84.0	16.0	84.0	16.0
Felinos	100	0	100	0	28.5	71.5	28.5	71.5	28.5	71.5

Con el cuadro 4 se muestra el número de casos positivos y negativos por especie que coincidieron en 2, 4 y 5 de las técnicas comparadas, estableciéndose al final el total de muestras que se trabajaron de cada especie.

Los casos coincidentes a 2 técnicas (I.F. e I.I.C.) son aquellos que no presentaron corpúsculos de Negri ni lesiones histopatológicas, pero si la acción del virus en la reacción Ag-Ac de la prueba de I.F. y sobre los ratones inoculados.

Positivos coincidentes a 4 técnicas nos representan los casos que no presentaron lesiones histopatológicas, pero si corpúsculos de Negri y la acción del virus en los

ratones y con el antígeno marcado (I.F.).

Aquellos casos que coincidieron en las 5 técnicas, son los que tuvieron la acción completa del virus, como es la reacción con el antígeno marcado, reproducción de la enfermedad en los ratones inoculados, formación de corpúsculos de Negri y producción de lesiones histopatológicas.

#### CUADRO 4

Total de casos positivos coincidentes  
por especie a 2, 4 y 5 técnicas.

Especie	Positivos a 2 técnicas	Positivos a 4 técnicas	Positivos a 5 técnicas	Total de muestras
Caninos	7	8	53	68
Bovinos	4	0	21	25
Felinos	5	0	2	7
Totales	16	8	76	100

Los resultados contenidos en el cuadro anterior, expresados en porcentaje, se presentan dentro del cuadro 5, a excepción del total de muestras, cuyo porcentaje es el mismo que los totales del cuadro 4.



CUADRO 5

Porcentaje de casos positivos coincidentes  
por especie a 2, 4 y 5 técnicas.

Especie	Positivos a 2 técnicas	Positivos a 4 técnicas	Positivos a 5 técnicas
Caninos	10.3	11.7	77.9
Bovinos	16.0	0.0	84.0
Felinos	71.4	0.0	28.5

Dentro del cuadro 6, son presentados los resultados con los testigos negativos.

CUADRO 6

Resultados obtenidos con  
los testigos negativos.

	I.F.	I.I.C.	S.	W.	H-E
+	0	0	0	0	0
-	20	20	20	20	20

Con el cuadro 7 se presenta un resumen global de los resultados obtenidos, de acuerdo a los objetivos trazados. Los signos (+) simbolizan la cantidad del material y el grado de capacitación (Cap.) que se requiere para procesar una muestra.

El costo aquí presentado corresponde al de los reactivos, colorantes y material biológico únicamente. Sólo es una aproximación que debe ser tomada como punto de comparación en este trabajo; dicho costo varía considerablemente día a día y de un lugar a otro.

CUADRO 7

Resumen global de resultados.

Técnica	Efectividad (%)	Tiempo	Mate- rial	Capaci- tación (grado)	Costo/ diag- nóstico
I.F.	100	45-50 minutos	XXXX	XXXX	\$ 30.00
I.I.C.	100	10-15 días	XXX	XXX	" 55.00
S.	83	1-2 minutos	X	X	" 0.15
W.	83	7-10 minutos	XX	XX	" 0.65
H-E	76	19-20 horas	XXXXXX	XXXXXX	" 6.50



## DISCUSION.

La efectividad de la I.F. en el presente trabajo fué establecida en un 100%, lo cual coincide con lo reportado en los trabajos de George M. Baer (5), Ronaldo Reis y J.M. Lamas da Silva (32)(33), O.P. Larghi (24) y Martin M. Kaplan e Hilary Koprowski (23). Si la muestra está mal conservada, baja dicha efectividad a 98-99.2% (2)(6)(39)(41)(42), e incluso se reportan índices de 91.8 a 97% (36)(39)(40)(41)(42) (en comparación con la técnica de I.I.C.). En estos porcentajes pueden atribuirse las diferencias a la detección de virus vacunal, estado de conservación en que se haya trabajado la muestra, o bien, a fallas humanas en el diagnóstico, pudiendo conjugarse más de un factor en ello. Conviene aclarar que en éste trabajo unicamente se procesaron muestras en buen estado de conservación.

En general, puede afirmarse que en cuanto a efectividad, es la mejor, considerando también el factor tiempo; el material es poco pero de manejo delicado y alto costo, debiendo ser el personal altamente capacitado.

Junto con la I.F., la técnica de I.I.C. tiene efectividad de un 100%, como puede verse en los cuadros de resultados; en este porcentaje coinciden otros autores (8)(21)(32)(35)(36), aunque existen cifras que la sí-

tían entre un 97.6 y 99.3 (39)(40)(41)(42), y otros reportes mencionan de 92.6 a 96.5% de efectividad (39)(40)(41)(42). Los autores de estos valores especifican que sus pruebas las hicieron con un elevado número de animales salvajes, por lo que se vió afectado el estado de conservación de las muestras, y que a consideración de ellos, no poseen la calidad indispensable para una excelente fidelidad en los resultados (39)(40)(41)(42).

Las ventajas de la I.I.C. sobre la I.F., son de que pueden trabajarse muestras en mal estado de conservación y de que no se corre el riesgo de reportar una muestra con virus vacunal como positiva. La principal desventaja es el tiempo necesario para obtener el resultado (10-15 días), que en la mayoría de las veces es de suma importancia para establecer un tratamiento preventivo. Otro contratiempo en ésta técnica, lo constituye la llamada "sustancia inhibidora del virus", que actualmente se sabe son anticuerpos, los que impiden la multiplicación del virus en el cerebro de los ratones inoculados, pero no su detección por la técnica de I.F. (23)(24). El personal necesario no necesita de gran capacitación para hacer las inoculaciones, que se llevan muy poco material, aunque el costo va ligado estrechamente al de los ratones, teniendo esto grandes variaciones



nes.

Quando se trabaja con la tinción de Saller's surgen controversias en cuanto a su efectividad, influido esto por las cepas de virus de calle que no forman corpúsculos de Negri (27) y por la dificultad que algunas veces se presenta para diferenciarlos de los llamados cuerpos de Lyssa. Algunos señalan su efectividad entre 85-90% (3)(4)(8)(21)(23), para otros es efectiva en un 70-85% (7)(29)(33), e incluso hay quien le señale un 60-70% (29)(34)(36)(38). En la presente evaluación se obtuvo un 83% de efectividad, que puede situarse aproximadamente en un punto medio respecto a los anteriores porcentajes, que también fueron comparativos con la I.F. o la I.I.C. (o ambas). Aún cuando se especifica que el corpúsculo de Negri es intracitoplasmático, algunas veces se le encuentra en el tejido de sostén; esto se atribuye a la neuronólisis (29)(36) o a los manejos durante la tinción (23). También debe pensarse en la calidad tridimensional del tejido que se somete a prueba mediante una impronta o corte.

Esta técnica, en cuanto a su efectividad, se coloca inmediatamente después de las técnicas de I.F. e I.I.C. En cuanto a tiempo, es la más rápida que se conoce (si se tiene preparada la tinción), no necesitando además

mucho material, el cual es de un costo mínimo. La mayor objeción que se presenta, además de la ausencia de corpúsculos de Negri, es la de diferenciar los cuerpos de Lyssa, cuerpos de inclusión originados por virus neurotrofos no rábicos (23). Se diferencian por ser más abundantes, más refringentes y con una matriz homogénea (sin estructuras internas) (10)(23)(29)(38), aunque algunas veces no es posible distinguir entre uno y otro (10).

Con Wilhite, al igual que con la técnica de Seller's, se obtuvo una efectividad del 83% en la detección del corpúsculo de Negri; anteriormente se había estimado su efectividad en un 75-80% (5). El tamaño que adquiere el corpúsculo, permite localizarlo más fácilmente y diferenciarlo de los cuerpos de Lyssa, puesto que son más visibles las inclusiones intracorpúsculares (2)(3). Esta técnica cayó en desuso cuando se aceptó ampliamente la de Seller's (5), teniendo la ventaja de que pueden trabajarse muestras fijadas en formol al 10% o en solución de Zenker (3)(38). La desventaja con Seller's es que requiere más tiempo y material, aumentando el costo en poco más del 300%, no obstante lo cual, sigue siendo bajo si se consideran las ventajas que posee. La capacitación necesaria para efectuarla es muy

sencilla, aunque no tanto como en la técnica de Seller's.

Con la técnica de H-E se obtuvo un 76% de efectividad, lo cual la sitúa en el último sitio en relación a las técnicas anteriores. Dicho porcentaje es más alto que el 58.5 a 75.5 (39)(40)(41)(42) obtenidos en otras evaluaciones, aunque hay quien le atribuye un 87.6% de efectividad (6). Además de las lesiones histopatológicas tomadas como parámetros, pueden encontrarse corpúsculos de Negri aproximadamente en el 10% de los casos, aunque es difícil distinguirlo y sólo se encuentra después de una búsqueda intensa (10)(30)(38). Las lesiones detectables por esta técnica son comunes a otras encefalitis de origen viral (3)(6)(10)(29)(36), en virtud de lo cual no debe emplearse para un diagnóstico definitivo de rabia, sino más bien como un apoyo en casos de duda con alguna otra técnica; cuando sea necesario recurrir a ella, debe tomarse mucho en cuenta la historia clínica, siempre que ésta provenga de una fuente confiable, antes de emitir un diagnóstico, que no será definitivo aún cuando se observen supuestos corpúsculos de Negri, pues bien pudiera tratarse de cuerpos de Lyssa.

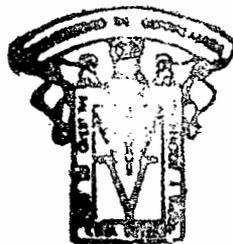
Se menciona que cuando el sitio de entrada del virus se localiza en una de las extremidades, el asta de

Ammón correspondiente se encuentra lesionada en mayor proporción (36). En los casos que pudo observarse lo anterior, las diferencias no eran muy notables, y éstas no eran suficientes para descartar definitivamente la muestra como negativa. Esto es más útil cuando se cuenta con el dato del sitio lesionado, lo que generalmente no sucede en la práctica diaria, aunque la información puede servir si tomamos en cuenta que mientras más corta haya sido la evolución clínica, más difícil es encontrar signos microscópicos de la enfermedad (29).

Respecto al tiempo y material necesarios para ésta técnica, también tiene desventajas, pues aunque se necesita menos tiempo que en la técnica de I.I.C., la efectividad que se le atribuye no lo justifica, además el material es muy numeroso (aunque el costo proporcional por muestra es bajo) y el personal debe contar con bastante capacitación.

Los resultados individuales por especie no son significativos, en especial los de bovinos y felinos, pues el número de muestras es muy reducido.

Fueron usados encéfalos de canino para los testigos negativos por haber sido esta especie la más numerosa con que se trabajó, además de la facilidad existente para conseguirlos.



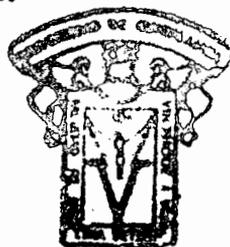
## CONCLUSIONES.

La técnica de I.F. es la más efectiva y rápida (en comparación con la I.I.C.). Igualmente efectiva pero más tardada en la obtención de resultados es la I.I.C., que tiene un mayor costo y es menos compleja en su desarrollo.

Las tinciones de Saller's y Wilhite comparten la misma efectividad entre si, diferenciándose básicamente en el mayor tiempo y costo necesarios para la técnica de Wilhite. Ambas son las más rápidas, pero si resultan negativas a rabia, no se descarta la posibilidad de la enfermedad.

H-E no es apropiada para el diagnóstico de rabia, y deberá ser considerada como técnica auxiliar o de complemento en casos de duda. Es la más complicada y cara de las técnicas comparadas.

El personal que efectúe diagnósticos de rabia, debe contar siempre con amplios conocimientos de la enfermedad y suficiente experiencia en el diagnóstico, independientemente de la técnica empleada para tal fin.



## RESUMEN.

Se empleó el hipocampo, cerebelo y corteza cerebral de 100 animales positivos a rabia (68 caninos, 25 bovinos y 7 felinos), para comparar la efectividad de las técnicas de I.F., I.I.C., Seller's, Wilhite modificado por Schleifstein y H-E por inclusión en parafina.

La I.F. fué tomada como prueba patrón, cada muestra se procesó por las 5 técnicas. Fueron inoculados 5 ratones suizos (blancos) de 15 días de edad (recién destetados) por cada caso. Como testigos negativos se utilizaron 20 encéfalos de caninos no sospechosos de rabia.

La efectividad obtenida fué: I.F. 100%; I.I.C. 100%; S. 83%; W. 83%; H-E 76%.

El tiempo necesario para procesar una muestra, es el siguiente: I.F. 45-50 minutos; I.I.C. 10-15 días; S. 1-2 minutos; W. 7-10 minutos; H-E 19-20 horas.

La cantidad de material y grado de capacitación del personal fueron simbolizados y son similares: I.F. (xxxx); I.I.C. (xxx); S. (x); W. (xx); H-E (xxxxx).

El costo aproximado por muestra procesada, incluyen do únicamente reactivos, colorantes y material biológico, resultó como sigue: I.F. \$ 30.00; I.I.C. \$ 55.00; S. \$ 0.15; W. \$ 0.65; H-E \$ 6.50.



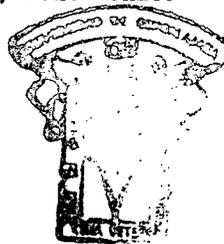
## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 1<sup>o</sup> edición. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C., U.S.A. 1977. pp. 343-344; 353.
- 2.- ALUJA, A.S. de. Comunicación personal. Fac. de Med. Vet. y Zoot. de la U. de G. Guadalajara, Jalisco, Méx. 23 de septiembre de 1978.
- 3.- ALUJA, A.S. de. Curso de actualización de diagnóstico de rabia. Comunicación personal. Fac. de Med. Vet. y Zoot. de la U.N.A.M. 18 de noviembre de 1976.
- 4.- ATANASIU, P. "Patogenia de la rabia." Salud Pública de México, época V, XVI, 3. Mayo-junio, 1974. pp. 357-359.
- 5.- BAER, G.M. Comunicación personal. Guadalajara, Jalisco, Méx. 7 de agosto de 1978.
- 6.- BAER, G.M. The natural history of rabies, vol. I. 1<sup>o</sup> edición. Academic Press. N.Y., U.S.A. 1975. pp. 378-394; 396-398.
- 7.- BURROWS, W. et al. Tratado de microbiología. 19<sup>o</sup> edición. Editorial Interamericana, S.A. México. 1969. pp. 879-880.

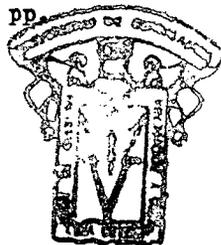
- 8.- COFFIN, D.L. Laboratorio clínico en medicina veterinaria. 3º edición. La prensa médica mexicana. México, D.F. 1977. p. 289.
- 9.- CUNNINGHAM, CH.H. Virología práctica. 2º edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1971. pp. 172-173.
- 10.- DERAKHSHAN, I. "Light microscopical diagnosis of rabies. A reappraisal." The Lancet. February 11, 1978. pp. 302-303.
- 11.- DISBREY, B.D.; RACK, J.H. Histological laboratory methods. 1º edition. E. & S. Livingstone. Great Britain. 1970. pp. 99-101.
- 12.- FENNER, F.J. et al. The biology of animal viruses. 2º edition. Academic Press. New York, U.S.A. 1974. pp. 30; 51.
- 13.- FENNER, F.J.; WHITE, D.O. Virología médica. 1º edición. La prensa médica mexicana. México, 1973. pp. 344-346.
- 14.- FLANDES G., A.; BULNES G., F.; PEREZ M., A. "Boletín epidemiológico." Salud Pública de México, época V, XVI, 1. Enero-febrero, 1974. p. 144.
- 15.- FLANDES G., A.; BULNES G., F.; PEREZ M., A. "Boletín epidemiológico." Salud Pública de México, época V, XVII, 6. Noviembre-diciembre, 1975.



- p. 891.
- 16.- FLANDES C., A. ; BULNES G., F. "Boletín epidemiológico." Salud Pública de México, época V, XVIII 3. Mayo-junio, 1976. p. 634.
- 17.- FLANDES C., A.; CRUZ L., R. "Boletín epidemiológico." Salud Pública de México, época V, XIX, 2. Marzo-abril, 1977. p. 316.
- 18.- FLANDES C., A.; CRUZ L., R. "Boletín epidemiológico." Salud Pública de México, época V, XIX, 6. Noviembre-diciembre, 1977. p. 855.
- 19.- GONZALEZ A., E. Comunicación personal. Servicios coordinados de salud pública en el estado, departamento de zoonosis. Guad., Jal., México. 14 de julio de 1978.
- 20.- HIGUERA B., F. "Aspectos generales de la rabia en México." Salud Pública de México, época V, XVI, 3. Mayo-junio, 1974. pp. 379-380.
- 21.- HUTYRA-MAREK-MANNINGER-MOCSY. Patología y terapéutica especiales de los animales domésticos, tomo I. 3º edición. Editorial Labor, S.A. Barcelona, España. 1973. pp. 579-584; 594.
- 22.- JAWETZ, E. Manual de microbiología médica. 6º edición. Editorial el manual moderno, S.A. México 1975. p. 458.



- 23.- KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. Laboratory techniques in rabies. 3<sup>o</sup> edition. World Health Organization. G<sup>e</sup>neva, Switzerland. 1973. pp. 33-37; 41-44; 49-50; 52-58; 76-78; 85-93.
- 24.- LARGHI, O.P. "Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia." Centro Panamericano de Zoonosis, nota t<sup>e</sup>cnica No. 8, rev. 2. Septiembre, 1975. pp. 5-9.
- 25.- MANRIQUEZ M., A. Simposium sobre la problem<sup>a</sup>tica actual de la rabia paral<sup>i</sup>tica (derriengue) en bovinos, su importancia econ<sup>o</sup>mica, medidas sanitarias y soluciones para su control. Comunicaci<sup>o</sup>n personal. Guad., Jal., M<sup>e</sup>xico. 28 de octubre de 1977.
- 26.- MAR, R. "Inmunofluorescencia, t<sup>e</sup>cnicas y aplicaciones." Memorias I simposium internacional de laboratorios de diagn<sup>o</sup>stico, tomo III. Gto., Gto., M<sup>e</sup>xico. Enero 15 al 22, 1977. pp. 601-621.
- 27.- MARTELL, M.A.; BATALLA, D.; BAER, G.M. "Reducci<sup>o</sup>n del tiempo del m<sup>e</sup>todo cl<sup>a</sup>sico para el diagn<sup>o</sup>stico de rabia por inmunofluorescencia." T<sup>e</sup>cnic pecuaria en M<sup>e</sup>xico, 14. Enero, 1970. pp. 48-50.



- 28.- MARTOJA, R.; MARTOJA-PIERSON, M. Técnicas de histología animal. 1<sup>o</sup> edición. Editorial Toray-Masson, S.A. Barcelona, España. 1970. pp. 21; 24-29; 39-42; 49-50.
- 29.- MENESES V., A.; VEGA C., M. "Patología de la rabia." Salud Pública de México, época V, XVI, 3. Mayo-junio, 1974. pp. 365-367.
- 30.- MERCHANT, I.A.; PACKER, R.A. Bacteriología y virología veterinarias. 3<sup>o</sup> edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1970. pp. 728-733.
- 31.- RAMON Y CAJAL, S.; MUÑOZ Y TELLO, J.F. Elementos de histología normal y de técnica micrográfica. 12<sup>o</sup> edición. Editora Nacional, S.A. México, D.F. 1955. pp. 100-101.
- 32.- REIS, R. et al. "Human rabies II. Serological studies and intra-vitam virus isolation." Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 18, 6. Novembro/dezembro, 1976. pp. 393-401.
- 33.- REIS, R.; LAMAS da SILVA, J.M. "Diagnóstico comparativo da raiva pela imunofluorescência e exames histopatológicos do gânglio de Gasser, cor no de Ammon, glândulas salivares submandibulares e adrenais." Arq. Esc. Vet., U.F.M.G., XIX. 1967. pp. 39-45.

- 34.- SAINZ, M. Las zoonosis. 1<sup>o</sup> edición. Editorial Aedos. Barcelona, España. 1976. pp. 109-113; 116.
- 35.- SALIDO R., F. "Envío de especímenes al laboratorio preparación de muestras, técnicas de examen y diagnóstico de laboratorio." Salud Pública de México, época V, XVI, 3. Mayo-junio, 1974. pp. 387-388.
- 36.- SALIDO R., F. "Patología y patogenia." Salud Pública de México, época V, XVI, 3. Mayo-junio, 1974. pp. 361-362.
- 37.- SIEGMUND, O.H.; EATON, L.G. The Merck veterinary manual. 3<sup>o</sup> edition. Editorial Board. Rahway, N.J., U.S.A. 1970. pp. 244-245.
- 38.- SMITH, H.A.; JONES, T.C.; HUNT, R.D. Veterinary pathology. 4<sup>o</sup> edition (1<sup>o</sup> reprint). Lea & Febiger. Philadelphia, U.S.A. 1974. pp. 352-356.
- 39.- SYKES-ANDRAL, M.; ANDRAL, L. "Centre d'étude sur la rage a Nancy-Malzéville. Activités de la section du diagnostic pendant l'année 1973." Revue Méd. vét., 126, 2. 1975. p. 180.
- 40.- SYKES-ANDRAL, M.; ANDRAL, L. "Centre d'étude sur la rage a Nancy-Malzeville. Activités de la section du diagnostic pendant l'année 1974."

Revue Méd. vét., 127, 1. 1976. p. 58.

- 41.- SYKES-ANDRAL, M.; ANDRAL, L. "Centre d'étude sur la rage a Nancy-Malzéville. Activités de la section du diagnostic pendant l'année 1975."  
Revue Méd. vét., 128, 3. 1977. p. 365.
- 42.- SYKES- ANDRAL, M.; ANDRAL, L. "Centre d'étude sur la rage a Nancy-Malzéville. Activités de la section du diagnostic pendant l'année 1976."  
Revue Méd. vét., 129, 3. 1978. pp. 398; 400; 403.
- 43.- ZUCKERMAN, A.J. "Virus exóticos." Zoonosis, vol. XIX, números 3-4, septiembre-diciembre, 1977. p. 88.

