

LA RABIA PARESIANTE BOVINA: DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y METODOLOGÍA DE CONTROL

M.V.Z., M.S. Ph.D. E. M. HERNÁNDEZ BAUMGARTEN

Jefe del Programa de Investigaciones sobre Rabia Paralítica Bovina (Deriengue). Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. S. A. G. Mexico, D. F.

I.Introducción	104
1.Rabia en las zonas urbanas	1 04
2.Rabia en los animales silvestres	104
II. Rabia paresiante bovina	105
1.El agente causal	106
a) Características del virus	106
2.Transmisión	109
a) Características del vector	109
3.Patogenia de la rabia	111
4.Características de la enfermedad	115
a)Signos clínicos	116
b)Diagnóstico	117
III. Metodología de Control	121
1.Tipos de vacunas	122
2.Métodos de aplicación	123
3.Control del vector	124
IV. Conclusiones	125
Referencias	126

I. Introducción

La rabia es una enfermedad infecciosa del sistema nervioso central, generalmente aguda, cuyo agente causal es un virus. Todos los animales de sangre caliente, incluyendo al hombre, son susceptibles en mayor o menor grado (1, 2).

Desde el punto de vista epizootológico la rabia puede dividirse en rabia de las zonas urbanas y rabia de los animales silvestres. Esta división, un tanto arbitraria, hace referencia al modo de transmisión y perpetuación de la rabia en las poblaciones animales.

1. La rabia en las zonas urbanas es principalmente la rabia transmitida por perros, aun cuando otras especies domésticas, como el gato, pueden estar involucradas. Este tipo de rabia representa un serio problema de salud pública.

2. La rabia de los animales silvestres involucra a un gran número de especies animales, según el nicho ecológico de que se trate. La historia de la rabia en Europa indica que existían áreas de las que partían epidemias recurrentes de rabia en lobos o en zorros. La rabia en los animales silvestres generalmente no es detectada a menos que ocurran brotes epidémicos mayores con un gran número de animales afectados y que ataquen animales domésticos o al hombre. En los bosques de coníferas del norte de América (Estados Unidos y Canadá) el armiña, *Mustela erminea*, es muy abundante y se han notado casos esporádicos en esta especie (3). Este animal parece ser la fuente más probable del virus que inicia brotes de rabia en los zorros del Ártico y en los lobos. En Estados Unidos el zorrillo manchado, *Spilogale putorius*, se ha encontrado infectado con el virus rábico, en tanto que otras especies no están simultáneamente infectadas. El zorrillo es sumamente susceptible (2). Las áreas pobladas por estas dos especies animales ocasionalmente se superponen de tal manera que las dos especies animales viven juntas, iniciando lo que se ha llamado el ciclo zorro-zorrillo de perpetuación de la rabia".

El zorrillo requiere de una fuerte dosis de virus para infectarse; una vez infectado, dura un periodo de varias semanas con ligeros síntomas clínicos de la enfermedad y excreta pequeñas cantidades de virus en la saliva. La excreción de virus en la saliva puede durar varias semanas antes de que el zorrillo finalmente sucumba a la enfermedad. El zorro por el contrario requiere de dosis muy bajas de

virus para presentar la rabia. La cantidad de virus en la saliva del zorrillo rabioso es suficiente para infectar al zorro. Una vez infectado, el zorro desarrolla una encefalitis rápida con excreción de gran cantidad de virus en la saliva durante un corto periodo. La cantidad de virus excretado durante la rabia del zorro es suficiente para infectar a una variedad de animales, incluyendo el zorrillo, cerrándose así el ciclo (4).

La rabia silvestre afecta a una gran variedad de roedores y carnívoros en casi todos los países del mundo y son éstos los probables responsables de la perpetuación de la rabia en diversos grupos de animales silvestres. La ausencia de la rabia en Australia, Hawaii y otros países es probablemente debida a la ausencia de hospedadores silvestres y no a la vigilancia ejercida por estos países.

Las colonias de murciélagos también se han encontrado infectadas con el virus rábico (5). En América Latina se han encontrado infectadas con el virus rábico colonias de murciélagos hematófagos, *Desmodus rotundus* (6), encontrándose que el vampiro puede comportarse como un portador asintomático de la enfermedad en tanto que excreta virus en la saliva por periodos hasta de cinco meses (7).

Las características, tanto del vector como de la enfermedad en los animales domésticos, hacen de la rabia pareasiente bovina (Derriengue) un capítulo aparte en la ecología de esta enfermedad.

II. La rabia pareasiente bovina

La rabia pareasiente bovina transmitida por murciélagos vampiros es, por derecho propio, parte de la rabia de los animales silvestres. El comportamiento del vampiro y sus hábitos alimenticios lo colocan en una categoría aparte de otros animales silvestres. El murciélago vampiro se alimenta exclusivamente de sangre tanto de animales domésticos, como de otros animales silvestres. Bajo estas circunstancias tanto el vampiro normal como el vampiro rabioso atacan cada noche a varios animales. Si el vampiro empieza a excretar el virus rábico en la saliva antes de presentar signos clínicos de enfermedad, se convertirá en un transmisor muy eficiente de la rabia pareasiente. Con mucho, el animal de que prefieren alimentarse los vampiros es el bovino; de ahí que el mayor impacto de la enfermedad se refleje en los bovinos y en menor proporción en otras especies animales.

1. El agente causal

a) Características del virus

La rabia es una enfermedad infecciosa causada por un virus del grupo rhabdovirus (8).

Las características del grupo son: Los viriones tienen forma de bala, miden de 130 a 220 nm de largo y de 60 a 80 nm de diámetro. Un extremo es redondeado y el otro aplanado con un cuerpo cilíndrico (de ahí que se le compare con una bala). Con ellos tienen alrededor de 2% de ácido ribonucleico de cadena sencilla con un peso molecular de 3.5×10^6 daltons en un nucleocápside de simetría helicoidal que está contenido en una envoltura con proyecciones superficiales fungiformes. Los virus de este grupo se sintetizan en el citoplasma y son ensamblados en las membranas celulares. La mayoría de los virus de este grupo se multiplican en vertebrados y artrópodos (9).

Los virus que pertenecen a este grupo son: El virus de la estomatitis vesicular cepas Indiana y New Jersey, Cocal, Piry, Flanders, Hart Park, Kern Canyon, virus de murciélagos del Monte Elgon, rabia, virus de murciélagos Lagos y el aislamiento Ib 27377 de las musarañas (*Sorex vulgaris*) (9).

El ensamblado de la mayoría de los rhabdovirus, como ya se indicó antes, tiene lugar en la membrana celular o en vacuolas intracitoplásmicas (10).

Hummeler *et al.* (11), consideran que el virus de la rabia madura principalmente en el citoplasma en asociación con los corpúsculos de inclusión (matrices víricas) y ocasionalmente en la membrana celular. La técnica empleada por Hummeler *et al.* (12) para colectar las células infectadas evitó que estos autores pudieran localizar virus rábico en la membrana celular. Las células infectadas fueron colectadas siete días después de la infección (11) utilizando tripsina para remover las células infectadas (12). De este modo sólo encontraron células infectadas en los estadios finales del ciclo de infección, que es cuando ocurre la maduración intracitoplásmica (13). Cuando se estudió el ciclo de infección utilizando técnicas más apropiadas (13), fue posible localizar el virus rábico madurando en la membrana de las células infectadas, en ausencia de virus intracitoplásmico (Fig. 1). En base a esta evidencia, Hernández B. (13) concluyó, en contraposición a Hummeler *et al.* (11), que la maduración del virus rábico ocurre principalmente en la membrana celular y oca-

sionalmente en el citoplasma. De este modo, una aparente diferencia del virus de rabia con otros rhabdovirus resulta ser más aparente que real. Probablemente el virus de la estomatitis vesicular no alcance a encontrarse en asociación con las matrices víricas debido a que es un virus citocida (mata a las células), en tanto que el virus de la rabia puede causar una infección crónica de las células en cultivo, transformándose éstas en "portadoras" del virus de la rabia (14). Faltaría estudiar en el microscopio electrónico, las células "portadoras" del virus de la estomatitis vesicular obtenidas por Pérez Villarreal y Holland (15), con la finalidad de determinar si en estos cultivos crónicamente infectados también muestran ocasionalmente maduración intracitoplásmica de este virus, además de la fase de maduración en la membrana celular.

El virus de la rabia en cultivos celulares sigue un ciclo que puede dividirse en seis fases con una ruta alterna: 1. Infección tiempo = 0 horas. El virus se adhiere a la membrana de una célula y penetra. 2. Fase de eclipse; tiempo 9-16 horas. Durante este periodo no se observan grandes cambios en las células, con la posible excepción de cúmulos de material granular en el retículo endoplásmico. 3. Infección temprana; tiempo de 16-24 horas en que se observa la aparición de matrices víricas y puede detectarse la liberación de las primeras partículas virales completas (viriones). 4. Punto medio de la infección; tiempo de 24-72 horas. Las matrices víricas aumentan en tamaño y en número; la mayor cantidad de viriones es producida en esa parte del ciclo de infección. 5. Infección tardía; tiempo de 72-120 horas. Las matrices víricas son aún más grandes, el virus continúa madurando en la membrana celular pero empieza el ensamble de viriones en el citoplasma. Generalmente este paso ocurre en las membranas del retículo endoplásmico. 6. Degeneración celular; tiempo de 120 horas en adelante. El sitio de ensamble vírico pasa de la membrana celular al citoplasma; ya no se encuentran partículas víricas en la membrana celular sino exclusivamente en el citoplasma de las células infectadas. Ésta es una degeneración intrínseca de las células y no está propiciada aparentemente por agentes externos. Esta degeneración celular no se extiende a todo el monoestrato; involucra a menos del 1 % de las células en cultivo.

La ruta alterna ocurre en el 4º periodo o sea el punto medio de la infección. Las células pueden estabilizarse en producción de virus y no proseguir hacia la degeneración celular. Esto sería el estado de cultivo "portador" del virus rábico que puede subcultivarse



FIG. I. Parte de una célula 135 en cultivo celular en los estados iniciales de la infección con la cepa V 319 del virus rábico. El retículo endoplásmico (ER) muestra cúmulos de una sustancia granular y se encuentra en estrecha asociación con mitocondrias (MI). El mismo material granular forma una masa sin membrana en el interior del citoplasma constituyendo una matriz vírica (MA). En la membrana celular se observan partículas víricas en diferentes grados de maduración y otras ya libres (VP). Aumento original 5000 x (micrografía electrónica tomada por el autor).

indefinidamente en tanto que está persistentemente infectado. Esta ruta es seguida por la mayor parte de las células en cultivo. Todas estas observaciones corresponden a sistemas *in vitro*, es decir a células en cultivo, infectadas con virus de la rabia. (13). Las similitudes con las observaciones en el sistema nervioso central se discutirán más adelante.

2. Transmisión

a) Características del vector

La familia *Desmodontidae* consta de tres géneros, cada uno con una sola especie: *Desmodus rotundus* o vampiro común, *Diphylla eucaudata* o murciélago de patas peludas y *Diaemus youngi* o murciélago de alas blancas. Estas tres especies animales se alimentan exclusivamente de sangre tanto de mamíferos como de aves. Las tres especies de vampiros son potencialmente capaces de transmitir la rabia (16). La escasez de las especies *Diphylla* y *Diaemus* sin embargo, los hace poco importantes desde el punto de vista de la rabia pareasiente bovina. El *Desmodus rotundus*, por el contrario es muy abundante y el grueso de los daños atribuidos a esta familia corresponde a los causados por este animal. Es por esto que nos ocuparemos solamente de esta especie, dada la importancia económica del problema que representa.

La distribución y densidad de población del vampiro ha ido aumentando en las zonas de América Latina en que se ha introducido ganado. Su distribución va desde el norte de México hasta la parte central de Argentina en todas las zonas por debajo de los 2000 metros sobre el nivel del mar. Se le encuentra en una gran variedad de *habitats*, tales como sabanas, desiertos, pantanos y en general en las zonas subtropicales de Latinoamérica. Ningún otro continente presenta esta especie animal (17). Como puede apreciarse, las zonas afectadas por el murciélago vampiro constituyen las principales regiones ganaderas de México y otros países de Centro y Sudamérica.

Los murciélagos vampiros habitan en colonias de 100 a 200 individuos en estrecho contacto, aun cuando se han encontrado colonias de mas de 2 000 animales (17). Pueden compartir una cueva con otras especies de murciélagos, aun cuando dentro de la cueva cada especie ocupe nichos independientes. Los murciélagos vampiros también pueden encontrarse en árboles huecos (pochotas), en

pozos abandonados y en túneles tanto de minas y canales de irrigación como en puentes del ferrocarril (alcantarillas). Generalmente no se les encuentra en los tejabanos de casas habitadas como sucede con otros murciélagos.

Con el fin de sobrevivir, el murciélago vampiro debe alimentarse cada noche. Generalmente no consumen de un solo animal toda la sangre que necesitan; pueden atacar a varios bovinos en una sola noche o bien alimentarse de sangre de varias especies animales. Se ha encontrado en estudios de ingesta gástrica de vampiros, que algunos de ellos se alimentaban hasta de cuatro animales diferentes en una noche. Los animales atacados eran bovinos, equinos, ovinos, caprinos, aves y humanos en orden decreciente de frecuencia (18).

Algunos investigadores (17, 19) han utilizado equipo de visión nocturna a fin de observar al comportamiento del murciélago vampiro en condiciones naturales. El vampiro sale en las horas de menor luz, cuando la luna no ha salido aún o cuando ya se ha puesto (19). Llegan con un vuelo a baja altura (menos de dos metros) y se posan en el suelo. Observan atentamente a los animales y proceden a atacar ya sea en las patas, el lomo o en la región perineal, según lo permita la posición de los animales. Se ha visto a varios vampiros (hasta siete) alimentarse simultáneamente de un animal y en ocasiones varios de ellos de la misma herida. La forma en que se empujan unos a otros para alimentarse de la misma herida no indica la presencia de una estructura jerárquica entre ellos. Si un vampiro ha consumido una gran cantidad de sangre, lo que le impide volar con facilidad, se refugia en un árbol o matorral cercano en donde reposa durante unas horas y después se dirige a su refugio. Si el animal que un determinado vampiro ha elegido para su ataque se resiste, el vampiro se retira volando y vuelve unos segundos después y continúa en esta forma hasta que el animal se queda quieto. En caso de que un animal se mueva mientras los vampiros están posados sobre él, todos los vampiros se retiran rápidamente. De hecho los vampiros se retiran antes de que sea visible ningún movimiento en el animal. Probablemente sienten las contracciones musculares del animal antes de que se produzca ningún movimiento.

Los murciélagos vampiros consumen sangre a razón de 20 ml cada noche (7.5 litros al año) (16). Los ataques nocturnos repetidos causan pérdida crónica de sangre a los animales no sólo por el consumo directo de los vampiros sino por la profusión con que sangran las mordeduras. La pérdida de sangre es causada por el anticoagulante (Desmodontina) contenido en la saliva del vampiro. Las heridas pueden

ser puerta de entrada a miasis (gusaneras) e infecciones de tipo bacteriano, además de la depreciación de las pieles. Como podrá observarse, las pérdidas ocasionadas por el vampiro son múltiples sin cuantificar las causadas por transmisión de la rabia.

3. *Patogenia de la rabia*

La última palabra en cuanto a patogenia de la rabia está aun por decirse. No es fácil comprender cómo es que un virus que mata muy pocas células en cultivo, es capaz de causar la muerte de un animal.

La infección del sistema nervioso central por vía de los troncos nerviosos fue propuesta por Goodpasture ya en 1925 (20) y, en su tiempo, fue descartada por la mayoría de los investigadores. Evidencia de infección por vía de las células endoneurales ha sido demostrada después de la inoculación subcutánea de virus herpes en ratones lactantes. En este experimento pudo observarse multiplicación viral en células endoneurales por medio de inmunofluorescencia (21). Esta infección ascendente fue confirmada por medio de microscopía electrónica (22). Sin embargo, el antígeno del virus de la rabia no ha sido observado en las células endoneurales durante la diseminación del virus al sistema nervioso central. La evidencia de que el virus de la rabia invade al sistema nervioso central de los troncos nerviosos procede de dos líneas principales de investigación. Si se inocula el virus de la rabia por vía intramuscular, éste desaparece del sitio de la inoculación, en lo que parece ser una fase de eclipse, para aparecer mas tarde en la médula espinal en la zona de donde procede la innervación al sitio inoculado (23). Por otra parte, si se secciona el nervio ciático antes de hacer la inoculación en el cojinete plantar en ratones, los animales no mueren de rabia aún cuando la dosis haya sido suficiente para matar animales testigos (24). Incluyendo variaciones entre el tiempo de inoculación y el tiempo de la neurectomía, Dean *et al* estimaron la velocidad de transmisión del virus rábico por los troncos nerviosos a razón de 3 mm por hora (24). La velocidad de avance del virus fijo CVS puede ser mayor que la observada en cepas de calle (24). La velocidad de transmisión del virus rábico parece indicar que se trata de un proceso que no requiere de multiplicación viral (25). Este rápido ascenso del virus al sistema nervioso central requiere de un sistema de conducción, por ejemplo los linfáticos perineurales, axoplasma o los espacios intersticiales. El antígeno viral no se ha

observado en los espacios endoneurales (25), sugiriendo también que no ocurre la multiplicación viral antes de invadir el sistema nervioso central. La viscosidad del axoplasma y su flujo centrífugo parecía indicar lo poco probable de la infección ascendente por este medio. Sin embargo, estudios recientes del axoplasma muestran que es metabólicamente activo y constituye un medio ideal de transporte. Se han descrito contracciones activas de la mielina (26), y Burwood ha demostrado movimientos bidireccionales de partículas en el axoplasma (27). Si bien la confirmación definitiva de la teoría de Goodpasture (20) no se ha obtenido; es necesario reconsiderar el fácil rechazo que de ésta se ha venido haciendo.

El virus de la rabia, entonces, penetra por una solución de continuidad, generalmente en la piel (la mordedura del vampiro en nuestro caso), y de ahí procede a infectar a las células nerviosas del área. No es claro si lo hace a través de terminaciones nerviosas sensitivas o motrices intactas o pueda aprovechar para ello los cilindroejes o dendritas rotas al producirse la solución de continuidad. Viaja por las vías nerviosas hasta los ganglios nerviosos regionales a razón de 3 mm por hora (valor promedio estimado en base al tiempo que tarde en ser localizado el virus en los ganglios o en la médula espinal) e infecta a las células nerviosas de los ganglios y la médula espinal. El cuerpo de la neurona es un sitio de gran actividad sintética. En el citoplasma que rodea al núcleo se sintetizan las proteínas y materiales que llenan las prolongaciones celulares y que es preciso reponer con regularidad (28). El volumen de las prolongaciones de una neurona excede el volumen del citoplasma situado alrededor del núcleo en varios cientos de veces. El virus de la rabia se encuentra en situación ideal en medio de una maquinaria sintética tan eficiente. Procede a redirigir la síntesis de proteínas virales y a iniciar la síntesis de ácidos nucleicos propios. El virus es ensamblado en la membrana celular de la neurona desde donde puede infectar a un gran número de nuevas neuronas que entren en contacto con ésta. De este modo el ciclo se repite en cada una de las neuronas secundariamente infectadas. De esta forma es fácil ver que dado el suficiente número de pasos individuales, el virus podría llegar a infectar la totalidad del sistema nervioso. El trastorno en el metabolismo de la neurona causado por el virus podría llegar a ser de tal magnitud que la neurona deje de funcionar; que haga "corto circuito", por así decirlo. Los corpúsculos de inclusión encontrados en las neuronas (corpúsculos de Negri) corresponden en estructura a la matriz vírica encontrada en las células en cultivo;

con la excepción de que en este caso la matriz vírica crece rápidamente y atrapa masas del citoplasma con gran cantidad de ribosomas en él. Estos ribosomas probablemente están sintetizando proteínas víricas; de ahí que su reacción tintórea sea diferente al del resto de los ribosomas celulares, como lo evidencia la coloración de Seller. La apariencia de un corpúsculo de Negri bien formado, bajo el microscopio electrónico, puede observarse en la Fig. 2 (13).

En algunas ocasiones se observan virus en la periferia de los corpúsculos de inclusión. La ausencia de virus en las membranas celulares del sistema nervioso central puede explicarse debido al estrecho contacto que hay en las células nerviosas; prácticamente no existen espacios libres en los que se pueda encontrar el virus; es decir, el virus al ensamblarse en las membranas celulares es proyectado hacia el interior de la célula contigua infectándola si no lo está. Los corpúsculos de inclusión corresponden entonces a las fases media y tardía del ciclo de infección tal y como se observa en cultivos celulares (capítulo II, 1, *a*). Si las células nerviosas entran en la fase degenerativa o no, es irrelevante pues con un suficiente número de células en "corto circuito", la vida del animal será imposible.

Si se infectan algunas células que inervan otros órganos, éstos pueden infectarse en mayor o menor grado según su susceptibilidad. Así, el virus de la rabia puede difundirse a las glándulas salivales, adrenales, grasa café y en menor proporción a las glándulas lagrimales, mucoides de la mucosa nasal y rara vez a otros órganos como el corazón, páncreas y útero (29).

Durante este proceso el sistema inmuno-competente del animal no está inactivo. De hecho se observa una buena producción de anticuerpos en los animales desafiados y que no han sido previamente vacunados (30). Existen, por otra parte, casos documentados de rabia abortiva (31, 32); es decir que los animales muestran síntomas de rabia, puede incluso aislarse el virus de ellos y el animal se recupera sin morir a causa de la enfermedad. Esto es relativamente común cuando se trabaja con virus de rabia de origen de murciélagos vampiros.

¿Qué es lo que está sucediendo? Aquí entramos a la parte más oscura de la patogenia del virus de la rabia. Indudablemente que si el sistema inmunocompetente del animal permaneciera totalmente inactivo, el virus de rabia tarde o temprano acabaría con la vida del animal. Es igualmente cierto que el exceso de virus inoculado que entra en la circulación es responsable de la producción de anticuerpos observada. Sin embargo una vez que el virus ha invadido



FIG. 2. Corteza cerebral de ratón infectado con virus V 319 de campo (no adaptado a cultivos celulares). Un corpúsculo de Negri (NB) mostrando las características inclusiones intracorpúsculares. También puede observarse una partícula vírica (VP) en el interior del corpúsculo. Aumento original 5 000 x (micrografía electrónica tomada por el auto)

el sistema nervioso central, el virus que se produzca y los antígenos virales que se liberen van a quedar restringidos por varios días a circular en el líquido cefalorraquídeo sin penetrar a la circulación general. Por otra parte, no se encuentran anticuerpos en el líquido cefalorraquídeo; es decir que aparentemente los anticuerpos circulantes no se difunden de la sangre al líquido cefalorraquídeo a través de la barrera hemático-cerebral. La única forma en que células inmunocompetentes pueden ponerse en contacto con las células infectadas en el sistema nervioso central es por diapédesis. En los animales muertos por rabia se encuentra infiltración perivascular y neuronofagia concurrente con destrucción de las neuronas. La señal que desencadena esta reacción no es clara; sin embargo, una vez que ha sido dada, se activa un mecanismo tendiente a eliminar la infección por destrucción de las neuronas infectadas. Si el número de células infectadas es bajo, la destrucción de las mismas es todavía compatible con la vida y se produce un caso de rabia abortiva; si el número de células infectadas es grande y su destrucción es incompatible con la vida, el animal moriría. De ser éste el caso, cuando los sistemas de defensa del animal hubieran destruido suficientes células nerviosas, ocurriría la muerte antes de que el virus hubiera tenido oportunidad de invadir a todas las células nerviosas. De los posibles mecanismos que causan finalmente la muerte del animal, probablemente todos juegan un papel de mayor o menor importancia, con variaciones de uno a otro caso clínico. La patogénesis de la rabia es una de las áreas de investigación más activa en el mundo (2).

Podría pensarse que si se inocula el virus por vía intracerebral los animales inmunes morirían de rabia. El caso es que la barrera hemático-cerebral se rompe durante la inoculación intracerebral y por lo tanto el virus queda expuesto a gran cantidad de anticuerpos en forma local. Los anticuerpos liberados durante la ruptura de la barrera hemático-cerebral son suficientes para inactivar al virus inoculado y por lo tanto, ésta no es una evaluación válida del estado inmune del animal.

4. Características de la enfermedad

La rabia pareasiente bovina ocasiona fuertes pérdidas a la ganadería de las áreas afectadas. Un cálculo conservador de las pérdidas en México es de 100 000 cabezas anualmente (33) y de 1 000 000 de cabezas de ganado bovino en Latinoamérica (34). El más reciente de estos cálculos considera la población de ganado bovino en Mé-

xico en 1964 y si bien el número de animales ha aumentado, también el porcentaje de animales vacunados es actualmente mayor. Las pérdidas actuales en cabezas de ganado muertas de rabia son difíciles de cuantificar dado el bajo número de casos sospechosos que se llevan a los laboratorios de la red nacional de laboratorios de diagnóstico o a otros laboratorios en los que se puede hacer el diagnóstico diferencial apropiado.

Como ya se mencionó antes, las pérdidas ocasionadas por el ataque de los murciélagos vampiros son múltiples e incluyen: *a)* debilitamiento de los animales por pérdida de sangre; *b)* miasis y otras infecciones secundarias de las heridas; *c)* muerte de aves por sangría total; *d)* baja conversión alimenticia al necesitar mas forraje para ganar peso y compensar la pérdida crónica de sangre; *e)* bajas en la producción de leche en los animales estabulados; *f)* depreciación de pieles; *g)* oclusión de los canales galactóforos de las cerdas en lactación debido a la cicatrización de las heridas en la glándula mamaria causada por vampiros; *h)* muerte por rabia parásitante. Como pérdidas aleatorias a la presentación de la enfermedad, se han citado las ventas de pánico que efectúan algunos ganaderos al presentarse la enfermedad. Como es lógico suponer, los precios a que venden sus animales es muy inferior al valor de los animales en el mercado (35).

Las mordeduras de vampiros en un animal no son necesariamente índice de que el animal enfermara de rabia. Existen áreas en nuestro país en que los vampiros están libres de rabia, sin embargo estas poblaciones pueden infectarse en un momento dado y los bovinos pueden empezar a morir de rabia. En este caso puede presentarse un brote de proporciones mayores, por lo cual sería muy conveniente tener vacunados a todos los animales domésticos y no esperar a que se presente el brote para vacunarlos.

a) Signos clínicos. Los animales afectados muestran pérdida de apetito, suspensión de la secreción láctea, inquietud y ansiedad en los estados iniciales de la enfermedad.

Mas tarde manifiestan temor y ocasionalmente puede observarse agresividad transitoria. Los animales no consumen ni agua ni alimento. El periodo agresivo (a veces de sólo unas horas) es seguido de una excesiva tranquilidad, falta de respuesta a los estímulos, el animal camina con dificultades motrices en el tren posterior, que van haciéndose mas aparentes a medida que avanza el cuadro clínico.

En los estadios finales de la enfermedad muestran incoordinación, parálisis del tren posterior, el animal camina derrengado (de ahí

el nombre de "derriengue" que se aplica a la enfermedad), y finalmente, es incapaz de levantarse, observándose contracciones musculares, movimientos desorganizados de los miembros y muerte. La muerte puede ocurrir entre los cuatro o seis días después de la presentación de los primeros signos clínicos. Una vez que se han presentado los primeros síntomas no hay nada que pueda hacerse por el animal. Con frecuencia los ganaderos envían al rastro a estos animales para su sacrificio rápido. Los animales muertos de rabia pareasiente son objeto de decomiso total, ya que representan un elevado riesgo de infección para los operarios del rastro y los carniceros que manejan estas canales. Es conveniente que el medico veterinario encargado de la inspección sanitaria de carnes tenga en mente la posibilidad de que se trate de introducir ilegalmente animales rabiosos, ya que en la actualidad no se hace ninguna prueba en los rastros para detectar esta enfermedad. En el caso de la rabia pareasiente, el cuarentenar al ganado por dos o más días, con observación diaria antes del sacrificio, puede ser muy útil para detectar a este tipo de animales.

b) *Diagnóstico*. Existen varios métodos para efectuar el diagnóstico diferencial de la enfermedad (36) que corresponden básicamente a dos tipos: 1) diagnóstico en animales de laboratorio, y 2) diagnóstico histopatológico. El diagnóstico histopatológico puede subdividirse en métodos de detección de corpúsculos de Negri e inmunodiagnóstico. Estos tipos de prueba se pueden efectuar una vez que ha muerto el animal. Recientemente se han introducido técnicas que permiten efectuar pruebas de diagnóstico diferencial en el animal vivo.

Diagnóstico en animales de laboratorio. Puede examinarse cerebro o glándulas salivales de animales sospechosos. Se prepara una suspensión de concentración conocida (generalmente al 10 o al 20%) de tejido sospechoso en solución salina estéril. Existen varios tipos de diluyente, sin embargo estos responden más a preferencias individuales que a una necesidad real de la prueba. Una vez preparada la suspensión se centrifuga a 1 500 r.p.m. (150 a 200 g) durante cinco minutos, para luego colectar el sobrenadante, e inocular un lote de ratones blancos de 21 días de edad por vía intracerebral. Los ratones deberán observarse diariamente durante 21 días, eliminando de la prueba a los que mueran antes de cinco días, pues estas muertes no son específicas.

El virus de la rabia debe ser completamente neutralizado por un suero antirrábico mono-específico de referencia. La neutralización

del virus con el suero de referencia constituye la prueba definitiva de que se trata de virus de rabia.

Pruebas histopatológicas. El diagnóstico histopatológico se basa en el reconocimiento de los corpúsculos de Negri en el encéfalo, cuya presencia continúa considerándose la lesión patognomónica de la rabia (37).

Existen numerosas técnicas para preparar el material para su examen. La mas sencilla es la tinción de impresiones frescas con el colorante de Seller. Se preparan impresiones de asta de Amon, corteza cerebral, cerebelo y medula oblonga. Antes de que se sequen las impresiones se sumergen en el colorante de 1 a 5 segundos, dependiendo del grueso de la impresión, se enjuagan rápidamente en agua de la llave y se dejan secar al aire. Se examinan al microscopio óptico con campo claro, primero a menor aumento para localizar áreas abundantes en neuronas y después bajo inmersión para detectar los corpúsculos de Negri. Los corpúsculos de Negri aparecen como estructuras redondeadas de color magenta, baja refringencia y con gránulos azules en su interior. La forma de los corpúsculos puede variar desde circular, oblonga, ameboide e inclusive triangular, pero siempre con bordes lisos y regulares (Fig. 3).

Colorante de Seller

1. Azul de metileno	10 gramos
Metanol (libre de acetona) para hacer	1 000 ml.
2. Fucsina básica	5 gramos
Metanol (libre de acetona) para hacer	500 ml.

Solución de tinción

Azul de metileno (solución 1)	2 partes
Fucsina básica (solución 2)	1 parte

Mezclar bien las dos soluciones sin filtrar. La solución de tinción y las soluciones base deben mantenerse en frascos con tapón de rosca o tapón de vidrio esmerilado.

En ocasiones ocurre que la diferenciación de colores no es adecuada. Esto es notorio si las preparaciones teñidas tienden demasiado hacia el azul o hacia el rojo. Si el citoplasma celular aparece rojo en lugar de rosa en las áreas más delgadas, la fucsina es demasiado dominante. Agregar cantidades medidas de azul de metileno hasta obtener el balance deseado. Si los corpúsculos de Negri apa-

recen de color café lechoso y las neuronas teñidas de color muy oscuro, el azul de metileno es dominante y se debe agregar fucsina básica hasta obtener el balance de color deseado. Una vez que se han ajustado las concentraciones de los colorantes para obtener el balance de color deseado, el colorante se mantendrá en buenas condiciones si se previene la evaporación.

Existen otros métodos más elaborados tanto de preparar como de teñir los especímenes. Estos métodos requieren de inclusión en un medio de soporte, cortes finos, etcétera, para obtener buenos resultados y además requieren experiencia considerable para su ejecución correcta. Existen el método de Mann, el de Fucsina-Safranina, el de Stovall y Bleck, el de Lentz, el de Romanwski y el de

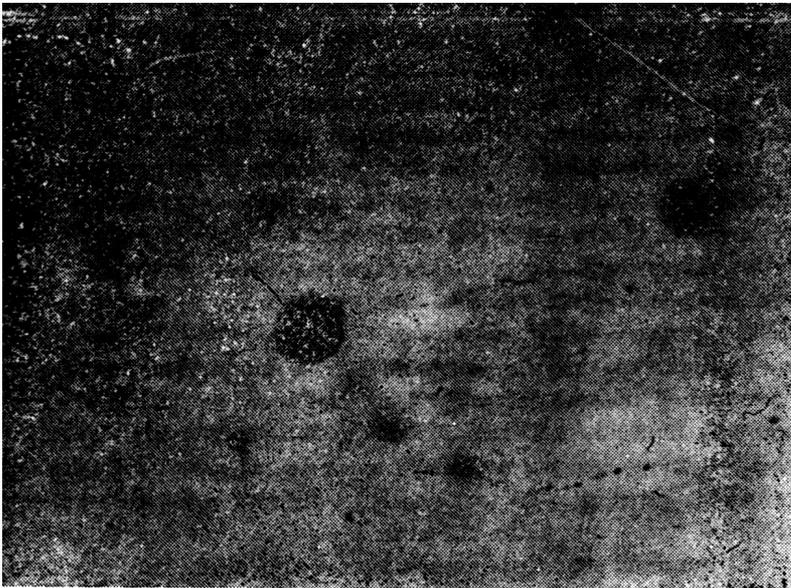


FIG. 3. Impresión de cerebro de ratón infectado con virus de rabia de equino, tinción de Sellers. Aumento 800 x (cortesía del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM)

Schlefstein (37), entre otros, todos los cuales requieren de inclusión en parafina o en otro medio de soporte como el metacrilato soluble en agua, etcétera. Requieren asimismo de equipo completo y personal especializado para hacer los cortes, tinciones y observación microscópica.

Técnicas de inmunodiagnóstico. La especificidad de los anticuerpos para combinarse con su antígeno ha sido empleado con ventaja. para efectuar el diagnóstico diferencial de la rabia y otras enfermedades. Los anticuerpos presentes en un suero antirrábico hiperinmune se marcan con un colorante, generalmente un fluorocromo (el mas empleado es el isotiocianato de fluoresceína (bajo condiciones apropiadas que impidan la desnaturalización de las proteínas. Los anticuerpos así tratados retienen su capacidad de combinarse con su antígeno. Al localizarse los anticuerpos en el sitio en que se encuentra el antígeno, se fijan a este y es posible detectar el antígeno con un alto grado de seguridad y eficiencia.

Esta técnica requiere de equipo especializado (microscopio para fluorescencia) así como de personal entrenado, pero es comparativamente sencilla y rápida de efectuar (38).

Recientemente se ha empezado a utilizar otro tipo de sustancias para marcar los anticuerpos. Una de ellas que promete llegar a ser una valiosa ayuda para el laboratorista es la de utilizar enzimas que normalmente no se encuentran en los tejidos. Hasta la fecha se han hecho conjugados con fosfatasa ácida y con peroxidasa de rábano (39). Ambas enzimas son escasas o inexistentes en la mayoría de los tejidos hasta hoy estudiados. Este tipo de preparaciones retiene las ventajas de la inmunofluorescencia en el sentido de que continúa siendo una reacción antígeno-anticuerpo específica, pero tiene algunas ventajas adicionales.

El límite máximo de sensibilidad de la inmunofluorescencia esta dado por el número máximo de moléculas que es posible conjugar con una molécula de gama globulina. Si la proporción es de 1:1, el ojo humano necesitará contar con varios miles de moléculas concentradas en el sitio de localización antigénica a fin de poder detectarlas como un punto brillante.

El inmunodiagnóstico enzimático, por otra parte, no depende del número de moléculas combinadas con el antígeno, pues no es a la enzima a la que se busca, sino del número de moléculas de reacción que la enzima produzca.

La cantidad de producto de reacción en el área del antígeno estará dada por el tiempo de reacción mas que por el número de moléculas de enzimas que se encuentren presentes. El conjugado consiste, entonces, de una molécula de gama globulina y una molécula de enzima, ambas activas. Los anticuerpos se fijarán a un antígeno y una vez realizada la combinación se procederá a localizar la enzima, proporcionándole para ello el substrato adecuado.

El producto de reacción enzimática puede poseer un color característico o bien puede fijar preferentemente a un colorante. En el caso de la peroxidasa, el sustrato es la diaminobencidina. El producto de reacción fija preferentemente al ácido ósmico, lo cual permite observar los corpúsculos de inclusión teñidos de color café oscuro. Las preparaciones son permanentes, se pueden observar en el microscopio óptico con campo claro e iluminación normal. Este tipo de preparaciones ofrece la ventaja adicional de ser apropiada para microscopía electrónica (el ácido ósmico es un colorante para microscopía electrónica).

Se conocen dos pruebas diagnósticas que pueden efectuarse en el animal vivo: Se ha encontrado que el virus de la rabia es excretado en saliva, moco y lágrimas de los animales infectados. Una impresión de córnea en una laminilla se colorea con anticuerpos fluorescentes en la forma usual. Las células de la conjuntiva ocular que se desprenden y se eliminan en las lágrimas pueden mostrar corpúsculos de inclusión específica de rabia (38). La saliva puede colectarse en hisopos estériles y utilizarse para infectar cultivos celulares. Tres días después de la infección se tiñen los cultivos con anticuerpos fluorescentes y se puede observar grupos de células infectadas con el virus de la rabia (40). Si bien ambas pruebas si son positivas son concluyentes en cuanto a la presencia de la enfermedad, en caso de ser negativas esto no necesariamente significa que la rabia quede excluida. La importancia de estas pruebas reside no tanto en el diagnosticar esta enfermedad en animales vivos como en determinar si el virus fue excretado en la saliva y lágrimas o no. Una prueba complementaria consiste en examinar las glándulas salivales para presencia del virus utilizando algunas de las pruebas antes descritas.

III. Metodología de control

Todo esfuerzo encaminado a resolver el problema de la rabia pareasiente no puede ser enfocado desde un punto de vista simplista. Las pérdidas ocasionadas por la enfermedad son muy importantes (véase el capítulo II, 4), sin embargo, el ataque de los murciélagos vampiros, ocupa un renglón importante en las pérdidas ocasionadas a la ganadería subtropical. La solución satisfactoria a esta serie de problemas debe ser a lo largo de dos líneas de ataque. Primeramente se debe aplicar los métodos mas eficientes para reducir la población de vampiros y en segundo termino, se debe vacunar a

todos los animales susceptibles y que habitan en las zonas en que existe el murciélago vampiro.

1. *Tipos de vacunas.* Desde que se identificó el agente causal del "Derriengue" como virus rábico (6), se empezaron a utilizar vacunas para la prevención de esta enfermedad. Esas primeras vacunas eran vacunas inactivadas producidas a partir de tejido nervioso de carnero infectado con el virus rábico. La primera vacuna de virus vivo modificado fue una vacuna avianizada (41) producida en embrión de pollo. Esta vacuna fue introducida a México hace 15 años (42). Este tipo de vacunas fueron lo mejor con que se contaba en su tiempo y es muy laudable el que nuestros colegas mexicanos se hayan preocupado de elaborar la vacuna Flury de alto pasaje en embrión (HEP) en nuestro país. Por una u otra razón, en 1965 se tienen noticias de la ineficacia de la vacuna cepa Flury para detener un brote de derriengue, encontrándose que a los seis meses de la vacunación no se encontraron anticuerpos en los animales vacunados (43). Entre otras cosas se observa que de nueve vacunas comerciales probadas sólo una llenaba los requisitos mínimos para su aprobación (44).

En 1971 se comprueba nuevamente que el nivel de anticuerpos conferido por estas vacunas es inadecuado y que los animales no estaban protegidos contra el desafío virulento (45). En 1967 y 1968 se empezó a probar en México una nueva vacuna desarrollada en Canadá (46) y preparada en cultivos primarios de riñón de cerdo. En pruebas críticas se encontró que ésta era una vacuna adecuada para la prevención de la rabia pareasiente bovina (30, 47). Ante esta situación se retiraron del mercado mexicano las vacunas de embrión de pollo cepa Flury y se empezó a utilizar en gran escala la cepa ERA en todo el país.

Paralelamente a estos trabajos, el Proyecto de Investigaciones sobre Rabia Parálitica FAO /INIP* desarrolló una vacuna antirrábica a partir de un aislamiento (V 319) de virus rábico de origen de murciélago vampiro (48, 49). Esta vacuna también es elaborada en cultivos celulares, lo que permite producción en gran escala a costo reducido. En la actualidad más de 100000 cabezas de ganado en México han recibido la vacuna cepa V319** de origen

* Organización para la Agricultura y la Alimentación y el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias.

** La cepa V 319 a partir de la que se elabora la vacuna contra derriengue en el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, ha sido llamada también cepa Acatlán por razones "políticas" (¿?).

de murciélago vampiro. Estas dos vacunas ERA y V 319, son las únicas que se elaboran en cultivos celulares que han pasado las pruebas de control de calidad determinadas para este tipo de productos. Existen además otras dos vacunas contra el derriengue, producidas en cultivos celulares siendo, una a virus vivo y otra inactivada, que se están probando actualmente en nuestro laboratorio y que prometen ser productos biológicos adecuados.

La situación privilegiada que ocupan actualmente las vacunas cepa ERA y cepa V 319 es muy envidiada por firmas comerciales poco escrupulosas que han quedado rezagadas en la producción de este tipo de biológicos. La historia de la vacuna cepa Flury nos dio una lección muy valiosa y que es preciso no olvidar: La cepa avianizada producida por Koprowski (41), fue entregada a numerosas firmas comerciales. Después de muchos años de producción, la semilla maestra de esta cepa se agotó y en lugar de recurrir a Koprowski para que proporcionara nuevos lotes de semilla maestra, los laboratorios procedieron a recuperar el virus de las vacunas ya elaboradas. Además, algunos laboratorios simplemente compraron vacunas de otras firmas comerciales, tomando de ellas la cepa vacunal. Con esto, se fue dando un número indeterminado de pases a la cepa HEP, hasta que ésta perdió su inmunogenicidad. Esto podría explicar los resultados desfavorables con esta cepa encontrados por Arellano *et al.* en 1971 (45).***

Es probable que en la actualidad algunas firmas comerciales se sientan tentadas a repetir este tipo de "piratería" de cepas y que con cambiar el nombre de la misma, se crean a salvo de demandas por parte de los laboratorios que desarrollaron el producto. Si bien es cierto que este tipo de procedimientos es posible, lo que no ven es que han dado un número adicional de pases a la cepa vacunal y que ésta puede perder su inmunogenicidad. En este caso se encontrarán con una cepa de virus rábico adaptado a cultivo de tejidos, pero no con una vacuna.

2. *Métodos de aplicación.* La gran mayoría de las vacunas antirrábicas que se han usado y actualmente en usa, son de aplicación intramuscular. La excepción son las vacunas de uso humano cuya aplicación mas conveniente (mas cómoda) es la subcutánea.

Paradójicamente a medida que las vacunas se han ido mejorando, su manejo se hace cada vez mas delicado. Las vacunas inac-

*** Observaciones del autor.

tivadas pueden resistir una o varias semanas sin refrigeración sin perder su poder inmunizante aunque de corta duración. Las vacunas avianizadas debían mantenerse en refrigeración constante y solo reconstituir antes de su uso el número de dosis que iba a usarse.

Las vacunas antirrábicas de virus vivo preparadas en cultivos celulares son las más delicadas en su manejo. Hay buenas razones para la tediosa lista de precauciones de manejo de estas vacunas. Si bien su bajo contenido de proteínas extrañas hace nulo el riesgo de choques anafilácticos a la revacunación, su mismo bajo nivel de proteínas hace que el virus esté poco protegido y por lo tanto cualquier mal manejo de la vacuna resultará en una pérdida de su potencia. Las vacunas antirrábicas preparadas en cultivos celulares deben manejarse siempre en refrigeración; transportarse hasta el corral en donde se van a vacunar los animales en un caja de espuma plástica (aislante) con suficiente hielo para todo el día. Sólo debe reconstituirse un frasco de 10 dosis a la vez. El frasco de vacuna que se ha reconstituido, deberá aplicarse en su totalidad durante la siguiente hora de su preparación. Deberá trabajarse siempre bajo una sombra, evitando la exposición de la vacuna a los rayos directos del sol. Deberá regresarse el frasco con las dosis no usadas al hielo y si no se va a vacunar a un animal inmediatamente después de cargada la jeringa, esta deberá mantenerse también con hielo. Es conveniente cargar una sola dosis en la jeringa en cada ocasión, a menos que se tenga a varios animales bien sujetos y listos para vacunarse. Con el fin de evitar la transmisión de hemoprotozoarios se recomienda utilizar una aguja para cada animal, procediendo a lavarlas y hervirlas antes de usarlas nuevamente.

Estas precauciones podrán aparecer exageradas a primera vista pero nuestras pruebas de laboratorio con varias vacunas indican que son indispensables.

3. *Control del vector.* Los métodos del control del vampiro han evolucionado considerablemente a través del tiempo. Se ha probado dinamitar las cuevas, usar gases venenosos y otros sistemas semejantes, cuya falta de selectividad ha causado problemas a la ecología de la región. El único método selectivo con que se contaba consistía en colocar trampas a la entrada de las cuevas y examinar a cada quiróptero que quedará atrapado en ellas. Si se trataba de un vampiro se le mataba y si era otro *tipo* de murciélago se le dejaba en libertad. Como podrá suponerse este sistema resultó demasiado lento y costoso para producir una reducción significativa en la población de vampiros en una región

Recientemente el Departamento del Control de Vampiros del INIP de México, en colaboración con el Departamento de Caza y Pesca de los Estados Unidos de Norte América inició una nueva metodología para el control de los murciélagos vampiros (50, 51). Este método consiste en aplicar un anticoagulante (difenadiona) suspendido en un gel de petrolato al dorso de vampiros capturados en los corrales alrededor del ganado. Cada vampiro tratado lleva suficiente producto vampiricida para contaminar a 10 vampiros en la cueva. Cuando los vampiros consumen el producto al limpiarse la piel y el pelo, mueren por hemorragias masivas. La consistencia del producto es importante ya que debe ser lo suficientemente pegajosa como para hacer que el vampiro se sienta incómodo y se limpie la piel (esta operación la efectúan con las uñas de las patas y con la lengua). La susceptibilidad del vampiro a los anticoagulantes es desacostumbradamente alta. Una dosis que no tiene efecto en un ratón (5 mg por kg de peso, por ejemplo) es letal para el vampiro. Esto da un amplio margen de seguridad para el manejo del producto ya que la definadiona se emplea a dosis terapéuticas para el hombre a niveles hasta de 30 mg diarios. Para mayor información se remite al lector a una información especializada (52).

IV. Conclusiones

Se cuenta actualmente con la tecnología adecuada para resolver el problema que representa la rabia pareasiente bovina y el ataque nocturno del vampiro a los animales domésticos. Para resolver el problema es necesario aplicar estas técnicas en gran escala.

1. Reducción de la población de vampiros por medio de anti-coagulantes. Si bien este método ha dado muy buenos resultados en el campo, es difícil suponer que se pueda eliminar por completo al vampiro. El método es eficiente y económico de aplicar para reducir las colonias de vampiros, a un nivel compatible con una buena ganadería y eliminar periódicamente a los vampiros que entren a las zonas ganaderas.

2. Vacunar periódicamente a todo el ganado mantenido en las zonas habitadas por el murciélagos vampiro. Es importante vacunar aun en ausencia de vampiros infectados en la región, ya que de introducirse el virus rábico, esto ocasionará un brote de proporciones mayores. También es importante vacunar los becerros de vacas inmunes hasta los seis meses de edad, ya que los anticuerpos

maternos transmitidos a estos becerros inhiben el virus vacunal, impidiendo que queden protegidos.

La aplicación conjunta y extensa de ambas técnicas de control de la rabia pasesiante, permitirá una ganadería subtropical libre del problema que ésta representa.

REFERENCIAS

1. Johnson, H. N. *Rabies Virus, in Viral and Rickettsial infections of Man*. J. H. Lippincot Co. 4th ed. pp. 819-840, 1965.
2. World Health Organization, Expert Committee on Rabies. *Sixth Report*, WHO, Geneva, Switzerland, 1973.
3. Plummer, P. J. G. Rabies in Canada with special reference to wild life reservoirs. *Bulletin of the World Health Organization*. 10: 767-774, 1954.
4. Baer, G. Comunicación personal, 1964.
5. Lenette, E. H., Soave, O. A., Nakamura, Kand Kellogg G. H. A fatal human case of rabies following the bite of a rabid bat (*Lasionjcteris noctivagans*), isolation and identification of the virus from the vector and victim. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*. 5 55: 89-93, 1960.
6. Pawan, J. L. The transmission of paralytic rabies in Trinidad by the vampire bat (*desmodus rotundus murinus*, Wagner, 1890). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 30: 101-131, 1936.
7. Queiroz Lima, E. De. A transmisao de raiva bovina pelo morcego hematophago *Desmodus rotundus*. *Brasil Medico*. 48: 39-40, 1934.
8. Atanasiu, P. Le virion rabique. *Economie et medicine Animal*. 5:257268, 1971.
9. Andrewes, C., and Pereira, H. G., *Viruses of vertebrates*. Edited by Williams Wilkins Co. 1972.
10. Hackett, A. J., Schafer, F. L. and Machin, S. A. The separation of infectious and autointerfering particles in vesicular stomatitis virus preparations. *Virology*. 31:114-119, 1967.
11. Hummler, K., Koprowski, H., and Wiktor, T. Structure and development of rabies virus in tissue culture. *Journal of Virology*. 1: 157-170, 1967.
12. Hummler, K., Armstrong, D., and Tomasini, N. Cytopathogenic Mycoplasmas associated with two human tumors. II. Morphological aspects. *J ournal of Bacteriology*. 90: 511-516, 1965.
13. Hernandez Baumgarten, E. M. Comparative electron microscope studies of the virus-cell interactions associated with several tissue culture adapted strains of rabies virus *Written examination for the requirements for the Ph. D. degree* at the University of California. 1972.
14. Kuwert, E., Wiktor, T. J. Sokol, F., and Koprowski, H. "Hemmagglutination by rabies virus", *Journal of Virology*. 2: 1381-1392, 1968.
15. Perez Villarreal, L. and Holland, J. J. Transcribing complexes in

- cells infected by vesicular stomatitis virus and rabies virus. *Journal of Virology*. 14:441-4-50, 1974.
16. Greenhall, A. M. Lucha contra los murciélagos vampiros. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 71(3): 231-264-, 1971.
 17. Greenhall, A. M., Schmidt, U. and López-Forment W. The attacking behavior of the vampire bat, *Desmodus rotundus* (E. Geoffroy, SaintHilarie) under field conditions in Mexico. *Biotrópica*, Vol. 3(1): 136141, 1971.
 18. Campos Vela, J. M. Identificación de la ingesta gástrica para determinar los huéspedes del murciélago *Desmodus rotundus* como contribución a la epizootiología de la rabia paralítica en México. *Tesis para obtener el grado de Médico Veterinario*, UNAM. 1972.
 19. Flores Crespo, R., Linhart, S. B., Burns, R. J. and Mitchell, G. C. Foraging behavior of the common vampire bat related to moonlight. *Journal of Mammology*, 53: 336-368, 1972.
 20. Goodpasture, E. W. A study of rabies with reference to a neural transmission of the virus in rabbits and the structure and significance of Negri bodies. *American Journal of Pathology* 1:547:552,1925.
 21. Johnson, R. T.; "The pathogenesis of *Herpes virus encephalitis*. I virus pathway to the nervous system of suckling mice demonstrated by fluorescent antibody." *Journal of Experimental Medicine*. 119:343, 1964-.
 22. Rabín, E. R., Jenson, A. B. and Melnick, J. L. "Herpes simplex virus in mice: electron microscopy of neural spread". *Science* 162: 126-134-, 1968.
 23. Schindler, R. Studies on the pathogenesis of rabies. *Bulletin of the World Health Organization*. 25:119-126, 1961.
 24. Dean D. J., Evans, W. M. and McClure, R. C. Pathogenesis of Rabies. *Bulletin of the World Health Organization*. 28:477-486, 1963.
 25. Johnson R. T., Experimental rabies. Studies of cellular vulnerability and pathogenesis using fluorescent antibody staining. *Journal of Neuropathology and experimental neurology*. 24: 662-68, 1965.
 26. Singer, M. and Byrant, S. V., Movements in the myelin Schwann sheath of the vertebrate axon. *Nature* 221: 1148-1149. 1969.
 27. Burwood, W. O. Rapid bidirectional particle movement in neurons. *Journal of Cell Biology* 27: 115 A 1965.
 28. Du Praw E. J. *The functional organization of neurons in Cells and Molecular Biology*. Academic Press; Inc., Fifth Printing, 1970.
 29. Arellano S. C., Sureau, P. y Zavala F., O. Estimación de la frecuencia de la infección y detección de portadores sanos en vampiros naturalmente infectados. *VIII Reunión Anual INIP, 1971*.
 30. Arellano, S. C., Sureau, P., Batalla, C., D. Evaluación de la eficacia de la vacuna antirrábica cepa "ERA" en bovinos: I antigenicidad. *Técnica Pecuaria en México* 18: 12-15, 1971.
 31. Bell, J. F. Abortive rabies infection. I Experimental production in the white mice and general discussion. *Journal of Infectious Diseases*. 114: 249-257, 1964.
 32. Bijlenga, G. Hernández B., E. M. y Mar C., R. Infección abortiva de rabia. *VIII Reunión Anual INIP. 1971*.

33. Valdez Ornelas, O. and Atristain, G. Bat rabies in Mexico. *Southern Veterinarian*. I: 13-16, 1964.
34. Malaga Alba, A. La rabia de los murciélagos como problema veterinario y de salud publica tropical. *Ciencias Veterinarias*. 4:520-531, 1959.
35. Prieto, F. Comunicación personal, 1968.
36. Koprowski, H. The mouse inoculation test in Laboratory Techniques in Rabies. Ed. by Kaplan, M. M. and Koprowski, H. *World Health Organization Monograph Series No. 23*. Third edition, 1973.
37. Lepine P. Histopathological diagnosis in Laboratory Techniques in Rabies. Eds. Kaplan, M. M. and Koprowski H. *World Health Organization Monograph series No. 23*, Third edition, 1973.
38. Dean, O., J. and Abelseth, M. K. The fluorescent antibody test in Laboratory Techniques in Rabies, Eds. Kaplan M. N., and Koprowski, H. *World Health Organization monograph series No. 23*, Third edition, 1973.
39. Nekane, P. K. and Pierce, G. B. "Enzyme labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens". *Journal of Cell Biology*. 33:307-317, 1967.
40. Mancisidor N. A. y Arellano, S. C. Aislamiento en cultivo celular a partir de saliva y cerebro de ratones lactantes experimentalmente infectados. *VII Reunión Anual INIP*, 1971.
41. Koprowski, H. Studies on chick-embryo-adapted rabies virus. VII. Immunological responses of animals to vaccination with high egg passage of Flury strain. *Journal of Immunology*. 72:503-510, 1954.
42. Camargo N., F. y Velazquez E., A. Desarrollo y producción en México de la vacuna avianizada para el control del Derriergue. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 43: 251-259, 1957.
43. Baer, G. M. Rivera, C., E., Mancisidor, A., A. Títulos de sueroneutralización contra el Derriergue producidos por una vacuna autógena. *Técnica Pecuaria en México*. 6: 11-15, 1965.
44. Correa, G., P. y Solana M. P. Potencia de vacunas contra derriergue adquiridas en farmacias veterinarias y en sus laboratorios de producción. *Técnica Pecuaria en México*. 18: 22-26, 1966.
45. Arellano S. C., Surcau, P., Batalla C., D. y Morales R. J. Evaluación de la vacuna cepa Flury contra la rabia paralítica bovina. *Técnica Pecuaria en México*. 19:9-14, 1971.
46. Abelseth, M. K. An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture. *Canadian Veterinarian*. 5: 279-286, 1964.
47. Sureau, P., Arellano S., C. V Batalla C., D. Evaluación de la eficacia de la vacuna antirrábica cepa "ERA" en bovinos: II. Duración de Inmunidad. *Técnica Pecuaria en México*. 18: 16-21, 1971.
48. Bijlenga G., and Hernandez Baumgarten, E. M. "Adaptation, attenuation and plaque purification of a rabies isolates (V 319) from a vampire bat (*Desmodus rotundus*)."
American Journal of Veterinary Research (in the press), 1975.
49. Bijlenga, G. and Hernández Baumgarten, E. M. "Testing of the vaccine potential of the plaque purified rabies virus strain V 319, derived from a vampire bat (*Desmodus rotundus*) in Mexico." *American Journal of Veterinary Research* (in the press), 1975.

50. Linhart, S. B., Flores Crespo, R. y Mitchell G. C. Control de murciélagos vampiros por medio de un anticoagulante. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 73(2): 100-109, 1972.
51. Flores Crespo, R., Said, S. y Burns, R. J. Reducción de la dosis de anticoagulante (difenadiona) para el control de los vampiros. *Técnica Pecuaria en México*. 23: 19-22, 1972.
52. Flores Crespo, R. y Morales R., J. Métodos para combatir los vampiros y prevenir la rabia bovina. *Boletín Informativo del INIP* (en prensa, 1975).