

## ESTUDIO DE UN BROTE DE RABIA EN EL ESTADO LARA, VENEZUELA DURANTE EL PERÍODO ENERO-DICIEMBRE 2007

### Study of a Rabies Outbreak in Lara State, Venezuela. January-December 2007

Mayra Hidalgo<sup>\*1</sup>, José Gómez<sup>\*</sup>, Luzmir Boyer<sup>\*</sup>, Sara Papo<sup>\*</sup>, Zoris Páez<sup>\*\*</sup> e  
Hilda Perfetti de Vásquez<sup>\*\*\*</sup>

*\*Sanidad Animal, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias-Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (CENIAP-INIA). Maracay, estado Aragua. \*\*Laboratorio Regional de Diagnóstico del Servicio Autónomo de Sanidad Agropecuaria (SASA) del estado Lara. \*\*\*Oficina de Epidemiología SASA-Lara.*

**Correo-E: [mhidalgo@inia.gob.ve](mailto:mhidalgo@inia.gob.ve)**

Recibido: 08/02/08 - Aprobado: 01/10/08

#### RESUMEN

En Venezuela la rabia se ha presentado en forma endemo-epidémica, causando pérdidas económicas a la ganadería y afectando la salud humana. Para reportar la situación epidemiológica de la rabia en el estado Lara, período enero-diciembre 2007, se analizaron 228 muestras de tejido nervioso pertenecientes a un humano y a distintas especies de animales domésticos y silvestres, recolectadas en esa región y estados limítrofes. Para evidenciar la presencia del virus, se utilizó la prueba de inmunofluorescencia directa (IFD). La amplificación viral se efectuó en ratones lactantes. La caracterización antigénica se realizó por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la nucleocápside viral. Se evaluó la potencia de la vacuna antirrábica utilizada durante el brote, por el método NIH y se determinó el título de anticuerpos antirrábicos a 51 muestras de suero de bovinos por el método de seroneutralización en ratones jóvenes. Dieciocho muestras resultaron positivas en el estado Lara, en tejidos de humano (1), bovinos (8), equino (1), caprinos (3), ovinos (3) y vampiros *Desmodus rotundus* (2). Se detectó un equino positivo en el estado Cojedes. Las cepas virales se clasificaron

#### ABSTRACT

In Venezuela, rabies has evolved as endemic-epidemic, causing economic losses to livestock and affecting human health. To report the epidemiological situation of rabies in the State of Lara, Venezuela, from January to December 2007, a total of 228 samples of nervous tissue belonging to a human patient and various species of domestic and wild animals harvested in the region and in bordering states was analyzed. To detect the presence of the rabies virus antigen, a direct immunofluorescence test (DIF) was used. Virus amplification was carried out in suckling mice. Antigenic characterization was performed by indirect immunofluorescence test using monoclonal antibodies directed against the viral nucleocapsid. Potency of rabies vaccine used during the outbreak was assessed by the NIH method and rabies antibodies title was determined in 51 bovine serum samples by means of the serum neutralization method in young mice. The distribution of the eighteen positive samples in Lara State was as follows: 1 human, 8 cattle, 1 horse, 3 goats, 3 sheeps, and 2 vampire bats (*Desmodus rotundus*). One horse was detected positive in Cojedes State. Viral strains were classified as type-3 antigenic

<sup>1</sup> A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

como Variante Antigénica 3, indicando que el principal transmisor de la enfermedad fue el *Desmodus rotundus*. La vacuna antirrábica utilizada mantuvo su potencia relativa en 7,58 UI/mL y el índice de protección antirrábica promedio resultó 1:163 DE<sub>50</sub>/0,03 mL, demostrado en el 94% de los sueros analizados. Este brote se originó en el Municipio Morán del estado Lara, evidenciando el gran peligro que la rabia silvestre representa para la salud humana.

**(Palabras clave:** Chiroptera, rabia, animales domésticos, género humano, vigilancia de enfermedades, vacuna, Lara, Cojedes)

variant, indicating that the main source of the disease was the *Desmodus rotundus*. The rabies vaccine used maintained its relative potency in 7.58 IU/mL and the average index of rabies protection was 1:163 DE<sub>50</sub>/0.03 mL, which was detected in 94% of the sera. This outbreak originated in the Morán Municipality of Lara State, underscoring the great risk that wild rabies represents to human health.

**(Key words:** Chiroptera, rabies, domestic animals, mankind, disease surveillance, vaccines, Lara, Cojedes)

## INTRODUCCIÓN

La rabia es una enfermedad zoonótica mortal, que afecta al sistema nervioso central de una gran cantidad de mamíferos salvajes y domésticos de todas las edades, incluyendo al hombre. Es ocasionada por el virus rábico, prototipo del género *Lyssavirus*, de la familia *Rhabdoviridae*. El genoma está compuesto por ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple y polaridad negativa, rodeado de una cápside proteica con forma de bala, de 165 nm de largo y 50 nm de ancho (Rose y Whitt, 2001).

En Venezuela, la rabia se ha presentado durante muchos años en forma endemo-epidémica, (Hidalgo et al., 2005; Molina y Plaza, 2006; MPPAT-SASA, 2007) constituyendo un problema socioeconómico ya que afecta a la población humana y produce pérdidas económicas en la ganadería. La enfermedad se encuentra distribuida en todo el país y se ha incrementado en los últimos años en regiones que por décadas, se consideraban libres de la enfermedad (Hidalgo, 2005). Debido al carácter zoonótico de esta enfermedad y a que la mortalidad es del 100%, se hace necesario mantener una vigilancia epidemiológica permanente, para controlar la aparición de brotes de rabia en los animales o casos en la población humana, ya que una vez que los síntomas se desarrollan, el desenlace de la enfermedad es fatal.

Los resultados de detección de antígeno rábico en combinación con la tipificación del virus con anticuerpos monoclonales (AcM), permiten la

identificación de la especie animal que sirve como reservorio responsable de un brote de rabia en una determinada zona, lo cual lleva a establecer medidas rápidas y eficaces de control y vigilancia epidemiológica. Por otra parte, evaluando la respuesta inmune que confiere la vacuna antirrábica en los rebaños inmunizados con este biológico, se logra obtener información sobre el grado de protección contra la rabia. El objetivo de esta investigación fue estudiar la aparición de un brote del virus de la rabia en el estado Lara, evaluando el período enero-diciembre 2007, analizando muestras de un humano, 26 mamíferos domésticos y 101 mamíferos silvestres.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Muestras*

Se analizaron 228 muestras de tejido nervioso de un humano y de especies de mamíferos domésticos y silvestres, procedentes del estado Lara y estados limítrofes, así como murciélagos hematófagos y no hematófagos que fueron remitidas al Laboratorio de Rabia de Sanidad Animal-Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), durante el período enero a diciembre 2007. Cincuenta y cuatro (54) muestras de suero sanguíneo de bovinos vacunados contra la rabia durante el desarrollo del brote, fueron recolectadas por el personal del Servicio Autónomo de Sanidad Agropecuaria (SASA) del Ministerio de Agricultura y Tierras. Se analizó un lote de vacuna antirrábica comercial, recolectada

de la nevera ubicada en la Oficina de SASA del estado Lara, que fue la utilizada para inmunizar a los animales en las fechas previas al brote.

### **Clasificación de murciélagos**

La identificación taxonómica de los murciélagos se realizó utilizando el manual Mamíferos de Venezuela, lista y claves para su identificación (Fernández-Badillo *et al.*, 1988).

### **Detección de virus rábico**

Se efectuó por la prueba de inmunofluorescencia directa (IFD), siguiendo el protocolo de Meslin *et al.* (1996), el cual consistió en hacer improntas de los cerebros sospechosos en láminas portaobjeto, fijarlas en acetona y teñirlas con suero hiperinmune contra virus rábico producido en oveja, y conjugado con isotiocianato de fluoresceína. Luego de 30 min de incubación a 37°C, las láminas se lavaron, se dejaron secar y se observaron en un microscopio de fluorescencia marca Zeiss, con un aumento de 40X. Cada ensayo incluyó una lámina con improntas de cerebro de ratón, previamente inoculado con virus rábico, como control positivo.

A objeto de amplificar las cepas de virus rábico de las muestras que resultaron positivas, se inocularon por vía intracraneal suspensiones de cerebros infectados en ratones lactantes de 3 d (Meslin *et al.*, 1996) se observaron diariamente hasta la aparición de signos nerviosos, recolectándose sus cerebros. La presencia del virus en los cerebros se confirmó por la prueba de IFD.

### **Caracterización antigénica por inmunofluorescencia indirecta con AcM**

Se hicieron improntas de los cerebros de los ratones positivos a la amplificación viral, se tiñeron por inmunofluorescencia indirecta (IFI) con un panel de ocho AcM dirigidos contra la nucleocápside viral, en dilución 1:1000, siguiendo el protocolo de de Mattos y de Mattos (1989). Luego de un período de incubación de 30 min a 37°C, las láminas se lavaron a fin de remover los AcM libres y se tiñeron nuevamente, con una dilución 1:100 de inmunoglobulina G de cabra contra ratón, conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Cappel, Organon Teknika Corp. Pensilvania, EUA). Las láminas se incubaron por 30 min a 37°C, se lavaron y dejaron secar y se observaron en un microscopio de fluorescencia marca Zeiss, con

un aumento de 40X.

### **Detección de anticuerpos antirrábicos en las muestras de suero de bovino**

La detección de anticuerpos, se realizó por la prueba de seroneutralización en ratones jóvenes de 11-14 g de peso siguiendo el protocolo de Meslin *et al.* (1996). Consistió en hacer diluciones quintuplas de cada suero, utilizando como diluyente suero fetal bovino al 2%, que luego fueron confrontadas con 64 DL<sub>50</sub>/0,03 mL de virus rábico de desafío. Las diluciones de los sueros desafiados y las diluciones control del virus rábico, se incubaron en estufa a 37°C durante 90 min y cada dilución se inoculó a un grupo de 5 ratones jóvenes, vía intracerebral a una dosis de 0,03 mL, observándose diariamente por 15 d. Los resultados se obtuvieron aplicando la fórmula de Reed y Muench (1938).

### **Análisis de potencia del lote de vacuna antirrábica comercial**

Se efectuó por la Prueba de Potencia NIH (National Institute of Health, EUA), siguiendo el protocolo de Meslin *et al.* (1996). El proceso se realizó vacunando dos grupos de ratones adultos, cada siete días, dos veces, con diluciones quintuplas de la vacuna en estudio y de una vacuna de referencia. Siete días después de la última vacunación, los animales inmunizados y un grupo control fueron desafiados por vía intracerebral con virus rábico de desafío (CVS). La observación de los ratones se realizó durante 14 d, al final de los cuales se determinó la dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>) tanto de la vacuna en análisis como la de referencia, con base en los animales que sobrevivieron. Se calculó la potencia relativa de la vacuna en estudio, comparando los valores de DE<sub>50</sub> con relación a la vacuna referencia. El valor mínimo para aprobación considerado es de 1,1 UI/mL.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

De las 228 muestras de tejido nervioso, se analizaron 72 procedentes del estado Lara, de las cuales 18 (25%) resultaron positivas a rabia. Después de 4 años de silencio epidemiológico, el brote se inició entre los meses de febrero y marzo con la detección de 2 bovinos positivos en el Municipio Morán (Tabla 1). Las parroquias Hilario Luna Luna, Bolívar y

**Tabla 1.** Detección de virus rábico en muestras de tejido nervioso, procedentes del estado Lara. Período enero-diciembre 2007

Mes	Bovino		Canino		Caprino		Equino		Humano		Ovino		Vámpiros		No Hematófagos		Total		
	Pos	neg	Pos	neg	Pos	neg	Pos	neg	Pos	neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	
Ene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Feb	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Mar	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Abr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
May	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jun	6	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	1	-
Jul	-	1	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	2	20	-	31	4	52	-
Ago	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	1	3	1	-
Sep	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
Oct	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nov	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Dic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	8	1	-	1	3	-	1	-	1	-	3	-	2	20	-	32	18	54	-

**Fuente:** Registros de resultados de diagnóstico. Laboratorio de Rabia de Sanidad Animal CENIAP-INIA, Maracay, estado Aragua

Humocar Alto del Municipio Morán fueron las más afectadas. El humano positivo a rabia fue un joven de 16 años, mordido en la mano por un murciélago que no pudo ser identificado, el período de incubación fue de 45 d, los síntomas iniciaron con un cuadro neurológico de parestesia en el miembro superior derecho, con 3 d de evolución y luego en el miembro inferior izquierdo de 12 d de evolución, seguido por trastornos sensoriales, fue hospitalizado, falleciendo tres días después de su ingreso. El diagnóstico fue realizado post-mortem.

De los estados limítrofes, se recibieron 156 muestras de tejido nervioso de distintas especies de animales, procedentes de los estados Portuguesa, Falcón, Cojedes y Yaracuy, detectándose un equino positivo en el estado Cojedes, Municipio Girardot, Parroquia El Baúl (Tabla 2). Durante el brote, se realizaron 28 sesiones de captura de quirópteros, se clasificándose 199 murciélagos (Fernández-Badillo et al., 1988), 84 como vampiros de la especie *Desmodus rotundus*, (Figura 1), dos de ellos positivos a rabia y 115 no hematófagos (92 frugívoros, 20 insectívoros, 3 nectarívoros ; Figuras 2, 3 y 4). Estos resultados sugieren que el principal murciélago hematófago existente en la zona, para ese momento, era el *Desmodus rotundus*. El gran número de murciélagos hematófagos atrapados, indicó que existía una alta densidad de población de esta especie habitando

en los nichos ecológicos de la región. Las colonias presentaban individuos de diferentes generaciones muchos de los cuales se observaron muy longevos, en consecuencia, los murciélagos migraban hacia los poblados humanos al reducirse el espacio físico donde habitaban, invadiendo las viviendas y exponiendo a las personas a ser mordidas. En relación a las cepas de virus rábico aisladas, todas se caracterizaron como variante antigénica tipo 3 (Tabla 3), indicando que el principal transmisor de la enfermedad, en el brote, fue el vampiro *Desmodus rotundus*, ya que no hubo rabia canina en el área durante los meses de estudio, estos resultados apoyan las investigaciones de Hidalgo et al. (2005), quienes encontraron la misma variante antigénica en un estudio realizado en diferentes regiones de Venezuela para el período 2001-2004. La aparición de este brote determinó el establecimiento de medidas epidemiológicas inmediatas que incluyeron: a) Educación sanitaria de la población, mediante charlas a la comunidad y cursos de captura de murciélagos; b) Reuniones interdisciplinarias con personal del Servicio Autónomo de Sanidad Agropecuaria-MAT, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Coordinación Nacional de Zoonosis del Ministerio de Salud; c) Vacunación de la población bovina del municipio (15.898 cabezas), con una cobertura de vacunación del 94,92%, a objeto de reducir el número

**Tabla 2.** Detección de virus rábico en muestras de tejido nervioso, procedentes de los estados Portuguesa, Cojedes, Falcón y Yaracuy. Período enero-diciembre 2007

Mes	Bovinos		Canino		Equino		Bufalo		Vampiros		No Hematófagos		Total	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
Ene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Feb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mar	-	3	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	5
Abr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
May	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jun	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	3	-	6
Jul	-	-	-	-	-	-	-	1	-	23	-	30	-	54
Ago	-	-	-	-	1*	-	-	-	-	31	-	42	1	73
Sep	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	8	-	14
Oct	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nov	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	3
Dic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total		6		1	1			1		64		83	1	155

\* Equino positivo a rabia detectado en el estado Cojedes. **Fuente:** Registros de resultados de diagnóstico. Laboratorio de Rabia de Sanidad Animal CENIAP-INIA, Maracay, estado Aragua



**Figura 1.** Murciélago hematófago *Desmodus rotundus*



**Figura 2.** Murciélago frugívoro *Phyllostomus elongatus*



**Figura 3.** Murciélago insectívoro *Molossus molossus*



**Figura 4.** Murciélago nectarívoro *Glossophaga longirostris*

**Tabla 3.** Caracterización antigénica de cepas de virus rábico aislado de diferentes especies animales procedentes del estado Lara. Enero-diciembre 2007

Especie donde se aisló	N° DE CEPAS PERTENECIENTES A CADA VARIANTE ANTIGÉNICA DEL VIRUS RABICO										
	1 Perro, mangosta	2 Perro	3 Vampiro <i>Desmodus rotundus</i>	4 <i>Tadarida brasiliensis</i>	5 Vampiro Venezuela	6 <i>Lasirus cinereus</i>	7 Zorro de Arizona	8 Zorrillo centro/sur EUA	9 <i>Tadarida brasiliensis mexicana</i>	10 Zorrillo Sur California	11 Vampiro
Bovino	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-
Caprino	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Humano	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Ovino	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Equino	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Vampiro	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-

**Fuente:** Registros de resultados de diagnóstico. Laboratorio de Rabia de Sanidad Animal CENIAP-INIA, Maracay, estado Aragua

de animales susceptibles; d) Estudio de anticuerpos séricos en bovinos, para conocer el nivel de protección conferido por las vacunas antirrábicas. La zona donde ocurrió el brote es montañosa, de producción cafetalera con animales en explotación ganadera, con suficientes afluentes de ríos, que permiten la supervivencia de murciélagos hematófagos, los cuales establecieron sus nichos en esos lugares (Bracamonte, 1997). Así mismo, se observó una alta deforestación de la vegetación, lo cual contribuyó a la migración de los murciélagos a los centros poblados, sometiendo a la población al riesgo continuo de contraer la rabia (Bracamonte, 1997). La vacuna antirrábica, utilizada para controlar el brote de rabia e inmunizar a los bovinos, equinos, caprinos y ovinos, demostró una potencia relativa satisfactoria, de 7,58 UI/mL. La titulación de anticuerpos antirrábicos, realizada a 51 muestras de suero de bovinos, inmunizados durante el brote, indicó que la vacuna antirrábica confirió una adecuada protección a los animales, ya que el 94% de los sueros analizados, demostró un valor promedio en el índice de protección antirrábica de 1:163 DE<sub>50</sub>/0,03 mL, el cual es muy superior al valor mínimo de protección en animales (1:5 DE<sub>50</sub>/0,03mL) y sólo el 6% de los sueros estudiados no presentó títulos antirrábicos protectores, resultando con valores < 1:5 DE<sub>50</sub>/0,03 mL (Tabla 4).

Los registros oficiales del SASA-Lara indicaron una escasa actividad de control de murciélagos en ese Municipio, previamente a la ocurrencia del brote, lo cual incidió sobre el aumento de la población de vampiros.

**Tabla 4.** Encuesta serológica de bovinos inmunizados con vacuna antirrábica inactivada durante el brote de rabia en el Municipio Moran del estado Lara. Período enero-diciembre 2007

N° Muestra	Título Antirrábico DE <sub>50</sub>	N° Muestra	Título Antirrábico DE <sub>50</sub>
1	1:229	28	1:238
2	1:1399	29	1:9
3	1:280	30	1:11
4	1:280	31	1:280
5	1:68	32	1:229
6	1:32	33	1:9
7	1:25	34	1:7
8	1:25	35	1:32
9	<1:5	36	<1:5
10	1:14	37	1:68
11	1:14	38	1:238
12	1:9	39	1:42
13	1:13	40	1:11
14	1:238	41	1:280
15	1:19	42	1:14
16	1:33	43	1:33
17	1:19	44	1:68
18	1:8	45	1:280
19	1:37	46	1:817
20	1:19	47	1:1397
21	1:280	48	1:66
22	1:11	49	1:228
23	1:13	50	<1:5
24	1:46	51	1:68
25	1:209		
26	1:19		
27	1:46		

**Fuente:** Registros de resultados de diagnóstico. Laboratorio de Rabia Sanidad Animal CENIAP-INIA, Maracay, estado Aragua

## CONCLUSIONES

El brote de rabia en el Municipio Morán del estado Lara, tuvo su origen mediante la transmisión por vampiros. Durante el período de ocurrencia del brote la cobertura de vacunación de los bovinos fue óptima, utilizando una vacuna que indujo buena inmunidad, de acuerdo a los resultados de la titulación de anticuerpos evidenciando en el caso humano el gran peligro que la rabia silvestre representa para la salud pública, además de un escaso conocimiento de los pobladores de esa región, sobre las características de la enfermedad y su transmisión.

## REFERENCIAS

- Bracamonte, M. 1997. El curioso mundo de los murciélagos y su importancia en la transmisión de la rabia bovina. *FONAIAP Divulga*, 56 abril-junio, 14-16.
- De Mattos C.; de Mattos C. 1989. Técnicas Moleculares para Caracterización de Virus Rábico. Organización Panamericana de la Salud, OMS, 30 p.
- Fernández-Badillo, A.; Guerrero R.; Lord, R.; Ochoa, J.; Ulloa, G. 1988. Mamíferos de Venezuela, lista y claves para su identificación. Museo del Instituto de Zoología Agrícola (MIZA-UCV). Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. pp. 51-58.
- Hidalgo, M. La rabia una zoonosis mortal. 2005. *Revista Digital CENIAP Hoy*, N° 7, enero-abril 2005.
- Hidalgo, M.; Papo, S.; Plaza, N.; Moreno, M. 2005. Caracterización antigénica de cepas de virus rábico aisladas de diferentes regiones de Venezuela, periodo 2001-2004. *Rev. Fac. Cs. Vets.*, 46:33-41.
- Meslin, FX.; Kaplan, M.; Koprowski, H. 1996. *Laboratory Techniques in Rabies*. World Health Organization, 476 p.
- Ministerio del Poder Popular para Agricultura y Tierra (MPPAT-SASA). 2007. Servicio Autónomo de Sanidad Agropecuaria. Registros Epidemiológicos de SASA, estado Lara.
- Ministerio del Poder Popular para Agricultura y Tierra (MPPAT-SASA). 2007. Registros de resultados de diagnóstico. Laboratorio de Rabia Sanidad Animal CENIAP-INIA, Maracay, estado Aragua.
- Molina, M.; Plaza, N. 2006. Informe Epidemiológico Año 2006. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA).
- Reed, L., Muench, H. 1938. A simple method of estimating 50% end points. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*,

27:493-497.

Rose, J.; Whitt, M. 2001. Rhabdoviridae: The virus and their replication. En: *Fields Virology*. Fourth Ed. Chapter 38. Lippincott Williams & Wilkins Ed. 121 p.