

01672

4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA RABIA EN PERROS CALLEJEROS DE LA CIUDAD DE MEXICO A TRAVES DE LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIRRABICOS EN SUERO Y LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO (1998)

285730

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE: MAESTRA EN CIENCIAS VETERINARIAS PRESENTADA POR: MVZ LUZ MARIA GALINDO CHIRINOS

DIRECTOR DE TESIS: MCV GUSTAVO A. ABASCAL TORRES COASESOR: DR. JUAN ANTONIO MONTAÑO HIROSE





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DECLARACION

La autora da consentimiento a la División de Estudios de Postgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible a cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.



MVZ Luz María Galindo Chirinos

Dedicatoria

**A ti Señor,
que me has mostrado cuán grande eres**

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por su comprensión y palabras de aliento en el momento necesario.

Al MCV Gustavo A. Abascal Torres por su apoyo incondicional a través del tiempo.

Al Centro de Control Canino "Alfonso Angellini de la Garza" (CCCAAG) de la Jurisdicción Sanitaria de Coyoacán en especial al MVZ Raúl Coss Lira y grupo de trabajo.

A Hill's Pet Nutrition de México S.A. de C.V. por el concentrado que proporcionó para la alimentación de los animales.

Al Laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM) en especial al MVZ Emeterio Saldivar Zúñiga.

A la Comisión México Americana para la Prevención de la Fiebre Aftosa y Otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA) en especial al MVZ Moisés Fraire y personal del Laboratorio de Alta Seguridad.

A la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS) en especial al Dr. Alvaro Aguilar Setién y grupo de trabajo.

Al MVZ Jaime Navarro por su tiempo y apoyo.

A los sinodales por las orientaciones dadas.

A todos los amigos que compartieron estos momentos.

MVZ LUZ MARIA GALINDO CHIRINOS: CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA RABIA EN PERROS CALLEJEROS DE LA CIUDAD DE MEXICO A TRAVES DE LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIRRABICOS EN SUERO Y LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO (1998) DIRECTOR DE TESIS: MCV GUSTAVO A. ABASCAL TORRES, COASESOR: DR. JUAN ANTONIO MONTAÑO HIROSE

RESUMEN

Diferentes autores han reportado estudios experimentales que revelan recuperación de animales y en el caso de humanos la sobrevivencia a la infección rábica adquirida en forma natural; en ambas situaciones se ha comprobado la presencia de anticuerpos neutralizantes en suero y en líquido cefalorraquídeo. Este hecho motivó la presente investigación, cuyo objetivo fue evidenciar la respuesta inmune causada por el virus rábico en animales aparentemente sanos para ello se tomaron muestras de suero y de líquido cefalorraquídeo de 288 perros callejeros que fueron capturados por el Centro de Control Canino "Alfonso Angellini de la Garza" de la Jurisdicción Sanitaria de Coyoacán. Los perros se caracterizaron de acuerdo al sexo, la edad y la delegación política de procedencia. Se obtuvieron muestras de sangre y líquido cefalorraquídeo de perros que no presentaron signos sugerentes de rabia u otra enfermedad. En el animal vivo la sangre se obtuvo de la vena safena y posterior a su sacrificio por choque eléctrico se realizó una punción en la cisterna magna para extraer líquido cefalorraquídeo. Las muestras fueron refrigeradas a 7°C y congeladas posteriormente a -32°C. Previo a su proceso fueron inactivados a 56°C durante 30 minutos y se evaluaron por medio de la prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes (RFFIT) en diluciones 1:5 en el caso de sueros y sin diluir en el caso del líquido cefalorraquídeo. Los resultados mostraron que se evaluó una mayor proporción de animales adultos (69.1%); que las hembras representaron el 55.2% del total y las principales delegaciones políticas de las cuales procedieron los animales fueron Xochimilco (37.85%), Milpa Alta (29.51%) y Alvaro Obregón (20.49%). Las muestras consideradas positivas a los anticuerpos neutralizantes deberían hacerlo por lo menos en el 50% de los campos tanto en muestras de suero como de líquido cefalorraquídeo. Se encontraron 156 (54.17%) sueros positivos, de los cuales 100 muestras (64.1%) correspondieron a animales adultos. El mayor porcentaje de muestras positivas se presentó en hembras.

Las muestras positivas se obtuvieron predominantemente de animales de Xochimilco (40.38%) Milpa Alta (28.85%) y Alvaro Obregón (19.88%) En los resultados de líquido cefalorraquídeo no mostraron la presencia de anticuerpos neutralizantes, con lo cual se descarta la existencia de animales recuperados en la infección rábica dentro de la población estudiada.

Palabras claves: rabia, perro callejero, anticuerpos neutralizantes, Ciudad de México, inmunidad.

**MVZ LUZ MARIA GALINDO CHIRINOS:CONTRIBUTION TO RABIES STUDY
IN STRAY DOGS OF MEXICO CITY THROUGH NEUTRALIZING
ANTIBODIES OF SERUM AND CEREBROSPINAL FLUID DETERMINATION
(1998)**

Abstract

Several authors have reported the recovery of clinically rabid dogs in experimental conditions as well as the human survival from rabies in natural conditions; neutralizing antibodies in cerebrospinal fluid and serum have been present at the same time in both cases. The purpose of this survey is to show the immune response to rabies virus in apparently healthy dogs. Blood and cerebrospinal fluid samples from 288 apparently healthy stray dogs were obtained from routine activities from the ongoing antirabies campaign in México City. Dogs were kept at the "Alfonso Angellini de la Garza" Canine Control Center of the Sanitary District of Coyoacan, where the dogs were kept and were fed for 72 hours. Dogs were characterized according to sex, age and their political delegation origin. The blood and cerebrospinal fluid samples were collected from animals without signs of illness or other evident disease. Blood was collected from the saphenous vein, the dogs were then killed by electric shock and the cerebrospinal fluid obtained by cisternal puncture. Subsequently, samples were kept at 7°C and then frozen at -32°C until tested. Before analysis, they were heated at 56°C during 30 minutes and then tested by the Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test. Sera were tested at a 1:5 dilution and cerebrospinal fluid were tested undiluted. Most dogs were adult (69.1%) female dogs predominated (55.2%) the most common political delegations represented were Xochimilco (37.85%), Milpa Alta (29.51%) and Alvaro Obregón (20.49%). 156 sera (54.17%) were positive; 100 (64.1%) were from adult animals. Most positive samples were from female dogs and depended on the origin: Xochimilco (40.38%) Milpa Alta (28.85%) and Alvaro Obregón (19.88%). Finally, neutralizing antibodies were not found in any cerebrospinal fluid, so the possibility of recovery in dogs after infectious rabies was discarded.

Key words: rabies, stray dogs, neutralizing antibodies, México City.

INDICE

Capítulo	Página
Introducción	1
Objetivo General	7
Objetivos Específicos	7
Hipótesis	8
Material y Método	9
Población objetivo	9
Muestras	11
Procesamiento	12
Resultados	16
Población canina	16
Muestras	16
Suero	16
Líquido cefalorraquídeo	17
Discusión	18
Conclusiones	25
Bibliografía	27
Anexo I: Cuadros de resultados	36
Anexo II: Relación de habitantes por perro en el Distrito Federal, 1981	42
Anexo III: Distribución por delegación política, número de animales analizados y focos rábicos en el Distrito Federal 1998	43
Anexo IV: Número de focos rábicos y dosis aplicadas para su preven- ción en el Distrito Federal 1990-1998	44

**CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA RABIA EN PERROS CALLEJEROS DE
LA CIUDAD DE MEXICO A TRAVES DE LA DETERMINACION DE
ANTICUERPOS
EN SUERO Y LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO
(1998)**

INTRODUCCION

La rabia es una enfermedad que se encuentra ampliamente distribuida en el mundo (Acha 1977, Meslin 1999). Una gran variedad de mamíferos mantienen y transmiten la enfermedad cuyo ciclo se divide en silvestre y urbano (Acha 1977). En el ciclo silvestre existen especies terrestres que actúan como reservorios, principalmente carnívoros como coyotes, chacales, lobos y diferentes variedades de zorros. En el ciclo urbano la rabia canina es la principal fuente de infección para el hombre (OMS 1984, Wandeler y col. 1993, Meslin 1999). Esta situación no es ajena a México (Vargas P.F., 1987, SSA, NOM.011-SSA2 1993, SSA 1994, Vargas y Cárdenas 1996, SSA 1999)

En los países no industrializados, la rabia urbana es aún de prevalencia elevada probablemente debido a que de acuerdo a Vargas y Cárdenas (1996) la población canina es cada vez más abundante por razones de seguridad y protección, lo que a su vez genera un incremento de perros que callejean o que son verdaderos callejeros y garantiza que el ciclo se mantenga activo. Investigadores como Beck (1973) y Daniels (1983) asocian este incremento al abandono de mascotas.

En México los casos de rabia canina confirmados por laboratorio, presentaron un descenso continuo durante el período 1993-1998, con 1596 casos en el primer año y 397 en el último. Para los mismos años, los Servicios de Salud Pública del Distrito Federal (1999) informaron que el número de focos rábicos tuvo

una tendencia similar con un descenso continuo, con excepción del año 1994 en el cual se presentó un incremento en comparación al año anterior. Cabe destacar que mientras que en 1997 las delegaciones políticas de Tláhuac, Xochimilco y Gustavo A. Madero ocuparon los primeros sitios en presentación de focos rábicos, en 1998 sólo Tláhuac y Gustavo A. Madero presentaron casos de rabia canina.

A raíz de que en la Jurisdicción Sanitaria de Coyoacán, en el período de 1997-1999 se reportó un foco rábico en el primer año, esta delegación estableció como una parte de su programa de vigilancia epidemiológica el envío regular de encéfalos de perros del Centro de Control Canino "Alfonso Angellini de la Garza" (CCCAAG) al Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE) con el propósito de confirmar sus diagnósticos y descartar otras enfermedades (Iturbe 1989, Tierkel 1982); o bien identificar animales que sin manifestar signología hayan padecido la enfermedad.

A este respecto llama la atención la existencia de casos de animales que han presentado la enfermedad y que se han recuperado (Markus y col., 1969; Afshar y col., 1972; Baer y col., 1972; Bell y col., 1972; Fekadu y col., 1981; Fekadu y col., 1988; Aghonomo y col. 1989; Fekadu y col., 1992; Aghonomo y col. 1990), incluyendo tres casos de recuperación en humanos. (Álvarez y col., 1994; Arellano y col., 1997, Hattwick y col. 1972)

Este hecho ha generado una interrogante sobre la existencia de la rabia asintomática, especialmente por el hallazgo de la excreción de virus rábico por perros aparentemente sanos, misma que se ha incrementado (WHO 1984) y es conocido que algunos caninos pueden sobrevivir con o sin secuelas a una infección experimental, mostrando ser posteriormente inmunes (Soave, 1967; Markus y col. 1969; Afshar 1972; Bell y col. 1972; Roux, Babes, Hogyes, Hejj, mencionados por Hutyra y col. 1973; Fekadu y Baer, 1980. Fekadu, Shaddock y

Baer 1981; Andral y Serié y Veeraraghavan y col. citados por Tierkel 1982; Fekadu y col.1988)

Con relación a lo anterior se ha observado la presencia de signos de rabia en cachorros previamente inoculados con virus rábico aislado de saliva de perros no vacunados y clínicamente sanos (Aghomo y col. 1989). También se ha descubierto la presencia de anticuerpos en suero de animales salvajes capturados o sacrificados, principalmente en áreas enzoóticas (Bell 1975)

En personas y animales recuperados se observaron niveles importantes de anticuerpos tanto en la sangre como en el líquido cefalorraquídeo durante y después de la recuperación (Álvarez y col., 1994; Arellano y col., 1997; Bell y col.1972, Fekadu y col.1980; Fekadu y Baer ,1980; Hattwick y col. 1972).

Con relación a la inmunidad, se sabe que anticuerpos producidos contra el virus pueden ser transferidos de la madre al feto a través de la placenta, variando el título entre hermanos. En cachorros recién nacidos se han encontrado títulos altos de anticuerpos al igual que en la leche materna dos días después del parto (Winters 1981) los cuales son transmitidos a las crías durante la lactancia (Tizard 1979) Sin embargo, los títulos decrecen de manera importante llegando a niveles muy bajos o no detectables entre 3 y 4 semanas post-parto.

En los cachorros, los anticuerpos se mantienen en niveles altos hasta la sexta semana, a partir de la cual empiezan a decrecer, llegando a desaparecer alrededor de la decimosegunda semana, por lo que en algunos casos, por la presencia de anticuerpos, la inmunidad mediante vacunación no se estimula.

Ante un desafío del virus, los anticuerpos generados son del tipo G y tipo M. En la respuesta primaria los anticuerpos Ig M pueden ser detectados a partir del tercero o cuarto día, mientras que las Ig G son detectadas en promedio hasta el

décimo día. Las Ig M generalmente disminuyen su concentración dentro de los primeros 41 días en contraste con las Ig G que comienzan a disminuir antes de 225 días, y en algunos casos, pueden ser detectadas hasta los 20 años o después.

En humanos o en animales que enferman de rabia, los anticuerpos neutralizantes en suero aparecen generalmente a partir del octavo día posterior a la aparición de los signos, y los anticuerpos en líquido cerebroespinal se hacen presentes uno o dos días después de presentarse en suero. Este hecho ha llevado a pensar que la presencia de anticuerpos neutralizantes en líquido cefalorraquídeo se considere como un signo característico que involucra daño en el Sistema Nervioso Central (Bell J.F. y Moore G.J. 1979) y en animales aparentemente sanos, como evidencia de recuperación de la rabia. (Bell y col. 1972, Hattwick M. A. y col. 1972. Fekadu M. y Baer G., 1980, Fekadu M. y col. 1992, Álvarez H.L. y col. 1994, Arellano C.E. y col. 1997).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (1992) es de suponer que el perro callejero es un animal no vacunado, por lo que se esperaría la ausencia de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, se ha observado que perros no vacunados y con dueño han estado asociados en la presentación de focos rábicos (Archivos Jurisdicción Sanitaria de Coyoacán 1995) en tanto que otros perros son vacunados hasta más de una ocasión al año, muchos de los cuales son abandonados en las calles oscureciendo el panorama epidemiológico de la rabia, sobre todo cuando se pretende estudiar la presentación del ciclo urbano de la enfermedad.

En el Distrito Federal durante 1999 se reportaron tres focos rábicos en los que los animales involucrados fueron perros no vacunados y con dueño (SSA 1999). Así mismo en la VI Reunión Interpaíses sobre el Control de la Rabia (OPS, SSA, 1988) se mencionó que en el 74.3% de las agresiones a humanos por

animales sospechosos de rabia, son ocasionadas por perros con dueño y el resto son animales callejeros. En 1995 el total de focos rábicos en el Distrito Federal fue de 129, en los cuales estuvieron involucrados 91 (70.54%) animales con dueño. La mayoría de ellos (84) no vacunados (SSA 1995). Situación similar se reportó en el Estado de México en el mismo período.

Para llevar a cabo programas preventivos y de control de la rabia es necesario conocer, entre otras cosas, el tamaño de la población canina. A este respecto, Fuentes (1981) calculó su población en la Ciudad de México, estimando que la relación de habitantes por perro que variaba según la delegación política (Anexo II). Esta relación puede variar debido a la dinámica de las poblaciones y al desarrollo urbano. Por ejemplo, la relación de habitantes por perro en la Delegación Villa Alvaro Obregón se calculó de 10:1 en 1979 (Fuentes 1981) y de 8:1 en 1988. Por su parte, los Servicios de Salud Pública del Distrito Federal (SSA 1996) utilizan la relación de un perro por cada 6.9 habitantes para los programas de control de la rabia.

La gran cantidad de perros presentes en áreas urbanas y particularmente en la Ciudad de México ha hecho necesario realizar acciones como el sacrificio humanitario. A este respecto, se calcula que alrededor de tres mil quinientos animales son sacrificados mensualmente en los principales centros de control canino en la Ciudad de México (alrededor de cinco mil animales en el área metropolitana). De éstos, la mayoría son callejeros (Asociación Nacional para la Aplicación de Leyes de Protección a los Animales, A.C.).

Como apoyo a la vigilancia epidemiológica de la rabia se hace necesario realizar investigaciones que permitan determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes en suero de perros que deambulan en la calle y ayuden a explicar el descenso en el número de focos de rabia en la Ciudad de México. Así mismo, la búsqueda de anticuerpos neutralizantes en líquido cefalorraquídeo de estos

animales mediante pruebas alternas confirmatorias nos puede conducir a valorar la posible existencia de perros callejeros que se hayan recuperado de la enfermedad, con el riesgo potencial que pudiera representar para la población.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes en suero y líquido cefalorraquídeo obtenidos de perros callejeros sin signos aparentes de rabia como un indicador de que hayan enfermado y recuperado de esa enfermedad, capturados dentro de la zona de influencia del Centro de Control Canino Alfonso Angellini de la Garza.

Objetivos Específicos

1. Identificar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra virus rábico en suero de perros callejeros que no presenten signos de rabia..
2. Identificar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra virus rábico en líquido cefalorraquídeo de perros callejeros que no presenten signos de rabia.

HIPOTESIS

1.-Es posible encontrar anticuerpos neutralizantes contra el virus rábico en suero sanguíneo y líquido cefalorraquídeo de perros callejeros, sin importar edad, sexo o área de procedencia, que no presenten signos de la enfermedad en la zona de influencia del Centro de Control Canino Alfonso Angellini de la Garza.

2.-Existen perros callejeros, sin importar edad, sexo o procedencia, que han enfermado y recuperado de rabia y que deambulan dentro de la zona de influencia del Centro de Control Canino Alfonso Angellini de la Garza.

MATERIAL Y METODOS

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM) y en el Laboratorio de Alta Seguridad de la Comisión México Americana para la Prevención de la Fiebre Aftosa y Otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA) a partir de muestras de perros procedentes del Centro de Control Canino "Alfonso Angellini de la Garza" (CCCAAG) de la Jurisdicción Sanitaria de Coyoacán. La lectura de los resultados se efectuó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. Este estudio fue de tipo transversal, prospectivo y observacional.

I.- Población objetivo. El criterio de inclusión consideró animales capturados, clínicamente sanos, mayores de seis meses¹ sin importar el sexo, la raza o la talla.

Tamaño de la muestra. Para determinar el número de individuos sujetos de estudio, se utilizó la fórmula propuesta por Navarro (19), que requiere de un valor esperado (P) obtenido a partir del conocimiento previo del problema.

$$N = (1-P) / (PV)$$

donde

P = probabilidad de que ocurra el evento, es decir, porcentaje estimado de individuos que se espera resulten positivos a la presencia de anticuerpos.

¹ Por restricción de la representante de la Asociación Protectora de Animales en el Centro de Control Canino.

V = coeficiente de variación expresado como fracción del estimador (error estándar del estimador). Para el presente estudio se consideró una variación del 5%.

Se utilizó un valor de 7.84% obtenido por Afshar (1972) en la ciudad de Shiraz, Irán en una investigación llevada a cabo para determinar la presencia de virus en glándulas salivales y saliva así como de anticuerpos rábicos en suero de perros callejeros asintomáticos.

Entonces,

N = 288.

Animales.- Los perros callejeros se obtuvieron, durante los meses de abril a junio de 1998, de la captura rutinaria llevada a cabo por el personal de los centros de control canino de las delegaciones políticas Álvaro Obregón, Coyoacán, Gustavo A. Madero, Iztapalapa, Milpa Alta, Tlalpan y Xochimilco, de la Ciudad de México, como parte del Programa de Prevención y Control de la Rabia, y remitidos al Centro de Control Canino Alfonso Angellini de la Garza (Jurisdicción Sanitaria de Coyoacán) en donde permanecieron en observación durante 72 horas (Ley de Protección a los Animales, 1981) en jaulas individuales.

Durante su permanencia en este lugar se les proporcionó agua *ad libitum* y alimento comercial dos veces al día. Durante este período no se les proporcionó ningún tratamiento médico o profiláctico.

Los perros fueron identificados con número progresivo y se registraron los siguientes datos: fecha de captura, sexo, edad y delegación política de procedencia. Posteriormente se dividieron en cuatro grupos etáreos².

El primero se conformó por perros jóvenes cuya edad fue menor de un año. El segundo grupo, animales adultos cuya edad varió entre uno y siete años y el tercer grupo estuvieron los animales mayores de siete años. Por último se consideró un grupo de animales cuya edad no fue registrada. Según el sexo los animales se dividieron en hembras, machos y no registrados

II. Muestras.

Obtención y manejo. De cada animal se obtuvo una muestra de aproximadamente 10 ml de sangre por punción de la vena safena (Kirk y col., 1990), con tubos al vacío, sin anticoagulante (Becton Dickinson Vacutainer Systems). Posteriormente los animales fueron sacrificados de manera humanitaria utilizando choque eléctrico (Banister y col., 1996; Asociación Nacional para la Aplicación de Leyes de Protección a los Animales, 1981)

Una vez sacrificado, se obtuvo una muestra de líquido cefalorraquídeo de 3 ml aproximadamente, por punción en la cisterna magna (Widner, 1991; Kirk y col., 1990) con jeringa y aguja estériles (Terumo Medical Corporation), de 5 ml y 22 g x 1¼" respectivamente y depositadas en tubos de ensayo estériles de 10 ml.

Las muestras fueron identificadas con el número del animal y conservadas en hieleras de poliuretano con refrigerante a 7°C, hasta su llegada al laboratorio, donde se centrifugaron a 700 x g durante diez minutos para obtener el suero y clarificar el líquido cefalorraquídeo. De cada muestra, se depositó 1.5 ml en viales

² Según gráfica del Dr. Fred Metzgar. Salud Animal Laboratorios Pfizer

estériles. Las muestras se mantuvieron en congelación (-30°C) hasta su procesamiento.

III. Procesamiento.

Técnica.- Los anticuerpos neutralizantes fueron detectados con una modificación de la prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes (PRIFF) (Smith y col., 1973) que requiere de monoestratos de cultivos celulares en placas de 96 pozos (Costar®), en los que se incubaba una dosis constante de virus con diluciones de los sueros problema y se utiliza un suero testigo. Después de 24 horas de incubación se observa la diferencia del número de focos de infección (focos fluorescentes) entre los pozos que recibieron el suero testigo y los que recibieron los sueros desconocidos.

Interpretación de resultados.- Para considerar una muestra positiva a la presencia de anticuerpos neutralizantes, deberá reducir por lo menos el 50% de las unidades formadoras de focos (UFF). Muestras con porcentajes de reducción menores se tomaron como negativas (Smith y col., 1973)

Las muestras de suero que resulten positivas indicarán que el animal estuvo en contacto con el antígeno, en tanto que las muestras de líquido cefalorraquídeo que resultaran positivas a la PRIFF indicarán que el animal padeció y se recuperó de la rabia. (Álvarez y col., 1994; Arellano y col., 1997; Bell y col.1972, Fekadu y col.1980; Fekadu y Baer ,1980; Hattwick y col. 1972).

Criterio de eliminación.- Las muestras que presentaron sospecha de estar contaminadas (principalmente por observarse turbidez) o que durante el procesamiento causaron muerte de las células fueron descartadas.

Cultivos celulares. Células BHK-21 C-13. Son células de cultivos de riñón de Hamster bebé, obtenidas de cultivos certificados de la American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland. Esta línea celular fue mantenida a 37°C con medio de cultivo MEM (Dulbecco) ajustado a pH 7 con bicarbonato de sodio y adicionado de 10% de suero fetal bovino (SFB), 3% de L-glutamina y 0.1% de piruvato de sodio (medio de crecimiento).

Neuroblastoma murino CCL 131. Células de neuroblastomas de ratón obtenidas de cultivos certificados de la American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland. Esta línea celular fue mantenida a 37°C con medio de cultivo BHK-21 (In Vitro S.A.) ajustado a pH 7 con bicarbonato de sodio y adicionado de 10% de suero fetal bovino (SFB), 0.3% de L-glutamina y 0.1% de piruvato de sodio (medio de crecimiento).

Virus PV.- El virus utilizado en este trabajo se tituló por el método de Titulación Rápida de Virus en Células (Bourhy H. and Sureau P.1990) para lo cual se utilizaron cultivos de neuroblastoma en placas con 96 pozos y el resultado obtenido fue de 10^5 UFF/ml. . El virus Pasteur original se obtuvo de la cepa aislada en 1882 a partir de un bovino mordido por un perro, adaptada originalmente a cerebro de ratón, posteriormente a células BHK-21 y a neuroblastomas murino.

Producción de virus. Se inocularon 4 botellas T₂₅ (Falcon) con cultivos de neuroblastoma con 1 ml/botella de virus. Los cultivos infectados fueron incubados con medio BHK-21 de mantenimiento (5% de SFB, 0.3% de L-glutamina y 0.1% de piruvato de sodio) pH 7, a 37°C y 5% de CO₂. A las 72 horas se colectó el sobrenadante y se centrifugó a 700 x g durante 10 minutos a 4°C para eliminar los detritos celulares. Posteriormente se distribuyó en alícuotas de un ml y se mantuvieron en congelación (-70°C).

Para la titulación del sobrenadante se hicieron crecer células de neuroblastoma murino en botellas T₂₅; una vez que se conformó el monoestrato, se separaron con la ayuda de tripsina y se suspendieron en medio BHK-21 de crecimiento, en una concentración de 40,000 células/ml. De esta suspensión celular se depositaron 100 µl/pozo y se incubaron 24 horas a 36°C.

Con el virus se hicieron diluciones décuples seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁷. Se depositaron 100 µl de las diluciones en cada pozo con monoestrato y se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se retiró el medio de cultivo, las células infectadas se fijaron con acetona al 80% durante 30 minutos a 4°C y se incubaron con conjugado antirrábico a base de anticuerpos monoclonales (Laboratorios Baer). Para la lectura se utilizó un microscopio invertido con epifluorescencia (Olympus). Se obtuvo un título de 10^{5.1} UFF/ml.

Suero testigo positivo. Como suero testigo se utilizó el obtenido de un canino, macho, de cinco años de edad con antecedentes de vacunación antirrábica en forma anual. El suero fue titulado por el método de reducción rápida de focos fluorescentes, para lo cual se hicieron diluciones quíntuples (de 1:5 hasta 1:15,625). El suero neutralizó la totalidad de los focos en la dilución 1:625.

El total de las muestras y el suero testigo fueron inactivados en baño maría a 56°C durante 30 minutos. Posteriormente se prepararon diluciones 1:5 de cada suero (50 µl del suero problema más 200 µl de medio sin SFB). De estas diluciones se depositaron 50 µl más 50 µl de suspensión viral en pozos con monoestrato de células de neuroblastoma murino de 24 horas de crecimiento. Esta mezcla se dejó incubar por 60 minutos a 37°C y 5% de bióxido de carbono. Pasado este tiempo se agregaron 100 µl de medio de mantenimiento y se dejaron incubar por 24 horas. Inmediatamente después se retiró el medio, se fijaron 30 minutos en acetona 80% a 4°C y se incubaron por 30 minutos con anticuerpos

monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína, para posteriormente leerse en un microscopio invertido con epifluorescencia.

Las muestras de líquido cefalorraquídeo fueron igualmente inactivadas y trabajadas sin diluir utilizando igual cantidad de volumen que la suspensión viral (50 μ l) y fueron procesadas con la misma técnica.

La reducción del 50% o más de las unidades formadoras de focos en las muestras procesadas, significa la presencia de anticuerpos neutralizantes (Smith y col. 1973)

RESULTADOS

Población canina.- Se clasificó de acuerdo a las variables de sexo, edad y delegación política, y se obtuvieron los siguientes resultados:

Procedencia. Los animales observados procedieron principalmente de las delegaciones políticas de Xochimilco (37.85%), Milpa Alta (29.51%) y Alvaro Obregón (20.49%). Cuadro 1

Edad y sexo.- La frecuencia de la edad distribuida según el sexo se presenta en el cuadro 2. Los animales adultos se encontraron en mayor porcentaje (69.1%) y predominaron en este grupo las hembras adultas (41.67%)

Muestras.- Se obtuvieron 288 muestras pareadas de suero y líquido cefalorraquídeo de un número igual de animales. En el caso de las muestras de suero sólo se procesaron 243 ya que cuarenta y cinco de ellas se eliminaron por presentar contaminación o por citotoxicidad.

Suero.- De los 243 sueros procesados se obtuvieron 156 (64.2%) muestras positivas. La diferencia entre el porcentaje promedio de inhibición entre las muestras positivas y las negativas fue estadísticamente significativa con una $p < 0.05$. Cuadro 3

Distribución de los sueros positivos según la edad de los animales estudiados.- De las 156 muestras positivas dos (1.28%) correspondieron a animales jóvenes, 100 (64.10%) a animales adultos, 34 (21.80%) a animales viejos y 20 (12.82%) correspondieron a animales cuya edad no fue determinada. La diferencia entre el

porcentaje de sueros positivos y la edad resultó estadísticamente significativa ($p < 0.05$) Cuadro 4

Distribución de los sueros positivos según sexo.- De las 135 hembras analizadas 89 (65.92%) resultaron positivas, mientras que para los machos de 108 67 (62.03%) muestras presentaron anticuerpos neutralizantes. No se encontró diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) Cuadro 5

Distribución de los sueros positivos según la Delegación Política.- Del total de sueros procesados destaca la presencia de muestras positivas en las delegaciones de Xochimilco con 63 (40.38%), Milpa Alta con 45 (29.49%) y Alvaro Obregón con 31 (19.87%) en relación con las delegaciones Benito Juárez, Iztapalapa, Coyoacán y con el Estado de México en donde los porcentajes fueron de cero, 1.93, 7.05 y 1.28% respectivamente. Sin embargo, al analizar el número de muestras positivas contra el total de muestras por delegación no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$). Los resultados se muestran en el cuadro 6.

Líquido cefalorraquídeo. Las 288 muestras fueron procesadas resultando todas negativas a la prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes.

DISCUSION

La recuperación de la infección rábica natural en animales ha sido el eje de diversas investigaciones, para afirmar lo anterior es necesario demostrar que la infección activa ha ocurrido. Diferentes evidencias se han presentado cuando se inoculan animales; algunos enferman y mueren, mientras otros, de manera excepcional, con signos de enfermedad se recuperan. Entre estas evidencias se encuentran la prueba de córnea positiva, el aislamiento del virus de la saliva y la presencia de anticuerpos neutralizantes en líquido cefalorraquídeo (Bell J.F. 1975). Esta última resulta una herramienta valiosa en los estudios epidemiológicos ya que permite conocer el estado inmune y el diagnóstico de la enfermedad rábica tanto en animales vivos o muertos, por lo que se adoptó este procedimiento para el presente estudio en perros capturados de manera rutinaria, dentro del Programa de Control y Prevención de la Rabia, en el cual se propusieron parámetros de sexo, edad y procedencia para conocer las características del universo de trabajo.

En la presente investigación, realizada en animales no domiciliados, se encontró entre los perros capturados y observados un porcentaje de hembras (55.2%) mayor que el número de machos (44.4%). En investigaciones realizadas en animales domiciliados, se han reportado frecuencias de 69.8% de machos y 30.2% de hembras en perros domiciliados del Distrito Federal y zona metropolitana (Fuentes 1981); resultados similares (67.9% de machos y 32.1% de hembras) reportó Gandarillas C.O (1995) en la población canina domiciliada de la Ciudad de Oaxaca (México). Los porcentajes observados pueden ser debido a la preferencia de los dueños de tener perros machos como animales de guardia y protección, y porque las hembras por el hecho de que conllevan la posibilidad de procrear cachorros son abandonadas con más frecuencia.

Al analizar la variable edad, Fuentes y col. (1981) encontraron en la Ciudad de México que 42% de la población canina tenía entre uno y cinco años de edad:

mientras que Gandarillas C.O. (1995) informó que la población adulta en el Estado de Oaxaca representaba el 80.7% y Martínez P. y col. (1995) reportaron el 55.11% para la misma categoría, a este respecto, en la población estudiada se observó un predominio de perros adultos (69.1%) es decir, animales con un promedio de vida entre uno y siete años, en contraste con el grupo de animales jóvenes y el grupo de perros viejos que tuvieron porcentajes menores. Se debe considerar que el grupo de animales adultos, tuvo un rango mayor comparado con los otros grupos de edad.

De los individuos jóvenes remitidos al Centro de Control Canino Alfonso Ángellini de la Garza (CCCAAG) no fue posible evaluar perros menores de seis meses. Esta restricción fue establecida por la Asociación Nacional Para la Aplicación de Leyes de Protección de Animales A.C. que prohibió el muestreo en estos animales argumentando el posible sufrimiento de los cachorros durante la toma de la muestra. Este hecho adquiere importancia ya que a esa edad se ha informado de diversos episodios rábicos. En 1993 durante un foco ocurrido en la Delegación de Coyoacán, D.F. (México)³ se diagnosticó rabia por la prueba de inmunofluorescencia en cuatro cachorros que no presentaron signos de la enfermedad pero que nacieron de una madre con diagnóstico clínico y de laboratorio positivos.

En 1995, de 65 muestras positivas de perros confirmadas por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 22 (33.33%) fueron de cachorros menores de 6 meses de edad, de los cuales 3 (9.0%) eran callejeros. El resto correspondió a cachorros con dueño. A este respecto, Eng y col. (1993) encontraron en Hermosillo, Sonora, que el promedio de edad en los animales confirmados como rabiosos fue de un año, mientras que Mimonpitak y col. (1997)

³ Archivos del Servicio de Epidemiología y Control de Enfermedades. Dirección General de Servicios Médicos, Universidad Nacional Autónoma de México 1994

encontraron en Tailandia que más del 60% de los perros diagnosticados como rabiosos se encontraron por debajo del año de edad.

Según su origen, los sujetos estudiados pertenecieron principalmente a otras delegaciones diferentes a la delegación de Coyoacán (en donde se ubica el CCCAAG), entre ellas se encontraron: Alvaro Obregón (20.49%), Milpa Alta (29.51%) y Xochimilco (37.85%). Cabe mencionar que las delegaciones de Milpa Alta y Xochimilco cuentan con grandes áreas rurales y de acuerdo con Fishbein y col. (1992) es en ellas donde la densidad de población canina es mayor; por lo que es posible que las capturas se intensifiquen en las zonas rurales debido al riesgo que los perros callejeros representan. En el caso de las delegaciones políticas Benito Juárez e Iztapalapa, así como el Estado de México, la cantidad de perros capturados fue inferior (0.35, 1.39 y 1.39% respectivamente) en comparación con las delegaciones mencionadas anteriormente, este hecho puede deberse a que en tales delegaciones los animales capturados sean remitidos de manera rutinaria a otros centros de control canino y el número escaso de perros pertenecientes a las delegaciones de Benito Juárez, Iztapalapa y Estado de México se deba a una situación fortuita.

Los 243 especímenes analizados mostraron diferentes grados de actividad neutralizante la cual se reportó como porcentaje de Inhibición de Unidades Formadoras de Focos (UFF). El hecho de que el 64.20% de las muestras fuera positivo es similar a los resultados reportados por Cleaveland y col. (1999) quienes encontraron un 49.4%; Ogunkoya y col. (1990) reportaron 39.2%; aunque fue menor a lo informado por Mebatsion T. y col. quienes señalan un 80% utilizando la misma técnica (RFFIT). Senties (1964) utilizando la prueba de seroneutralización en ratones, encontró anticuerpos neutralizantes en el 100% de los sueros de animales procedentes de asilos para caninos vagabundos.

Las pruebas de seroneutralización se han usado para medir la correlación entre los anticuerpos y su resistencia en desafío de perros, gatos, vacas, zorros y otros animales (Thomas J.B. 1975). La presencia de anticuerpos en suero indica la exposición del individuo al antígeno (Follman E.H. 1992) por lo que su presencia en los sueros positivos puede explicarse a que tal vez estos animales fueron vacunados (Bell y col. 1966), situación factible ya que los Servicios de Salud Pública en el Distrito Federal llevan a cabo campañas masivas de vacunación gratuita dos veces por año y reportan un ascenso en el número de dosis de vacuna antirrábica aplicadas en el periodo de 1993 a 1998 (SSA 1999) ver Anexo IV.

Lo anterior sugiere que la población pudo estar compuesta en parte por mascotas abandonadas como lo propone Daniels (1983), previamente vacunadas o por perros de barrio (OMS 1992) que han sido incluidos en las campañas de vacunación masiva. Sin embargo la posibilidad de una infección limitada a tejidos diferentes al nervioso, no debe ser descartada (Bell 1972). De acuerdo a Baer G.M. y Tordo N (1994) los animales con anticuerpos neutralizantes, aun en niveles bajos, casi siempre sobreviven a un desafío subsecuente con virus rábico de la calle. También se han observado la presencia de anticuerpos en suero en animales salvajes capturados o sacrificados, siendo más frecuente este hecho en animales de áreas enzoóticas que en aquéllos de áreas no infectadas (Bell 1975).

Llama la atención el porcentaje elevado de respuesta inmune hallado, si se parte de que los animales evaluados eran callejeros condición que, de acuerdo con los hallazgos en el suero, hace suponer que los animales estuvieron en contacto con el antígeno y/o que hayan sido vacunados al menos una vez durante su vida.

Este hecho contrasta con la propuesta de la Organización Mundial de la Salud (1992), que señala el desprecio de la sociedad hacia el perro callejero en

virtud de la responsabilidad que implica, por lo tanto no hay una persona que los tome a su cuidado lo que presupone que sean animales no vacunados.

Al desglosar la distribución de las muestras positivas de acuerdo a la edad se observa que los animales jóvenes (entre seis meses y un año) representaron sólo el 1.28% del total y el 20% dentro del mismo grupo etario, que se puede entender como normal ya que a esta edad se ha perdido la inmunidad materna (Winters 1981) y es posible que los cachorros que resultaron positivos hayan sido vacunados. A su vez, otras investigaciones como la llevada a cabo en Nigeria por Wosu y Anyanwu (1990) en cachorros no vacunados reportaron 7.3% de muestras positivas analizados por la prueba de inhibición de la hemaglutinación. Por su parte Kasempimolporn y col. (1996) encontraron 15.62% por la prueba de ELISA en cachorros de Tailandia, pero resulta interesante que en este último reporte los autores no encontraron muestras positivas utilizando la RFFIT.

En este trabajo se observó un mayor número de sueros positivos (64.1%) en animales adultos en comparación con el grupo de animales jóvenes. Así mismo Wosu y Anyanwu (1990) observaron un incremento en el número de muestras positivas alcanzando el 16.1% de suero positivos en la población adulta. Por último en el grupo de animales viejos la cantidad de sueros positivos al 94.44%.

No se comprobó la presencia de animales que hayan sobrevivido a la enfermedad ya que no se observaron anticuerpos neutralizantes en las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR). Bell y col. (1971) obtuvieron resultados similares al investigar suero de 120 perros de capturados en áreas enzoóticas de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

En todos los casos de recuperación los anticuerpos neutralizantes han estado presentes en suero y en líquido cefalorraquídeo en niveles altos (Álvarez y col. 1994; Arellano y col. 1997; Bell y col. 1972, Fekadu y col. 1980; Fekadu y Baer

1980; Hattwick y col. 1972). En algunos casos se observó que esos niveles permanecieron hasta por cinco meses en los perros recuperados (Bell 1972); sin embargo no se encontraron datos que indiquen su tiempo máximo de duración en el líquido cefalorraquídeo.

Bell (1966) observó en ratones inoculados experimentalmente que sobrevivieron a la enfermedad mantuvieron los niveles de anticuerpos por un período máximo de 18 meses. Hattwick y col. (1972), encontraron en un niño recuperado de la infección rábica niveles elevados de anticuerpos en líquido cefalorraquídeo diez meses después de iniciados los síntomas.

La presencia de anticuerpos rábicos en LCR continúa siendo uno de los principales criterios para afirmar que la enfermedad se ha desarrollado (Bell J.F. 1975) y se ha discutido sobre la posibilidad que los anticuerpos producidos por vacunaciones repetidas puedan cruzar la barrera hematoencefálica y encontrarse en títulos elevados en el LCR (Arko y col. 1973)

A este respecto Bell y col. (1979) encontraron que los anticuerpos rábicos generados por vacunación no logran atravesar dicha barrera. Baer y col. (1975) lograron obtener títulos altos de anticuerpos neutralizantes en LCR de animales sanos sólo después de inocularlos directamente en la cisterna magna con vacuna atenuada y vacuna inactivada (cepa ERA)

El uso de otras técnicas como la prueba de cerebro neutralización (Kubes y Gallia citados por Bell 1966), que permiten diferenciar si los anticuerpos presentes son de tipo vacunal o producidos por una infección; utilizadas junto con la RIFFT, apoyarían estudios similares futuros en los cuales no se conocen los antecedentes de la población. La detección de virus en glándulas salivales por medio de la prueba de inmunofluorescencia realizada de manera rutinaria junto con la

determinación de anticuerpos en LCR podría ampliar el panorama con relación a la existencia de animales recuperados.

En México los términos utilizados con mayor frecuencia por las autoridades de salud para clasificar a la población canina son: perro con dueño, perro sin dueño o perro callejero considerando que el perro con dueño es aquel animal que está bajo la responsabilidad y cuidado de una o varias personas y por lo tanto debería ser vacunado por lo menos en una ocasión, en contraposición del perro sin dueño o perro callejero.

Esta variedad de términos no es práctica en los programas de prevención y control de la rabia ya que como se detectó a lo largo de la presente investigación existen perros, aún con dueño, que viven en la calle y perros domiciliados, sin que esta clasificación sea del todo categórica ya que unos y otros pueden o no estar vacunados, concluyendo que la situación de cada animal es totalmente azarosa.

Los diferentes criterios para clasificar a los perros, resultan completamente inoperantes, si se considera que los parámetros utilizados para ello son subjetivos y en consecuencia no se pueden aplicar fácilmente para llegar a una categoría final. Por lo tanto sólo se debería tomar en cuenta si son o no perros vacunados en función del riesgo que ellos implican.

Conclusiones

El perfil de la población canina conforme a las variables de sexo y edad es similar al reportado por otros autores y de acuerdo al origen los animales pertenecieron principalmente a delegaciones políticas que cuentan con áreas rurales grandes.

Dada la importancia que tienen los cachorros en la presentación de la rabia es necesario realizar investigaciones que ayuden a conocer el riesgo potencial que estas poblaciones representan.

Los resultados mostraron la presencia de sueros positivos con lo cual se confirmó la hipótesis sobre la posibilidad de encontrar anticuerpos en suero sanguíneo de perros callejeros. Sin embargo, no se encontró evidencia de animales con anticuerpos neutralizantes en líquido cefalorraquídeo.

La presencia de anticuerpos específicos en suero no es una evidencia útil de infección pasada en animales con antecedentes desconocidos por lo que es posible pensar en una vacunación previa más que en una recuperación.

Las acciones de las campañas de vacunación masiva se ven reflejadas en los llamados perros callejeros a través de la cantidad de animales que resultaron sero-positivos, lo que sugiere que estos animales en algún momento de su vida no fueron callejeros.

Ya que la recuperación de la infección por el virus rábico es poco común se recomienda complementar la búsqueda de anticuerpos en suero y líquido cefalorraquídeo con otras pruebas, cuando no se conocen los antecedentes de la población.

Finalmente se puede mencionar que no hay una relación en cuanto a la inmunización de los perros y la dependencia de un dueño, pues como se observó, perros callejeros evidenciaron haber sido inmunizados y perros domiciliados no lo fueron.

BIBLIOGRAFÍA

- Acha P.N. y Szyfres B. 1977: Rabia. Publicación científica 354. Ed. Organización Panamericana de la Salud pp 343.
- Afshar A. 1972: A contribution to the detection of inapparent rabies in stray dogs. Vet Rec 91: 562-565.
- Aghomo H.O., Oduye O.O. Tomori O. and Ibe M., 1989: Isolation of rabies virus from clinically healthy and previously unvaccinated dogs. Bull Anim Health Prod Afr 37:131-136
- Aghomo H.O., Oduye O.O., Tomoti O., 1990: Experimental infection of dogs and mice with rabies virus isolated from the saliva of unvaccinated clinically healthy dogs. Bull Anim Health Prod Afr 38: 297-300.
- Álvarez H.L. y col. 1994: Partial recovery from rabies in a nine-year-old boy. The Pediatr Infect Dis J 13:1154-1155.
- Arellano C.E. y col. 1997: Recuperación parcial de rabia humana. Bol Méd Hosp Infant Méx 54:195-198.
- Arko R.J., Schneider L.G. y Baer G.M. 1973: Nonfatal canine rabies. Amin. J. Vet. Res. 34:937-938.
- Asociación Nacional para la Aplicación de Leyes de Protección a los Animales, A.C. 1992: Instructivo para la utilización del aparato eléctrico de eutanasia.
- Banister K., Baumans V., Bernoth E., Bromage N., Bunyan J, Erhardt W., Flecknell P. and Gregory N., Hackbarth H., Morton D. and Warwick C., 1996: Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. Lab Anim 30: 293-316.
- Baer G.M., Shaddock J.H. y Williams L.W., 1975: Prolonging morbidity in rabid dogs by intrathecal injection of attenuated rabies vaccine. Infect Immun 12:98-103
- Baer G.M. and Tordo N. 1994 Encyclopedia of Virology. Ed. Academic Press Ltd. pp 1180-1185

- Ballew H., Forrester and col. 1981: Basic laboratory methods in virology. Atlanta, Georgia Ed. U.S. Department of Health and Human Services.
- Beck, A.M. 1973: The Ecology of Stray Dogs: A Study of Free Ranging Urban Animals. Baltimore Ed. New York Press pp 45-51.
- Bell J.F., Lodmell D.L., Moore G.J and Raymond G.H.1966: Brain Neutralization of rabies virus to distinguish recovered animals from previously vaccinated animals. J Inmun 97:747-753.
- Bell J.F., González M.A., Díaz A.M. and Moore G.J. 1971: Nonfatal rabies in dogs: experimental studies and results of a survey. Anim J Vet Res 32: 2049-2058.
- Bell J.F., Sancho M.I., Díaz A.M. and Moore G.J. 1972: Nonfatal rabies in an enzootic area: results of a survey and evaluation of techniques. Anim J Epidemiol 95: 190-198.
- Bell J.F., 1975: Latency and abortive rabies. In: The natural history of rabies. (Ed. Baer G.) New York : Ed. Academic Press, Inc. Vol. 1. pp 331-354.
- Bell J.F. y Moore G.J. 1979: Allergic encephalitis, rabies antibodies and the blood/brain barrier J Lab Clin Med 94:5-9.
- Burleson F., Chambers T. and Wiedbrauk D. 1992: Virology: A Laboratory Manual. San Diego, Cal: Ed. Academic Press, Inc. pp 8-33.
- Bourhy H. and Sureau P.1990: Métodos de laboratorio para el diagnóstico de la rabia. Versión en español por Juan A. Montaña Hirose .Paris. Ed. Unidad de Rabia, Instituto Pasteur. pp 144-146.
- Centro de Control Canino Alfonso Angellini de la Garza.1995: Informe Anual de Actividades.
- Cleaveland S., Barrat J., Barrat M.J., Selve M, Kaare M., y Esterhuysen J 1999: A rabies serosurvey of domestic dogs in rural Tanzania: results of a rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) and a liquid-phase blocking ELISA used in parallel. Epidemiol Infect 123:157-164.
- Daniels T.J 1983: The social organization of free-ranging urban dogs. II Estrous groups and the mating system. Appl Anim Ethol 10: 365-373.

- Eng T.R., Fishbein D.B., Talamante H.E., Hall D.B., Chávez G.F., Dobbins J.G., Muro F.J. Bustos J.L., De los Angeles R.M., Munguía A. 1993: Urban epizootic of rabies in México: epidemiology and impact of animal bite injuries. Bull World Health Organ 71: 615-624.
- Fekadu M. 1988: Pathogenesis of rabies virus infection in dogs. Rev Infect Dis 10: S678-S683.
- Fekadu M., 1993: Canine rabies. Onderstepoort. J Vet Res 60:421-4 27.
- Fekadu M., Baer G., 1980: Recovery from clinical rabies of 2 dogs inoculates with a rabies virus strain from Ethiopia. Anim J Vet Res 41:1632-1635.
- Fekadu M., Shaddock J., Baer G., 1981: Intermittent excretion of rabies virus in the saliva of a dog two and six months after it had recovered from experimental rabies. Am J Trop Med Hyg 30: 1113-1115.
- Fekadu M., Shaddock J., Baer G., 1982: Excretion of rabies virus in the saliva of dogs. J Infect Dis 145: 715-719.
- Fekadu M., Summer J., Shaddock J., Sanderlin D. Baer G, 1992: Sickness and recovery dogs challenged with a street rabies virus after vaccination with a vaccine virus recombinant expressing rabies virus N protein. J Virol 66: 2601-2604.
- Fishbein D.B., Frontini Ma.G., Dobbins J.G., Flores C.E., Quiroz H.Gpe., Gamez R., J.J., Woo M. B., Garza R.J.Belotto A.J., Balderas T. J.M., Yenne K. M., Linhart S.B. y Baer G.M.: 1992. Prevention of canine rabies in rural Mexico: an epidemiologic study of vaccination campaigns. Am J Trop Med Hyg 47: 317-327.
- Follman E.H., Ritter D.G. y Beller M. 1992: Report of a survey of fox trappers from the North Slope Borough for the presence of rabies antibodies.
- Fuentes R.M., Cárdenas L. J. y Aline S.A. 1981: Cálculo de la población canina en la Ciudad de México, determinación de sus condiciones de atenciones y su destino. Rev Vet Méx 12: 59-71

- Gandarillas C.O.1995: Poblaciones caninas en áreas rurales en el Estado de Oaxaca. Memorias VI Reunión Internacional sobre Avances en la Investigación para el Control de la Rabia en las Américas, Mérida (Yucatán) México. Secretaría de Salud, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos pp 22-23.
- Hattwick M. A. y col. 1972: Recovery from rabies: a case report. Ann Inter Med 76:931-942.
- Hill R.E., Smith K.E., Beran G.W., Bead P. 1993: Further studies on the susceptibility of raccoons (*Procyon lotor*) to a rabies virus. origin and comparative susceptibility of stripped skunks (*Mephitis mephitis*). J Wildl Dis 29: 475 – 477.
- Hutyra F., Marek J. y Manniger R., 1973: Patología y terapéutica especiales de los animales domésticos. Barcelona Ed. Labor S.A. pp 577-605.
- Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico 1994: Manual de Técnicas de Diagnóstico de Rabia. Colección de cuadernos técnicos de INDRE No. 5 Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo Ed. Secretaría de Salud
- Iturbe R.R., 1989: Diagnóstico de moquillo canino por inmunofluorescencia directa, en perros diagnosticados clínicamente como rabiosos. Rev Vet Méx 20:161-167.
- Jayahumar R. and Ramados P. 1991: Evaluation of diagnostic tests of rabies in dogs. Indian Vet J 68: 765-768.
- Jurisdicción Sanitaria de Coyoacán 1995: Archivos del Servicio de Epidemiología.
- Kaplan M and Koprowski H. 1973: Laboratory techniques in rabies. 3th ed. Geneva Ed. World Health Organization.
- Kasempimolporn S., MitmoonpitakC., Chaiyaburt N., Sapakorn K., Brahmasa R. y Sitprija V 1996: Maternal antibodies against rabies in Thai puppies. A preliminary study. J Med AssocThailand 79: 36-39

- Kirk R., Bistner S. and Ford R. 1990: Handbook of veterinary procedures and emergency treatment. 5th ed. Ed. W. B. Saunders Company pp 512-513.
- Ley de Protección a los Animales 1981. Diario Oficial de la Federación del 7 de Enero de 1981. Ed. Secretaría de Gobernación.
- Mebatsion T., Sillero-Zubiri C., Gottelli D. Y Cox J. H. 1992: Detection of rabies antibody by ELISA and RFFIT in unvaccinated dogs and in the endangered Simien jackal (*Canis simensis*) of Ethiopia. Zentralbl Veterinarmed (B) 39:233-235.
- Mendoza G., R. 1994: Estudio de las lesiones histológicas en la glándula salival de perros con infección natural de virus rábico. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México
- Meslin F.X.: Global review of human and animal rabies. En: Rabies: Guidelines for Medical Professionals Trenton, NJ. Ed. Veterinary Learning Systems
- Morgan S.J. y Darling D.C. 1993: Cultivo de células animales España Ed. Acribia, S.A.
- Markus H., Jobin G. e Jobin G.B. 1969: Cura espontánea de raiva em cao experimentalmente infectado. Bol Of Sanit Panam 67:101-107.
- Martínez P.R., Pérez S.L., Luna S.H. y Arzate S.R. 1995: Poblaciones caninas en áreas urbanas en el Estado de México. Memorias VI Reunión Internacional sobre Avances en la Investigación para el Control de la Rabia en las Américas, Mérida (Yucatán) México. Secretaría de Salud, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos pp 23-24.
- Navarro F.R 1987: Introducción a la Bioestadística. Análisis de Variables Binarias. México: Ed. Libros McGraw-Hill de México, S.A. de C.V pp 138-141.
- Ogunkoya A.B., Beran G.W., Umoh J.U., Gomwalk N.E. y Abdulkadir I.A. 1990 Serological evidence of infection of dogs and man in Nigeria by lyssaviruses (family Rhabdoviridae) Trans R Soc Trop Med Hyg 84: 842-845.

- Organización Mundial de la Salud. Comité de Expertos de la OMS en Rabia 1966
5º Informe. Serie de Informes Técnicos 321. Ginebra: Ed. Organización
Mundial de la Salud pp 27.
- Organización Mundial de la Salud Comité de expertos de la OMS sobre Rabia
1992. Octavo informe. Serie de Informes Técnicos 824. Ginebra: Ed.
Organización Mundial de la Salud.
- Robinson L. E. and Fishbein D.B., 1991: Rabies. Semin Vet Med Surg (Small
Animals) 6: 203-211.
- Rodríguez T. J.G., 1987: Mecanismos de exposición e infección rábica en riesgos
de trabajo. En Simposio: La Atención Médica de las Personas Involucradas
en un Incidente de Rabia: Ed. Secretaría de Salud, Organización
Panamericana de la Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social pp 96-102.
- Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana para la Prevención y Control de la
Rabia. Ed. Diario Oficial de la Federación 25 de Enero 1995.
- Secretaría de Salud. Comité Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 1999: Manual
para la Vigilancia Epidemiológica de la Rabia Humana. México: Ed.
Secretaría de Salud
- Secretaría de Salud. Dirección General de Medicina Preventiva de la Secretaría de
Salud 1994: La rabia en México, 1988-1993 Ed. Rev Sal Públ Méx 36: 462-
466
- Secretaría de Salud. Servicios de Salud Pública en el Distrito Federal 1995:
Programa para la Prevención y Control de la Rabia.
- Secretaría de Salud. Servicios de Salud Pública del Distrito Federal 1996: Reunión
Anual Nacional del Programa de Zoonosis. Coordinación de Vigilancia
Epidemiológica, SSPDF. 1996.
- Secretaría de Salud. Servicios de Salud Pública del Distrito Federal 1999.
Programa de Prevención y Control de la Rabia. Informe Anual.
- Sentíes E.S.C. 1964: Determinación de anticuerpos contra la rabia en perros,
mediante la prueba de sero-neutralización. Tesis de licenciatura
Universidad Nacional Autónoma de México.

- Smith J.S., Yager P.A. and Baer G.M. 1973: A Rapid tissue culture test for determining rabies neutralizing antibody. En: Laboratory techniques in rabies. 3th ed. Geneva Ed. World Health Organization. pp 354-357
- Soave O.A. 1967: Infección rábica latente. I Seminario Internacional sobre Rabia en las Américas. Buenos Aires.
- Thomas J.B. 1975: The Serum Neutralization: indirect fluorescent antibody and rapid fluorescent focus inhibition tests. En: The Natural History of Rabies pp 417- 433 Ed. Baer G Vol. 1 Academic Press.New York
- Tierkel E.S., 1982: Rabia canina. En: Historia Natural de la Rabia. (Editor Baer G.). México: Ed. La Prensa Médica Mexicana, S.A. pp 39.
- Tizard Ian R. 1979: Inmunología Veterinaria. Ed. Interamericana pp 173-174.
- Van Kampen K.R. 1999: Rabies Vaccines. En: Rabies: Guidelines for Medical Professionals. Ed. Veterinary Learning Systems pp 67-71
- Vargas G.R.; Cárdenas L. J., 1996: Epidemiología de la Rabia: Situación Actual en México. En: Ciencia Veterinaria (Editor Moreno Ch. R.) Volumen 7, pp 332-358.
- Vargas P.F., 1987: Situación Actual de la Rabia en México. En Simposio "La Atención de la Personas Involucradas en un incidente de Rabia" Ed Secretaría de Salud, Organización Panamericana de la Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social pp 17-43.
- Wandeler A.I., Matter H.C., Kappeler A. y Bludde A. 1993: The ecology of dogs and canine rabies: a selective review. Rev Sci Tech O. I. E 12: 51-71.
- World Health Organization: Guidelines for dog rabies control. Ginebra, 1984.
- World Health Organization and World Society for the Protection of Animals Guidelines for dog population Management . Geneva 1990.
- Widner W and Blevins W. 1991: Veterinary Myelography: A review of Contrast media, adverse effects and technique. J Am Anim Hosp Assoc 27: 163-165
- Winters W.D. 1981: Time dependent decreases of maternal canine virus antibodies in newborn pups. Vet Rec 108:295-299.

Wosu L.O. and Anyanwu H. N. 1990: Seroepidemiological survey of rabies virus antibodies in non-vaccinated dogs in Nsukka Environs, Nigeria. J Commun Dis 22: 124-128.

ANEXOS

ANEXO I

CUADROS DE RESULTADOS

Cuadro 1

Procedencia por Delegación Política de los perros remitidos al Centro de Control Canino Alfonso Angellini de la Garza, México D.F. Abril-Junio 1998

Delegación	Número	Porcentaje
Alvaro Obregón	59	20.49
Benito Juárez	1	0.35
Coyoacán	26	9.03
Iztapalapa	4	1.39
Milpa Alta	85	29.51
Xochimilco	109	37.85
Estado de México	4	1.39
Total	288	100

CUADRO 2

Distribución por edad y sexo de los perros estudiados en el Centro de Control Canino "Alfonso Angellini de la Garza, México D.F., Abril-Junio 1998

Edad◊	Hembras	%	Machos	%	Sexo no registrado	%	Total de perros	%
Jóvenes	12	4.16	5	1.74	0	0	17	5.9
Adultos	120	41.67	79	27.43	0	0	199	69.1
Viejos	15	5.20	26	9.00	0	0	41	14.24
No registrada	12	4.18	18	6.27	1	0.3	31	10.76
Total	159	55.2	128	44.5	1	0.3	288	100.

A. jóvenes = De seis meses a menos de un año.

A. adultos = De uno a siete años

A. viejos = Mayores de siete años

◊ Se calculó por medio del desgaste de los dientes

Cuadro 3

Resultado de los sueros analizados según la Prueba Rápida de Inhibición de Focos Fluorescentes

Inhibición de UFF* (%)	Número de Muestras	Porcentaje de muestras
Negativos	87	35.80
Positivos	156	64.20
Total*	243	100.00

*De los 288 sueros colectados, 45 no se procesaron por presentar contaminación o causar efecto citotóxico
Los sueros con un porcentaje de inhibición igual o mayor al 50% se consideraron positivos.

Cuadro 4

Distribución de los sueros positivos según la edad de los animales estudiados, Centro de Control Canino Alfonso Angellini de la Garza, México,D.F. Abril- Junio1998.

Edad	Total de muestras *	Positivas	Porcentaje
Jóvenes	10	2	20.0
Adultos	172	100	58.13
Viejos	35	34	97.14
Sin edad determinada	26	20	76.92
Total	243	156	63.41

A. jóvenes = De seis meses a menos de un año.

A. adultos = De uno a siete años

A. viejos = Mayores de siete años

* De las 288 muestras,45 no fueron procesadas por estar contaminadas o causar efecto citotóxico

Cuadro 5

Distribución de los sueros positivos según el sexo de los animales estudiados en el Centro de Control Canino Alfonso Angellini de la Garza, México D.F. Abril-Junio 1998

Sexo	Total de muestras	Número de muestras positivas	Porcentaje de muestras positivas
Hembras	159	89	57.05
Machos	128	67	42.95
Total	287*	156	100.00

*No se registró el sexo de uno de los animales. El resultado del suero correspondiente fue negativo.

Cuadro 6

Distribución de los sueros positivos según Delegación Política de los animales estudiados en el Centro de Control Canino Alfonso Angellini de la Garza, México D.F. Abril-Junio1998

Delegación Política	Total de muestras procesadas	Número de muestras, positivas	Porcentaje
Álvaro Obregón	50	31	0.62
Coyoacán	20	11	0.55
Iztapalapa	4	3	0.75
Milpa alta	74	46	0.62
Xochimilco	92	63	0.68
Estado de México	3	2	0.66
Total	243	156	0.64

ANEXO II

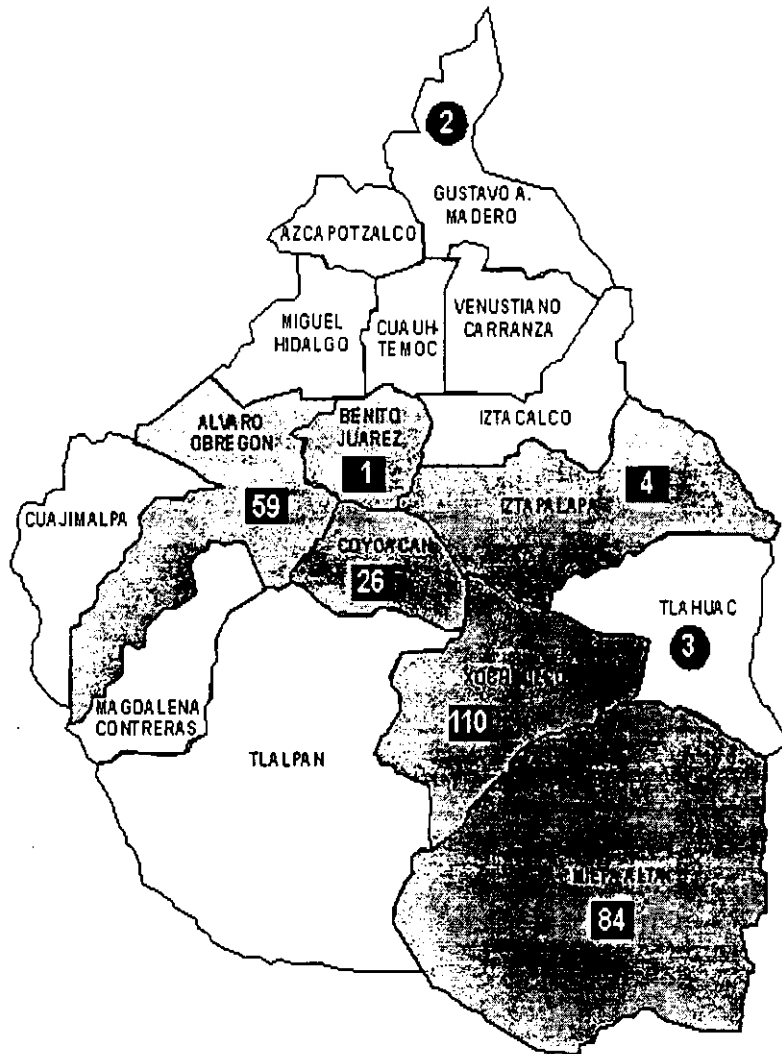
Relación de habitantes por perro en el Distrito Federal, 1981

Delegación	Habitantes:perro
Azcapotzalco	5.9:1
Benito Juárez	5.2:1
Coyoacán	5.9:1
Cuajimalpa	5.1:1
Cuauhtémoc	7.6:1
Gustavo A. Madero	6.2:1
Iztacalco	5.9:1
Iztapalapa	4.4:1
Magdalena Contreras	4.0:1
Miguel Hidalgo	4.2:1
Milpa Alta	4.4:1
Tláhuac	9.3:1
Tlalpan	9.3:1
Venustiano Carranza	10:1
Villa Alvaro Obregón	10:1
Xochimilco	7:1

Fuente: Fuentes R.M y col., 1981: Cálculo de la población canina en la Ciudad de México, determinación de sus condiciones y destino. Rev. Vet. Méx. 12:59-71

ANEXO III

Distribución por delegación política, número de animales analizados y focos rábicos en el Distrito Federal en 1998.



EDO. DE MEXICO = 4 ANIMALES

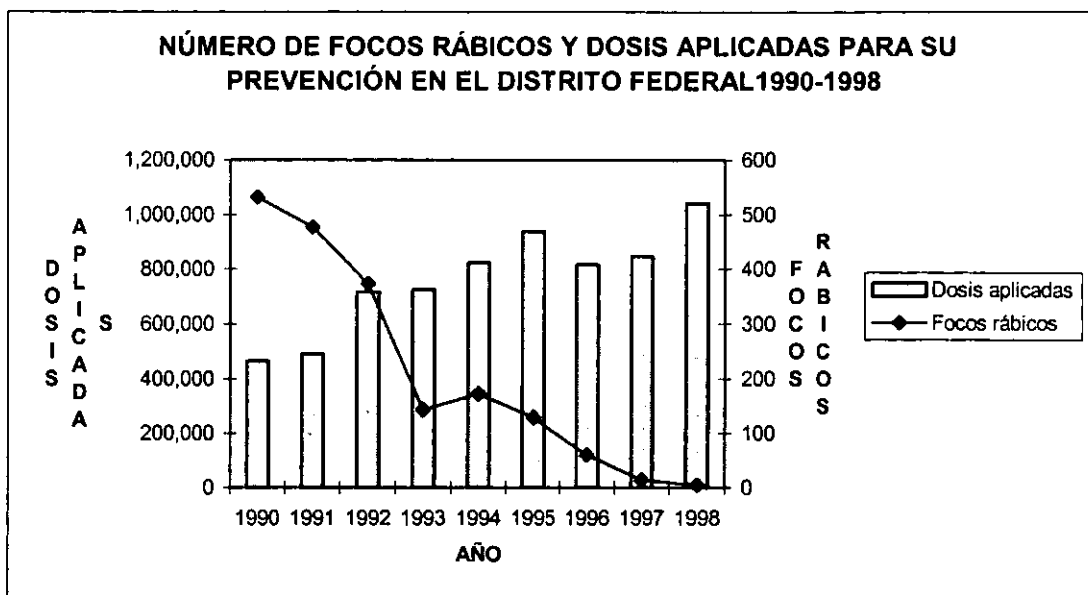
ANIMALES MUESTREADOS



FOCOS RÁBICOS



ANEXO IV



Fuente: Programa de Prevención y Control de la Rabia. Servicios de Salud Pública del D.F., 1999