



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**“PRESENCIA DE *Leptospira* spp. Y MOQUILLO CANINO EN
POBLACIONES DE PERROS Y CARNÍVOROS SILVESTRES EN LA
ISLA COZUMEL”**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

HORACIO MENA GONZALEZ

TUTOR: DR. FRANCISCO GALINDO MALDONADO

**COMITÉ TUTORAL:
DRA. DULCE MARÍA BROUSSET HERNÁNDEZ JÁUREGUI
DR. ALFREDO CUARÓN OROZCO**



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.

DEDICATORIA

A mis padres

Memo y Betina, soy el más afortunado.

A mis hermanas

Clau, Lich y Yuni, gracias por su amor y sonrisas en todo momento.

A Pimis y Valen donde se encuentren... Terminamos otro capitulo, gracias por tener fe en mi y mostrarme la humildad los amo.

A Karly, tanquecito, con todo mi amor.
Tan solo es el inicio de esta aventura juntos

Y sobre todo a ti mi mejor amigo que entre tanto amor y palabras de aliento ahora solo recuerdo estas:

... "Jamás he perdido la fe en ti desde aquel día en que por primera vez te salvé de la ola gigantesca y te arrojé desamparado sobre la playa. De la forma en que mides el tiempo, esto tuvo lugar hace más de 500 millones de años. Hubo muchos modelos, muchos cortes, muchas tallas antes de que alcanzara la perfección en ti, hace más de treinta mil años. No he hecho un esfuerzo posterior para mejorarte a últimas fechas. Te di este mundo y dominio sobre el. Después para que fueras capaz de alcanzar tu máximo potencial posé mi mano sobre ti, una vez más y te doté de poderes desconocidos para todas las demás criaturas del universo, aún hasta hoy.... "

Yo te instruiré, te enseñaré el camino, te cuidaré, seré tu consejero.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr Francisco Galindo por confiar y abrirme la puerta a la realización de uno de mis grandes anhelos y por esos cafecitos que en verdad disfruté.

Al Dr. Alfredo Cuarón por invitarme a ir a más, y por darme calidad de tiempo. Por tu confianza acertados consejos, sugerencias y correcciones.

A la Dra. Dulce Brousset, siempre al pendiente, buscando salidas cuando para mi era imposible. Gracias por estar en ese momento de incertidumbre, angustia y dolor familiar... mil gracias!

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo a través de la beca de estudios de maestría otorgada (CLAVE:189450) y por el apoyo económico para la realización del trabajo a través del proyecto "Efectos ecológicos de la introducción de la boa (*Boa constrictor*) sobre la biota de Cozumel" (CONACYT 33635-V; Dr. Alfredo D. Cuarón, responsable), del Fondo Sectorial de Investigación Ambiental SEMARNAT-CONACyT con el proyecto "Ecología y manejo para la conservación de una biota endémica insular críticamente amenazada"(SEMARNAT-2002-C01-0571; Drs. Francisco Galindo y Alfredo D. Cuarón, responsables) y del Durrell Wildlife Conservation Trust (Dr. Alfredo D. Cuarón, responsable).

Al Laboratorio de Medicina de Conservación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. Doctor Héctor Zepeda, gracias por su asesoría en momentos difíciles, por mostrarme la humildad, por escucharme y aconsejarme. Jorge bravo, mil gracias por tu paciencia, tiempo y apoyo durante el trabajo del laboratorio. Héctor, ni hablar te toco entrarle de emergente a mi trabajo, gracias por todo.

Al Departamento de Microbiología e inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en especial al Doctor Alejandro de la Peña, por su apoyo y asesoría, al Dr. Iturbe de virología, a la Dra. María Alejandra Ayanegui, por su asesoría, paciencia, comprensión y tiempo en verdad mil gracias, Oli y Carlitos gracias por su apoyo incondicional y desinteresado hasta el final.

Al Centro de control Animal y el Ayuntamiento de Cozumel, gracias por su apoyo sin reservas al proyecto.

A la Sociedad humanitaria de Cozumel A.C. por facilitarme sus instalaciones para el procesamiento y cuidado de mis muestras.

A Empresas Turísticas Nacionales - Grand Beach Park, en especial al representante legal Contador Jose Luis Cervantes Martínez por permitirnos el acceso y sobre todo a la bióloga Carmen Pech Chin por su confianza y apoyo incondicional en el monitoreo de animales del albergue Playa Mía.

A mis padres por el apoyo económico, material, emocional y espiritual, en momentos difíciles, sin ustedes no hubiera terminado. Karlita gracias por tu amor, asesoría estadística y crítica constructiva a mi trabajo.

A Paola y Rodrigo, que puedo decirles amigos, son grandes guerreros, siempre pendientes y presentes en todo momento, en las horas críticas del huracán, en el hospital y aún hoy en una que otra pachanga. Los amo mis amigos.

A la familia Cárdenas Borges en especial a la sra. Carmen y Lara por adoptarme y apoyarme desinteresadamente en la Isla. Que hermosos domingos a su lado, los amo.

A la familia Bojorquez Rodríguez a la tia Blanca, al tio Alejandro, a Jorge y Ale por su apoyo espiritual, emocional y material durante el paso del huracán

Al huracán Wilma, gracias amigo por recordarme uno de los regalos jamás recibidos y pocas veces valorado, la vida y más aún, incrementaste mi Fe. Ahora entiendo, créeme en verdad entiendo...

Y principalmente a todos los ambientes geográficos de la isla donde transite, por cuidarme y respetarme. También a los animales silvestres nativos, exóticos y domésticos por regalarme más que una muestra de sangre, siempre estarán en mi mente. Dios de al hombre sabiduría, respeto y amor para con ustedes. Gracias.

INDICE

Capitulo 1: INTRODUCCION.....	1
IMPORTANCIA DE LA EPIDEMIOLOGÍA EN LA CONSERVACIÓN DE VIDA SILVESTRE.	3
Conservación y programas de manejo en vida silvestre	3
Enfermedad	4
Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes	4
Isla Cozumel	6
Importancia epidemiológica de la introducción de perros en Cozumel.....	7
Capítulo 2: PRESENCIA DE <i>Leptospira</i> spp. EN POBLACIONES DE PERROS Y CARNÍVOROS SILVESTRES EN LA ISLA COZUMEL ”	9
RESUMEN	9
OBJETIVO GENERAL	18
Objetivo particular	18
HIPÓTESIS	18
MÉTODOS	19
Área de estudio	19
Sitios de captura	20
Método de captura	21
Contención	24
Monitoreo durante la anestesia	25
Estado general de salud.....	26
Identificación y marcaje de los animales capturados	26
Toma de muestras y conservación	27
Determinación de <i>Leptospira</i>	28
Análisis estadístico	30
RESULTADOS	31
Exámen fisico general	31
Seroprevalencia de <i>Leptospira</i>	33
DISCUSIÓN	35
Exámen fisico general	35
Presencia de <i>Leptospira</i>	38
Cultivos positivos a la prueba de PCR.....	47
CONCLUSIONES	49

Capítulo 3: PRESENCIA DE MOQUILLO CANINO EN POBLACIONES DE PERROS Y CARNÍVOROS SILVESTRES EN LA ISLA COZUMEL.	51
RESUMEN.....	51
INTRODUCCIÓN.....	52
OBJETIVO GENERAL	58
HIPÓTESIS.....	58
MÉTODOS.....	58
Toma de muestras y conservación	60
RESULTADOS	61
DISCUSIÓN.....	62
CONCLUSIONES.....	67
DISCUSION GENERAL	68
CONCLUSIONES GENERALES.....	71
IMPLICACIONES	72
REFERENCIAS	73
CUADROS Y FIGURAS	85
APENDICE I. FORMATO DE REGISTRO DE LOS ANIMALES CAPTURADOS	102
APENDICE II. RESULTADOS DEL PCR PARA <i>Leptospira</i> spp.	103
APENDICE III. RESULTADOS DE RT-PCR PARA MORBILLIVIRUS	107

RESUMEN

La presencia abundante de perros (*Canis familiaris*) en la Isla Cozumel, representa un riesgo para la conservación de especies como el pizote de Cozumel (*Nasua nelsoni*) y el mapache enano (*Procyon pygmaeus*). De febrero a mayo del 2006, se muestrearon en cinco ambientes geográficos, entre otras especies, 41 perros (*Canis familiaris*) y 39 mapaches enanos (*Procyon pygmaeus*). La técnica de aglutinación microscópica (MAT) fue utilizada para la determinación de *Leptospira* spp., Animales con títulos $\geq 1:100$ fueron considerados como positivos, y animales con títulos $\geq 1:50$ con títulos residuales de una infección pasada o anticuerpos de reciente formación. Las muestras de sangre y orina de los animales, fueron cultivadas y sometidas a PCR de *Leptospira*, en busca de evidencia directa del microorganismo, resultando positivos, seis perros, un mapache y un armadillo. La seroprevalencia se analizó por la prueba de independencia de χ^2 , no hubo diferencias entre las zonas de muestreo, perros y mamíferos silvestres nativos ($P < 0.05$). La seroprevalencia entre animales silvestres nativos, exóticos, perros urbanos y rurales, fue diferente ($P > 0.05$). *Balum Castelloni*, *hardjobovis* y *canicola* fueron las serovariedades importantes en perros y *autumnalis* y *australis* en mapaches. En la prueba de PCR se obtuvieron amplificadores de siete mapaches, un tlacuache, y un tigrillo. El moquillo canino fue determinado por inmunofluorescencia de improntas oculares y por la prueba de RT-PCR a partir de glóbulos blancos. Un mapache fue positivo a la prueba de inmunofluorescencia y cuatro perros, tres mapaches y una martucha amplificaron para morbillivirus por RT-PCR, sugiriendo la presencia de moquillo canino en tres sitios de muestreo. Los resultados indican la presencia de *Leptospira* y moquillo canino en la isla y crean la necesidad de conocer su comportamiento en el transcurso del año y en las diferentes especies, para determinar los posibles riesgos a la fauna nativa.

Palabras Clave: Moquillo canino, leptospirosis, *Procyon pygmaeus*, *Canis familiaris*, *Nasua nelsoni*, Isla Cozumel,

ABSTRACT

The abundant presence of dogs (*Canis familiaris*) in Cozumel Island represents a risk to threatened endemic species, such as pizote (*Nasua nelsoni*) and the pygmy raccoon (*Procyon pygmaeus*). From February to May 2006, were sampling 41 dogs (*Canis familiaris*) and 39 pygmy raccoons (*Procyon pygmaeus*). The sampled was made in five geographic zones of the Island. The microscopic agglutination technique (MAT) was used to determine *Leptospira* spp. Antibodies, microagglutination titers were interpreted as: $\geq 1:100$ positive, $\geq 1:50$ residual titer of past infection or newly formed. *Leptospira* PCR was used in blood and urine *Leptospira* cultures for direct evidence of the *Leptospira* in the sampled population. Six dogs, one raccoon and one armadillo were positive and four dogs and two raccoons were regarded antibodies as a previous infection or antibodies of recent formation. The seroprevalence of *Leptospira* by the test of square independence of χ^2 did not show differences between zones and dogs and wild native mammals ($P < 0.05$). But the seroprevalence between wild native mammals, wild exotic mammals, urban dogs and rural dogs, we found statistical evidence ($P > 0.05$) that they are different. Serovares found with greater importance in dogs were: *ballum castelloni*, *hardjobovis* and *canicola*, in raccoons were *autumnalis* and *australis*. In the *Leptospira* PCR test nine amplified on tree species were obtained. The immunofluorescence test in conjunctival smears and the RT-PCR test from leucocytes were used to determine canine distemper. Presence the positive result of one raccoon to the immunofluorescence test and four dogs, tree pygmy raccoons and one kinkajou RT-PCR amplifies to morbillivirus, suggest the presence of canine distemper in three sites of sampling. The results points out the presence of *Leptospira* and canine distemper in dogs and raccoons in the Island. The results create the necessity to better understanding of the behavior of these infections in the different seasons and species determine their impact and risks to native fauna.

Keywords: Canine distemper, *Leptospira*, *Procyon pygmaeus*, *Canis familiaris*, *Nasua nelsoni*, Cozumel Island.

Capítulo 1: INTRODUCCION

Las islas constituyen sitios de enorme importancia en la conservación de la biodiversidad. Más del 50% de las especies de aves y reptiles catalogadas en peligro de extinción habitan en ellas (Ceballos y Rodríguez 1993). Tal es el caso de la Isla Cozumel que actualmente es habitada por dos procionidos catalogados por la Unión Mundial para la Conservación (UICN) como especies amenazadas. Uno es el pizote (*Nasua nelsoni*) y el otro es el mapache (*Procyon pygmaeus*) (Hilton-Taylor 2000; Cuarón et al., 2004). La amenaza a estas especies se ve incrementada por la introducción de especies a la isla como la boa (*Boa constrictor*), perros y gatos ferales que a través de la depredación o bien mediante la transmisión de enfermedades pueden disminuir las poblaciones no solo de *Procyon pygmaeus* y *Nasua nelsoni*, si no del resto de carnívoros presentes en la isla como son la zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*) o el martucha (potos *flavus*) (Cuarón et al 2004). La introducción de perros en la isla, es originada por la ignorancia e indiferencia de sus pobladores. Estos animales son abandonados sin haber recibido la mínima atención nutricional y médica. El incremento en la densidad poblacional de perros hace que estos animales se desplacen favoreciendo el contacto entre animales domésticos y fauna silvestre (Scott y Causey, 1973) facilitando que los ciclos infecciosos se mantengan activos (Vargas et al., 1996). Lo anterior ubica a las enfermedades como la principal causa de mortalidad en todas las especies de fauna silvestre y tienen un efecto negativo en áreas fragmentadas (Combes 1996; Riper et al., 1986 citado por Suzán et al., 2000), donde las poblaciones animales sufren mermas en el número de individuos. Por ello debe considerarse su evaluación durante la elaboración de los programas de conservación (Combes 1996; Suzán et al., 2000).

La leptospirosis es una zoonosis común de distribución mundial de alta incidencia en climas tropicales más que en templados (Levett y Whittington, 1998).

En climas cálidos, los perros son vectores importantes para los humanos (Weekes et al., 1997).

El moquillo canino es la segunda enfermedad infecciosa más importante a nivel mundial en perros domésticos (*Canis familiaris*), después de la rabia (Deem et al. 2000). Se ha reportado su presencia en todas las familias de carnívoros terrestres: Canidae, Felidae, Hyaenidae, Mustelidae, Procyonidae, Ursidae, Viverridae, Ailuridae, Ailuropodidae (Frölich et al., 2000; Deem et al. 2000) y en otras familias de mamíferos como Tayassuidae, que aunque no son carnívoros, son susceptibles al virus del moquillo canino (Noon et al., 2003).

Debido a la variedad de especies que la Isla Cozumel concentra, resulta de gran importancia en salud pública y conservación evaluar el papel que juega la fauna silvestre como reservorio y vector de enfermedades como moquillo canino y leptospirosis. Hasta ahora, no existe un perfil epidemiológico detallado de las poblaciones de perros y fauna silvestre que habitan la Isla Cozumel, lo que representa un serio riesgo para la salud animal y pública asociada a la transmisión de esas infecciones. Por lo anterior, el propósito de este trabajo es generar información respecto al comportamiento de estas dos enfermedades en los diferentes ambientes geográficos que conforman la isla y su relación con las poblaciones animales existentes en la isla, como perros urbanos, rurales, mamíferos nativos y exóticos. La información obtenida en esta investigación, será relevante para el manejo de poblaciones animales silvestres y domésticas en esta y otras islas.

IMPORTANCIA DE LA EPIDEMIOLOGÍA EN LA CONSERVACIÓN DE VIDA SILVESTRE.

Conservación y programas de manejo en vida silvestre

La conservación de las especies es un tópico de importancia a partir del deterioro del ambiente; la conservación es un conjunto de medidas implementadas para mantener, recuperar o aumentar poblaciones de especies silvestres dentro de su hábitat, así como disminuir las poblaciones que son perjudiciales para las especies nativas. Estas técnicas pueden estar relacionadas con el manejo del hábitat o el manejo directo de las poblaciones a través de programas de uso, reintroducción o reubicación. Hasta la fecha, sin embargo, han sido pocos los programas de manejo que utilizan como herramienta los estudios epidemiológicos en el manejo de poblaciones silvestres (Kleiman 1989; Suzán et al., 2000).

El estudio de la epidemiología aporta información sobre los agentes infecciosos y su desempeño en los nichos ecológicos, donde pueden ser devastadores para poblaciones en peligro de extinción, alterando la salud animal, la salud del ecosistema y finalmente la salud humana (Daszak y Cunningham, 2002). De manera general los esfuerzos veterinarios pueden ir dirigidos hacia el manejo directo del agente causal de la enfermedad. Esto se puede hacer a través de programas de inmunización con previa justificación epidemiológica (Blancou et al., 1988), hacia el manejo de la población del huésped, modificando la densidad de población (Peterson, 1991), o bien dirigida hacia la modificación del ambiente y la influencia de las actividades del hombre en la zona de interés (Wobser., 1994 citado por Suzán et al., 2000).

Enfermedad

La enfermedad es considerada un estrés en el ambiente (Macrogiese 2005), es un proceso que afecta el bienestar físico, mental, social, la eficiencia y eficacia del individuo o de la comunidad (Vargas 2000). La enfermedad es provocada por un desequilibrio en la triada epidemiológica que incluye al huésped, al agente y al ambiente, y dependiendo de las características propias del agente se podrá o no favorecer la transmisión (San Martín, 1981). Cada componente de esta triada tiene factores que afectan las formas de presentación de una enfermedad en el huésped varíen, como: especie, edad, raza, sexo, perfil genético, estado nutricional, conducta y presión competitiva (Lyls y Dobson, 1993; Anderson y May, 1982). El agente causal de enfermedades parasitarias, infecciosas y no infecciosas, es un componente necesario, pero no determinante para la presentación de la enfermedad, y el grado de afección depende de su patogenicidad, virulencia, dosis infectiva y especificidad del huésped (Anderson y May, 1982). Finalmente el ambiente es influido por el clima, tipos de hábitat, eventos naturales, perturbación de hábitat y contaminación, que además de alterar la salud de los animales, puede tener repercusiones severas en el mantenimiento de la diversidad biológica y en la salud del ser humano (Martens, 1999).

Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes

Gran parte de la diversidad biológica se pierde debido al impacto de las actividades del hombre, así como a las enfermedades, que son consideradas como la principal causa de mortalidad en todas las especies de fauna silvestre (Combes, 1996; Riper et al., 1986 citado por Suzán et al., 2000). Los patógenos emergentes y re-emergentes representan un gran desafío para la medicina humana y veterinaria. Esta emergencia esta comúnmente asociada con cambios ecológicos y factores de riesgo relacionados al tipo de patógeno, ruta de transmisión y rango de huéspedes. Tres cuartas partes de los patógenos

emergentes humanos, son zoonóticos. (Woolhouse 2002; Lednicky et al., 2004). Los patógenos emergentes, pueden ser definidos como agentes infecciosos de los cuales la incidencia esta en aumento y es introducido por primera vez en una población de huéspedes. En un patógeno reemergente la incidencia esta en aumento en una población de huéspedes ya existente. Los patógenos emergentes y reemergentes son oportunistas y responden a cambios en la ecología de ellos o del huésped (Woolhouse 2002).

El 60% de las enfermedades infecciosas emergentes en vida silvestre se deben a la contaminación con patógenos causada por cuestiones antropogénicas, movimiento de animales domésticos, plantas, y sus derivados (Daszak y Cunningham 2002; Cleaveland 2003; Lednicky et al., 2004). Este tipo de enfermedades tienen un efecto negativo en áreas fragmentadas o perturbadas de otra manera donde las poblaciones animales sufren mermas en el número de individuos que las forman. Como el caso del Serengeti donde la rápida expansión de las poblaciones de perros que vivían a las orillas del parque provocó la presencia del moquillo canino en el parque y la devastación de la población de leones (*Panthera leo*). Otro ejemplo es el incremento en Norteamérica de la conjuntivitis por micoplasma en aves provocada por cambios en el hábitat y la alimentación artificial. Así mismo la emergencia provocada por chytridiomicosis (una enfermedad provocada por hongos en la piel) que a resultado en la mayor disminución de las poblaciones de anfibios en Australia y en América, y que se encuentra asociada a cambios climáticos y al movimiento de anfibios cautivos. (Cleaveland 2003). En África donde los perros salvajes (*Licaon pictus*) fueron exterminados por la rabia (Daszak y Cunningham, 2002; Woolhouse 2002). Esta enfermedad también disminuyo la población de lobos etíopes (uno de los carnívoros más raros del mundo) o el moquillo canino que ha causado la mayor disminución de zorros (*Urocyon littoralis*) de las islas del canal Island foxes y el lago Baikal Seals. El ser generalista, parece ser una característica común en los patógenos emergentes (Cleaveland 2003).

Actualmente nuevos y antiguos patógenos han surgido con un aumento en el impacto sobre la salud de los animales. Esta situación representa un gran desafío para el desarrollo diagnóstico y terapéutico y el uso efectivo de estrategias de intervención para el rescate de especies amenazadas. La gran diversidad de especies de patógenos representa de igual forma una gran diversidad de ciclos de vida de parásitos, rutas de transmisión, epidemiologías diversas y presentación patógena. (Woolhouse 2002). Por lo tanto, las enfermedades infecciosas emergentes representan un desafío complejo que requiere la integración interdisciplinaria (Woolhouse 2002) y demanda la colaboración de médicos, veterinarios, biólogos, ecologistas, epidemiólogos, antropólogos, sociólogos y economistas. Para el veterinario esto significa comprender la relación entre medio ambiente, ecología y enfermedad dentro de las poblaciones (Daszak y Cunningham, 2002).

Isla Cozumel

Las islas constituyen sitios de enorme importancia en la conservación de la biodiversidad. Más del 50% de las especies de aves y reptiles catalogadas en peligro de extinción habitan en ellas y más del 90% de las extinciones ocurridas desde el año 1600 se han presentado en islas (Cleaveland et al., 1999). De hecho, la mayor cantidad de extinciones de mamíferos (75%) a nivel mundial ha ocurrido en ambientes insulares, principalmente en las islas del Mar Caribe (McPhee y Flemming 1999).

La Isla Cozumel alberga un total de 25 formas endémicas de vertebrados, de las cuales 3 son especies y 4 subespecies de mamíferos, 4 especies y 15 subespecies de aves, y una especie de reptil (Cuarón et al., 2004). Cozumel es habitada por 4 especies de carnívoros que incluye dos procionidos endémicos, el pizote de Cozumel (*Nasua Nelsoni*) y el mapache enano (*Procyon pygmaeus*). Ambos están catalogados por la Unión Mundial para la Conservación (IUCN) y

México a través de la NOM-059-SEMARNAT-2001 (CITES 2002) como especies amenazadas. Además la zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*), y un tercer procionido, la martucha (*Potos flavus*), también se encuentran registrados en la Isla. Otras de las especies que habitan en la isla son el pécarí de collar de Cozumel (*Pecari tajacu nanas*), el hocofaisán (*Crax rubra griscomi*) y el cuitlacoche (*Toxostoma guttatum*) (Cuarón et al., 2004). Dentro de las especies exóticas introducidas a la Isla Cozumel se encuentran la *Boa constrictor*, perros y gatos ferales que son depredadores potenciales de la fauna de la Isla (Martínez–Morales y Cuarón 1999, Cuarón et al., 2004; Bautista 2006). El perro doméstico es probablemente el carnívoro más abundante en el mundo y la mayoría de las islas han sido colonizadas por ésta especie debido a la estrecha relación existente con el humano (Butler et al., 2004). Cozumel tiene una población abundante de perros (*Canis familiaris*) y gatos (*Felis catus*) ferales y mascota (Bautista 2006) no vacunados. Estas poblaciones actúan como reservorio de patógenos generalistas que ponen en riesgo la conservación de los carnívoros silvestres endémicos de la isla como el *Procyon pygmaeus* y *Nasua nelsoni* (Cuarón et al., 2004; McFadden et al., 2005).

Importancia epidemiológica de la introducción de perros en Cozumel.

El perro doméstico es transmisor de más de 100 enfermedades (WHO 1990) dentro de las cuales se pueden destacar las de tipo infeccioso y zoonótico como leptospirosis y rabia entre otras (Woldehiwet 2002; Chomel 2003; Flores y Estrella 2004), y que garantiza la permanente actividad de los ciclos infecciosos (Vargas et al., 1996). Estos animales son comúnmente abandonados (Daniels 1983) a su suerte sin haber recibido la mínima atención nutricional y médica. Así mismo, a través de una conducta agresiva, provocan miedo a los transeuntes al ladrar, gruñir, o intentar morder (Rubin et al., 1982; Reid et al., 1984 ; Guy et al., 2001). El incremento en la densidad poblacional de perros hace que estos animales se desplacen poco a poco hasta convertirse en depredadores

potenciales de fauna silvestre desestabilizando y modificando los ecosistemas (Scott y Causey 1973; Butler et al., 2004). Tal es el caso de Cozumel donde se han registrado observaciones de la presencia de perros en prácticamente toda la isla y donde se alimentan de manera destacada de fauna silvestre (Bautista 2006). Este desajuste provoca la proliferación de especies generalistas que son tolerantes a la perturbación y que pueden desplazar a otras especies a través de mecanismos como competencia y depredación, facilitando de esta manera la transmisión de ciertos agentes infecciosos con riesgo para la salud animal, pública y facilitando la extinción de especies (Goosem, 1997 citado por Suzán et al., 2000; Butler et al., 2004).

Capítulo 2: PRESENCIA DE *Leptospira* spp. EN POBLACIONES DE PERROS Y CARNÍVOROS SILVESTRES EN LA ISLA COZUMEL”

RESUMEN

Actualmente la presencia abundante de perros (*Canis familiaris*) en la Isla Cozumel, representa un riesgo para la conservación de especies como el pizote de Cozumel (*Nasua nelsoni*) y el mapache enano (*Procyon pygmaeus*). De febrero a mayo del 2006, se muestrearon entre otras especies, 41 perros (*Canis familiaris*) y 39 mapaches enanos (*Procyon pygmaeus*). El monitoreo se realizó en cinco ambientes geográficos. La técnica de aglutinación microscópica (MAT) fue utilizada para la determinación de *Leptospira* spp. Animales con títulos $\geq 1:100$ fueron considerados como positivos, y animales con títulos $\geq 1:50$ con títulos residuales de una infección pasada o anticuerpos de reciente formación. Las muestras de sangre y orina, fueron cultivadas y sometidas a PCR de *Leptospira*, en busca de evidencia directa del microorganismo. Seis perros, un mapache y un armadillo resultaron positivos, y sugerentes a infección pasada o con anticuerpos de reciente formación, cuatro perros y dos mapaches. La seroprevalencia se analizó por la prueba de independencia de χ^2 . No hubo diferencias entre las zonas de muestreo, perros y mamíferos silvestres nativos ($P < 0.05$), Pero entre animales silvestres nativos, silvestres exóticos, perros urbanos y perros rurales, se encontró diferencia estadística ($P > 0.05$). Las serovariedades de mayor importancia en perros fueron: *ballum Castelloni*, *hardjobovis* y *canicola* y en mapaches *autumnalis* y *australis*. En la prueba de PCR se obtuvieron amplificadores pertenecientes a siete mapaches enanos, un tlacuache y un tigrillo. Los resultados anteriores indican la presencia de *Leptospira* en perros y mapaches de la isla y crean la necesidad de conocer su comportamiento durante el año y en las diferentes especies, para determinar posibles riesgos a la fauna nativa y como zoonosis.

Palabras Clave: leptospirosis, *Procyon pygmaeus*, *Canis familiaris*, *Nasua nelsoni*, Isla Cozumel.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis común de distribución mundial de alta incidencia en climas tropicales, más que en templados (Levett et al., 1998; Levett 2001). La leptospirosis es causada por una espiroqueta del género *Leptospira*. El agente etiológico de la enfermedad fue visto por primera vez por Stimson en 1907 en cortes de tejido renal de un paciente muerto durante una epidemia de fiebre amarilla y en 1915, fue aislado e identificado por los japoneses Inada e Ido, a partir del hígado de un cobayo que había sido previamente inoculado con sangre de un hombre enfermo (Nester et al., 1978; Freeman 1989).

La *Leptospira* es una bacteria unicelular, procarionte, microscópica de 0.2 a 10 micrómetros (1 micrómetro igual a 1/25,000 pulgadas). Por lo general están ausentes de organelos, como un núcleo (Plank y Dean 2000). Pertenece a un grupo de eubacterias Gram.-negativas aeróbicas, flexibles, helicoidales, que tienen que tienen una envoltura celular compleja constituida por una membrana externa, una capa delgada e interna de peptidoglucano y una membrana citoplasmática (Plank y Dean 2000; Brooks et al., 2002). Se han identificado más de 4,000 especies hasta la fecha. La *Leptospira* se divide en dos especies (Fuentes et al., 2001) las de vida libre *L. biflexa* y las parasitarias *L. interrogans*, cuya clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Procariota
Eubacterias
División: Spirochetes
Clase: Scotobacterial
Orden: Spirochaetales
Familia: Leptospiraceae
Género: *Leptospira*
Especie: *L. interrogans*

El significado etimológico de *Leptospira* es [*lepto*= más, *Speira*= rizo o espiral⁹.

Dentro de las leptospiras la especie más importante es *Leptospira interrogans*, la cual se ha subdividido en serovariedades o serotipos (unidad taxonómica básica, representada por una cepa de referencia (Nester et al., 1978)), las cuales, hasta antes de 1967 eran consideradas como especies separadas. Se han identificado más de 218 serovariedades que pertenecen a unos 23 serogrupos (agrupaciones de serotipos, según su afinidad antigénica compartida revelada en la prueba de aglutinación cruzada), con base en su afinidad serológica (Plank y Dean 2000; Levett 2001; Brooks et al., 2002). Actualmente, la nomenclatura de las leptospiras se encuentra basada en la afinidad del ADN.

Con la nueva nomenclatura del género *leptospira* que se inclina sobre las relaciones genéticas del organismo, por ejemplo, análisis de endonucleasa de restricción de ADN cromosomal, hay actualmente 7 genoespecies, 28 serogrupos y numerosas serovariedades y genotipos. Hasta el momento se han descrito tres especies de *Leptospira* saprófitas (Levett 2001).

Las leptospiras patógenas son hemolíticas, oxidasa-positivas y no son inhibidas por 5-fluorouracilo u 8-azaguanina, son aerobias obligadas (Freeman 1989). Las leptospiras saprófitas de vida libre no patógenas halladas en el agua a menudo se denominan *Leptospira biflexa* (Mandell et al., 1992; Brooks et al., 2002), la cual posee más de 60 serovariedades con 28 serogrupos.

Los humanos pueden ser infectados a través del contacto con orina, tejido o agua contaminados por animales (Levett 2001; Bharti et al. 2003). La presentación clínica es difícil de distinguir del dengue, malaria, influenza, hantavirus, tifoidea, y

hepatitis viral entre otras enfermedades caracterizadas por fiebre, dolor de cabeza y mialgias (Levett y Whittington, 1998; Bajani et al., 2003)

Las ratas (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus*, *Rattus brevicaudatus*) son consideradas el reservorio de mayor importancia en el mundo, pero en lugares con climas cálidos, los perros también son vectores importantes para los humanos. La leptospirosis canina fue reportada por primera vez en el Caribe en 1945 y treinta años después se encontró evidencia de esta infección en perros callejeros en Trinidad, Barbados y Puerto Rico (Weekes et al., 1997).

Para que se constituya un foco de leptospirosis es necesario que, además de animales portadores, existan condiciones ambientales favorables para la supervivencia del agente causal en el medio exterior. La temporada de lluvias y suelos con pH neutro o ligeramente alcalino resultan adecuados. La presencia de reservorios como poblaciones de ratas, ganado doméstico o intromisión humana a hábitat de vida silvestre, incrementan las posibilidades de transmisión de la enfermedad entre animales domésticos, animales silvestres y humanos (Bharti et al., 2003; Richardson y Gauthier, 2003). Terrenos bajos, anegadizos, receptáculos naturales o artificiales de agua dulce (lagunas, arroyos, embalses y otros) son favorables a su supervivencia, en tanto que el agua salina les resulta deletérea (Acha y Szifires 2003).

En el mundo, la infección por *Leptospira* se ha registrado en aproximadamente 160 especies de mamíferos (Bunnell et al., 2000). Cada serovariedad tiene su huésped o huéspedes predilectos, pero cada especie animal puede ser huésped de uno o más serovariedades. Por ejemplo el reservorio principal de *L. canicola* es el perro, pero en ocasiones se le puede encontrar en zorros, cerdos y bovinos (Acha y Szifires 2003).. Los pequeños mamíferos silvestres son los principales reservorios de *Leptospira* en la naturaleza. Sin embargo, para entender la epidemiología de una enfermedad en una región

particular, es importante identificar las serovariedades presentes y su prevalencia así como los animales que actúan como reservorios. Cuando la leptospirosis es endémica, usualmente se transfiere de animal a animal por contacto directo, o bien por la exposición al agua contaminada con leptospiras, donde perros callejeros y perros con acceso a estanques y riachuelos son un riesgo para los perros mascota y otros animales (Levett 2001; Barthi et al., 2003; Richardson et al., 2003). Estudios serológicos para leptospirosis en New York y Maryland (Estados Unidos) detectaron seroprevalencias en mapaches (*Procyon lotor*) en un rango de 22% al 84% y en Florida del 55% (Mitchell et al. 1999). Se ha reportado a los mapaches como reservorio natural de *Leptospira interrogans*; serovariedades *grippotiphosa* (Bharti et al., 2003) e *icterohemorragiae* y *bratislava* principalmente cuando habitan áreas cercanas a granjas o rancherías (Richardson et al., 2003; Mikaelian et al., 1997; Mitchell et al., 1999). También se ha reportado la presencia de anticuerpos contra esta bacteria en procionidos de zoológico como en el zoológico de Rio de Janeiro, Brasil, donde el pizote (*Nasua nasua*) y martucha (*Potos flavus*) fueron seropositivos (Lilenbaum et al., 2002). Existen poblaciones de mapaches en zoológicos de Estados Unidos que suelen estar infectados de forma subclínica en un 30% o más y el impacto de la leptospirosis en esta población no esta clara (Bolin, 1999).

La Isla Cozumel como ya se mencionó esta habitada por 4 especies de carnívoros que incluye dos procionidos endémicos que son el pizote de Cozumel (*Nasua nelsoni*) y el mapache enano (*Procyon pygmaeus*), ambos están catalogados por la Unión Mundial para la Conservación (IUCN) y México a través de la NOM-059-SEMARNAT-2001 (CITES 2002) como especies amenazadas. Además la zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*), y un tercer procionido, la martucha (*Potos flavus*) (Cuarón et al., 2004). Estas especies son vulnerables a la presencia de agentes infecciosos como leptospirosis. Esta enfermedad, puede verse influenciada de forma directa en estos animales por la presencia de poblaciones de perros infectados que actúan como reservorio (Cuarón et al., 2004;

McFadden et al., 2005), aunado a las condiciones ambientales que en ciertas zonas de la Isla suelen ser ideales para su desarrollo.

Después de penetrar por la piel o las mucosas, los microorganismos se multiplican, tienen una fase bacterémica que les permite llegar y multiplicarse rápidamente en el hígado de donde se distribuyen a la sangre periférica por varios días, periodo caracterizado por fiebre, momento en el cual aparecen anticuerpos en el torrente circulatorio y microorganismos en la orina (Blood y Radostitis 1992). La leptospirosis se presenta de forma icterica y hemorrágica. La forma más grave es la hemorrágica, que se instala repentinamente con fiebre por 3 a 4 días, seguida por rigidez y mialgias en los miembros posteriores y hemorragias en la cavidad bucal con tendencias a la necrosis y faringitis. En una etapa posterior puede haber gastroenteritis hemorrágica y nefritis aguda. Tanto en la infección por *L. canicola* como por *L. icterohaemorrhagiae* puede haber ictericia sobretodo en la infección por esta última serovariedad (Blood y Radostitis 1992; Birchard y Sherding 1994; Chin., 2001). Muchos animales silvestres, entre ellos los roedores están adaptados a las leptospiras por lo que en ocasiones no manifiestan síntomas o lesiones. Cursan la enfermedad de manera subclínica y eliminan la bacteria razón por la cual son considerados huéspedes de importancia. Los animales de zoológico normalmente adquieren la enfermedad por contacto con la orina o alimentos que estuvieron en contacto con los huéspedes. Los signos que normalmente se encuentran suelen ser agudos y en términos generales hay fiebre, anorexia, depresión, vomito, diarrea, ictericia, falla renal, aborto, hemoglobinuria, y muerte. Los casos de leptospirosis que ocurren en animales en vida silvestre pocas veces son descubiertos y menos notificados. Sin embargo en ciertas especies de animales ocurre de forma regular como en la costa oeste de los Estados Unidos donde usualmente animales marinos están asociados a la infección por la serovariedad *pomona* (Bolin., 1999).

La identificación del agente puede hacerse directamente de tejido o fluidos corporales. La prueba serológica de referencia y la más usada, tanto para el hombre como para los animales, es la de aglutinación microscópica (MAT) (Levett 2001). Esta técnica se emplea para detectar anticuerpos IgM e IgG leptospirales en el suero y su título, el cual puede ser influenciado por la edad y la densidad del antígeno cultivado. La técnica consiste en mezclar cierta cantidad de suero con un cultivo de leptospiras para después evaluar el grado de aglutinación con la ayuda de un microscopio de campo oscuro (WHO 1990). También ayuda a identificar los aislamientos de *Leptospira* y clasificar cepas, además de servir de base para evaluar cualquier otro método serológico nuevo para el diagnóstico de la enfermedad. En la realización de la prueba se deben incluir serovariedades representativas de los diferentes serogrupos y especialmente los que se encuentran en la región. Esto último en virtud de que un aislamiento de la zona reemplazará a la cepa de referencia que se está utilizando por producir títulos más altos del mismo serogrupo (Myers y Martínez 1985; Levett 2001). Es necesario tener en cuenta que las reacciones cruzadas se producen no solo entre diferentes serovariedades del mismo serogrupo, sino que al principio de la infección (2 a 3 semanas) también se dan entre serovariedades de diferentes serogrupos. Las reacciones cruzadas son mucho más frecuentes en el hombre por ser un huésped accidental que en los animales (Acha et al., 2003; Bharti et al., 2003).

El registro del grado de aglutinación de cada antígeno en relación con el antígeno control se realiza, según la escala 1+ a 4+, o como negativo.

Negativo= Sin aglutinación

+ = Aglutinación con 75% de células libres

++ ...= Aglutinación con 50% de células libres

+++ = Aglutinación con 25% de células libres

++++ = Aglutinación co 0-25% de células libres

Posterior a la infección los títulos bajos de aglutinación pueden existir por meses o años. A causa de esta persistencia de los títulos, a veces resulta difícil establecer si se trata de una infección en curso o si los anticuerpos son consecuencia de una experiencia anterior a la enfermedad. Por esta razón es necesario examinar por lo menos dos muestras de sangre toda vez que sea posible (Myers y Martínez 1985). Los títulos bajos de 1:50 a 1:100 pueden significar anticuerpos residuales de una infección pasada o anticuerpos de reciente formación que aún no han tenido tiempo de alcanzar un nivel alto de 1:800 (Plank y Dean 2000).

Una prueba muy sensible para detectar el DNA leptospiral en muestras de sangre y orina es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (puede detectar cuando hay solo diez leptospiras presentes). Es un método rápido y sencillo para copiar y amplificar secuencias específicas de ADN de hasta alrededor de 1kb de longitud, El PCR se utiliza como técnica de preparación y análisis en todos los campos de la biología molecular, como clonación de genes conocidos, o genes relacionados con otros conocidos, cuantificación de la presencia de secuencias concretas de ADN en una muestra. Para usar este método es necesario conocer la secuencia de una región corta de ADN situada en cada extremo de la secuencia de mayor tamaño que va a copiarse. El proceso consta de tres etapas. La primera es la desnaturalización que favorece el rompimiento de puentes de hidrógeno entre las bases del ADN. La segunda es el alineamiento, donde los iniciadores se unen al ADN molde y la tercera etapa es la amplificación, con la enzima ADN Taq polimerasa (Abbas y Lichtman 2004).

Para la prueba se utilizan iniciadores (primers), que son secuencias cortas de DNA específicas para leptospiras, las cuales, en combinación con calor estable del ADN polimerasa, y en presencia de nucleotidos y sujeto a ciclos de temperatura, amplifica un fragmento de ADN leptospiral. El PCR puede aplicarse a cultivos de sangre, orina, fluido cerebroespinal y muestras de tejido. La utilización

de los iniciadores G1/G2 y B64I/B64II son utilizados para la extracción del ADN de orina y sangre. La amplificación del ADN es detectada de manera sencilla en geles (electroforesis en geles de agarosa) (WHO 1990).

Hasta ahora, no existía un perfil epidemiológico detallado de las poblaciones de perros y fauna silvestre que habitan la Isla Cozumel, lo que representa un serio riesgo para la salud animal y pública debido a la transmisión de enfermedades. Por lo anterior, el propósito de este trabajo fue generar información respecto al comportamiento de leptospirosis en los diferentes ambientes geográficos que conforman la isla y su relación con las poblaciones animales existentes en la isla, como perros urbanos, rurales, mamíferos nativos y exóticos. La información obtenida en esta investigación, será relevante para el manejo de poblaciones animales silvestres y domésticas en esta y otras islas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia y prevalencia de *Leptospira* spp. por aglutinación microscópica (MAT) y la prueba de Reaccion en Cadena de la Polimerasa (PCR) en poblaciones de perros (*Canis familiaris*) y mamíferos silvestres pertenecientes a diferentes ambientes geográficos de la Isla Cozumel

Objetivo particular

- Determinar y comparar la seroprevalencia de *Leptospira* spp. entre distintos ambientes geográficos de la Isla y distinto tipo de animales, contemplando mamíferos silvestres nativos, exóticos, perros urbanos y rurales.

HIPÓTESIS

- En todas las zonas monitoreadas de la isla existen animales con anticuerpos contra *Leptospira* spp

- La presencia de animales positivos a leptospirosis es mayor en perros que en mamíferos silvestres exóticos y nativos.

MÉTODOS

Área de estudio

La Isla Cozumel es una isla oceánica de origen coralino, ubicada en el mar Caribe a 17.5 km de la costa de la Península de Yucatán (20° 20'N, 87° 00'E; 20° 30'N, 86° 50'E) en el estado de Quintana Roo. Es la mayor de las islas mexicanas del Caribe. Su superficie aproximada es de 486 km² (Martínez-Morales 1996) y está separada del continente por el canal de Cozumel (Cuarón et al., 2004). La precipitación anual en la isla es de 1,750 mm. La temporada de lluvias abarca los meses de mayo-junio a septiembre-octubre. La temperatura promedio anual es de 25.5 °C, con máximas mensuales en los meses de julio y agosto (27.3°C) y mínimas en enero (22.9 °C) (García 1988). El clima es cálido húmedo con lluvias en verano y otoño (Am W"(l) (INE 1998). La isla esta expuesta a la acción de huracanes que representan uno de los factores ecológicos más importantes que afectan la composición y estructura forestal en la región caribeña (Martínez-Morales 1996). Al igual que en la península de Yucatán, en Cozumel el drenaje es solamente subterráneo, excepto algunos cenotes y aguadas estacionales (Cuarón et al., 2004). Estos cuerpos de agua juegan un papel importante en la sobrevivencia de las especies, ya que las proveen de agua en la estación seca. La vegetación de la isla se compone principalmente por selva mediana subperenifolia, selva baja subcaducifolia y manglar (Romero-Najera 2004; Romero –Najera et al., 2007).

Cozumel cuenta con una población aproximada de 65 000 habitantes, la mayoría de los cuales vive en la ciudad de San Miguel y la principal actividad económica es el turismo (Cuarón et al., 2004).

Sitios de captura

Los sitios de captura para carnívoros silvestres fueron elegidos de acuerdo a las observaciones registradas por Cuarón et al., (2004). Se consideraron tres sitios de captura en la zona noroeste de la isla donde se reporta una alta presencia de mapaches (*Procyon pygmaeus*) y el mangle es el tipo de vegetación predominante. El sitio uno ($86^{\circ}87'N$ $20^{\circ}54'W$) es un sitio ubicado en la zona más noroeste de la isla, coincide con el término de la carretera y conecta vía marítima con Isla Pasi3n. Esta 3rea de la isla se caracteriza por tener manglar limitado por selva mediana. El sitio dos ($86^{\circ}95'N$ $20^{\circ}49'W$) est3a localizado a los alrededores del campo Cozumel Country Club, En este sitio el trampeo se realizo en zona de manglar. El sitio tres ($86^{\circ}91'N$ $20^{\circ}55'W$) localizado aproximadamente a 1.5 km noroeste del sitio dos (3.5 km del sitio uno) es zona de manglar cercano a la costa. Tambi3n se programaron capturas en la zona centro de la isla conocida como CAPA (Comisi3n de Agua Potable y Alcantarillado). Esta zona se caracteriza por tener selva mediana y esta dividida por ejes de los cuales fueron seleccionados como sitio cuatro el eje 6 cruces 4,5 y 7; y el sitio cinco eje 8 cruce 4, 5 y 7 de CAPA sur y el eje 1 cruce 9 de CAPA norte (sitio 6). . Finalmente se trabajo en la costa sureste de la Isla frente a Punta chiqueros en la entrada a la H (sitio 7) y en la costa oeste frente al parque Chankanaab (sitio 8) (ver sitios del trampeo en la Figura 1).

En la zona rural los perros fueron capturados en la zona noroeste de la isla (sitios de captura 2 y 3 de carnívoros silvestres), a lo largo de la costa este, incluyendo el basurero principal de la Isla, la carretera transversal que cruza de la costa oeste a la costa este, adem3s se capturaron perros urbanos en la ciudad de San Miguel, y la costa sureste.

Por 3ltimo, se capturaron para este estudio, carnívoros silvestres no nativos de Cozumel cautivos, ubicados en el refugio de animales en Playa Mía en la costa

sureste, así como en casas particulares. Estos eran animales que habían sido decomisados por las autoridades, animales en exhibición (Playa Mía) o mascotas.

Método de captura

El trapeo se realizó en un periodo de tres meses (febrero a mayo del 2006), Para este estudio se plantearon y realizaron dos métodos de trapeo, el intensivo y el no intensivo. El muestreo fue diseñado para los propósitos de un estudio balanceado, las necesidades de información poblacional, de distribución de carnívoros silvestres (principalmente del mapache enano), *Leptospira* y moquillo canino. Los muestreos intensivos permitían tener un registro exhaustivo de los carnívoros silvestres en esas áreas incrementando la posibilidad de capturar a la mayoría o totalidad de los animales residentes en esa área. El propósito principal de los muestreos no intensivos era tener muestras de la mayor cantidad de sitios posibles de la isla no importando el número de animales capturados. En este caso se sacrificaba el tener un muestreo exhaustivo de la población en un sitio, por tener más sitios muestreados, esto era importante para establecer mejor la distribución de los carnívoros, pero también de las enfermedades monitoreadas en el estudio.

Los muestreos intensivos se realizaron durante ocho días y los no intensivos durante cuatro, esto debido a que se buscó optimizar el uso del equipo y permitir el desarrollo de dos proyectos simultáneos que requerían de capturar y muestrear mamíferos medianos de Cozumel. Ocho días es el tiempo mínimo para permitir una buena tasa de captura de mamíferos medianos en un sitio, de hecho se requieren al menos siete días para propósitos de inventarios o estimaciones de datos poblacionales (Wilson et.al. 1996).

El trampeo intensivo, se realizó en los tres sitios de la zona noroeste donde se tiene registrada una mayor abundancia de animales (McFadden 2004). También en el eje 6 cruce 5 y eje 8 cruce 4 y 5 de CAPA sur (Bautista 2006). En estos sitios las trampas se activaron durante 8 días. El trampeo no intensivo se realizó en la costa este frente a punta chiqueros, costa oeste cerca del parque Chankanaab, el eje 1 cruce 9 de CAPA norte, eje 6 cruce 4 y 7 y eje 8 cruce 7 de CAPA sur donde las trampas permanecieron activadas durante 4 días.

La revisión de las trampas se hacía por la mañana una vez al día, verificando que tuvieran cebo, que no estuvieran disparadas, o bien con animales ajenos a los intereses de la investigación.

Para la captura de estos carnívoros en el manglar del campo de golf (sitio de captura 2), se distribuyeron 60 trampas de cierre automático (20 Havahart # 1079 live animal trap y 40 tomahawk # 207) en forma lineal, formando 3 grupos de 20 trampas cada uno. Los grupos se ubicaron separados entre si, tratando de distribuirlos en todo el campo de golf a distancias similares. Las trampas fueron separadas una de otra a una distancia de 50 metros, se escondían y activaban en el manglar o selva adyacente al camino por donde transitan los carros de golf. Se marcaba su ubicación con cinta y se registraba en el GPS. Los primeros tres días se utilizó como cebo calamar, atún, plátano y papaya. En esos días se observó que los animales eran capturados con cualquier cebo de los utilizados. Por ello se decidió trabajar solo con plátano, pues a parte de ser más económico, fácil de conseguir y manejar, es más duradero al ser expuesto al medio ambiente, donde duraba tres días en las trampas. Se utilizaron sesenta trampas totales porque es el material con el que contábamos y la intención era cubrir la mayor distancia posible del sitio seleccionado. En sitios donde utilizamos 20 trampas o menos era porque de manera simultánea se estaba monitoreando otro sitio.

En el trayecto del manglar del norte (sitio de captura 3) que mide una distancia aproximada de 2.5 km., se pusieron 10 trampas en forma lineal a 500 metros de la entrada del mismo. Las trampas fueron ubicadas a 50 metros una de otra y escondidas en el manglar. Se marco su ubicación con cinta y se registro su ubicación en GPS. En el camino de terrasería a la isla pasión (sitio de captura 1) se distribuyeron 40 trampas, 20 en forma de grilla dentro de la zona de manglar y humedal cerca del embarcadero de la Isla Pasión y 20 a lo largo del camino de terrasería, ubicando para este caso, dos trampas, esto es una en frente de otra a ambos lados de la carretera. Para el trampeo intensivo en CAPA sur y norte fueron puestas en grupos de 40, es decir veinte sobre el cruce seleccionado y veinte sobre el eje, esto es 10 trampas del cruce seleccionado hacia el cruce siguiente y 10 trampas hacia el cruce anterior.

El diseño de trampeo no intensivo para la costa este (sitio de captura 7) y oeste (sitio de captura 8) fue similar al que se utilizó en el manglar, excepto por el número de trampas que fueron 20. Las trampas se ubicaban dentro de la selva adyacente a la carretera. En la costa este, las 20 trampas fueron ubicadas de forma lineal frente a Punta Chiqueros. Durante el trampeo no intensivo en CAPA sur y norte (sitio de captura 6), las trampas siempre fueron puestas en grupos de 20 sobre los cruces seleccionados. (ver resumen del trampeo en el Cuadro 1). Finalmente los carnívoros silvestres exóticos en cautiverio ubicados en el refugio de animales en Playa Mía o en casas particulares fueron capturados sin el uso de químicos.

Las capturas de los perros en las zonas rurales se realizaron con la ayuda de los propietarios o sub-propietarios de perros, (estos últimos solo dan asilo nocturno y alimentan a estos animales en sus casas o negocios). Con ellos se negociaba algunas veces vacunando o desparasitando a sus perros a cambio de la toma de muestras. En la zona urbana de San Miguel, las capturas fueron

realizadas con el apoyo el centro de control Animal (CCA) del ayuntamiento de Cozumel.

Finalmente para la captura de los perros de la zona rural ubicados en el basurero, se hablo con los cuidadores, quienes ayudaron a la captura de aquellos perros que se mostraban más dóciles y que permanecían más cerca de ellos.

Los sitios de captura previamente descritos fueron agrupados e identificados de acuerdo al ambiente geográfico donde se encuentran (cuadro 2). Los ambientes geográficos fueron los siguientes:

1. Manglar, constituido por elementos arbóreos de 5 a 10 m de altura y caracterizado por tener poca diversidad.

2. Zona de transición manglar – selva baja, constituido por elementos arbóreos de 5 a 10 m de altura y caracterizado por tener poca diversidad y un estrato arbóreo principal y otro arbustivo o subarbóreo, no presenta estrato herbáceo.

3. Selva mediana subcaducifolia. Constituida por dos estratos arbóreos entre 8 – 20 m de altura, con escaso estrato arbustivo-herbáceo.

4. Transición tasistal – selva baja caducifolia, constituida por asociación de poca diversidad o monoespecífica de palma de 3 – 10 m de altura y un estrato arbóreo principal y otro arbustivo o subarbóreo, no presenta estrato herbáceo (Téllez- Valdez 1989; Romero-Nájera et al., 2007).

5. Influencia humana (transformado), constituido por la zona urbana, rural y el basurero de la ciudad.

Contención

La contención en los perros se realizo de manera física o química o mediante una combinación de ambas, dependiendo de las condiciones particulares de cada

animal al momento de su captura. La contención física se realizó con la ayuda del propietario o sub – propietario previa colocación de bozal y sujeción o derribo del perro. Si el perro lo permitía se realizaba la toma de muestras en ese momento sin el uso de químicos. En caso contrario se decidía si solo se sedaba al animal o se anestesiaba. En caso de requerirse contención química se utilizó el siguiente protocolo: vía intramuscular, ketamina-xilacina 10 mg/kg / 1mg/kg o tiletamina zolazepam 7 a 10 mg/kg.

Los carnívoros silvestres siempre fueron contenidos de forma química tomando como base los siguientes protocolos, vía intramuscular: ketamina - xilacina (10 mg/kg / 2 mg/kg) (Inoketam 1000 y sedaject) o tiletamina zolazepam (5 a 6.6 mg/kg) (zoletil 50) (Denver, 1999; Nielsen, 1999; IVIS 2002). Estos protocolos fueron modificados debido a las necesidades que demandó el trabajo de campo, como tiempo total de anestesia, animales en espera a ser procesados, condiciones ambientales, estado general del animal. El considerar estos aspectos permitió realizar y ensayar protocolos de anestesia más prácticos y de acuerdo a las condiciones particulares y específicas en cada zona de la isla.

Los carnívoros silvestres cautivos no nativos de Cozumel fueron contenidos de forma física y química. En ciertas ocasiones para agilizar la recuperación de los animales anestesiados se utilizó de manera indistinta, y dependiendo del estado general del animal, yohimbina (0.12 mg/kg) como antagonista de la xilacina, Dopram V (2-10mg/kg) como estimulante respiratorio o adrenalina (1 cc/4.5 kg) como estimulante cardiaco (Nielsen 1999).

Monitoreo durante la anestesia

El monitoreo de los animales durante la anestesia consistió en colocar al animal anestesiado bajo la sombra en decubito lateral derecho. Los signos vitales se monitorearon en tres tiempos: el primero posterior a la inducción, el segundo a

la mitad del procesamiento del animal (después de la toma de medidas morfológicas) y el tercero al finalizar la toma de muestras biológicas. Los signos vitales evaluados fueron; la profundidad y calidad de respiración, la frecuencia respiratoria, la frecuencia cardiaca, la intensidad de latido, la calidad del pulso, el color de mucosas, el tiempo de llenado capilar y la temperatura corporal. (Denver, 1999; Nielsen, 1999).

En los animales anestesiados se aplicó lubricante para ojos, los cuales fueron cubiertos con una banda de tela para evitar la estimulación visual.

Estado general de salud

Se realizó un examen físico general con la finalidad de obtener la mayor información posible del estado de salud de cada ejemplar al momento de su captura. El examen consistió en la evaluación por sistemas, incluyendo: condición corporal, sistema tegumentario, ojos, cavidad oral, sistema respiratorio, cardiaco, linfático, digestivo, genitourinario, muscular y nervioso. Los sistemas fueron evaluados como normal, anormal y no examinado. Cuando un individuo presentaba alguna anomalía en cualquiera de sus sistemas se le evaluaba como con cambios patológicos aparentes (CCPA) y describen a un animal enfermo. Si por el contrario, el animal no presentaba anomalía alguna en sus sistemas se evaluaba sin cambios patológicos aparentes (SCPA) y describen a un animal sano.

Identificación y marcaje de los animales capturados

Para una identificación más eficiente, se elaboró un formato de registro individual de cada uno de los animales capturados. El formato incluyó información general, como nombre común de la especie capturada, nombre científico, sexo,

edad aproximada, sitio de captura. También, datos sobre el proceso de anestesia, medidas morfológicas, evaluación de sistemas y muestras a recolectar (Apéndice 1). La identificación y marcaje se hizo con foto e información clínica para el caso de perros y para los carnívoros silvestres se colocó un arete (National Band and Tag Co. Mod. 1500-1, Newport USA) en la base de ambas orejas y un marcaje temporal a base de pintura indeleble (azul de metileno)

Toma de muestras y conservación

El procedimiento para el cuidado y manejo de muestras biológicas en el campo fue diseñado y propuesto por el Laboratorio de Medicina de Conservación (LMC) de la Escuela Superior de Medicina (ESM) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) y la Sociedad Humanitaria A.C. de Cozumel nos apoyó con sus instalaciones y equipo para el manejo de las muestras obtenidas.

Muestras de sangre

Se obtuvieron en promedio 5 ml de sangre venosa periférica de la vena cefálica o safena de cada animal seleccionado. Se inoculó con dos gotas de sangre un tubo de 7 ml con medio EMJH y un tubo con agua desionizada estéril. Después de la inoculación los tubos fueron homogeneizados lentamente y conservados a temperaturas inferiores a 30°C y mayores a 10°C. Cada tubo fue identificado con una clave, fecha y tipo de muestra. El resto de la sangre obtenida se dividió en dos tubos, uno con anticoagulante (heparina de litio - tapón verde) y otro sin anticoagulante (tapón rojo). Ambos tubos con muestra, fueron identificados y mantenidos a menos de 30°C. Los tubos vacutainer con sangre coagulada fueron centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos. Después de centrifugar se separó el suero y se colocó en un criotubo de 5 ml. el cual fue identificado correctamente. El criotubo fue puesto en congelación hasta su traslado al Laboratorio de Medicina de Conservación de la ESM del IPN.

Muestras de orina

Las muestras de orina se obtuvieron por compresión de vejiga o cistocentésis. Se inocularon con dos gotas un tubo con medio EMJH y un tubo con agua desionizada estéril. Ambos tubos fueron mantenidos a temperaturas inferiores a los 30°C, esto se logro colocando los tubos en una hielera con geles refrigerantes. El resto de la orina se coloco en un tubo estéril con tapón de goma.

Determinación de *Leptospira*.

La determinación de la concentración de anticuerpos contra *Leptospira* se realizó mediante la prueba de Aglutinación Microscópica (MAT) considerada la prueba de oro o método de elección (Levett 2001). El Departamento de *Leptospira* de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM asesoró la prueba. Para este estudio se seleccionó una batería de 23 serovariedades (Cuadro 3), considerando reportes previos de serovariedades presentes en islas (Weekes et al 1997), o en especies silvestres o domésticas similares o iguales a las que se encuentran en Cozumel. Los sueros de animales analizados que reportaron títulos ≥ 100 fueron considerados como positivos (Cole et al., 1973, Faine 1994; Weekes et al., 1997, Richardson y Gauthier 2003, Aslantas et al., 2005; Clifford et al., 2006). Los que reportaron títulos ≥ 50 se consideran como con anticuerpos residuales de una infección pasada o anticuerpos de reciente formación que están por alcanzar sus niveles máximos (Plank y Dean 2000). Cabe mencionar que se realizaron diluciones de los sueros desde 1:20 para conocer que otro tipo de serovariedades posiblemente, estén presentes, aunque no de manera infecciosa, en los animales monitoreados.

Todas las serovariedades utilizadas son parte de la colección del Departamento de Microbiología e Inmunología (Facultad de Medicina Veterinaria y

Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México). La colección fue previamente obtenida del Centro Panamericano de Zoonosis (OPS/OMS), Buenos Aires, Argentina.

Las muestras cultivadas en medio EMJH y agua (sangre y orina) obtenidas de los animales capturados, fueron procesadas según la metodología de el Laboratorio de Medicina de Conservación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional (IPN), con el objetivo de lograr el cultivo y posterior aislamiento e identificación de alguna *Leptospira* presente en las poblaciones animales de la isla. El primer pase o resiembra se realizó después de 5 meses de cultivo, y dos subcultivos más a intervalos de dos meses. Los subcultivos no fueron revisados al microscopio de campo oscuro como indica Fine (1994) pues el microscopio no estaba disponible durante los primeros pases.

Al término de este tiempo se realizó el PCR de todos los cultivos para tratar de obtener por este método un amplificado de los mismos, indicando así la presencia de *Leptospira*.

Para la prueba de PCR se utilizó el kit QUIAGEN Taq PCR Core kit (250U) y los iniciadores G1 5'-CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT y G2 5'-GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG para la amplificación a 285 pb, de las serovariedades que pertenecen a *Leptospira interrogans*. El control positivo para estos iniciadores fue el ADN de la serovariedad *hardjo prajitno* y los iniciadores B64I 5'-ACT AAC TGA GAA ACT TCT AC y B64II 5'-TCC TTA AGT CGA ACC TAT GA para la amplificación a 563 pb, para las serovariedades que pertenecen a *Leptospira kirschneri* (WHO 1990), donde se utilizó el ADN de *L. gripphotiphosa* como control positivo.

Análisis estadístico

Para conocer si la seroprevalencia de *Leptospira* es independiente o dependiente de la zona de muestreo, si la proporción de la seroprevalencia presente entre perros y mamíferos silvestres endémicos es diferente, si la seroprevalencia entre animales endémicos y no endémicos es diferente, si a mayor perturbación del ambiente la seroprevalencia de *Leptospira* en los mamíferos endémicos es mayor, o si la seroprevalencia entre animales silvestres nativos, silvestres exóticos, perros urbanos y perros rurales es diferente, se realizó un análisis estadístico a través de la distribución de χ^2 donde la prueba de independencia busca probar la hipótesis nula que indica que dos criterios de clasificación son independientes cuando se aplican al mismo conjunto de entidades. Se dice que dos criterios de clasificación son independientes si la distribución de un criterio es la misma sin importar cual sea la distribución del otro. Para ello se utilizaron cuadros de contingencia clasificando un conjunto de entidades de acuerdo con dos criterios (Wayne 2004). Esto es, si la presencia de *Leptospira* y los sitios de muestreo o poblaciones monitoreadas, son independientes, se esperaría encontrar la misma seroprevalencia de *Leptospira* en las diferentes zonas y poblaciones animales monitoreadas.

La seroprevalencia en el estudio, se expresó en porcentaje (%) con intervalos de confianza del 95%.

RESULTADOS

En el periodo de muestreo comprendido de febrero a mayo de 2006, se capturaron y analizaron 92 individuos pertenecientes a ocho especies que representan tres órdenes y cinco familias de mamíferos medianos silvestres y domésticos.

Los 92 individuos incluyeron 41 perros (17 urbanos, 24 rurales); ocho carnívoros silvestres exóticos: seis pizotes (*Nasua narica*), dos martucha (*Potos flavus*), un tigrillo (*Leopardus wiedii*) y un armadillo (*Dasypus novemcinctus*), 41 carnívoros silvestres nativos: 39 mapaches enanos (*Procyon pygmaeus*), un pizote de Cozumel (*Nasua nelsoni*), finalmente un tlacuache (*Didelphis marsupialis*),. Estos animales fueron capturados en diferentes ambientes geográficos de la isla como son: manglar, zona de transición mangle – selva baja, selva mediana subcaducifolia, transición tasistal – selva baja caducifolia e influencia humana (transformado) (Romero-Nájera et al., 2007). La participación de cada una de las especies para las seis zonas de muestreo se presenta en el Cuadro 4.

Exámen físico general

En la evaluación de salud de los 92 animales, el 38% no presento cambios patológicos aparentes durante la evaluación de sus sistemas, por lo que fueron tomados como animales clínicamente sanos. Por el contrario, el 62% presento algún cambio patológico durante la evaluación de sus sistemas. Estos animales fueron considerados enfermos (Figura 2). Del 62% de animales enfermos, el 32.6% presento anomalías en el sistema tegumentario, siendo las lesiones compatibles en su mayoría a sarna, lesiones abrasivas por contacto con las trampas para los animales silvestres, y lesiones por mordedura de algún congénere para pizotes cautivos, perros y mapaches. Solo en dos mapaches y tres perros se observo la presencia de garrapatas (1 a 2 parásitos por individuo en

los primeros y más de 10 parásitos por individuo en los segundos). El 28% (n=26) de los individuos presentó una pobre condición corporal, destacando los mapaches de la zona de manglar expuesta a la presencia de basura, tránsito y permanencia de turistas, animales domésticos y vehículos a base de combustible. Finalmente los animales pertenecientes al albergue de Playa Mía ubicado en la zona con influencia humana, los pizotes (*Nasua narica*) y una martucha (*Potos flavus*) presentaron sobrepeso. El 20.6% (n=19) presentó anomalías en cavidad oral que consistieron básicamente en colmillos despuntados o fracturados. Los mapaches ubicados en la zona de manglar descrita anteriormente y los pizotes del albergue Playa Mía son los más afectados en este sentido. El 12.5% (n= 9) presentó anomalías en el sistema linfático, básicamente agrandamiento de los ganglios popliteos escapulares y retrofaringeos. Estos animales fueron en su mayoría perros del basurero, y de la zona urbana. El 10.5% (n=9), en su mayoría perros, registraron anomalías compatibles a insuficiencia cardíaca como disnea, arritmias cardíacas, tos, cansancio y en dos casos cianosis y elevación de la vena yugular. 8.6% de los animales, principalmente mapaches, presentó anomalías en ojos compatibles a glaucoma. 9% (n= 8) presentó anomalías del sistema genitourinario en su mayoría fueron los perros del basurero, y las lesiones observadas fueron compatibles a tumor venéreo transmisible. Tan solo el 1.5% presentó problemas digestivos.

Respecto a la presencia de animales con cambios patológicos aparentes en cada zona de muestreo (Figura 3), sobresale el manglar donde el 81% de los animales analizados presentaron una condición corporal pobre y anomalías en piel y cavidad oral. La zona con influencia humana (transformado) presentó el 76% de animales con patologías diferentes, destacando la zona de vegetación de dunas costeras (restaurantes), donde el 67% de los animales de ese sitio tenían problemas en cavidad oral (fracturas de piezas dentales), ojos (conjuntivitis) y sistema cardíaco (insuficiencia cardíaca). En el basurero las patologías correspondieron a problemas de piel, musculares, genitourinarios, oculares y

linfadenitis. En la zona urbana a problemas en piel. La selva mediana subcaducifolia y la de transición manglar – selva mediana, fueron las zonas con menor porcentaje de animales enfermos, 50% (n=2) y 27% (n=3) respectivamente.

Seroprevalencia de *Leptospira*

El 48.9% (n=45) de los animales analizados presentó títulos contra *Leptospira*. Sólo 14 serovariedades de las 23 seleccionadas presentaron al menos un animal con títulos; el 44.4% (n=20) de estos animales fueron nativos y el 55.6% (n=25) exóticos. La presencia de animales seropositivos ($\geq 1:100$) en el 8.6% del total de los individuos se observó para las serovariedades *autumnalis*, *australis*, *ballum castelloni*, *canicola* y *hardjobovis*. El 6.5% de los animales presentó anticuerpos residuales sugerentes a una pasada infección o de reciente formación ($\geq 1:50$), y presentaron títulos contra las serovariedades *autumnalis* y *ballum castelloni*. Las siguientes serovariedades mostraron concentraciones de 1:20 y 1:40: *autumnalis*, *australis*, *ballum castelloni*, *canicola* y *hardjobovis*, *ballum mus*, *bratislava*, *celledoni*, *gripphotyphosa*, *hardj prajitno*, *mozdok*, *panama*, *pyrogenes* y *wolffi* (Cuadro 6). El 42.2% de los animales con anticuerpos reaccionó positivamente a más de una serovariedad. *Autumnalis* fue la serovariedad de mayor presencia en el estudio (7.4%) y la que mas se comparte entre perros y mamíferos nativos medianos de la isla.

La prevalencia de *Leptospira* de los 92 animales monitoreados, fue estadísticamente diferente para los grupos con distintos títulos de anticuerpos ($\chi^2=232.2$, gl. 6, $P>0.05$, Figura 4)

Las serovariedades encontradas con mayor frecuencia en el análisis de los 92 sueros fueron: *autumnalis* (13.5%, n=10), *ballum castelloni* (12.2%, n=9), *australis*, *bratislava* y *hardjobovis* (10.8%, n=8 cada una), *canicola* y *hardjoprajitno* (9.5%, n=7 cada una) (Figura 5). En los mamíferos silvestres (básicamente

mapaches) sobresale por haber aglutinado al MAT, más no por los títulos detectados (no son sobresalientes), *celledoni* (17.6%, n=6), *australis* y *bratislava* (14.7%, n=5 cada una), *autumnalis* y *canicola* (11.8%, n=4 cada una) (Figura 6). De las 8 especies analizadas en el estudio, solo los perros (58.5%, n=24), los mapaches (51.3%, n=20) y el armadillo presentaron anticuerpos contra *Leptospira* (Figura 7). Finalmente en los perros (*Canis familiaris*), las serovariedades más frecuentes fueron *ballum castelloni* (22.5%, n=9), *autumnalis* (15%, n=6), *hardjobovis* y *hardjoprajitno* (12.5%, n=5 cada una) (Figura 8).

Los 7 pizotes (*Nasua narica* y *Nasua nelsoni*), las 2 martuchas (*Potos flavus*), el tlacuache (*Didelphis marsupialis*) y el tigrillo (*Leopardus wiedii*) resultaron negativos en la prueba. El 51.3% de los mapaches analizados presentó anticuerpos y el 58.5 % de los perros. El armadillo (*Dasypus novemcinctus*) analizado en este estudio resultó positivo. Las especies que presentaron títulos de anticuerpos $\geq 1:100$ (seropositivas) y $\geq 1:50$ (anticuerpos residuales de una infección pasada o de reciente formación) se muestran en el Cuadro 6.

Con respecto a la seroprevalencia de *Leptospira* en la isla, se encontró al evaluar a los 92 individuos y las seis zonas de muestreo, que no hay diferencia entre el número de animales con y sin anticuerpos (cualquier título) en las diferentes zonas ($\chi^2=1.08$, gl=4, $P<0.05$, Figura 9). De igual manera, no hubo diferencias en la seroprevalencia presente en los mamíferos silvestres nativos en las diferentes zonas de muestreo ($\chi^2= 6.82$, gl=4 , $P< 0.05$; Figura 10). Tampoco hubo diferencias en el caso de los mapaches ($\chi^2=.065$, gl=2, $P<0.05$, Figura 11), ni en el de los perros ($\chi^2=0.064$. gl 2, $P<0.05$, Figura 12) evaluados de manera independiente en sus respectivos sitios de captura. La seroprevalencia de *Leptospira* entre perros (58.5%, n=24) y mamíferos silvestres nativos (41%, n=21) tampoco reportó diferencias ($\chi^2= 2.14$, gl=1, $P<0.05$). Por otro lado, se encontró diferencia estadística en la seroprevalencia entre animales silvestres nativos 49% [27%, 71%], animales silvestres exóticos 10% [0%, 69%], perros urbanos 69%

[39%, 99%] y perros rurales 53% [28%, 78%], ($\chi^2= 8.45$, $gl= 3$, $P>0.05$, Figura 13). Finalmente, la seroprevalencia entre perros (82%, $n=24$) y mamíferos silvestres exóticos (13%, $n=1$) ($\chi^2= 4.59$, $gl= 1$, $P>0.05$) fue estadísticamente diferente.

En la prueba de PCR realizada a los cultivos de sangre y orina de los 92 individuos, se obtuvieron 9 amplificados pertenecientes a 7 mapaches (*Procyon pygmaeus*), 1 tlacuache (*Didelphis marsupialis*) y 1 tigrillo (*Leopardus wiedii*) (Cuadro 7).

DISCUSIÓN

Varias poblaciones de animales silvestres en el mundo, se han visto disminuidas o extintas a causa de las enfermedades (Cleaveland 2003). Lo anterior crea la necesidad de generar información que aporte las bases para prevenir brotes epidémicos y epizooticos. Hasta ahora, no existía un perfil epidemiológico de las poblaciones de perros y fauna silvestre que habitan en la Isla Cozumel. Por lo que este trabajo representa un inicio en el estudio epidemiológico de los animales de la zona.

Exámen físico general

Perros

La mayor densidad de perros se encontrara en lugares donde hay mayor cantidad de basura acumulada (Beck, 1971,1973; Bautista 2006). El basurero principal de la isla es un sitio ideal para la transmisión de enfermedades. En este sitio los perros pueden refugiarse, alimentarse reproducirse y sobrevivir. También pueden desplazarse desde 2000 m al interior de las zonas boscosas (Scott y Causey 1973; Bautista 2006) hasta 4,072 m (Bautista 2006), o bien por la

ubicación del basurero pueden acceder a los restaurantes ubicados en las playas de la costa de la Isla, donde pueden encontrar los recursos suficientes para sobrevivir (Torres 2006).

En el presente estudio, la inflamación generalizada de ganglios linfáticos en todos los perros monitoreados en el basurero municipal, estado general y características de las lesiones observadas, sugiere la presencia de enfermedades crónico-degenerativas como el tumor venéreo transmisible (TVT). Se ha descrito experimentalmente que esta enfermedad de comportamiento epizoótico puede transmitirse durante cuarenta generaciones en una colonia de perros y desarrollarse en el 68% de ellos (Gandora et al., 1993). También se encontró signología compatible a dirofilariasis como: tos, disnea, crepitaciones pulmonares, ronquidos y en dos necropsias realizadas en la Sociedad Humanitaria de Cozumel A.C. pudo visualizarse el agente. Esta enfermedad es un problema común particularmente en regiones tropicales y subtropicales. La enfermedad ha sido endémica en las costas Atlánticas y es producida por un nematodo *Dirofilaria immitis* que se transmite mediante la mordedura de mosquitos infectados. (Birchard y Sherding 1996).

Las lesiones en piel sugerentes a sarna y conjuntivitis se observaron de manera frecuente, posiblemente por las condiciones ambientales del basurero. La presencia de conjuntivitis en los perros muestreados en los restaurantes de la costa este (dunas costeras) puede deberse la exposición a la arena de las playas y los signos de insuficiencia cardíaca, pueden ser consecuencia de dirofilariasis.

En la zona urbana destaca la presencia de perros callejeros con pobre condición corporal. Algunos al ser recibidos en el Centro de Control Animal presentaron diarrea sanguinolenta y presencia de garrapatas, situación que los convierte en posibles transmisores de enfermedades como parasitosis intestinales

y de la piel (sarna, piodermas por picadura de pulga, pulgas), parvovirus, erlichiosis, entre otras.

Mamíferos silvestres

La pobre condición corporal, colmillos despuntados y problemas de piel encontrados en mayor porcentaje, en los mapaches de la zona de manglar, puede verse influenciado en gran medida por los daños ocasionados a la Isla por los huracanes Emily en julio de 2005 y Wilma en octubre de 2005. Algunos mapaches fueron observados frecuentemente en los basureros buscando alimento. Considerando que los mapaches endémicos de la isla, son depredadores oportunistas, omnívoros que básicamente se alimentan de cangrejos (más del 50% de la dieta), seguido de frutas e insectos y que dependiendo de la temporada del año y situación geográfica pueden variar su dieta (McFadden 2004), es comprensible que los daños ocasionados por ambos huracanes, hallan disminuido la presencia de alimentos importantes para la dieta de estos animales, repercutiendo directamente en la condición corporal y problemas de piel. El despunte de colmillos puede deberse al consumo de cangrejos que realizan en esa zona. También, la zona de manglar se ve afectada por situaciones que favorecen el posible contacto entre animales silvestres nativos con perros y humanos, como el tránsito de turistas a caballo, perros, tránsito de vehículos de motor a base de combustible, presencia de basura inorgánica y orgánica, presencia de brechas utilizada por los turistas (observación personal). Estas situaciones repercuten de manera directa en el comportamiento natural de los animales silvestres que no pueden transitar libremente en el transcurso del día o la noche donde incluso algunos turistas permanecen hasta la madrugada en esos sitios (observación personal). Los animales muestreados en la zona de manglar cerca del embarcadero turístico a la Isla de la Pasión, donde la presencia de basura es un recurso de alimento, junto con la presencia de turistas o habitantes de la isla quienes llevan alimento para ofrecer a los mapaches, hace que estos

animales ya acostumbrados a ese tipo de alimentación presenten una mejor condición corporal.

Las anomalías en cavidad oral como colmillos despuntados o fracturados, que presentaron los pizotes (*Nasua narica*) pertenecientes al albergue de Playa Mía ubicado en la zona urbana, pueden deberse al tipo de alojamiento pues son animales que trepan por las mallas de alambre todo el tiempo y las mastican. El sobrepeso es un problema común en animales en cautiverio.

Presencia de *Leptospira*

El objetivo de este estudio fue obtener evidencias epidemiológicas sobre la presencia y prevalencia de *Leptospira* en los mamíferos silvestres y en los perros urbanos y rurales de la isla. Los resultados obtenidos en el presente monitoreo, indican que algunas de las especies capturadas han estado en contacto con *Leptospira*. Si bien se encontraron animales con títulos en todas las zonas de la isla donde hay mamíferos nativos, no todos los animales muestreados han estado expuestos a ella. De hecho, poco menos del 50% de los animales analizados en el estudio presento anticuerpos contra la enfermedad y la presencia de animales nativos y exóticos con títulos es prácticamente la misma.

En el presente estudio, se encontraron ocho (9%) animales positivos \geq 1:100 (dos mamíferos nativos y seis perros) y seis (7%) sugerentes a infección pasada o con anticuerpos de reciente \geq 1:50 (dos mapaches y cuatro perros). Ninguno de ellos presentó signología compatible a la enfermedad. Richardson y Gauthier (2003) sugieren que en ocasiones la leptospirosis en perros no es tan específica en cuanto a signos clínicos y frecuentemente la etapa infecciosa suele no reconocerse. La presencia o ausencia de signos clínicos, o de la enfermedad, se encuentra influenciada de manera directa con el huésped involucrado, clima,

tipo de serovariedad y títulos presentes (Levett 2001). Asimismo, la concentración de títulos dependerá de situaciones que promuevan la exposición como una alta densidad de población y presencia de huéspedes accidentales (Levett 2001). Por ejemplo en Québec, Ontario y el noreste de Estados Unidos la exposición de las poblaciones de perros y mapaches (*Procyon lotor*) a *Leptospira* es frecuente. De hecho, se ha asociado la falla renal en perros a las serovariedades *icterohaemorrhagiae* y *canicola*, relacionadas con ratas y perros, respectivamente (Ribotta et al., 2000; Aslantas et al., 2006; Ward 2002a, 2002b).

Se identificaron 14 posibles serovariedades de las cuales sobresalen *autumnalis*, *australis*, *ballum castelloni*, *canicola* y *hardjobovis*. Es importante señalar, que el 80% (n=74) de los animales que presentaron títulos, lo hicieron en concentraciones de 1:20. Si bien estas concentraciones fueron consideradas en los resultados de seroprevalencia del estudio y nos dan una idea de las posibles serovariedades presentes en la isla, no son una fuente confiable de información pues a parte de ser los títulos muy bajos, corresponden a una sola toma de suero (Prescott et al., 1999). Por lo tanto la posibilidad de que pueden existir reacciones cruzadas entre serovariedades de un mismo serogrupo se incrementan (inespecificidad de la prueba) (Levett y Whittington 1998; Prescott et al., 1999).

La serovariedad *autumnalis* fue la de mayor presencia en el estudio (13.5%, n=10), seguida de *ballum castelloni* (12.16%, n=9) y *australis* (10.8%, n=8). Estas suelen estar asociadas a la presencia de ratas (Fine 1995) y lo registrado coincide de cierta manera con lo encontrado en Barbados por Weeks y colaboradores (1997). En su estudio en perros, ellos encontraron también a la serovariedad *autumnalis* como el reactor más común (45%), seguido por *australis* (16%). Ambos estudios difieren en la seroprevalencia, donde en Barbados fué del 62% (48/78) para *autumnalis* y en Cozumel fue del 2% (n=2) e incluye como animales positivos a dos mapaches enanos.

En el presente estudio solo se encontraron dos perros positivos a *canicola*. Estos perros fueron capturados en los restaurantes de la zona de dunas costeras (costa este). Por ser los únicos dos perros positivos a esta serovariedad y sin la presencia de signos clínicos, cabe la posibilidad de que la concentración de 1:320 para ambos, pueda haberse originado por una vacunación previa (Fine 1994). Aunque de haber sido así, estos animales también debieron presentar anticuerpos contra *icterohaemorrhagiae*, que es una serovariedad de presentación común en perros y forma parte de las vacunas comerciales en esta especie. De hecho, ambas son las serovariedades más reportadas que infectan perros, pero su importancia varía de un país a otro (Genevieve 2006). En Australia y Barbados, *canicola* no se encuentra comúnmente en perros y con respecto a *Icterohaemorrhagiae*, se ha observado en islas como Puerto Rico, Australia y algunas ciudades de Brasil, pero no de manera frecuente en Barbados (Weekes et al., 1997).

Los títulos más altos detectados en el muestreo, correspondieron a dos perros (1:640 y 1:1,280), ambos contra la serovariedad *ballum Castelloni*. De hecho esta fue la serovariedad con mayor presencia en los perros monitoreados de Cozumel, (22.5%). Las ratas (*Rattus rattus*) son huéspedes de esta serovariedad (Fine 1994; Levett 2001) y están adaptadas a las *Leptospira*, por lo que en ocasiones no manifiestan síntomas o lesiones. Cursan la enfermedad de manera subclínica y eliminan la bacteria, razón por la cual son considerados huéspedes de importancia (Bolin., 1999).

Otras serovariedades patógenas asociadas a perros que dieron títulos en este estudio son, *Leptospira interrogans* serovariedades *Bratislava*, asociada a cerdos, así como *hardjobovis* y *hardjoprajitno*, asociadas a ganado (Ward 2002a, 2002b). En el muestreo se encontró un perro de la zona de transición manglar – selva mediana positivo (1:160) a *hardjobovis*. Indicando un posible contacto de este perro con secreciones de ganado positivo a esta serovariedad.

Cozumel tiene las características necesarias para favorecer la presencia de leptospirosis como: clima tropical con temperaturas ideales para el crecimiento de la bacteria, depósitos de agua estancada como charcos en zonas mal pavimentadas y sin drenaje en ciudad de San Miguel, cuenta con huéspedes apropiados como roedores *Rattus rattus*, *Mus musculus* y perros (Martínez-Morales y Cuarón 1999). Según registros recabados en sendas encuestas a los pobladores de la isla sobre su visión de la problemática social en Cozumel (Martínez et al., 2004) y sobre sus actitudes y percepciones con relación a la fauna de la isla (Navarro 2005), los perros fueron percibidos por los pobladores de Cozumel como el segundo problema ambiental de la isla. Bautista (2006) encontró la presencia de perros en prácticamente toda la isla y Un registro de *Rattus rattus* en la dieta de los perros.

Los perros y *Rattus rattus*, tienen características de tolerancia, adaptación y distribución (especies ferales) que las ubica como especies potencialmente transmisoras de enfermedades, con implicaciones para la salud pública y para los mamíferos silvestres en áreas naturales (Mills et al., 1997). Presentan tolerancia ecológica a lugares fragmentados, conservados, zonas suburbanas, urbanas, y a la presencia del ser humano. La conducta de estas especies provoca contactos con miembros de otras especies y con seres humanos (Mills et al., 1997).

Aunque en la Figura 6 se muestra a la serovariedad *celledoni* como la de mayor presencia en los mamíferos silvestres (mapaches, básicamente), las concentraciones obtenidas, son en su mayoría de 1:20, igual que para *bratislava*, que fue la segunda en importancia, por lo que resulta inespecífica y poco confiable su interpretación. Para el caso de *australis* (11.7%, n=4) y *autumnalis* (11.7%, n=4), cuatro individuos de cada serovariedad presentaron niveles de anticuerpos \geq 1:40. Esta situación, presenta a ambas serovariedades como las de mayor trascendencia en los mamíferos silvestres nativos en este estudio. Tanto

autumnalis como *australis*, son comunes en ratas (*Rattus rattus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*) (Fine 1995, Levett 2001) y pequeños ratones. Al mapache continental se le considera huésped frecuente de *autumnalis* (Benenson 1993). En este sentido es importante considerar que aparte de estas especies de roedores, identificadas como huéspedes, los roedores nativos de Cozumel, *Oryzomys couesi cozumelae*, *Reithrodontomys spectabilis* y *Peromyscus leucopus cozumelae* (Fuentes 2007) habitan las mismas áreas que el mapache enano, y pudieran ser reservorios comunes para estas serovariedades y haber coevolucionado de manera conjunta. La presencia de títulos desde 1:20 hasta 1:160 (Cuadro 6), sin la presencia de signos, indican una posible adaptación a formas subclínicas de la enfermedad (Richardson y Gauthier 2003) o bien un contacto ocasional con dichas serovariedades, posiblemente a través de algún ratón. La mayoría de las infecciones en mamíferos silvestres ocurren dentro de una relación estable entre huésped y parásito sin llegar a la presencia de signos clínicos de la enfermedad, pero la *Leptospira* podría persistir por largos periodos en los túbulos renales del huésped y transmitirse a otros individuos (Williams y Barrer, 2001).

Aunque los mapaches enanos presentaron títulos (1:20) aparentemente contra las mismas serovariedades que los perros, excepto *ballum castelloni*, no son un indicativo confiable de análisis por la inespecificidad de la prueba. Sin embargo, demuestran que los mapaches han estado en contacto posiblemente con otras serovariedades diferentes a *australis* y *autumnalis* como *hardjobovis*.

En el caso de Cozumel los mamíferos silvestres nativos, básicamente mapaches, pudieran estar actuando como huéspedes, al menos de acuerdo a lo encontrado en este estudio, para las serovariedades *australis* y *autumnalis*. En el pasado los mapaches continentales fueron identificados como huéspedes de serovariedades causantes de enfermedad en animales domésticos y el hombre. Mikaelan et al. (1997) mencionan que la presencia de la enfermedad provocada

por la serovariedad *bratislava* en Québec en su forma aguda, es mantenida en cerdos, caballos, y ha causado la enfermedad aguda en humanos y perros. Los datos de su estudio sugieren que *bratislava* puede ser endémica y que se requiere de otros estudios epidemiológicos para poder entender el papel de este patógeno en el mapache continental. Estudios intensos como el anterior, donde se muestreó en las diferentes temporadas del año y se conjunta el monitoreo de la especie silvestre de interés con aquellas especies domésticas susceptibles a las serovariedades problema, son necesarios para evaluar el rol del mapache enano en la epidemiología de leptospirosis en la región.

No hubo diferencias significativas en la seroprevalencia entre perros y mamíferos silvestres nativos, sitios de muestreo. Es importante señalar que el bajo número de animales muestreados en cada zona y los amplios intervalos de confianza calculados para los sitios de transición tasistal–selva mediana y la selva mediana subcaducifolia, posiblemente no permiten conocer la situación real de la enfermedad en la isla. Cabe señalar que MacFadden (2004) realizó un esfuerzo intensivo de trampeo entre el año 2002 y 2003 que incluyó 3,588 trampas noche, en 10 sitios seleccionados dentro de los principales ambientes geográficos de la isla. Ella encontró que los mapaches enanos prefieren habitar en la zona noroeste de la isla caracterizada por la presencia de manglar, a cualquier otro tipo de hábitat (transición tasistal-selva mediana caducifolia y selva mediana subcaducifolia). MacFadden, no descarta estas zonas al señalar que, si existen poblaciones de mapaches enanos habitando en ellas, seguramente deben ser muy pequeñas para poder ser detectadas a través del trampeo. Esta situación pone en duda la posibilidad de capturar una cantidad de animales suficiente que permitan sustentar un modelo estadístico al menos para estas zonas. Por lo que los datos obtenidos son de gran valor e indican al menos si al momento del muestreo la enfermedad está o no presente.

Al analizar la prevalencia de *Leptospira* por títulos de anticuerpos e identificar las serovariedades predominantes en cada una de las especies principales en este estudio, sean perros o mapaches enanos, se aprecia que a pesar de compartir posiblemente algunas serovariedades (títulos 1:20), aún son dos especies que se están manteniendo básicamente en ambientes diferentes. Con ello, al menos por los datos obtenidos en este estudio, podríamos hablar de que aún existe una dinámica diferente para ambas poblaciones, al menos para esta enfermedad, y que el perro aún no juega un papel importante en la epidemiología de leptospirosis.

Esto no significa que no exista el riesgo de un incremento en la posibilidad de contacto entre especies y la posible transmisión de serovariedades. Si consideramos que se tiene registrada la presencia de perros en todos los sitios seleccionados en este muestreo (Bautista 2006).

Respecto al basurero municipal, todos los perros muestreados mostraron serología para alguna enfermedad, pero no para leptospirosis. De hecho, no presentaron anticuerpos contra la bacteria. Probablemente las características ambientales del lugar no corresponden a las idóneas para la sobrevivencia de la bacteria. La *Leptospira* es altamente susceptible a la desecación y a los cambios de pH ($\text{pH} < 6$ y $\text{pH} > 8$ son inhibidores); temperaturas menores de $7-10^{\circ}\text{C}$ y mayores de $34-36^{\circ}\text{C}$ son nocivas (Fine 1995). Los organismos de *Leptospira* sobreviven en suelos húmedos, por varios meses en superficies acuosas y sobreviven aun mejor en agua estancada que en movimiento (McDonough 2001, Acha y Cifres 2003.), con un pH alcalino de entre 7 y 8. Lo importante en este caso es que el agua salada o bien la desecación puede desorganizar la membrana celular de *Leptospira* (Plank y Dean 2000). Esta situación junto con la baja prevalencia encontrada en este estudio, nula evidencia clínica y poca inmunológica, baja sensibilidad del PCR, tal vez expliquen porque no se encontraron animales positivos en el basurero. Para conocer la situación real de la

presencia de la bacteria en esta zona se deberá obtener información de la presencia de roedores en el lugar y realizar el monitoreo en esta especie, recordando que los roedores son parte de los huéspedes normalmente implicados en la transmisión de *Leptospira* (Fine 1994, Levett 2001).

Las vías de transmisión de *Leptospira* entre animales, puede ser directa o indirecta, de animal a animal a través la orina infectada, por contacto con piel y mucosas de pastos o aguas contaminadas, por fluidos, placenta, descargas uterinas, aerosol que contenga la bacteria, contacto de la piel con la bacteria, especialmente si ésta se encuentra excoriada (Levett 2001). Alguna de estas podría ser la vía de transmisión entre perros de las zonas costeras y explica de alguna manera porque se detectaron perros positivos en estas zonas, si se supone que el agua salada y la desecación inactivan la bacteria.

Cuando se analizaron las seroprevalencias entre mamíferos silvestres nativos, exóticos, perros urbanos y rurales, se observó que son estadísticamente diferentes. Las seroprevalencias encontradas en los dos grupos de perros fué superior a la de los mamíferos silvestres, demostrando que la posible presencia de la bacteria en esta especie es mayor. Los perros urbanos presentaron 69% (9/13) de seroprevalencia. Rubel et al (1997) encontraron en su estudio en Gran Buenos Aires, que el callejeo del perro y la presencia de agua estancada frente a las viviendas del propietario fueron los factores de riesgo mas importantes, pues la serprevalencia de perros con vida callejera fue significativamente mayor (119/200=59%) que la de los perros confinados a una vivienda (8/22=36%). Weekes et al (1997) encontraron el 62% de seroprevalencia en perros callejeros de Barbados y Aslantas et al (2005) en Ankara Turquía 43.96%. En nuestro estudio, los perros rurales presentaron 53% de seroprevalencia, esta situación junto con sus hábitos de desplazamiento, alimentación y ubicación en la Isla, los coloca como reservorios importantes de transmisión de esta y otras enfermedades para las especies silvestres nativas o endémicas.

El confinamiento que limita el desplazamiento y de alguna manera, disminuye las posibilidades de contacto de las especies silvestres exóticas del albergue de Playa Mía con otras especies, y la baja prevalencia de *Leptospira* determinada en este estudio, (el perro muestreado que pertenece al albergue también resultó negativo). Pueden influir de cierta manera en el resultado negativo a leptospirosis en este grupo de animales. Al igual que en el basurero, es recomendable considerar el monitoreo de roedores en ese sitio.

Los resultados obtenidos en el presente estudio no son suficientes para entender y menos explicar claramente la epidemiología de leptospirosis en cada uno de los sitios de la región. Pero si aportan información valiosa de la presencia de *Leptospira* en la isla.

Es importante identificar las serovares presentes y los reservorios en sitios donde se pretenda conocer la epidemiología de leptospirosis (Richardson y Gauthier 2003). Para ello, en lugares tropicales como Cozumel, es recomendable ir identificando como se comportan la bacteria y los huéspedes en las diferentes épocas del año, para establecer en algún momento un punto de corte en los títulos de anticuerpos (Levett 2001) y definir, a partir de que concentración serán considerados los animales con títulos de una infección aguda y los animales con exposición previa. Como Weekes et al. (1997) en Barbados determinaron en su estudio, de acuerdo al diagnóstico presuntivo en pacientes sintomáticos para infección aguda, títulos $\geq 1:800$ y títulos $\geq 1:100$ para perros con previa exposición a *Leptospira*. Es importante señalar que para el caso de Cozumel, el haber obtenido el 9% de animales positivos y como título más alto el de 1:1280, y la nula observación de animales con síntomas, indican que la leptospirosis de acuerdo al presente estudio, no presenta un alto nivel de circulación en las poblaciones de perros y mamíferos silvestres por lo que no representa un problema de salud importante para las poblaciones animales.

Cultivos positivos a la prueba de PCR

La ventaja de incluir la prueba de PCR en los monitoreos epidemiológicos de *Leptospira*, radica en la confirmación de la presencia de la bacteria en el animal muestreado. A diferencia de la aglutinación microscópica (MAT), que es la prueba más apropiada para investigaciones epidemiológicas (Levett 2001) pues aporta información de la concentración de anticuerpos en los individuos y los posibles serogrupos presentes en la zona en estudio (Ribotta et al 2000). Pero tiene la limitante de no indicar la presencia del agente infeccioso en ese momento, requiere de experiencia en la lectura y sobre todo, en mantener vivo el panel de antígenos utilizados (Levett y Whittington 1998). Por lo anterior, lo recomendable sería realizar ambas pruebas en el mismo individuo.

La prueba de PCR fue utilizada en este estudio como forma directa para demostrar la presencia de ADN del microorganismo, que es evidencia de la existencia de *Leptospira* patógenas en los animales de Cozumel. La prueba de PCR fue realizada de todos los cultivos de orina y sangre conservados en medio EMJH y obtenidos de los 92 animales capturados, de los cuales se obtuvieron nueve amplificadas pertenecientes a siete mapaches, un tlacuache y un tigrillo. La amplificación de solo 9 cultivos pudo deberse a la contaminación de las muestras durante la colecta en el campo, un mal manejo de los cultivos durante las resiembras o preparación incorrecta de los medios (Fine 1994).

La amplificación del cultivo del tlacuache a partir de sangre, y el resultado negativo del suero del mismo animal la prueba de MAT no es extraño. Se sabe que a partir de un cultivo positivo, el mismo animal puede ser serológicamente negativo y un animal seropositivo a menudo puede presentar un cultivo negativo, (Williams y Barker 2001) esto dependerá de la fase o estación en que se encuentre la enfermedad (Blood y Radostitis 1992; Levett 2001). Normalmente, durante el periodo de incubación que es de 2 a 20 días la *Leptospira* se encuentra

circulando por sangre y la respuesta inmune del animal comienza a activarse. Le tomará mínimo una semana alcanzar una respuesta inmune baja, momento en el cual el microorganismo ya se estará liberándose por orina, y entre 10 a 15 días el individuo alcanzará la respuesta más alta (Levett 2001). Por esta razón es posible que el tlacuache haya resultado positivo al PCR y negativo al MAT, al igual que los mapaches casos cuatro y 29. Los casos 25 y 64 pertenecientes a mapaches, presentaron títulos bajos de 1:20 y 1:40 respectivamente. Solo un mapache (caso 8) resulto positivo a ambas pruebas, los títulos que presento en el MAT fueron de 1:160.

La razón por la cual en esta prueba no amplifiqué ningún cultivo a partir de orina de perro, puede deberse, en el caso de los cultivos de orina a el tipo de dieta. El pH de la orina esta relacionado estrechamente con la dieta (Birchard y Sherding 1994). Las dietas a base de carne contienen los aminoácidos metionina y cistina, que al oxidar a los sulfatos neutros, producen iones de hidrógeno que acidifican la orina (Núñez 1998) hasta un pH de 9 (Senior 1997) e inhiben el crecimiento de *Leptospira* (Fine 1994), mientras que las dietas mas balanceadas que incluyen vegetales que contienen, lactatos, citratos y malatos, que al catabolizarse, fija los iones de hidrógeno para convertirse en bicarbonato y agua, confiriendo a la orina un pH alcalino (Núñez 1998) de 5.5 a 6 o inclusive 7 (Senior 1997) que favorece a *Leptospira* (Fine 1994).

Los resultados anteriores, confirman la presencia de la bacteria y mediante estos cultivos podría intentarse obtener algún aislamiento de una posible serovariedad presente en la Isla.

Es indispensable generar información más precisa acerca de las serovariedades presentes en diferentes partes del mundo y sitios específicos de monitoreo (Weeks et al 1997). Actualmente no se cuenta con serovariedades de referencia propias de Cozumel. Un aislamiento de la zona reemplazaría a la cepa

de referencia que se está utilizando y produciría títulos más altos del mismo serogrupo y en consecuencia una información más precisa (Myers y Martínez 1985; Levett 2001).

CONCLUSIONES

El tamaño de muestra no permitió encontrar diferencias estadísticas que permitieran conocer de manera más confiable la situación de leptospirosis en cada sitio de muestreo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las serovariedades más importantes encontradas en perros fueron *ballum castelloni*, *hardjobovis* y *canicola* y en mapaches fueron *autumnalis* y *australis*.

Los animales positivos, sugerentes a infección pasada o con anticuerpos de resiente formación se encontraron en los cinco sitios de muestreo, en consecuencia, en todas las zonas monitoreadas de las isla se encuentran animales con títulos contra *Leptospira* spp.

La presencia de animales positivos a *Leptospira* y con anticuerpos residuales de infección pasada o de resiente formación fueron en su mayoría perros.

La seroprevalencia en los perros urbanos y rurales fue estadísticamente diferente a la presente en mamíferos silvestres nativos y exóticos. Los porcentajes de seroprevalencia de *Leptospira* fueron mayores para los perros urbanos y rurales.

El porcentaje de seroprevalencia en este estudio fue mayor en el sitio de muestreo denominado como influencia humana.

De acuerdo a este estudio, las serovariedades de mayor presencia en la isla (*L. autumnalis* y *L. ballum castelloni*) no corresponden a las utilizadas en la elaboración de vacunas de uso comercial. Estas son para bacterinizar contra *L. canicola* y *L. icterohaemorrhagiae*.

Los resultados anteriores confirman la presencia de leptospira en la isla y crean la necesidad de conocer su comportamiento en las diferentes épocas del año para determinar el grado de positividad y posibles implicaciones y riesgos a la fauna nativa y como zoonosis.

Capítulo 3: PRESENCIA DE MOQUILLO CANINO EN POBLACIONES DE PERROS Y CARNÍVOROS SILVESTRES EN LA ISLA COZUMEL.

RESUMEN

El moquillo canino, es la segunda enfermedad infecciosa más importante a nivel mundial en perros domésticos (*Canis familiaris*). Es altamente contagiosa y la mortalidad normalmente excede el 80%, siendo preocupante para poblaciones animales que se encuentran amenazadas o en peligro de extinción. Actualmente la presencia abundante de perros en la Isla Cozumel, representa un riesgo para la conservación de especies endémicas amenazadas, como el pizote de Cozumel (*Nasua nelsoni*) y el mapache enano (*Procyon pygmaeus*). De febrero a mayo del 2006 se capturaron 41 perros y 51 mamíferos silvestres en la isla. Para la determinación de moquillo canino se utilizó la técnica de inmunofluorescencia de improntas oculares de los 92 individuos capturados y la prueba de Reacción en Cadena a la Polimerasa Transcriptasa Reversa (RT-PCR) a partir de glóbulos blancos de 10 perros, 10 mapaches, dos pizotes (*Nasua narica*), un pizote (*Nasua Nelson*) y dos martuchas. Estos animales fueron seleccionados de los cinco sitios monitoreados y caracterizados por la presencia de mamíferos silvestres nativos y perros. En el presente estudio, un mapache resulto positivo a la prueba de inmunofluorescencia y tres mapaches, 4 perros y una martucha amplificaron a la prueba de RT-PCR para morbillivirus. Los animales positivos pertenecieron a tres sitios de muestreo caracterizados por la presencia de perros. Los resultados anteriores confirman la presencia de morbillivirus sugerente a moquillo canino en la isla y crean la necesidad de profundizar en el conocimiento, identificación y comportamiento del virus en las diferentes épocas del año para determinar así, la presencia del mismo y sus posibles implicaciones y riesgos a la fauna nativa.

Palabras Clave: Moquillo canino, leptospirosis, *Procyon pygmaeus*, *Canis familiaris*, *Nasua nelsoni*, Isla Cozumel.

INTRODUCCIÓN

El Moquillo canino es una enfermedad infecciosa emergente que puede ser transmitida de los perros (*Canis familiaris*) a los carnívoros silvestres. Es la segunda enfermedad infecciosa más importante a nivel mundial en perros domésticos después de la rabia (Deem et al., 2000). Esta enfermedad es causada por un morbillivirus de la familia paramixoviridae (Frölich et al., 2000). Fue aislado por primera vez por Carré en 1905, y se sabe de la existencia clínica de la enfermedad desde hace siglos. Se ha reportado evidencia de la presencia de moquillo canino, en todas las familias de carnívoros terrestres: Canidae, Felidae, Hyaenidae, Mustelidae, Procyonidae, Ursidae, Viverridae, Ailuridae, Ailuropodidae (Appel 1987; Deem et al., 2000; Frölich et al., 2000). La transmisión interespecies ocurre de manera frecuente, pero en años recientes el morbillivirus ha sido observado en especies que anteriormente no eran consideradas susceptibles a la transmisión (Damien et al., 2002).

La familia *Paramixoviridae* de los morbillivirus incluye el virus del sarampión, el virus de la peste del ganado, el virus de la peste de pequeños rumiantes y, recientemente virus de distemper en focas y morbillivirus en cetáceos. Son altamente contagiosos. Las mortalidades normalmente exceden el 80%, siendo preocupante para poblaciones animales que se encuentran en peligro de extinción (Harder et al., 1997; Frisk et al., 1999). El virus de moquillo canino ha sido aislado de focas y osos polares (Saliki et al., 2002). De hecho, el moquillo canino mato a más de 10,000 focas (*Phoca sibirica*) en el año 2000 y produjo la extinción local de poblaciones aisladas de perros salvajes (*Lycaon pictus*) africanos (Daszak y Cunningham, 2002). Las epidemias originadas por este virus resultaron catastróficas en leones (*Panthera leo*) del Serengueti en 1994 (Lednicky et al., 2004). Posterior a la epidemia por moquillo canino en leones de el Serengueti, Cleaveland et al (2000) investigaron el papel del perro doméstico (*Canis familiaris*) en la epidemiología de la enfermedad a través del estudio de dos

poblaciones de perros ubicadas en dos distintos sitios adyacentes al Parque Nacional del Serengeti, distrito de Ngorongoro y el distrito de Serengeti. El estudio demostró que los patrones de infección difieren significativamente dependiendo de la densidad de población canina existente. Se reportó que la seropositividad mayor al 50% y la mortalidad mayor al 30% se mantenían constantes al paso de los meses y años en áreas de mayor concentración canina. No fue así en las áreas de menor concentración de perros donde se registró la presencia de la enfermedad, pero como brotes aislados y ubicados en ciertas épocas del año (Cleaveland et al. 2000).

En 1989 una epizotia provocada por moquillo canino en el sur de Arizona (Estados Unidos) provocó una alta mortalidad en pecari de collar (*Pecari tajacu*). Después, de 1993 a 1996, se recolectaron 364 sueros encontrándose 58% de animales positivos, sugiriendo que actualmente la infección es probablemente enzootica en estas poblaciones de pecari (Noon et al., 2003). En zorros (*Urocyon littoralis*) de las islas del canal de California, Estados Unidos, en 1999 el moquillo canino causó una dramática disminución en Santa Catalina (Clifford 2006). Aproximadamente el 90% de la población de zorros desapareció, sobreviviendo menos de 150 individuos. El virus de distemper fue encontrado en cadáveres de zorros. Para los años setenta se reportaron seroprevalencias para moquillo canino del 53% en procionidos, para quienes resulta devastadora esta enfermedad (Appel 1987). En el centro oeste de Illinois, Estados Unidos, fueron capturados 368 mapaches (*Procyon lotor*) de septiembre de 1989 a octubre de 1999, encontrando el 23% de los ejemplares seropositivos a moquillo canino. Los animales capturados en granjas reportaron una seropositividad menor (19%) que los capturados en parques públicos (29%), (Mitchell et. al. 1999).

La Isla Cozumel está habitada por 4 especies de carnívoros que incluye dos procionidos endémicos que son el pizote de Cozumel (*Nasua nelsoni*) y el mapache enano (*Procyon pygmaeus*) Ambos están catalogados por la Unión

Mundial para la Conservación (IUCN) y México a través de la NOM-059-SEMARNAT-2001(CITES 2002) como especies amenazadas. Además, la zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*) y un tercer procionido, la martucha (*Potos flavus*) (Cuarón et al., 2004). Estas especies son vulnerables a la presencia de agentes infecciosos como el moquillo canino. Esta enfermedad, puede verse influenciada de forma directa en estos animales por la presencia de poblaciones de perros no vacunados que actúan como reservorio. McFadden et al (2005) encontraron del 2002 al 2003 por seroneutralización la presencia de anticuerpos en el 3.6% de 28 mapaches (*Procyon pygmaeus*) muestreados en la Isla Cozumel.

El moquillo canino se presenta de forma aguda o subaguda, es altamente contagioso, provoca inmunodepresión e incluye procesos febriles, respiratorios, gastrointestinales, afectando también el sistema nervioso central (Appel 1987; Appel y Summers 1995; Ikeda et al., 2001). En fauna silvestre del 50 al 70% de los animales mueren cuando el sistema nervioso es afectado, posterior a episodios respiratorios o gastrointestinales. (Appel 1987; Deem et al., 2000). Posterior al contacto con aerosoles, la infección inicial ocurre en células epiteliales y tejido linfóide en la nasofaringe y la primera replicación se da en el tejido linfático del tracto respiratorio. En estos momentos se puede presentarse fiebre y linfopenia por un periodo de tres a seis días que coincide con la primera viremia y que es resultado de la infección de todo el tejido linfático (Birchard y Sherding 1994). La segunda viremia con fiebre se presenta algunos días después durante la infección de células epiteliales a lo largo del cuerpo, es acompañada por comezón y marcas iniciando así la fase sintomática, caracterizada por descarga nasal serosa, conjuntivitis, y anorexia. Signos gastrointestinales y respiratorios complicados aparecen por una infección bacteriana secundaria. La encefalomiелitis aguda puede ocurrir asociada con o inmediatamente después de la enfermedad sistémica. Y una hiperqueratosis del cojinete plantar y del epitelio de la nariz puede también observarse (Birchard y Sherding 1994; Deem et al., 2000; Messling et al., 2003; Józwick y Frymus 2005).

Se han sugerido una variedad importante de parámetros clínicos para obtener un diagnóstico antemortem definitivo y confiable. Sin embargo la forma variable e impredecible del curso de la enfermedad, tiempo de la viremia, manifestación de acuerdo al órgano afectado, aumento o disminución de la respuesta humoral y celular, hacen incierto el diagnóstico en la mayoría de los casos (Appel 1987; Appel y Summers 1995; Frisk et al., 1999). Improntas vaginales, células del epitelio urinario, biopsia de piel y estómago de algunos animales, células obtenidas del lavado traqueal frotis sanguíneos y fluido cerebroespinal han sido utilizados para el diagnóstico apoyado en pruebas de inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, ELISA e hibridación in situ (Appel 1987; Saito et al., 2006). Sin embargo, la mayoría de estos métodos son laboriosos y requieren de tiempo. Más importante aún es su limitada efectividad cuando se aplican en especímenes vivos, no así en diagnósticos posmortem donde son altamente confiables (Appel 1987).

La determinación del virus de moquillo canino en suero o fluido cerebroespinal por neutralización de anticuerpos puede ayudar en casos en los cuales el animal cruza un proceso crónico con afección del sistema nervioso central pero una vez más los resultados pueden ser variables dependiendo de la estación en que se encuentre la enfermedad (Frisk et al., 1999). Por lo anterior ninguno de los métodos antes mencionados reúne la sensibilidad requerida para la detección del virus de moquillo canino (Saito et al., 2006). En investigaciones recientes, el RT-PCR se ha utilizado para la detección del ARN del virus de moquillo canino en células mononucleares de sangre periférica de perros sospechosos a distemper, la positividad de estos animales ha sido del 53% (Frisk et al., 1999). El RT-PCR es rápido, sensible, y específico para el diagnóstico de moquillo canino en perros (86%) si el ARN del virus se detecta en suero. El diagnóstico a partir del suero, fluido cerebroespinal y sangre completa incrementan la sensibilidad mostrando una heterogénea distribución del RNA del

virus en diferentes compartimentos del cuerpo (Appel 1995; Frisk et al., 1999, Saliky 2002). Hasta 10 días posteriores a la vacunación el RT-PCR puede salir positivo indicando que bajo ciertas circunstancias la vacunación puede dar falsos positivos por la presencia inducida del RNA viral. En suma, el RT-PCR para la detección de moquillo canino representa un método sensible, específico y seguro para el diagnóstico temprano o antemortem utilizando suero, sangre completa, o fluido cerebroespinal, junto con los signos clínicos, hallazgos patológicos, neutralización de anticuerpos y distribución del antígeno del virus (Barrett 1999; Frisk et al., 1999, Deem et al., 2000).

La técnica de ELISA actualmente cuenta con diferentes aplicaciones y modificaciones que se han desarrollado para la detección de anticuerpos de otras especies de morbillivirus como el virus de sarampión o virus de peste del ganado que se encuentran antigénicamente emparentados al virus de moquillo canino (von Messling et al., 1999). Esta técnica ha resultado sensible y rápida para la detección de anticuerpos IgG e IgM específicos para moquillo canino en perros (von Messling et al., 1999). La aparición de IgM en el suero refleja etapas iniciales de la infección cuando los perros presentan signos clínicos que reflejan una infección aguda por distemper. La presencia del virus puede ser demostrada mediante el rastreo de su ARN para lo cual la técnica de RT-PCR resulta de suma importancia para corroborar el diagnóstico serológico de las infecciones agudas (Frisk et al., 1999). El aislamiento del virus es importante no solo para identificar el análisis de las secuencias sino también para el desarrollo de futuras vacunas en el caso en que las variantes del virus mermen la efectividad de la vacuna (Lednicky et al., 2004).

Hasta ahora, no existe un perfil epidemiológico detallado de las poblaciones de perros y fauna silvestre que habitan la Isla Cozumel, lo que representa un serio riesgo para la salud animal y pública debido a la transmisión de enfermedades. McFadden (2005) encontró un mapache enano adulto débil y positivo a moquillo

canino (1:8) mediante la prueba de seroneutralización. El animal se apreciaba debilitado. Por lo anterior, el propósito de este trabajo fue generar información respecto a la presencia de moquillo canino en las diferentes especies de mamíferos silvestres nativos, exóticos, perros urbanos y rurales. La información obtenida en esta investigación, será relevante para el manejo de poblaciones animales silvestres y domésticas en esta y otras islas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de moquillo canino mediante la prueba de RT-PCR e inmunofluorescencia en poblaciones de perros (*Canis familiaris*) y carnívoros silvestres en diferentes ambientes geográficos de la isla Cozumel.

HIPÓTESIS

Algunos mamíferos silvestres nativos y perros capturados en la isla Cozumel son positivos mediante las pruebas de inmunofluorescencia y RT-PCR a moquillo canino.

La presencia de animales positivos es mayor en perros que en mamíferos silvestres nativos.

MÉTODOS

El presente estudio se realizó en la Isla Cozumel, ubicada en el mar Caribe a 17.5 km de la costa de la Península de Yucatán ((20° 20'N, 87° 00'E; 20° 30'N, 86° 50'E) en el estado de Quintana Roo. Es la mayor de las islas mexicanas del Caribe. Su superficie aproximada es de 486 km² (Martínez-Morales 1996) y está separada del continente por el canal de Cozumel (Cuarón et al., 2004). El moquillo canino fue monitoreado por la técnica de inmunofluorescencia, de las improntas oculares tomadas a los 92 animales capturados en el estudio. De los 92 individuos, fueron seleccionados 25 de forma aleatoria para el monitoreo del virus de moquillo canino por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa-Transcriptasa Inversa (RT-PCR) (Saliki et al., 2002). Para esta técnica los animales fueron tomados de aquellos sitios donde se encontró la presencia

conjunta de perros y carnívoros silvestres (Bautista 2006), y en segundo lugar tomando algunos ejemplares de manera aleatoria de otras zonas monitoreadas obteniendo: cinco perros y seis mapaches del manglar, dos mapaches un perro y una martucha del sitio de transición manglar – selva mediana, dos mapaches y un pizote de la selva mediana subcaducifolia, un tlacuache del sitio de transición tasistal – selva baja caducifolia y cuatro perros una martucha y un pizote del sitio de influencia humana (transformado). En caso de requerirse contención química para los perros, se utilizó vía intramuscular ketamina-xilacina 10 mg/kg / 1mg/kg o tiletamina zolazepam 7 a 10 mg/kg. En el caso de los carnívoros silvestres se uso vía intramuscular, ketamina - xilacina (10 mg/kg / 2 mg/kg) (Inoketam 1000 y sedaject) o tiletamina zolazepam (5 a 6.6 mg/kg) (zoletil 50) (Denver, 1999; Nielsen, 1999; IVIS 2002). Para la identificación de los animales, se elaboró un formato de registró individual. (Ver detalles en la sección correspondiente del capítulo 2).

Toma de muestras y conservación

El protocolo para el manejo de muestras en campo fue propuesto por el Laboratorio de Medicina de Conservación (LMC) de la Escuela Superior de Medicina (ESM) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

Improntas oculares

Con un hisopo estéril se tomó la muestra ocular y se realizó un frotis en una laminilla previamente identificada. El frotis se aisló del sol en una caja porta preparaciones. Las improntas oculares se fijaron en acetona durante 12 horas a 4°C, para después mantenerse a esa misma temperatura hasta su análisis.

Muestras de sangre

Se obtuvieron 5 ml de sangre venosa periférica de la vena cefálica o safena de cada animal seleccionado. La sangre fue puesta en el tubo con anticoagulante (heparina de litio - tapón verde), fue identificado y mantenido a menos de 30°C. La Sociedad Humanitaria de Cozumel A.C. nos apoyó con sus instalaciones y equipo para el manejo de las muestras obtenidas, las cuales se procesaron de la siguiente manera: Los tubos vacutainer con sangre total heparinizada, fueron centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos (o el tiempo que permita separar el suero del paquete celular). Con ayuda de una pipeta semiautomática de 100µl, se separó la fracción de leucocitos y se colocó en un tubo eppendorf pequeño de 600µl, el cual se marcó y se mantuvo en congelación hasta su traslado al laboratorio de referencia. Las pruebas de inmunofluorescencia se realizaron de acuerdo al protocolo del Departamento de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Esta técnica se aplica de manera rutinaria en el diagnóstico de moquillo canino y para

el presente estudio se realizó a partir de las improntas oculares tomadas durante el muestreo de campo.

La prueba de RT-PCR se realizó de acuerdo a la técnica estandarizada para morbillivirus (Saliki et al., 2002) en el Laboratorio de Medicina de Conservación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. Para la prueba se utilizó el kit QUIAGEN OneStep RT-PCR kit (100) con los iniciadores Primer 3'Morbuni 5'ATT GGG TTG CAC CAC TTG TC-3 y Primer 5'Tissu Morb 5' ATT AAA AAG GGS ACA GGA GAG AGA TCA GCC-3'. Estos iniciadores fueron utilizados para amplificar a 78 pares de bases (pb) producidos en la fosfoproteína (P) del gen. Estos iniciadores han sido utilizados para determinar morbillivirus. Para la extracción del ARN se utilizó el RNA easy Mini Kit (cat no. 74104, Quiagen inc.). Como control positivo del virus se utilizó ARN de un cultivo celular de porpoise morbillivirus marsupia.

RESULTADOS

Se encontró evidencia molecular y celular de la presencia de morbillivirus sugerente a moquillo canino en tres de los cinco ambientes geográficos de muestreo (transición manglar – selva mediana, manglar y sitio de influencia humana (transformado). En la zona urbana con la ayuda del Centro de Control Animal (CCA), se capturaron y remitieron a ese centro dos perros (*Canis familiaris*) que al examen físico presentaron signología compatible a la enfermedad: mioclonos, descarga nasal serosa, conjuntivitis, y convulsiones. Estos animales dieron resultados negativos por la técnica de inmunofluorescencia y positivos en la prueba de RT-PCR. Por reglamento del CCA, decidieron mantener esos animales durante tres días. En ese tiempo los animales siguieron presentando signos característicos a la enfermedad. Finalmente fueron sacrificados y llevados al basurero de la ciudad ubicado en la costa este.

Solo 1 mapache (*Procyon pygmaeus*) capturado en la zona de humedales que representa el 1.08 % de los 92 animales analizados resultó positivo a la prueba de inmunofluorescencia.

De los 25 animales analizados por RT-PCR el 68% fue negativo y el 32% positivo e incluye tres mapaches (12%) uno perteneciente al sitio de transición manglar – selva mediana y dos al manglar, 4 perros (16%) uno perteneciente al sitio de transición manglar – selva mediana, uno al manglar, dos pertenecientes a la zona de influencia humana (transformado) y 1 martucha (*Potos flavus*) (4%) también de la zona la zona de influencia humana (transformado), (cuadro 8; figura 14). El sitio de influencia humana (transformado) presento un 60% de animales positivos a la prueba, seguido de sitio de transición manglar - selva mediana con 50% y el manglar con 27% (figura 15).

DISCUSIÓN

Usualmente para el diagnóstico de moquillo canino se considera la presencia de signos clínicos y la realización de más de una prueba diagnóstica como: pruebas serológicas, inmunofluorescencia a partir de isopados conjuntivales, epitelio respiratorio o genital, histopatología, aislamiento e identificación del virus (Deem et al 2000; Appel 1995; Moll et al 1995). En investigaciones epidemiológicas normalmente se trabaja con serología y alguna otra prueba diagnóstica de apoyo (Appel 1995, Mitchell 1999). Esto en virtud de lo fastidioso del virus. En consideración a sus características, en el planteamiento original de este estudio se tenía contemplado estandarizar una prueba de ELISA específica para los carnívoros silvestres de la isla, realizar el RT-PCR a partir de glóbulos blancos, intentar el aislamiento del virus e identificarlo mediante enzimas de restricción. Por falta de tiempo y previa consideración del personal capacitado y

disponible para apoyar el trabajo, solo pudimos realizar el RT-PCR para morbillivirus de 25 individuos de los 92 muestreados.

Se sabe que la presencia de moquillo canino varía de acuerdo a la zona geográfica y distribución de los huéspedes. (Lendicky et al., 2004). En el presente estudio se observó una mayor presencia de animales positivos a morbillivirus en el sitio de influencia humana, que coinciden con la presencia de perros. Se sabe que la alta densidad de una población animal susceptible a moquillo canino, representa un alto riesgo de infección (Appel 1987) y en este sentido, Cozumel no es la excepción. Según registros recabados en sendas encuestas a los pobladores de la isla sobre su visión de la problemática social en Cozumel (Martínez et al., 2004) y sobre sus actitudes y percepciones con relación a la fauna de la isla (Navarro 2005), los perros fueron percibidos por los pobladores de Cozumel como el segundo problema ambiental de la isla, y Bautista (2006) encontró la presencia de perros en prácticamente toda la isla.

La presencia en este estudio de cuatro mapaches enanos positivos y una martucha, coincidió con la presencia de cuatro perros también positivos en las mismas zonas. No se encontró la presencia en alguna zona, de algún animal silvestre positivo, donde un perro positivo no estuviera implicado.

Los perros tienen características de tolerancia, adaptación y distribución (especies ferales) que las ubica como especies potencialmente transmisoras de esta y otras enfermedades, con implicaciones para la salud pública y para los mamíferos silvestres en áreas naturales, tienen gran tolerancia ecológica a lugares fragmentados, conservados, zonas suburbanas, urbanas, y a la presencia del ser humano. La conducta de estas especies provoca contactos con miembros de otras especies y con seres humanos (Mills et al., 1997).

En el presente estudio los dos perros con signología compatible a moquillo canino pertenecían al sitio de influenza humana (transformado). Esos animales fueron llevados al Centro de Control Animal (CCA) y mantenidos durante tres días con la presencia de mioclonos y convulsiones, situaciones que favorecen la liberación de virus a través de cualquier tipo de secreción corporal (Appel 1987; Józwik y Frymus 2005; Amunde et al., 2006; Saito et al., 2006) y en consecuencia la transmisión de la enfermedad. Los cadáveres de los animales sacrificados, fueron llevados a los tiraderos de basura de la ciudad, representando un foco de la enfermedad ahora en los basureros, sitios donde la presencia de perros es abundante (Bautista 2006). El virus es sensible a la radiación solar, se sabe que es inactivado en 2 a 3 minutos a 56°C, en 10 minutos a 45°C, en 1 a 3 horas a 37°C, o en 2 horas a 21°C (Appel 1987). Esta situación inhibe de alguna manera la posible transmisión a través de los cadáveres en los basureros, pero no garantiza el que la enfermedad no pueda transmitirse bajo esas condiciones e ir a través de un reservorio (perro) a otra zona de la isla y en consecuencia poner en riesgo a las especies nativas.

Solo un mapache capturado en el manglar resultó positivo a la prueba de inmunofluorescencia realizada a partir de las improntas oculares. El animal no presentó signología compatible a la enfermedad al momento de ser capturado. Posiblemente el proceso de anestesia impidió una observación adecuada en cuanto a la presencia de mioclonos o algún otro signo que sugiriera la enfermedad, o bien el virus se encontraba en periodo de incubación (Appel y Summers 1995). Es importante señalar que la técnica de inmunofluorescencia solo puede confirmar la presencia de moquillo canino hasta tres semanas posteriores a la infección por que este es el tiempo máximo que suele permanecer el virus en células epiteliales (Appel y Summers 1995, Józwik y Frymus 2005). Por lo tanto, durante la presentación de formas subagudas o agudas de la enfermedad esta prueba es factible de dar resultados falsos negativos (Józwik y Frymus 2005). Lo

anterior podría sugerir que el mapache tenía menos de tres semanas de haber contraído la enfermedad.

La sensibilidad de la prueba de RT-PCR, varía de acuerdo al tipo de iniciadores utilizados, métodos de extracción de ARN y a las muestras clínicas analizadas que pueden ser glóbulos blancos, sedimento urinario, suero o fluido cerebroespinal (Appel 1995; Saito et al., 2006). Frisk y colaboradores (1999) reportaron sensibilidades del 86% (25/29) para suero y 88% (14/16) para glóbulos blancos en perros infectados de forma natural por el virus. Mientras que Amunde (2006) en cuanto a sensibilidad, encontró solo una muestra positiva de glóbulos blancos de cinco muestras analizadas de perros.

Es importante señalar que el protocolo de la prueba de RT-PCR utilizado en este estudio fué diseñado para usarse en el diagnóstico de morbillivirus a partir de especímenes que contienen ARN de tejido en descomposición fijado en formalina. En este protocolo (Saliki et al 2002) se obtuvieron amplificadores de perros, focas y delfines, pues las tres especies de morbillivirus que afectan estos animales, se encuentran genéticamente emparentadas y pueden reaccionar de forma cruzada. Saliki et al (2002) menciona que este protocolo de RT-PCR puede permitir el diagnóstico molecular de morbillivirus en animales vivos a partir de células mononucleares de sangre periférica. Lo anterior justifica de manera confiable la utilización de la prueba, y los resultados positivos a morbillivirus obtenidos en los perros de Cozumel. Con respecto a los mapaches enanos aun que los resultados son confiables, la prueba deberá validarse en la especie mediante el aislamiento e identificación del virus.

Existen algunas posibles razones por las cuales seis animales sin signología aparente a la enfermedad resultaron positivos. Originalmente el RT-PCR fue utilizado solo para el diagnóstico antemortem en perros con signos altamente sugestivos a la enfermedad. Sin embargo Amunde et al., (2006)

realizaron el diagnóstico por RT-PCR en perros donde la signología no está claramente definida, confirmando que en algunos casos puede estar presente con la ausencia de signos sistémicos y mioclonos y que los signos nerviosos pueden ocurrir sin la presencia de algún otro signo de origen sistémico.

El hecho de no percibir anomalías sistémicas en los animales positivos durante el proceso de captura y contención, no significa que el virus estuviera ausente. El moquillo canino es una enfermedad que cursa por diferentes etapas, bajo esta condición, cabe la posibilidad de que alguno de estos animales se encontrara durante la primera replicación del virus, que se da en el tejido linfático del tracto respiratorio. En estos momentos puede aunque no necesariamente, presentarse fiebre y linfopenia por un periodo de tres a seis días (Von Messling et al., 2003).

Se sabe que los mapaches continentales son transmisores potenciales de moquillo canino y aunque esta enfermedad causa alta mortalidad en esta especie, el virus puede circular ampliamente en una población con varios sobrevivientes (Mitchell et al., 1999). Esto sugiere que aparte de ser un reservorio potencial de distemper, el virus en sí, puede presentarse con diferentes niveles de virulencia (Lendicky et al., 2004). Para el caso de Cozumel deberá evaluarse de forma detallada el rol del mapache enano. Es importante conocer si los patógenos virulentos de los perros ya son parte de la fauna nativa.

CONCLUSIONES

El tamaño de muestra (n) utilizada en el estudio, no permite hacer inferencias del comportamiento de moquillo canino en la isla.

Las pruebas utilizadas de RT-PCR e inmunofluorescencia no tienen la sensibilidad suficiente para confirmar que el virus presente pertenece a moquillo cano.

El tipo de muestra utilizada para realizar el RT-PCR, en este caso glóbulos blancos, ha mostrado resultados variables en cuanto a la sensibilidad de la prueba se refiere.

El tamaño y número de muestras utilizadas en el estudio no son suficientes para detectar animales positivos, cuando no hay presencia de signos clínicos. Posiblemente la sensibilidad de la prueba no es la adecuada.

Los resultados obtenidos confirman la presencia de morbillivirus sugerente a moquillo canino en Cozumel,

La presencia de animales positivos fue mayor en perros, de hecho, en los sitios donde se encontraron mamíferos silvestres nativos positivos, siempre existieron perros positivos, no se encontró sitio donde existiera algún animal silvestre nativo positivo sin la presencia de algún perro positivo.

Es necesario evaluar en forma más detallada y precisa esta enfermedad en la Isla, considerando para ello, la estandarización de una prueba de ELISA específica para los carnívoros de la Isla, el aislamiento e isotipificación del virus.

DISCUSION GENERAL

Se encontró evidencia serológica y molecular de exposición a *Leptospira* y evidencia molecular de exposición previa a morbillivirus, posiblemente distemper canino en las poblaciones de perros y mamíferos silvestre nativos de Cozumel.

Los resultados muestran que si bien se encontraron animales con títulos contra *Leptospira* en todas las zonas de la isla donde se encontraron mamíferos nativos, no todos los animales muestreados han estado expuestos a ella. De hecho, poco menos del 50% de los animales analizados en el estudio presentó anticuerpos contra la enfermedad y la presencia de animales nativos y exóticos con títulos es prácticamente la misma. En el presente estudio, se encontraron ocho (9%) animales positivos $\geq 1:100$ (dos mamíferos nativos y seis perros) y seis (7%) sugerentes a infección pasada o con anticuerpos de reciente $\geq 1:50$ (dos mapaches y cuatro perros). Ninguno de ellos presentó signología compatible a la enfermedad. Richardson y Gauthier (2003) sugieren que en ocasiones la leptospirosis en perros no es tan específica en cuanto a signos clínicos y frecuentemente la etapa infecciosa suele no reconocerse. La presencia o ausencia de signos clínicos, o de la enfermedad, se encuentra influenciada de manera directa con el huésped involucrado, clima, tipo de serovariedad y títulos presentes (Levett 2001). Asimismo, la concentración de títulos dependerá de situaciones que promuevan la exposición como una alta densidad de población y presencia de huéspedes accidentales (Levett 2001).

La serovariedad con mayor presencia en los perros monitoreados de Cozumel, fue *ballum castelloni* 22.5%. Esta serovariedad es frecuente en roedores (*Rattus rattus* y *Mus musculus*) Los perros de la isla suelen alimentarse en gran cantidad de los basureros de la ciudad y de la zona rural (Bautista 2006) y en consecuencia estar más susceptibles al contacto directo con estosa roedores o

desechos de las mismas (orina y heces). Aunque los mapaches enanos presentaron títulos (1:20) aparentemente contra las mismas serovariedades que los perros, excepto *ballum castelloni*, no son un indicativo confiable de análisis por la inespecificidad de la prueba. Sin embargo, demuestran que los mapaches han estado en contacto posiblemente con otras serovariedades diferentes a *australis* y *autumnalis* como *hardjobovis*.

En el caso de Cozumel los mamíferos silvestres nativos, básicamente mapaches, pudieran estar actuando como huéspedes, al menos de acuerdo a lo encontrado en este estudio, para las serovariedades *australis* y *autumnalis*.

Cuando se analizaron las seroprevalencias entre mamíferos silvestres nativos, exóticos, perros urbanos y ferales se observó que son estadísticamente diferentes ($P > 0.05$). Las seroprevalencias encontradas en los dos grupos de perros fue superior a la de los mamíferos silvestres, demostrando que la actividad de la bacteria en esta especie es mayor, los perros rurales presentaron 72.7% de seroprevalencia).

Se sabe que la presencia de moquillo canino varía de acuerdo a la zona geográfica y distribución de los huéspedes. (Lendicky et al., 2004). En el presente estudio se observó una mayor presencia de animales positivos a morbillivirus en el sitio de influencia humana (transformado). Aunque también estuvo presente en los sitios de transición manglar – selva mediana y manglar. Se sabe que la alta densidad de una población animal susceptible a la enfermedad representa un alto riesgo de infección (Appel 1987) y Cozumel no es la excepción en este sentido, pues los pobladores perciben la presencia de perros como el segundo problema ambiental (Navarro 2005).

El protocolo de RT-PCR utilizado en este estudio (Saliki et al 2002) permite el diagnóstico molecular de morbillivirus en animales vivos a partir de células

mononucleares de sangre periférica. Lo anterior justifica de manera confiable la utilización de la prueba, y los resultados positivos a morbillivirus obtenidos en los perros de Cozumel. Con respecto a los mapaches enanos aun que los resultados son confiables, la prueba deberá validarse en la especie mediante el aislamiento e identificación del virus.

Para el caso del análisis de *leptospira*, el tamaño de muestra no permitió encontrar diferencias estadísticas que permitieran conocer de manera más confiable la situación de leptospirosis en cada sitio de muestreo. De igual forma el tamaño de muestra (n) utilizada en el estudio para morbillivirus, no permite hacer inferencias del comportamiento de moquillo canino en la isla.

Estudios intensos donde se realicen monitoreos de ambas enfermedades en las diferentes temporadas del año, contemplando las especies silvestres de interés y aquellas especies domésticas susceptibles a estas enfermedades, son necesarios para conocer la epidemiología de leptospirosis y moquillo canino en la región. La detección y prevención oportuna de posibles epizootias y epidemias que puedan comprometer la diversidad biológica y la salud pública en Cozumel y en México en general, son el principal objetivo.

CONCLUSIONES GENERALES

El tamaño de muestra utilizada en ambos estudios arrojó información valiosa pero no concluyente de la situación real del comportamiento de ambas enfermedades en la Isla

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se encontró evidencia de la presencia de *leptospira* en los cinco sitios muestreo (manglar, zona de transición manglar – selva baja, selva mediana subcaducifolia, transición tasistal – selva baja caducifolia, influencia humana), y de moquillo canino en tres sitios de muestreo (transición manglar – selva mediana, manglar y sitio de influencia humana (transformado)).

El sitio de muestreo denominado en este estudio como influencia humana, presentó mayores porcentajes de animales con cambios patológicos aparentes.

La presencia de perros positivos a ambas enfermedades fue superior a cualquier otro mamífero silvestre.

Se encontró evidencia de la presencia de *leptospira* spp. en los perros, los mapaches enanos y un armadillo. En cuanto a moquillo canino, se encontró evidencia de la presencia de morbillivirus en los perros, los mapaches enanos y una martucha.

IMPLICACIONES

Es necesario conocer el comportamiento de ambas enfermedades a lo largo del año mediante la realización de monitoreos en las diferentes temporadas.

Sería recomendable aislar e identificar el tipo de morbillivirus y *leptospiras* presentes en la Isla para realizar propuestas más específicas en cuanto a la prevención y control de estas enfermedades en un futuro.

Considerar como base en los monitoreos la medición de títulos de anticuerpos y de ser posible, complementar con otras pruebas como el PCR o RT-PCR dependiendo el caso.

Realizar monitoreos de roedores en todos los sitios de captura contemplados en este estudio.

Considerar en las evaluaciones de salud, la elaboración de hemogramas y químicas sanguíneas e identificar los valores normales en especies como *Procyon pygmaeus* y *Nasua nelsoni*

Promover la vacunación de animales domésticos en la zona urbana y rural y diseñar metodologías de trampeo para perros ferales en playas y zonas de la selva donde se tiene identificada su presencia.

Incrementar la promoción de campañas de esterilización en perros de las zonas rurales a través de clínicas móviles.

Evitar el abandono de cadáveres de animales domésticos en las carreteras y brechas de tránsito frecuente de animales silvestres.

REFERENCIAS

1. Abbas AK., Lichtman AH., 2004. Inmunología celular y molecular. 5ª edición. Ed. Elsevier. Madrid, España. 563 p.
2. Acha ON, Szifres B. 2003. Zoonosis y enfermedades comunes transmisibles al hombre y a los animales. Vol. 1. Bacterias y micosis. Organización Panamericana de la Salud (OPS). 3 ed. 398 p.
3. Aguirre AA, Ostfeld RS, Tabor G.M., House C., Pearl C.M. 2002. Conservation Medicine Ecological Health in practice. Oxford University Press. New York, USA. 403 p.
4. Anderson RM, May RM. 1982. Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology* 85:411- 426.
5. Amunde AM., Alfieri AA., Alfieri AF. 2006. Antemortem diagnosis of CDV infection by RT-PCR in distemper dogs with neurological deficits without the typical clinical presentation. *Veterinary Research Communications*. 30: 679 – 687.
6. Appel MJG. 1987. *Virus Infections in carnivores*. Elsevier. Amsterdam. 500 p.
7. Appel MJG, Summers BA. 1995. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Veterinary Microbiology*. 44: 187-191.
8. Aslantas O., Özdemir V., Kilic S., Babür C. 2005. Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis, and leishmaniasis among dogs in Ankara, Turkey. *Veterinary Parasitology*. 129: 187–191.
9. Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spieguel RA, Plikaytis BD, Perkins BA, Phelan M, Levett PN, Weyant RS. 2003. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 803-809.
10. Barrett T. 1999. Morbillivirus infection with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Veterinary Microbiology*. 69: 3-13.

11. Bautista S. 2006. Distribución, abundancia y dieta de perros y gatos ferales en la Isla Cozumel. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto de Ecología A.C. Xalapa, Veracruz , México. 137p.
12. Benenson A. 1992. El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. U.S.A.
13. Bharti RA, Nally EJ, Ricaldi NJ, Matthias AM, Diaz MM, Lovett AM, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM, Peru-United States leptospirosis consortium. 2003. Leptospirosis a zoonotic disease of global importance. Review. Elsevier. 757 – 771.
14. Beck AM. 1971. The life and times of SAG, a feral dog in Baltimore. Natural History. (80)8: 58-65.
15. Beck AM. 1973. The ecology of stray dogs: A study of free-rangig urban animals. York Press. USA. 98 p.
16. Birchard SJ, Sherding RG. 1994. Manual clínico de pequeñas especies. Vol 1. Ed McGraw-Hill interamericana. México, D.F. 947p.
17. Blancou J, Pastotet PP, Brochier B, Thomas IY, Bogel K. 1988. Vaccinating wild animals against rabies. Rev. Sci Tech Off Int Epizoot. 7: 156-159.
18. Blood DC, Radostitis OM. 1992. Medicina veterinaria. Ed. Interamericana McGraw – Hill. Séptima edición. Vol. 1. España. 851 p.
19. Bolin C. A. 1999. Leptospirosis. En: Fowler ME, Miller RE. Zoo and wild animal medicine. Elsevier Science. 5 ed. St. Luis Missouri, USA. 699 - 701.
20. Brooks G, Butel J & S Morse. 2002. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. El Manual Moderno. México.
21. Bunnell JE, Hice CL, Watts D.M, Montrueil V, Tesh RB, Vinetz JM. 2000. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. infections among mammals captured in the Peruvian Amazon basin region. Am. Jour. Med. Hyg. 63: 255 – 358.

22. Butler JRA, Du Toit JT, Bingham J. 2004. Free ranging domestic dogs (*Canis familiaris*) as predators and prey in rural Zimbabwe: threats of competition and disease to large wild carnivores. *Biological Conservation*. 115: 369-378.
23. Ceballos G, Rodríguez P. 1993. Diversidad y conservación de los mamíferos de México: II. Patrones de endemidad. En: Medellín R.A., y Ceballos G. (eds.) *Avances en el estudio de los mamíferos de México*. Publicaciones especiales. Vol. 1. Asociación Mexicana de Mastozoología, A.C. México, D.F.
24. Chin J. 2001. El control de las enfermedades transmisibles. Organización Panamericana de la Salud (OPS). 17 edición. 748 p.
25. Chomel B. 2003. Control and prevention of emerging zoonoses. *Journal of Veterinary Medicine*. 30: 145-147.
26. CITES. 2002. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres [en línea] E.U.A. <http://www.cites.org> [consulta 2002]
27. Cleaveland S. 2003. Emerging infectious diseases of wildlife. *Microbiology Today*. 30: 155-156.
28. Cleaveland S, Appel M.G.J, Chalmers WSK, Chillingworth, Kaare M, Dye C. 2000. Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. *Veterinary Microbiology*. 72: 217-227.
29. Cleaveland S, Thirgood S, Laurenson K. 1999. Pathogens as aliens in island conservation?. *Trends in Ecology & Evolution*. 14: 83-84 p.
30. Clifford DL., Mazet JAK., Dubovi EJ., Garcelon DK., Coonan TJ., Conrad PA., Munson L. 2006. Pathogen exposure in endangered island fox (*Urocyon littoralis*) populations: implications for conservation management. *Biological Conservation*. 131: 230-243.

31. Cole JR., Sulzer CR., Pursell AR. 1973 Improved microtechnique for leptospiral microscopic agglutination test. *Applied Microbiology*. 25: 976 - 986.
32. Combes C. 1996. Parasites, biodiversity and ecosystem stability. *Biodiversity and Conservation*. 5: 953-962.
33. Courtenay O., Quinnell RJ., Chalmers WSK. 2001. Contact rates between wild and domestic canids: no evidence of parvovirus or canine distemper virus in crab-eating foxes. *Veterinary Microbiology*. 81: 9-19.
34. Cuarón AD, Martínez MMA, Mcfadden KW, Valenzuela D, Gompper ME. 2004. The status of dwarf carnivores on Cozumel Island, México. *Biodiversity and Conservation*. 13: 317 - 331.
35. Damien BC, Martina BE, Losch S, Mossong J, Osterhaus AD, Muller CP. 2002. Prevalence of antibodies against canine distemper virus among red foxes in Luxembourg. *Journal of Wildlife Diseases*. 38: 856 – 859.
36. Daniels TJ. 1983. The social organization of free ranging urban dogs II Estrous groups and the mating system. *Applied Animal Ethology*. 10: 365-373.
37. Daniels TJ. and Beckoff. 1989. Spatial and temporal resource use by feral and abandoned dogs. *Ethology* 81: 300-312.
38. Daszak P, Cunningham A, Hyatt A. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife – threats to biodiversity and human health. Review. *Science*. 287: 443 -449.
39. Daszak P, Cunningham A. 2002. Emerging infectious diseases a key role for conservation medicine. En: Aguirre AA, Ostfeld RS, Tabor G.M., House C., Pearl C.M. *Conservation Medicine Ecological Health in practice*. Oxford University Press. New York, USA. 58 - 61 p.
40. Deem LS, Spelman HL, Yates AR, Montali RJ. 2000. Canine distemper in terrestrial carnivores. Review. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 31: 441-451.

41. Denver M. 1999. Procyonidae and viverridae. En: Fowler ME, Miller RE. Zoo and wild animal medicine. Elsevier Science. 5 ed. St. Luis Missouri, USA. 516 - 523 p.
42. Elia G., Decaro N., Martella V., Cirone F., Lucente MS., Lorusso E., Di Trani L., Buonavoglia C. 2006. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. Journal of Virological Methods. 1-6.
43. Faine S. 1994. Leptospira and leptospirosis. CRC press. Claiton Victoria Australia. 353 p.
44. Flores I, Estrella V. 2004. Canine ecology and socioeconomic factors associated with dogs unvaccinated against rabies in a Mexican city across the US - Mexico border. Preventive Veterinary Medicine. 62: 79 - 87.
45. Frisk AL, König M, Moritz A. Baumgärtner. 1999. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription – PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. Journal of Clinical Microbiology. 37: 3634-3643.
46. Freeman B. 1989. Microbiología de Burrows. Interamericana-McGraw-Hill. México.
47. Frölich K, Czupalla O, Haas L, Hentschke J, Dedek J, Fickel J. 2000. Epizootiological investigations of canine distemper virus in free-ranging carnivores from Germany. Veterinary Microbiology. 74: 283-292.
48. Fuentes ME. 2007. Efectos de borde provocados por caminos sobre poblaciones de ratones endémicos de la Isla Cozumel. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Instituto de Ecología. México D.F. 65 p.
49. Fuentes M, Heredia C, Barboza D, Fernández J, Saballo A, García E, Carrera E, Bordone A y C Rangel. 2001. Leptospirosis porcina. Detección de anticuerpos para los diferentes serovares involucrados en Venezuela. <http://www.ppca.com.ve/vp/articulos/e35p10.htm>
50. Gandora VK, Chauchan FS, Sharma RD. 1993. Occurrence of canine transmissible venereal tumor and evaluation of two treatments. Indian Veterinary Journal. 70:854-857.

51. Garcia E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen. Instituto de Geografía. UNAM. 3ª ed. México. 246 p.
52. Geneviève FA. 2006. Canine leptospirosis-Do we have a problem?. *Veterinary Microbiology*.
53. Goosem, M. 1997. Internal fragmentation: The effects of roads, highways, and powerline clearings on movements and mortality of rainforest vertebrates . *In: Tropical forest remnants. Ecology. Management and Conservation of Fragmentated Communities* (W. F. Laurance and R. O. Bierregaard. Eds) The University of Chicago Press.
54. Guy NC, Luescher UA, Dohoo SE, Spangler E, Miller JB, Dohoo IR, Bate LA. 2001. A case series of biting dogs: Characteristics of the dogs, their behaviour and their victims. *Applied Animal Behaviour Science*. 74: 43-57.
55. Harder TC, Osterhaus AD. 1997. Canine distemper virus – a morbillivirus in search of new hosts?. *Trends in Microbiology*. 5:120-124.
56. Hilton-Taylor C. (compilador) (2000). 2000 IUCN Red List of Threatened Species IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
57. Ikeda Y, Nakamura K, Miyazawa T, Chen MG, Kuo TF, Lin JA, Mikami T, Kai C, Takahashi E. 2001. Seroprevalence of canine distemper virus in cats. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 8: 641 – 644.
58. IVIS. 2002. Raccoons and relatives (carnivora, Procyonidae). *In: Zoological Restraint and Anesthesia*, D. Heard (ed.). Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA.
59. Józwik A., Frymus T. 2005. Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and Nested PCR in the diagnosis of canine distemper. *Veterinary Research Communications*. 29: 347-359.
60. Kleiman DG. 1989. Reintroduction of captive mammals for conservation. *Bioscience*. 39:152 – 169.
61. Levett PN. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 14: 296-326.

62. Levett PN, Whittington CU. 1998. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 11-14.
63. Lendicky JA, Dubach J, Kinsel MJ, Meehan TP, Bocchetta M, Hungerford LL, Sarich NA, Witecki KE, Braid MD, Pedrack C, Houde CM. 2004. Genetically distant American canine distemper virus lineage have recently caused epizootics with somewhat different characteristics in raccoons living around a large suburban zoo in USA. *Virology Journal*. 1: 1-14.
64. Lilenbaum W, Monteiro RV, Ristow P, Fraguas S, Cardoso VS, Fedullo LPL. 2002. Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. *Research in Veterinary Science*. 73: 319-321.
65. Lyls AM, Dobson AP. 1993. Infectious disease and intensive management: population dynamics, threatened hosts, and their parasites. *Journal Zoo of Wildlife Medicine*. 24: 313-326.
66. MacPhee RDE, Flemming. 1999. Requiem æternam: the last five hundred years of mammalian species extinctions. En: MacPhee R.D.E. (ed.) *Extinctions in the near time. Causes, contexts and consequences*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
67. Mandell G, Douglas G & J Bennett. 1992. *Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica*. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
68. Marcogliese DJ. 2005. Parasites of the superorganism: Are they the indicators of ecosystem health?. *International Journal of Parasitology*. 35: 705–716.
69. Martens P. 1999. How climate change affects human health?. *American Science*. 87: 534-541.
70. Martínez Cl., Tun-Chim JE., Moo-Canul MA. 2004. Cozumel: Vision de la problemática social. Universidad de Quintana Roo, Fundación Aviomar.
71. Martínez-Morales MA 1996. The Cozumel curassow: abundance, habitat preference and conservation. Tesis de maestría. Universidad de Cambridge, U.K.

72. Martínez-Morales MA, Cuarón AD. 1999. *Boa constrictor*, an introduced predator threatening the endemic fauna on Cozumel Island, México. *Biodiversity and Conservation*. 8: 957-963.
73. McDonough PL. 2001. Leptospirosis en caninos, estado actual. *In: Recent Advances in Canine Infectious Diseases*, Carmichael L. (Ed.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org).
74. McFadden K.W., Wade S.E., Dubovi E.J., Gompper M.E. 2005. A Serology and fecal parasitology survey of the critically endangered pygmy raccoon (*Procyon pygmaeus*). *Journal of Wildlife Disease*. (41)3: 615-617.
75. McFadden K.W. 2004. The Ecology, Evolution and Natural History of the Endangered Carnivores of Cozumel Island, Mexico. Degree of Doctor of Philosophy. Columbia University. 148 p.
76. Mikaelian I, Higgins R, Lequent M, Major M, Lefebvre F, Martineau D. 1997. Leptospirosis in raccoons in Quebec: 2 reports and seroprevalence in a recreational area. *Canadian Veterinary Journal*. 38: 440-442.
77. Mitchell MA, Hungerford LL, Nixon C, Esker T, Sullivan J, Koerkenmeier R, Dubey JP. 1999. Serologic survey for selected infectious disease agents in raccoons from Illinois. *Journal of Wildlife Diseases*. 35: 347-355.
78. Myers DM., Martínez. 1985. Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la Leptospirosis. Centro Panamericano de Zoonosis. OPS. Nota técnica No. 39. 46 p.
79. Navarro-Ramirez MG. 2005. Conocimientos y percepciones sobre la fauna por los habitantes de la Isla Cozumel. Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara. Jal. Mx. 88p.
80. Nester E, Roberts E, Pearsall N & B McCarthy. 1978. *Microbiology*. Holt, Rinehart and Winston. USA.
81. Nielsen L. 1999. Chemical immobilization of wild and exotic animals. Iowa State Press. Iowa, USA. 342 p.

82. Noon TH, Heffelfinger JR, Olding RJ, Wesche SL, Reggiardo C. 2003. Serologic survey for antibodies to canine distemper virus in collared peccary (*Tayasu tajacu*) populations in Arizona. *Journal of Wildlife Disease*. 39: 221-223.
83. Nuñez OL. 1998. Exploración clínica: Métodos y técnicas de diagnóstico. Módulo 1. Diplomado a distancia en cirugía y zootecnia en perros y gatos. 2ª Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México D.F. 316 p.
84. Peterson Mj, 1991. Wildlife parasitism, science, and management policy. *J Wild Mgmt*. 55: 782-789.
85. Plank R, Dean D. 2000, Overview of the epidemiology, microbiology, and patogénesis of *Leptospira* spp. in humans. Review. *Microbes and Infection*. 2: 1265 – 1276.
86. Prescott JF., Key D., Osuch M. 1999. Ontario, Leptospirosis in dogs. *Canadian Veterinary Journal*. 40: 431-432.
87. Reid JB, Chantrey D, Davie C. 1984. Eliminatory behavior of domestic dogs in an urban environment. *Applied Animal Behavior Science*. 12: 279 -287.
88. Ribotta M., Fortín M., Higgins R. 2000. Québec, Canine leptospirosis : serology. *Canadian Veterinary Journal*. 41: 494-495.
89. Richardson DJ, Gauthier JL. 2003. A serosurvey of leptospirosis in Connecticut peridomestic Wildlife. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*. 3: 187-193.
90. Romero-Nájera I. 2004. Distribución, abundancia y uso de hábitat de *Boa constrictor* introducida a la Isla Cozumel. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
91. Romero-Nájera., Cuarón AD., González Baca C. 2007. Distribution, abundance, and habitat use of introduced *Boa constrictor* threatening the native biota of Cozumel Island México. *Biodiversity Conservation*.

92. Rubel D., Seijo A., Cernigoi B., Viale A. y Wisnivesky-Colli C. 1997. *Leptospira interrogans* en una población canica del Gran Buenos Aires: variables asociadas con la seropositividad. Revista Panamericana Salud Publica/ Pan Am J Public Health 2:102-106.
93. Rubin H, Beck AM. 1982. Ecological behaviour of free-ranging urban pet dogs. Applied Animal Ethology. 8: 161-168.
94. Saito TB., Alfieri AA., Wosiacki SR., Negrao FJ., Morais HSA., Alfieri AF. 2006. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase Chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. Research in veterinary science. 80: 116-119.
95. Saliki JT., Cooper EJ., Gustavson JP. 2002. Emerging Morbillivirus infections of marine mammals. Development of two diagnostic approaches. Annals of the New York Academy of Sciences. 969: 51-52.
96. San Martín H., Salud y enfermedad. 1981. México D.F. La Prensa Médica Mexicana.
97. Scott MD, Causey K. 1973. Ecology of feral dogs in Alabama. Journal of Wildlife Management. 37: 253-265.
98. Senior F.D. 1997. Novedades en urología aplicada a la clínica de perros y gatos. AMVEPE.
99. Suzán A. 1998. Rabia, toxoplasma y parvovirus en mamíferos silvestres de dos reservas del Distrito Federal. Tesis de maestría en ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 68 p.
100. Suzán A, Maldonado GF, Ceballos G. 2000. La importancia del estudio de enfermedades en la conservación de fauna silvestre. Veterinaria México. 31: 3. 223-230.
101. Tershy BR., Bourillón L., Metzler L., and Barnes J. 1999. A survey ecotourism on islands in northwestern México. Environmental Conservation. 26:3. 212-217.

102. Torres PV. 2006. Distribución, abundancia y comportamiento de perros y gatos en la Isla de Cozumel. Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 131p.
103. Vargas GR, Cárdenas LJ. 1996. Epidemiología de la rabia. Situación actual en México. *Ciencia Veterinaria*. 7: 332 - 358.
104. Vargas GR. 2000. Términos de uso común en epidemiología veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México. 155p.
105. Von Messling V, Harder TC, Moennig V, Rautenberg P, Nolte I, Haas L. 1999. Rapid and sensitive detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:1049-1056.
106. Von Messling V., Springfield C., Devaux P., Cattaneo R. 2003. A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *Journal of virology*. 77:23. 12579-1259
107. Ward MP. 2002. Clustering of reported cases of leptospirosis among dogs in the United States and Canada. *Preventive Veterinary medicine*. 56: 215 – 226.
108. Ward MP. 2002. Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall. *Preventive Veterinary Medicine*. 56: 203-213.
109. Wayne DW. 2004. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias biológicas. 4ª edición. Ed. Limusa Wiley.
110. Weekes CC, Everard COR, Levett PN. 1997. Seroepidemiology of canine leptospirosis on the Island of Barbados. *Veterinary Microbiology*. 51: 215-222.

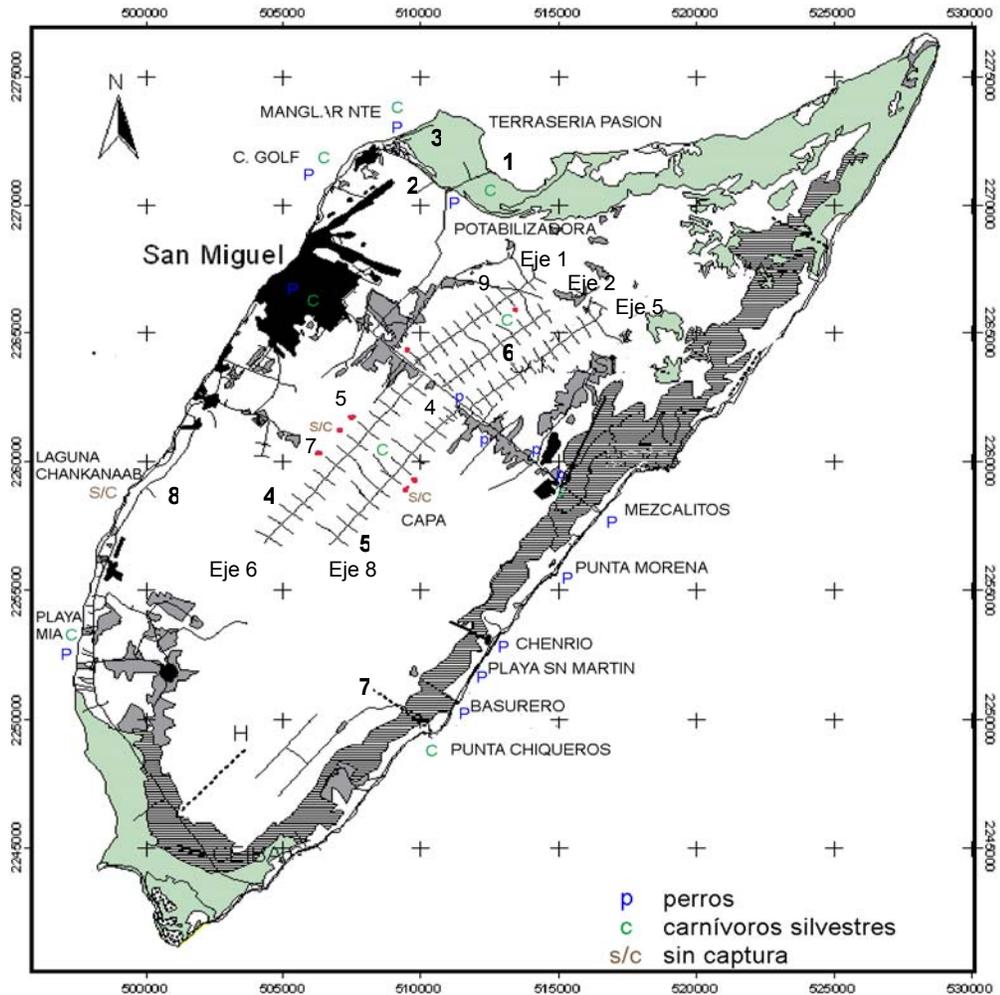
111. WHO. 1990. Guidelines for dog population management. World Health Organization (WHO) and the World Society for the Protection of Animals. Geneva.
112. Williams ES, and Barker KI: 2001. Infectious diseases of wild mammals. 3a Ed. Iowa State University Press/ Ames. 558 p.
113. Wilson DE., Cole FR., Nicholes JD., Pudran R. y Foster MS. (eds). 1996. Measuring and monitoring biological diversity: estándar methods for mammals. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
114. Woldehiwet Z. 2002. Rabies: recent developments. Research in Veterinary Science. 73: 17-25.
115. Woolhouse MEJ. 2002. Population biology of emerging and re-emerging pathogens. Trends in Microbiology. 10:10. 3-7.

CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Sitios de muestreo, ubicación y esfuerzo de muestreo para capturar mamíferos silvestres (número de trampas, días de observación y trampas noche).

Sitio	Lugar	No. de trampas	Días activas	Trampas noche
1	Camino de terrasería a Isla de la Pasión	40	8	320
2	Cozumel Country Club	60 / 57	7	405
3	Manglar N	10	8	80
4	Capa Sur eje 6 cruce 4, 5 y 7	40	8	320
5	Capa Sur eje 8 cruces 4 y 5	59	8	472
6	Capa Norte eje 1, cruce 9	10	4	40
7	Costa Este (Punta Chiqueros)	20	4	80
8	Costa Oeste (frente al parque Chankanaab)	20 / 19	4	78
TOTAL		259	51	1795

Después de dos días de trampeo en el campo de golf se extraviaron 3 trampas por lo que durante 5 días de observación se trabajó con 57 trampas en vez de 60. De manera similar sucedió en la Costa Oeste donde por dos días no se contó con una trampa.



Modificado de Romero, 2004

Figura 1. Isla Cozumel. Sitios de trapeo y captura de perros y carnívoros silvestres. Descripción grafica del sitio de trapeo y captura de perros y carnívoros silvestres en Cozumel; La P representa los sitios donde se capturaron perros, la letra C donde fueron capturados carnívoros silvestres; S/C son los sitios donde se trapeo y no se obtuvieron capturas, los puntos en la zona de (CAPA) muestran los sitios donde se ubicaron trampas.

Cuadro 2. Categorización de los sitios de captura en ambientes geográficos.

AMBIENTE GEOGRÁFICO	SITIO DE CAPTURA
Manglar	Camino a la Isla de la Pasión (mangle rojo) y Manglar del Norte (mangle blanco)
Transición manglar – selva mediana subcaducifolia	Cozumel Country Club y Costa Oeste (transición manglar – selva mediana)
Selva mediana subcaducifolia	CAPA sur y CAPA norte (Selva mediana subcaducifolia)
Transición tasistal – selva baja caducifolia	Costa Este (Transición tasistal – selva baja caducifolia)
Influencia humana (transformado)	Ciudad (urbano), carretera transversal (rural), restaurantes (dunas costeras), basurero

Cuadro 3. Serovariedades pertenecientes a la colección del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, utilizadas en la prueba de Aglutinación Microscópica (MAT) de este estudio.

<i>Australis</i>
<i>Autumnalis</i>
<i>Ballum castelloni</i>
<i>Ballum mus</i>
<i>Bataviae bataviae</i>
<i>Bataviae vantienen</i>
<i>Bratislava</i>
<i>Canicola</i>
<i>Celledony</i>
<i>Cynoptery</i>
<i>Djassiman</i>
<i>Grippotyphosa (L. kirschneri)</i>
<i>Hardjobovis</i>
<i>Hardjoprajitno</i>
<i>Icterohaemorrhagiae</i>
<i>Javanica</i>
<i>Mozdok</i>
<i>Panama</i>
<i>Pomona</i>
<i>Pyrogenes</i>
<i>Sejroe</i>
<i>Tarassovi</i>
<i>Wolffi</i>

Cuadro 4. Numero de animales capturados y muestreados por ambiente geográfico.

ESPECIE	TRANSICIÓN			TRANSICIÓN		INFLUENCIA HUMANA (TRANSFORMADO)	TOTAL
	MANGLAR	MANGLAR - SELVA MEDIANA	SUBCADUCUFOLIA	TASISTAL - SELVA BAJA CADUCIFOLIA			
Mapache enano (<i>Procyon pygmaeus</i>)	26	11	2				39
Pizote de Cozumel (<i>Nasua nelsoni</i>)			1				1
Pizote (<i>Nasua narica</i>)						6	6
Martucha (<i>Potos flavus</i>)		1				1	2
Tlacuache (<i>Didelphis marsupialis</i>)				1			1
Armadillo (<i>Dasyus novemcinctus</i>)			1				1
Tigrillo (<i>Leopardus wiedii</i>)		1					1
Perro (<i>Canis familiaris</i>)	5	2				34	41
TOTAL	31	15	4	1		41	92

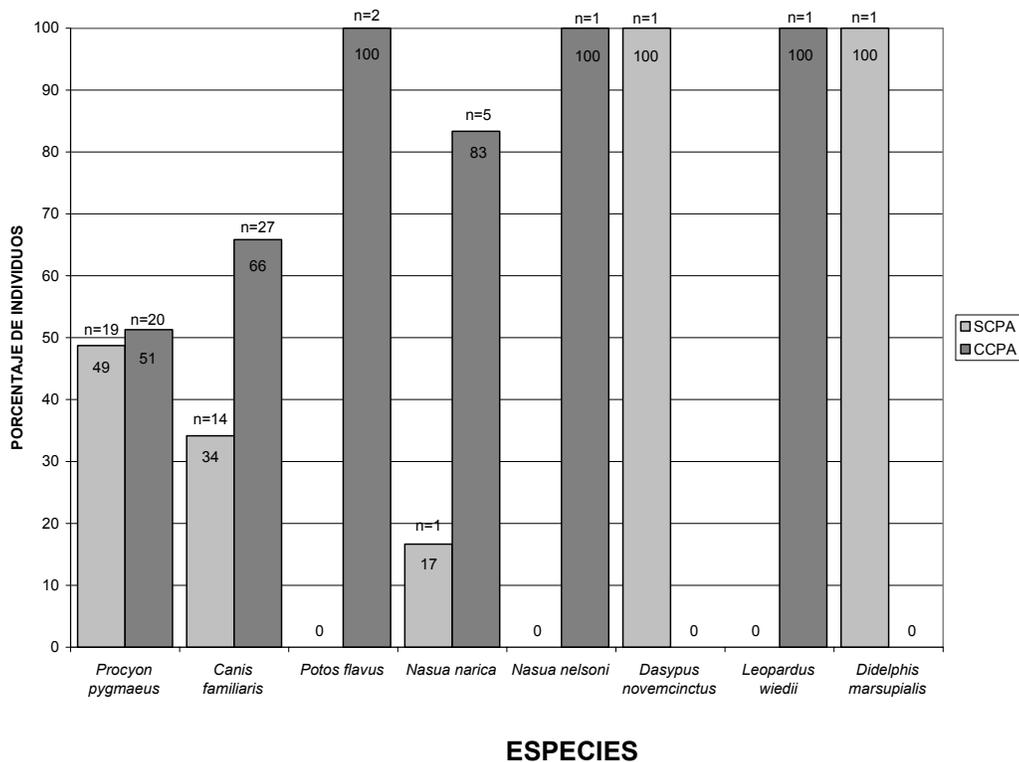
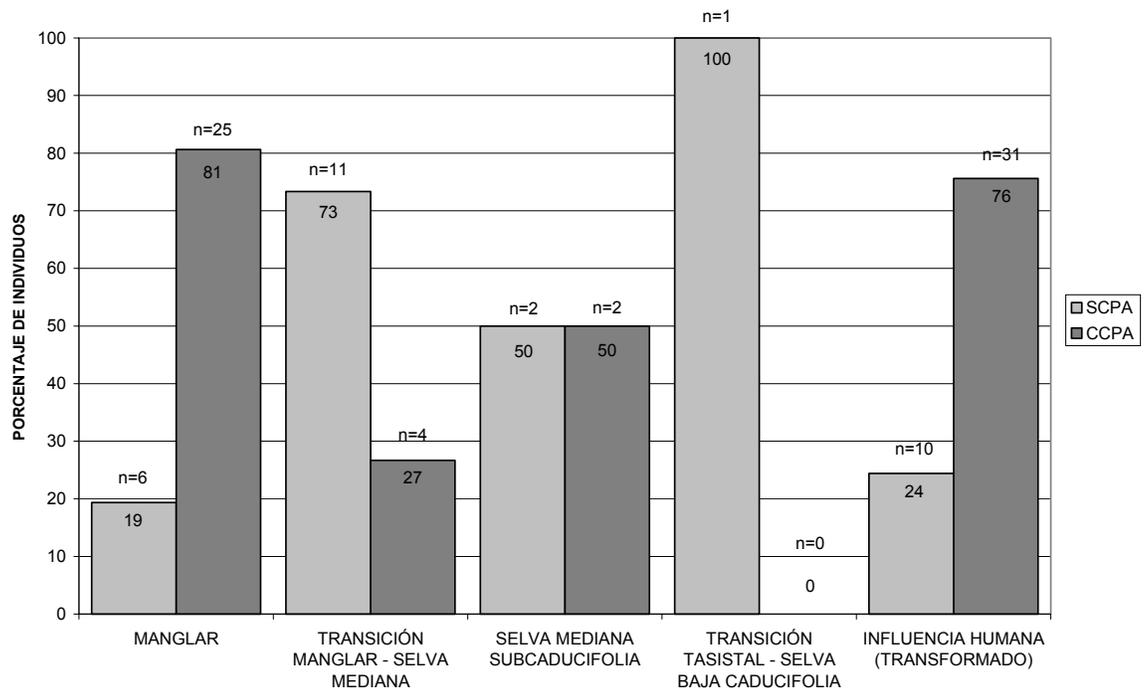


Figura 2. ESTADO GENERAL DE SALUD POR ESPECIE AL MOMENTO DEL MUESTREO. SCPA= SIN CAMBIOS PATOLÓGICOS APARENTES, CCPA= CON CAMBIOS PATOLÓGICOS APARENTES.



ZONAS DE MUESTREO

Figura 3. ESTADO DE SALUD DE LOS ANIMALES MUESTREADOS EN CADA ZONA. SCPA= SIN CAMBIOS PATOLOGICOS APARENTES, CCPA= CON CAMBIOS PATOLOGICOS APARENTES.

Cuadro 5. Relación entre sitio, especie y serovar de los animales con títulos en el estudio

Sitio	Especie	Serovares													
		Autumn	Austral	B.castell	Ball.mus	Bratis	Canicola	Celledony	Grippotyp	Hard.bov.	Hard.praj.	Mozdok	Panama	Pyrog	Wolffi
1	Mapache		01:40												
1	Mapache														01:20
1	Mapache		01:40			01:40						01:20			
1	Mapache								01:20			01:20	01:20		
1	Mapache						01:20	01:40							
2	Mapache		1:20			1:20									
2	Mapache							1:40							
2	Mapache							1:20							
2	Mapache						1:20								
2	Mapache					1:20					1:20				
2	Mapache	1:80				01:20		1:20			1:20				
2	Mapache						1:20								
2	Mapache						1:20				1:40				
2	Mapache					1:40	1:20								
2	Mapache	1:80													
3	Mapache		1:40							1:40					
2	Mapache									1:40					
2	Mapache	1:40													
1	Perro									1:160					
5	Perro		01:40								01:20				
5	Perro								1:40					1:40	
5	Perro			1:640											
5	Perro			1:1280		1:20	1:40			1:20					
2	Perro	1:160													
5	Perro	1:80								1:40	1:20				
2	Perro	1:20								1:20					
2	Perro	1:20													
5	Perro												1:20		
5	Perro				1:20										
5	Perro			1:40										1:20	
5	Perro		1:20	1:40	1:20	1:20									
4	Perro			1:40											
4	Perro			1:80											
4	Perro							1:320							
4	Perro			1:80	1:40										
4	Perro			1:80				1:320							
4	Perro	1:40													
5	Perro		1:20							1:40	1:20				
5	Perro									1:20					
5	Perro			1:20											
5	Perro								1:20						
5	Perro	1:40													
3	Armadillo	1:160													

Sitio 1. Transición manglar - selva mediana

Sitio 2. Manglar

Sitio 3. Selva mediana

Sitio 4. Transición tasistal - selva baja caducifolia

Sitio 5. Influencia humana (transición)

EN COLOR SE MUESTRAN LOS ANIMALES CON TÍTULOS POSITIVOS (≥100) EN EL ESTUDIO

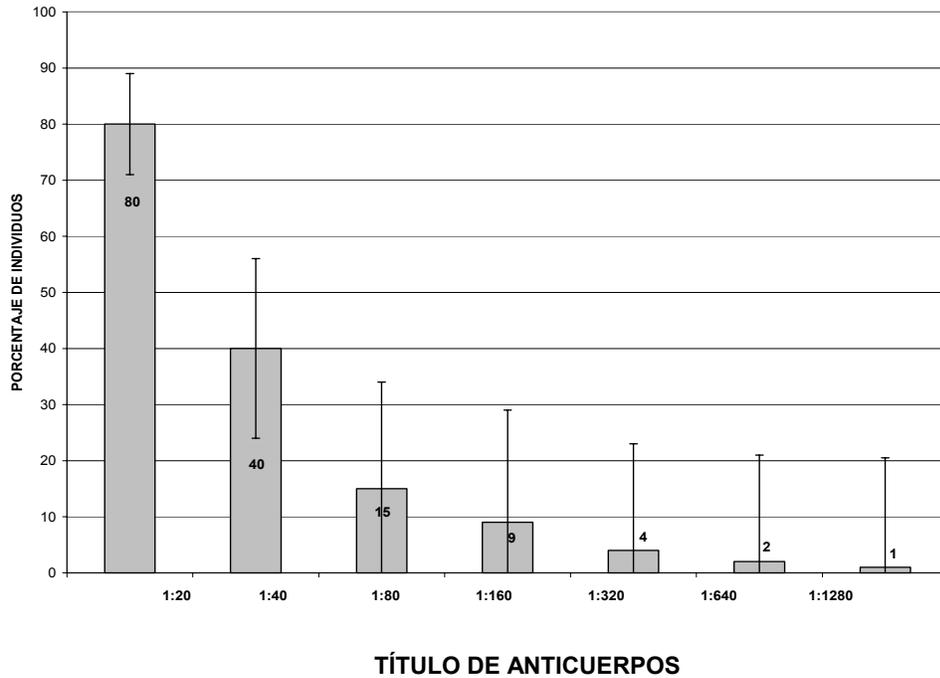


Figura 4. PREVALENCIA DE *Leptospira* spp. POR TITULO DE ANTICUERPOS DE LOS 92 ANIMALES MONITOREADOS.

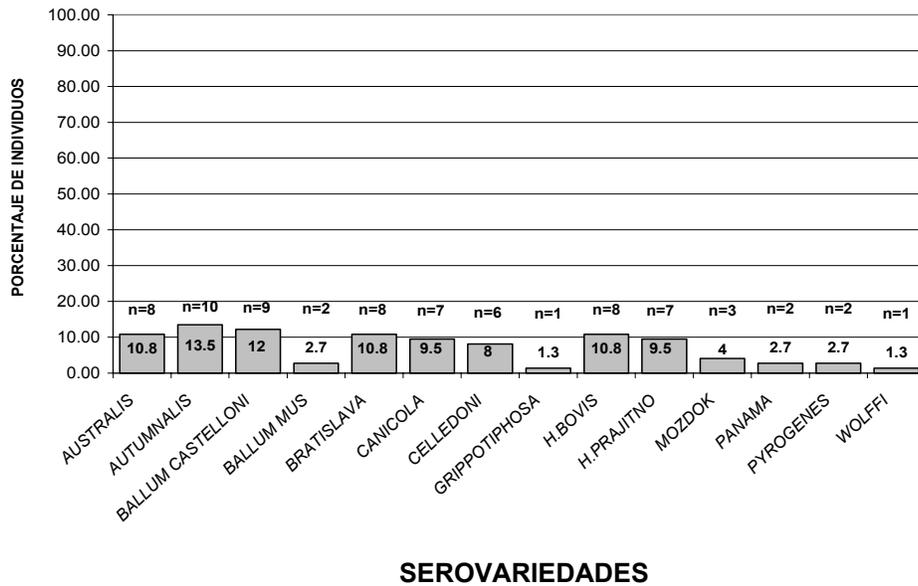


Figura 5. PORCENTAJE Y TIPO DE SEROVARIEDADES DE *Leptospira* ENCONTRADOS EN LOS 92 SUEROS ANALIZADOS EN ESTE ESTUDIO

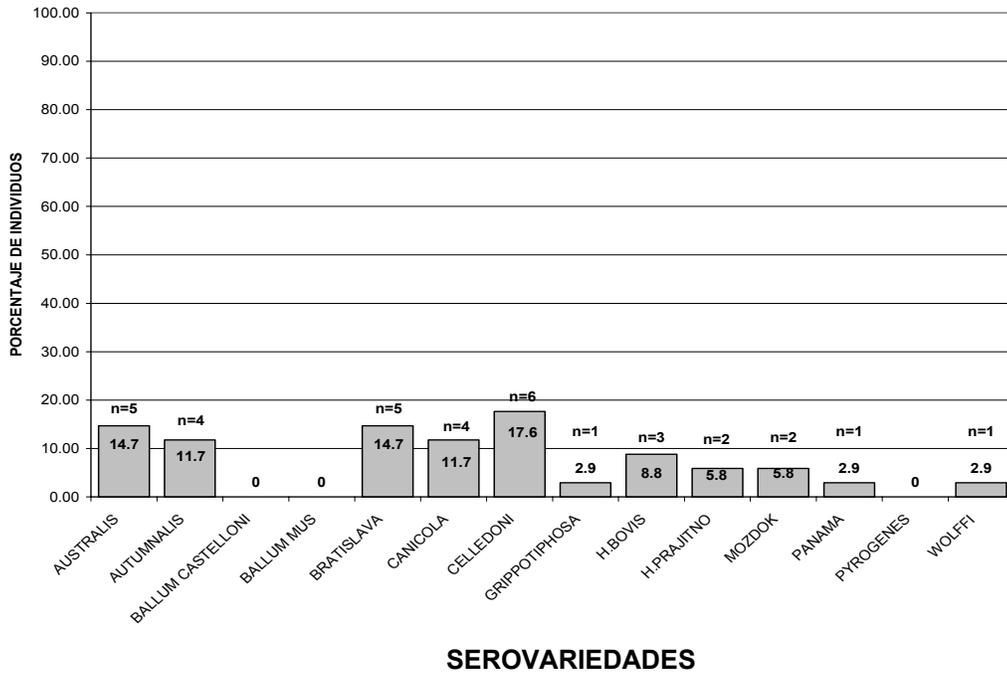


Figura 6. PORCENTAJE Y TIPO DE SEROVARIEDADES DE *Leptospira* PRESENTES EN MAMIFEROS SILVESTRES EN LA ISLA COZUMEL

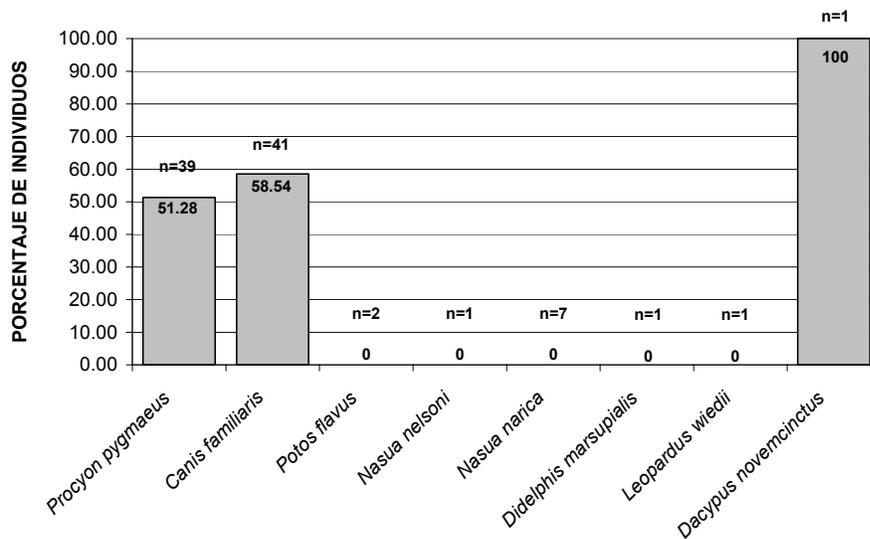
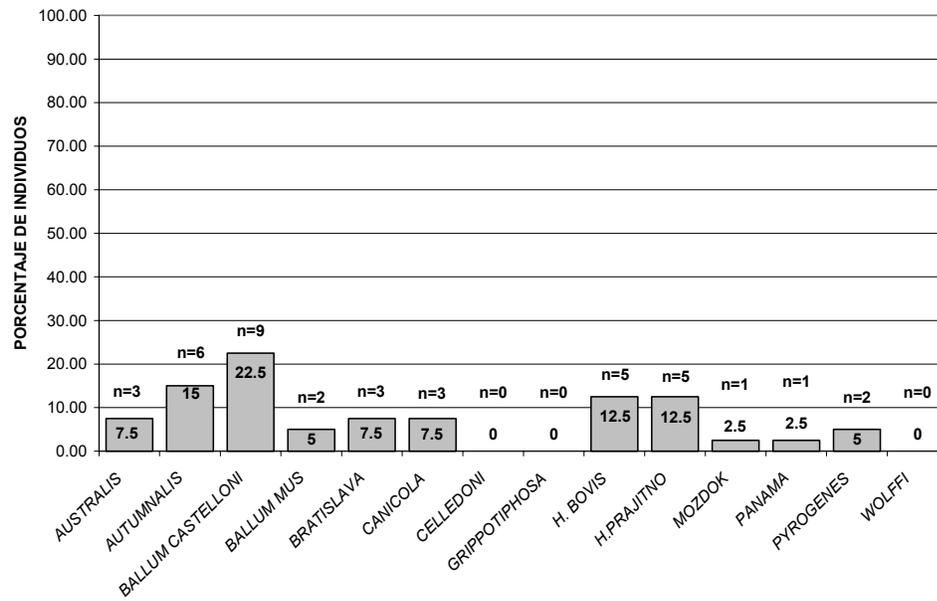


Figura 7. SEROPREVALENCIA DE *Leptospira* spp. ENCONTRADA EN LAS DIFERENTES ESPECIES MUESTREADAS EN EL ESTUDIO.



SEROVARIEDAD

Figura 8. PORCENTAJE DE INDIVIDUOS Y TIPO DE SEROVARIEDADES DE *Leptospira* PRESENTES EN PERROS (*Canis familiaris*).

Cuadro 6. Relación entre sitio de muestreo, especie, serovariedad y concentración de anticuerpos. Los títulos de anticuerpos $\geq 1:100$ representan a las especies consideradas sero-positivas en este estudio y los títulos $\geq 1:50$ a las especies con anticuerpos residuales de infección pasada o de reciente formación.

SITIO	ESPECIE	SEROVARIEDAD	CONCENTRACIÓN
1	<i>Procyon pygmaeus</i>	<i>Autumnalis</i>	1:80
1	<i>Procyon pygmaeus</i>	<i>Autumnalis</i>	1:80
1	<i>Canis familiaris</i>	<i>Autumnalis</i>	1:160
2	<i>Procyon pygmaeus</i>	<i>Australis</i>	1:160
2	<i>Canis familiaris</i>	<i>Hardjo bovis</i>	1:160
4	<i>Dasyopus novemcinctus</i>	<i>Autumnalis</i>	1:160
5	<i>Canis familiaris</i>	<i>Ballum Castelloni</i>	1:80
5	<i>Canis familiaris</i>	<i>Ballum Castelloni</i>	1:80
5	<i>Canis familiaris</i>	<i>Ballum Castelloni</i>	1:80
5	<i>Canis familiaris</i>	<i>Canicola</i>	1:320
5	<i>Canis familiaris</i>	<i>Canicola</i>	1:320
5	<i>Canis familiaris</i>	<i>Ballum Castelloni</i>	1:640
5	<i>Canis familiaris</i>	<i>Ballum Castelloni</i>	1:1,280
5	<i>Canis familiaris</i>	<i>Autumnalis</i>	1:80

Sitio 1. Manglar

Sitio 2. Transición manglar selva mediana

Sitio 3. Transición tasistal – selva baja caducifolia

Sitio 4. Selva mediana subcaducifolia

Sitio 5. Influencia humana (transformado)

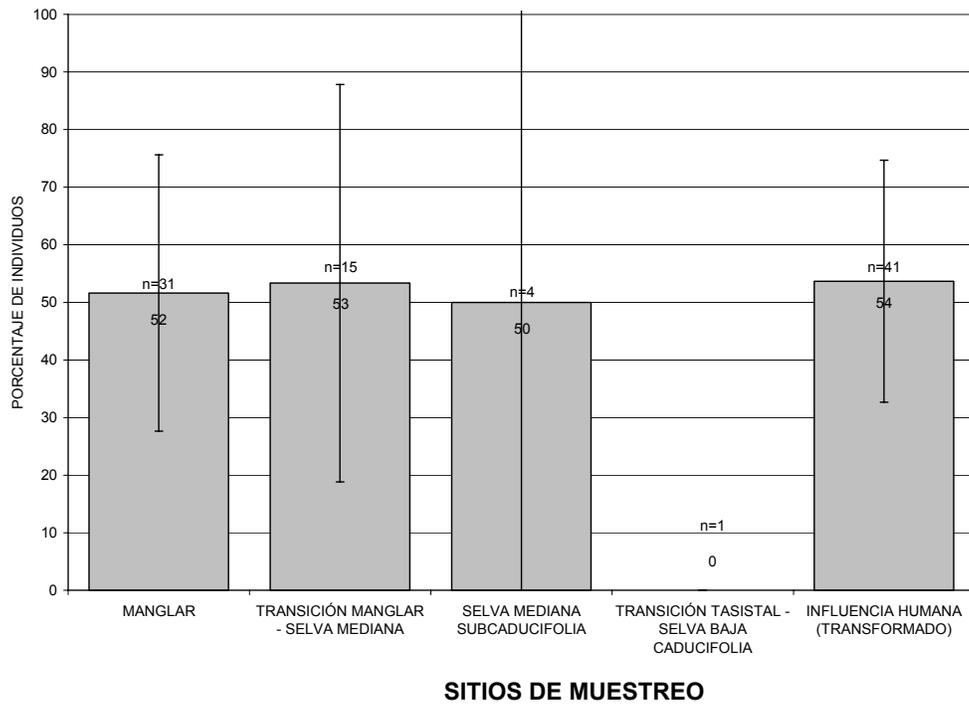


Figura 9. SEROPREVALENCIA DE *Leptospira* spp. ENCONTRADA EN LOS 5 SITIOS DE MUESTREO.

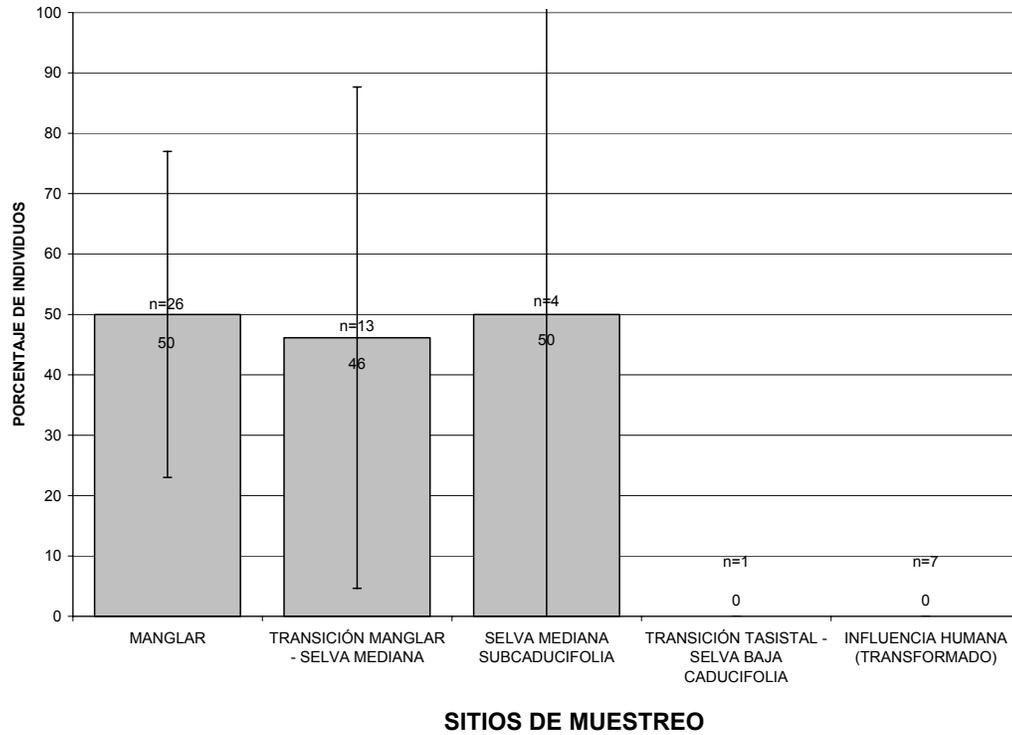
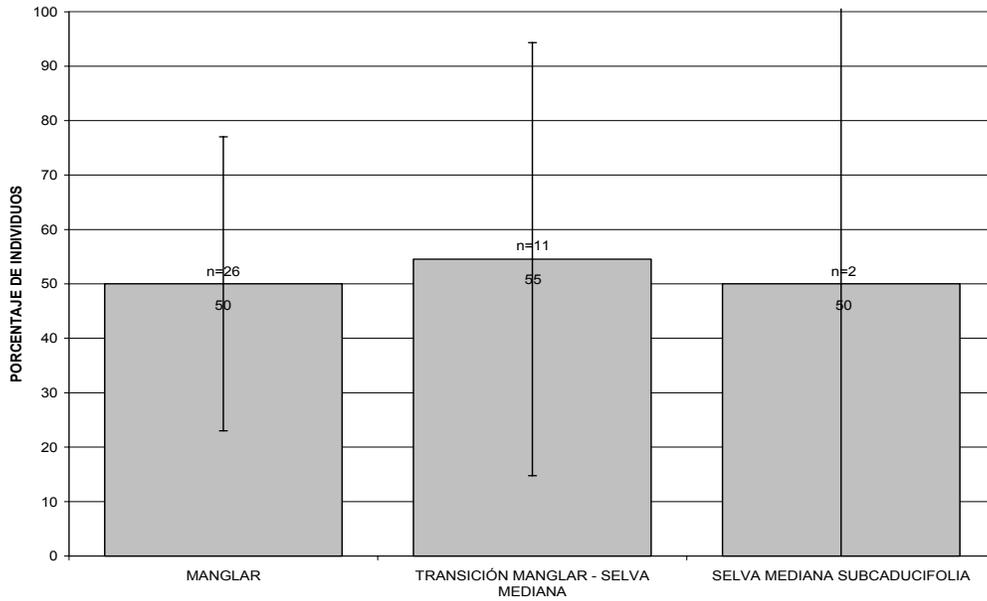
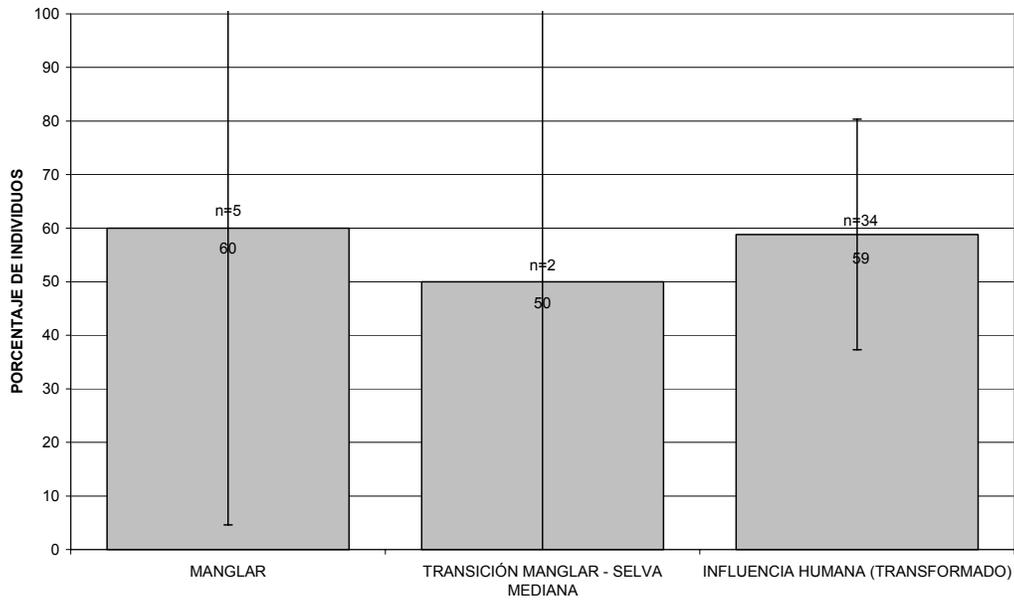


Figura 10. SEROPREVALENCIA DE *Leptospira* spp. EN MAMÍFEROS SILVESTRES EN LAS DIFERENTES ZONAS DE MUESTREO.



SITIOS DE MUESTREO

Figura 11. SEROPREVALENCIA DE *Leptospira* spp. EN MAPACHES (*Procyon pygmaeus*) EN LOS SITIOS DE CAPTURA.



SITIO DE MUESTREO

Figura 12. SEROPREVALENCIA DE *Leptospira* spp. EN PERROS (*Canis familiaris*) EN LAS DIFERENTES ZONAS DE MUESTREO DE LA ISLA COZUMEL.

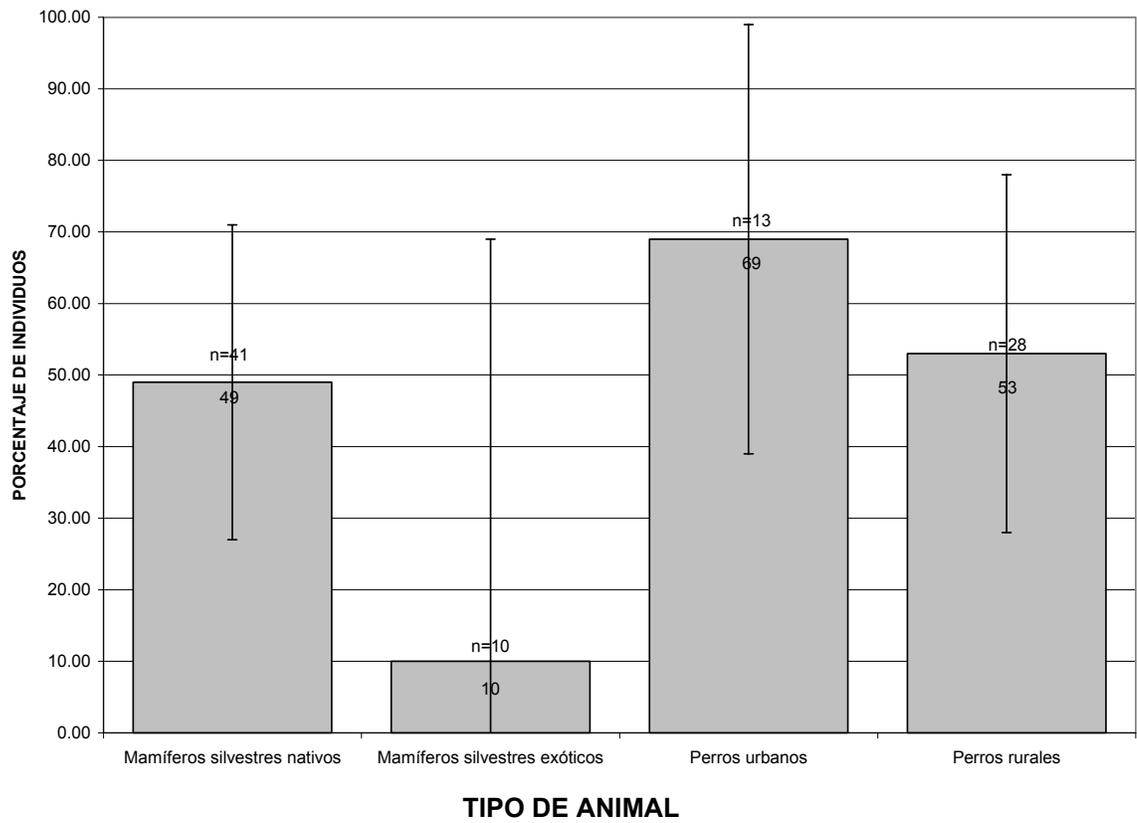


Figura 13. SEROPREVALENCIA DE *Leptospira* spp. EN LOS 92 INDIVIDUOS MUESTREADOS, AGRUPADOS EN MAMÍFEROS SILVESTRES.

Cuadro 7. Identificación de los cultivos positivos de sangre y orina en la prueba de PCR para *Leptospira* realizada a los 92 animales.

Número de caso	Especie	Sitio de captura	Origen del cultivo amplificado
25	<i>Procyon pygmaeus</i>	1	Sangre
27	<i>Procyon pygmaeus</i>	1	Orina
29	<i>Procyon pygmaeus</i>	1	Sangre
64	<i>Procyon pygmaeus</i>	1	Sangre
4	<i>Procyon pygmaeus</i>	2	Sangre
8	<i>Procyon pygmaeus</i>	2	Sangre
73	<i>Leopardus wiedii</i>	2	Orina
47	<i>Didelphis marsupialis</i>	3	Sangre
32	<i>Procyon pygmaeus</i>	4	Orina

Sitio 1. Manglar

Sitio 2. Transición manglar selva mediana

Sitio 3. Transición tasistal – selva baja caducifolia

Sitio 4. Selva mediana subcaducifolia

Sitio 5. Influencia humana (transformado)

Cuadro 8. Animales positivos a morbillivirus registrados mediante la prueba de RT-PCR a partir de glóbulos blancos.

Número de caso	Especie	Sitio de captura	Origen del amplificado
1	<i>Procyon pygmaeus</i>	transición manglar – selva mediana	Glóbulos blancos
9	<i>Canis familiaris</i>	transición manglar – selva mediana	Glóbulos blancos
17	<i>Canis familiaris</i>	Manglar	Glóbulos blancos
27	<i>Procyon pygmaeus</i>	Manglar	Glóbulos blancos
31	<i>Procyon pygmaeus</i>	Manglar	Glóbulos blancos
45	<i>Canis familiaris</i>	influencia humana (transformado)	Glóbulos blancos
46	<i>Canis familiaris</i>	influencia humana (transformado)	Glóbulos blancos
80	<i>Potos flavus</i>	influencia humana (transformado)	Glóbulos blancos

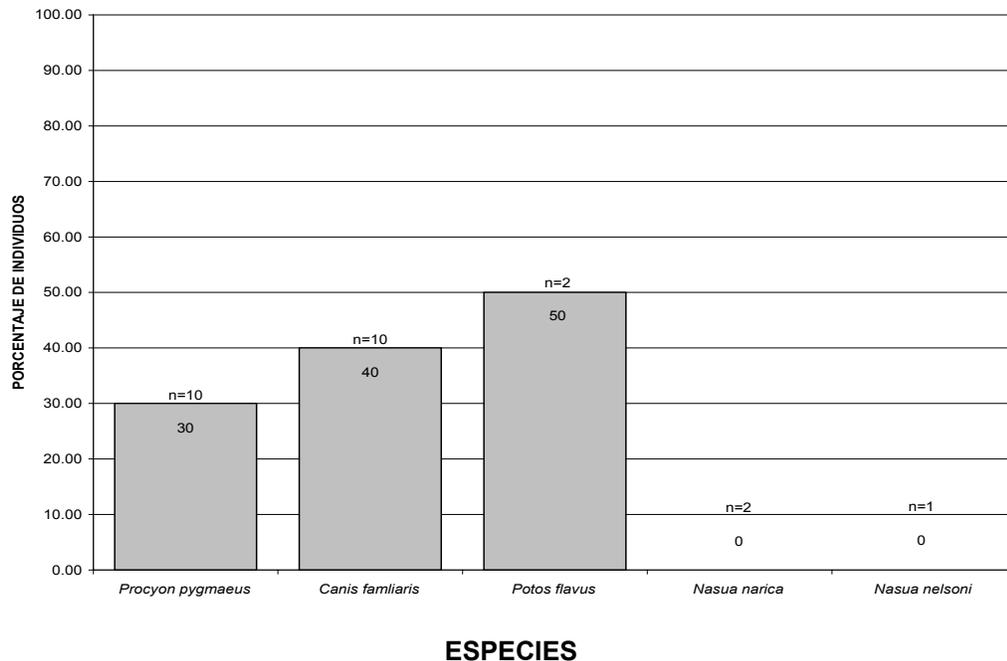


Figura 14. PORCENTAJE DE ANIMALES POSITIVOS POR ESPECIE A LA PRUEBA DE RT-PCR PARA MORBILLIVIRUS, A PARTIR DE GLÓBULOS BLANCOS DE LOS 25 ANIMALES SELECCIONADOS

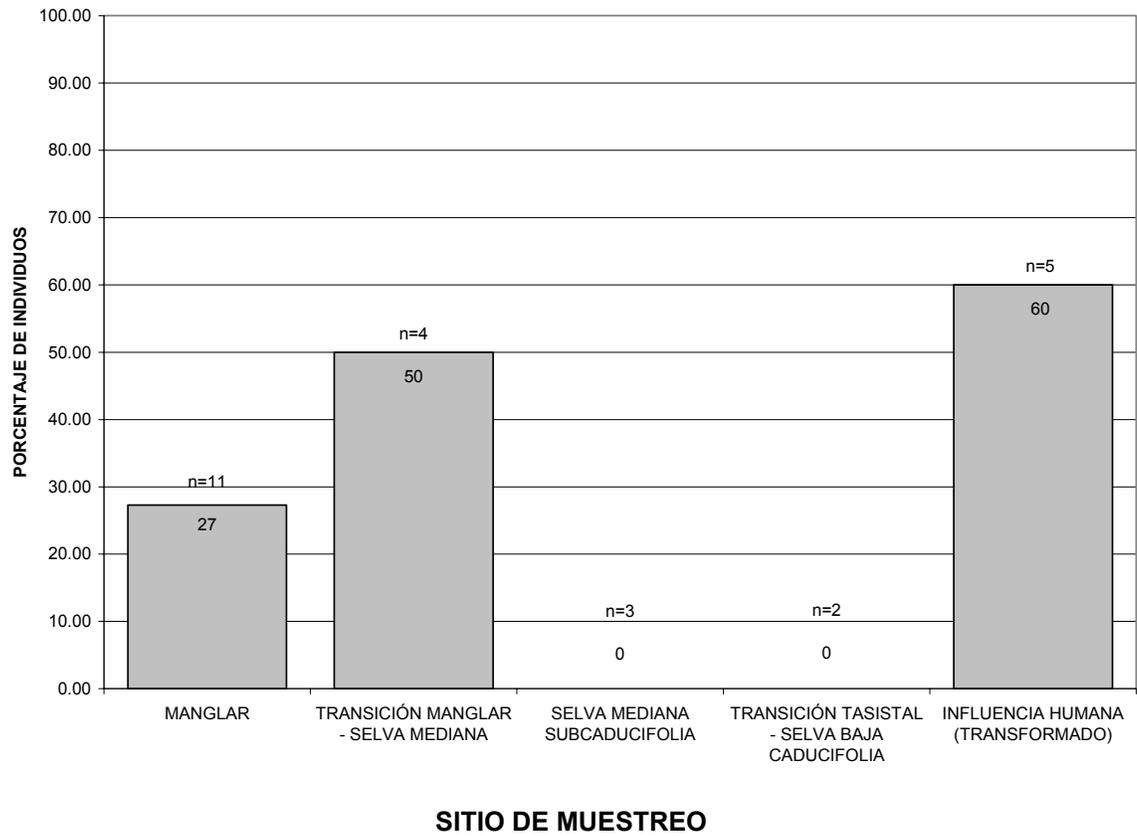


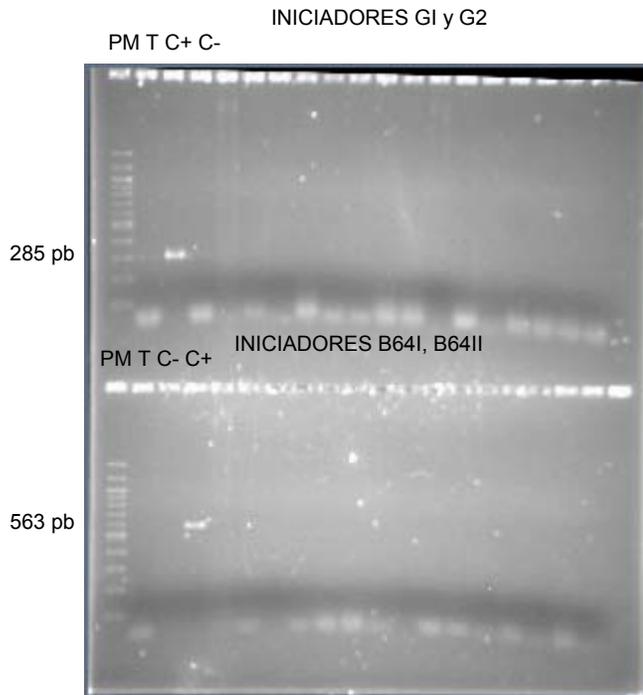
Figura 15. PORCENTAJE DE ANIMALES POSITIVOS POR ZONA DE MUESTREO A LA PRUEBA DE RT-PCR PARA MORBILLIVIRUS, A PARTIR DE GLÓBULOS BLANCOS DE LOS 25 ANIMALES SELECCIONADOS.

APENDICE I. FORMATO DE REGISTRO DE LOS ANIMALES CAPTURADOS

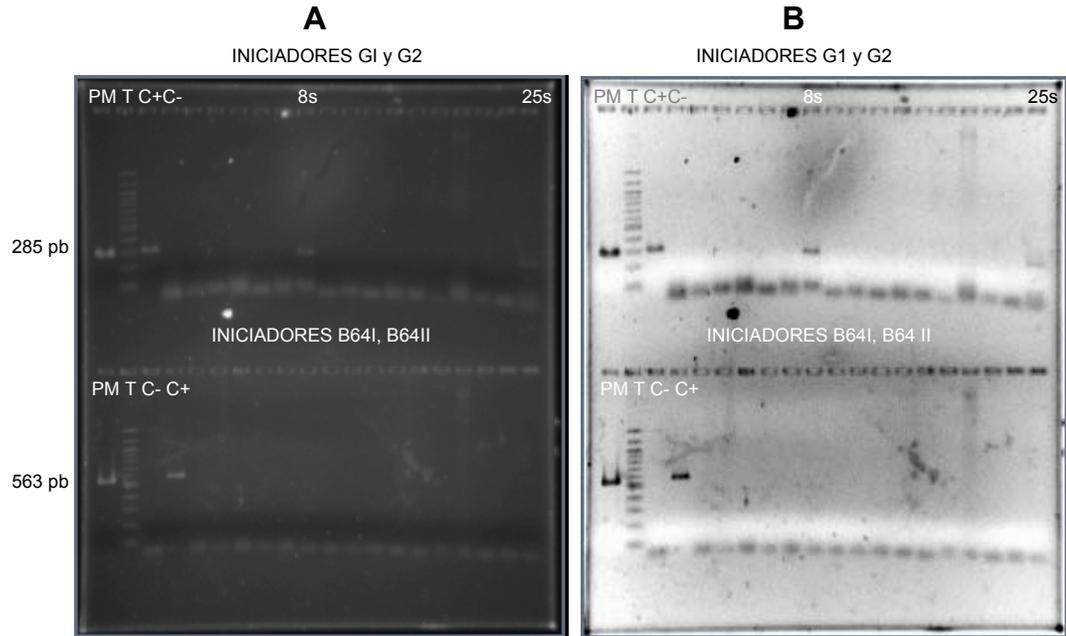
REGISTRO DE ANIMALES CAPTURADOS									
Lugar _____		No. de trampa _____		Fecha _____ 2008					
Procesado por _____		Recaptura _____ y _____							
Nombre científico _____				Nombre común _____					
SEXO _____		Edad C J A _____							
PESO _____		Cond. Corporal 1 2 3 4 5 _____							
ARETES: Derecho _____		Izquierdo _____		Marca temporal _____					
Anestesiautilizada _____		Dosis _____		Respuesta _____					
Comentarios _____									
Hora de inicio _____				Hora termino _____					
RECORD DE CONSTANTES FISIOLÓGICAS									
	Tiempo	F. cardiaca	F. respiratoria	Temperatura	Llenado capilar				
1	Inicio								
2	Intermedio								
3	Fin								
EXAMEN POR SISTEMAS									
Piel	Ojos	Oral	V.aerea	Card.	Linf.	Digest	Genuri	mucos	Nerv
Norm	Norm	Norm	Norm	Norm	Norm	Norm	Norm	Norm	Norm
Anorm	Anorm	Anorm	Anorm	Anorm	Anorm	Anorm	Anorm	Anorm	Anorm
No ex	No ex	No ex	No ex	No ex	No ex	No ex	No ex	No ex	No ex
Descripción de anomalías									

MUESTRAS OBTENIDAS EN CAMPO					No. Expediente				
Sangre con anticoagulante					Láminilla ocular				
Sangre sin anticoagulante					Hisopo ocular en medio viral				
Sangre EMJH					Hisopo vaginal o prepuccial en medio Stuart				
Sangre agua desionizada					Pedazo de oreja				
Orina					Pelo				
Orina EMJH					Parasitos externos				
Orina Agua desionizada					Heces				
MEDIDAS									
L. total	L. cola	L. cuello	Cint. pelvica	Cint. toracica	Alt. hombro	Alt. pierna			
V									
Pata izq.		Oreja		Colmillo sup.		Colmillo inf.		Cabeza	
Largo	Ancho	Largo	Ancho	Largo	Ancho	Largo	Ancho	Largo	Ancho

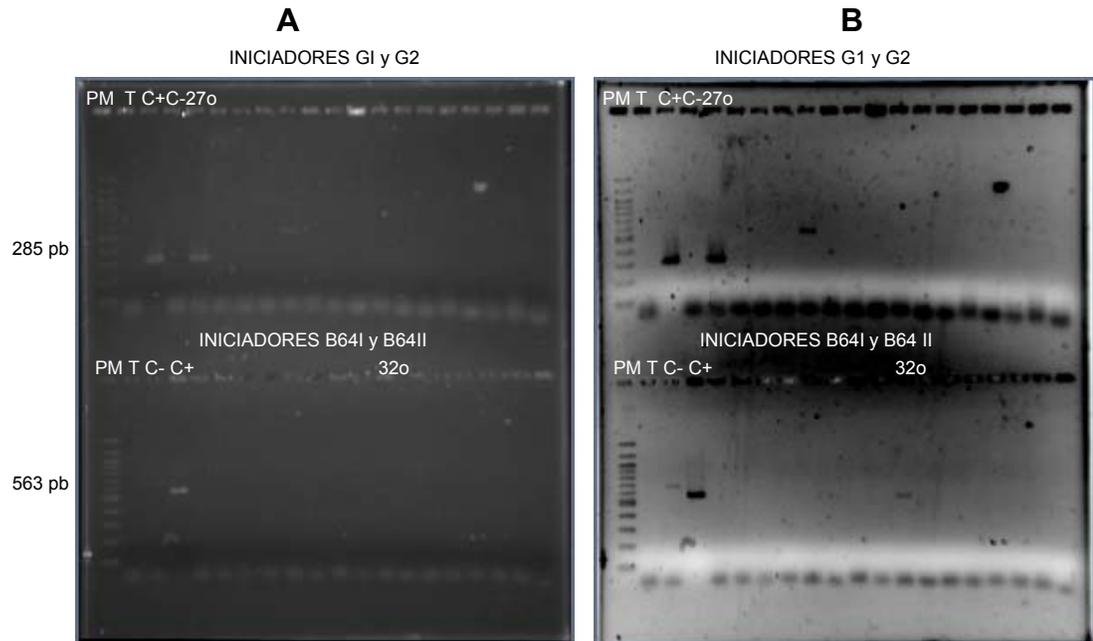
APENDICE II. RESULTADOS DEL PCR PARA *Leptospira* spp.



Comprobación de la amplificación de los controles positivos para *Leptospira interrogans* serovariedad *hardjo prajitno* 285 pb y *Leptospira kirschneri* serovariedad *gripphotiphosa* 563 pb).

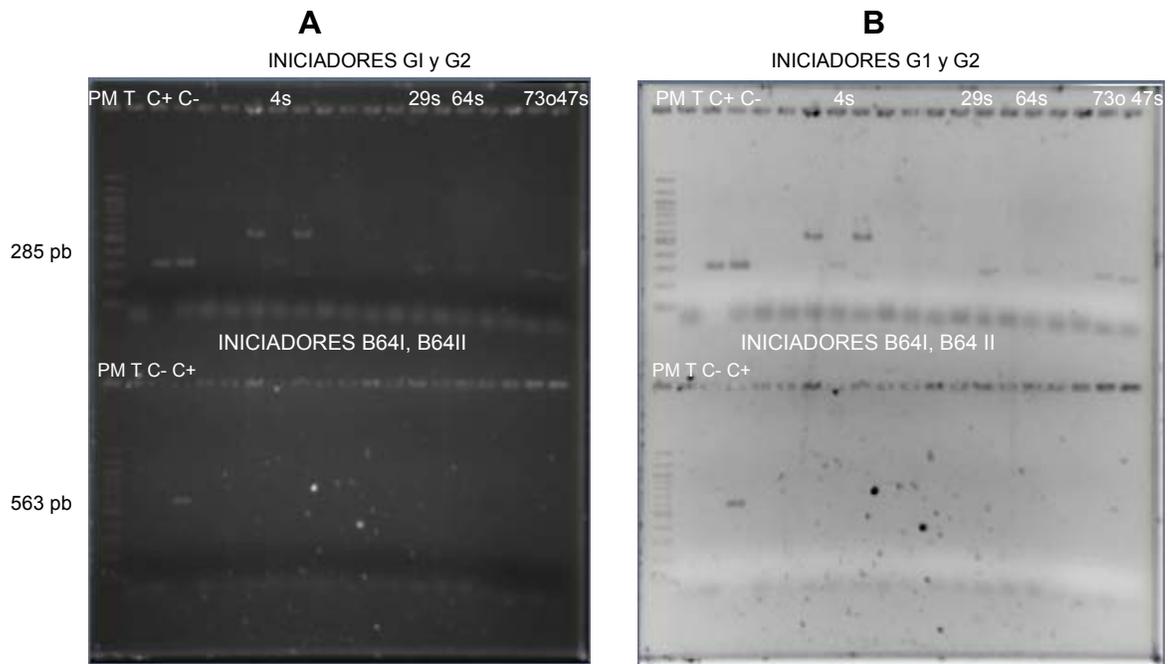


Amplificados a *Leptospira interrogans* de 2 cultivos de sangre (8S y 25S) pertenecientes a mapaches (*Procyon pygmaeus*) de la zona de manglar. (Las imágenes A y B son la misma, solo cambia el contraste del color para una mejor apreciación de los amplificados).



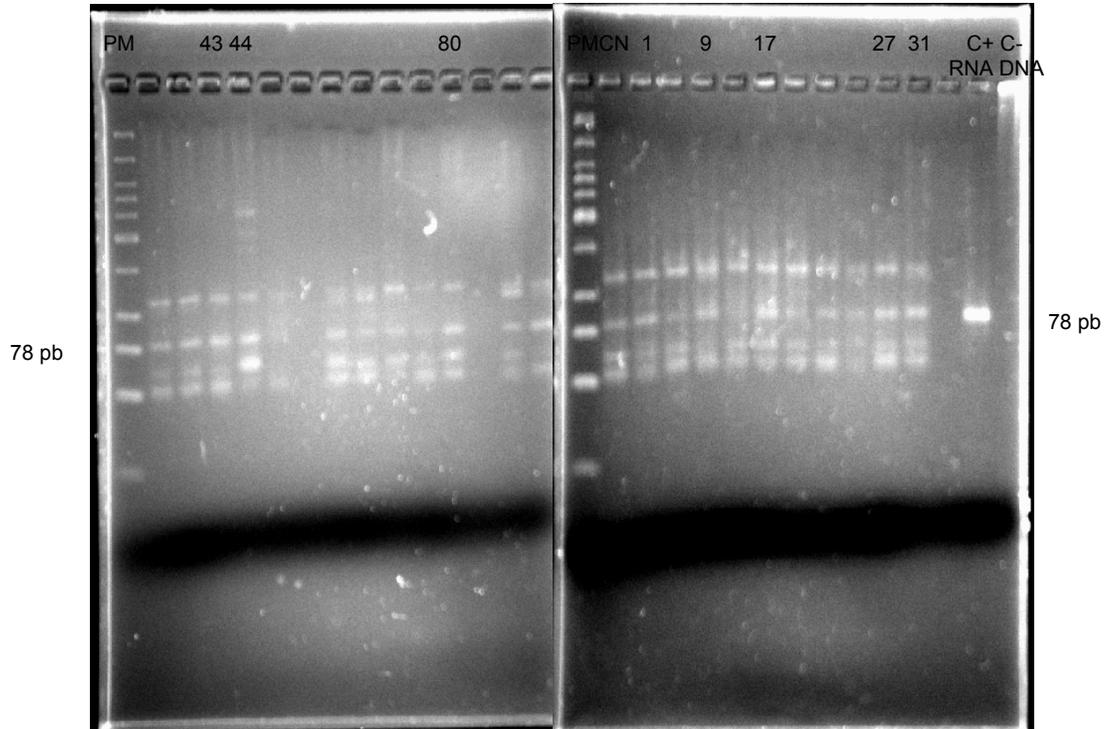
Amplificados a *Leptospira interrogans* (285 pb) y *Leptospira kirschneri* (563 pb) de 2 cultivos de orina (27-O y 32-O) pertenecientes a mapaches (*Procyon pygmaeus*) del manglar y selva mediana respectivamente.

(Las imágenes A y B son la misma, solo cambia el contraste del color para una mejor apreciación de los amplificados).



Amplificados a *Leptospira interrogans* (285 pb) de 5 cultivos, 3 de sangre (4S,29S,64S) pertenecientes a mapaches (*Procyon pygmaeus*) de la zona de transición manglar – selva mediana y manglar, 1 de orina (73-O) del tigrillo (*Leopardus wiedii*) de la zona de transición manglar – selva mediana y 1 de sangre (47S) del tlacuache (*Didelphys virginian*) de la selva mediana. (Las imágenes A y B son la misma, solo cambia el contraste del color para una mejor apreciación de los amplificadas).

APENDICE III. RESULTADOS DE RT-PCR PARA MORBILLIVIRUS



Amplificados a morbillivirus de ocho muestras de glóbulos blancos (43, 44, 80, 1, 9, 17, 27, 31) pertenecientes a tres mapaches, uno del sitio de transición manglar – selva mediana y dos del manglar, 4 perros, uno del sitio de transición manglar – selva mediana, uno del manglar, dos de la zona de influencia humana (transformado) y una martucha (*Potos flavus*) de la misma zona.