



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL**

**Seroprevalencia de rabia y *Leptospira* en poblaciones de perros de libre rango
(*Canis familiaris*) y tlacuaches (*Didelphis spp.*) que habitan dos reservas
ecológicas**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
Maestro en Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**PRESENTA
Pablo Andrés Arenas Pérez**

**TUTOR PRINCIPAL
Fernando Gual Sill
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM**

**COMITÉ TUTORAL
Juan Manuel Weber Rodríguez
El Colegio de la Frontera Sur, ECOSUR**

**Juan José Pérez-Rivero Cruz y Celis
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM**

México, CD. MX. Agosto de 2016

Dedicatoria

A mis papás, Francisco y Jeanneth por sus consejos, motivación, apoyo incondicional y sobre todo por el ejemplo que me dan. Es a ustedes a quienes les debo mi formación personal y académica.

A Daniel, porque la vida es mejor teniendo un hermano con quien compartirla.

A mi abuela Dora, por mantener la familia unida y por sus enseñanzas.

Agradecimientos

A mi tutor, M. en C. Fernando Gual por todo el apoyo, en el transcurso de la maestría y también durante mi formación como médico veterinario.

A mi comité Dr. Juan Pérez-Rivero y al Dr. Manuel Weber por su tiempo, enseñanzas y consejos durante la maestría.

Al Dr. Víctor Banda del INIFAP-Palo Alto y al Dr. Álvaro Aguilar del Centro Médico Siglo XXI por capacitarme para el diagnóstico serológico de leptospirosis y rabia.

Al personal de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, el Biól. Guillermo Gil y la M. en C. Marcela Pérez al igual que todos mis compañeros, por su apoyo y compañía durante el trabajo de campo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero para cursar este posgrado

Al posgrado de la FMVZ de la UNAM, laboratorio de virología del Centro Médico Nacional Siglo XXI y al laboratorio de microbiología del INIFAP-Palo Alto

Al Dr. Gerardo Suzán, Dr. Evaristo Barragán, Dra. Nidia Aréchiga y al Dr. Víctor Banda por sus valiosas aportaciones y a este trabajo

Resumen

Las actividades antropogénicas constituyen una de las principales causas por las que las enfermedades infecciosas se dispersan rápidamente entre animales domésticos y silvestres. Esto fundamenta la importancia de estudios epidemiológicos comparativos de enfermedades que pueden afectar las poblaciones de fauna silvestre. Con el objetivo de determinar la seroprevalencia de rabia y *Leptospira* en dos reservas ecológicas en México (Reserva de la Biósfera Los Petenes, Campeche, y Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, Ciudad de México) se capturaron tlacuaches y perros de libre rango/callejeros. Un total de 121 individuos fueron muestreados durante dos periodos de lluvias (junio a noviembre) de 2014 y 2015 incluyendo 57 tlacuaches de dos especies (*Didelphis virginiana* y *Didelphis marsupialis*) y 64 perros de libre rango (*Canis familiaris*). Se usó una batería de 5 serovariedades de *Leptospira interrogans* (*canicola*, *pomona*, *hardjo*, *bratislava* e *icterohaemorrhagiae*) mediante aglutinación microscópica y para la detección de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia (RVNA) se usó la prueba de reducción rápida de focos fluorescentes (RFFIT). La frecuencia de RVNA fue de 33.33% (IC 95% 6.39-59.6%) para tlacuaches y del 75% (IC 95% 54.99-95%) para perros de libre rango. Se registraron títulos de 0.07 a 7.6 UI en perros de libre rango y de 0.053 a 1.04 UI en tlacuaches. Por otra parte, la frecuencia de *Leptospira* de los perros de libre rango fue de 25% (IC 95% 14.39-35.6%) los cuales presentaron títulos de 1:80 hasta 1:3200 para todas las serovariedades: *canicola* (14.06%), *pomona* (12.50%), *hardjo* (6.25%), *icterohaemorrhagiae* (4.69%) y *bratislava* (14.06%). El suero de 7.01% (IC 95% 4.8-13.91) de los tlacuaches mostró evidencia de exposición a 3 serovariedades con títulos 1:20 y 1:40: *hardjo* (1.75%), *icterohaemorrhagiae* (3.51%) y *bratislava* (1.75%). Los resultados de este estudio muestran que los perros de libre rango y tlacuaches han estado en contacto con diferentes serovariedades de *Leptospira* y con el virus de la rabia. Es necesario continuar con estudios longitudinales a largo plazo con el objetivo de mejorar el entendimiento de la ecología de estas enfermedades en las poblaciones silvestres.

Palabras clave: perros de libre rango, *Didelphis*, rabia, *Leptospira*, serología

Abstract

Due to anthropogenic activities, infectious diseases may spread quickly between domestic animals and wildlife. This underlines the importance of comparative epidemiological studies of diseases that affect wildlife populations. To determine the frequency and diversity of *Leptospira* serogroups and the circulation of rabies virus, opossums and free-roaming dogs were live captured at two natural protected areas in Mexico (Los Petenes Ecological Reserve in Campeche and El Pedregal Ecological Reserve in Mexico City). 121 individuals were captured during two rainy seasons (June–November) of 2014 and 2015: The survey included 57 opossums, representing two species (*Didelphis virginiana* and *Didelphis marsupialis*) and 64 free-roaming dogs (*Canis familiaris*). Five *Leptospira interrogans* serovars (*canicola*, *pomona*, *hardjo*, *bratislava* and *icterohaemorrhagiae*) were tested using a microagglutination test and a rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) to detect rabies virus-neutralizing antibodies (RVNA) was used. Titers of RVNA between 0.07 and 7.6 IU in free-roaming dogs and 0.053 to 1.04 IU in opossums were found. The frequency of RVNA was 33.3% (95% CI 6.39-59.6%) in marsupials and 75% (95% CI 54.99-95%) in free-roaming dogs. The evidence of exposure to *Leptospira* was detected in 25% (95% CI 14.39-35.6%) of the free-roaming dogs presenting titers between 1:80 and 1:3200 against all serovars: *canicola* (14.06%), *pomona* (12.50%), *hardjo* (6.25%), *icterohaemorrhagiae* (4.69%) and *bratislava* (14.06%). Sera from 7.01% (IC 95% 4.8-13.91) of opossums showed evidence of exposure to three serovars with titers between 1:20 and 1:40: *hardjo* (1.75%), *icterohaemorrhagiae* (3.51%) and *bratislava* (1.75%). Results from this serosurvey show that the free-roaming dogs and opossums have been in contact with different *Leptospira* serovars and the rabies virus. Long term longitudinal studies should be carried out in order to understand the ecology of diseases in wildlife.

Key words: Free-roaming dogs, *Didelphis*, rabies, *Leptospira*, serology

Índice

1. Introducción.....	11
1.1. Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes.....	11
1.2. Especies invasivas.....	12
1.3. Historia natural de la enfermedad. Rabia.....	15
1.4. Historia natural de la enfermedad. Leptospirosis.....	21
1.5. Biología del tlacuache (<i>Didelphis spp.</i>).....	24
2. Justificación.....	27
3. Objetivos.....	28
3.1. General.....	28
3.2. Específicos.....	28
4. Materiales y métodos.....	29
4.1. Descripción del área de estudio. Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA).....	29
4.2. Descripción del área de estudio. Reserva de la Biósfera Los Petenes (RBLP).....	30
4.3. Capturas, toma de muestras y registro.....	31
4.4. Análisis serológico.....	34
4.5. Análisis estadístico.....	37
5. Resultados.....	38
5.1. Capturas.....	38
5.2. Evaluación serológica de rabia.....	38
5.2. Evaluación serológica de <i>Leptospira spp.</i>.....	40
6. Discusión y Conclusiones.....	45
6.1. Serología Rabia.....	45
6.2. Serología <i>Leptospira spp.</i>.....	50
7. Referencias.....	56
8. Anexos.....	69

Lista de cuadros

Cuadro 1. Perros de libre rango (<i>Canis familiaris</i>) y tlacuaches (<i>Didelphis</i> spp.) muestreados en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y en la Reserva de la Biósfera Los Petenes.....	39
Cuadro 2. Frecuencia de perros de libre rango y tlacuaches del género <i>Didelphis</i> expuestos al virus de la rabia en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y en la Reserva de la Biósfera Los Petenes.....	39
Cuadro 3 Frecuencia de RVNA según el sexo en perros de libre rango y tlacuaches del género <i>Didelphis</i> en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y en la Reserva de la Biósfera Los Petenes.....	40
Cuadro 4 Frecuencia de RVNA según la edad en perros de libre rango y tlacuaches del género <i>Didelphis</i> en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y en la Reserva de la Biósfera Los Petenes.....	41
Cuadro 5. Evaluación serológica de <i>Leptospirosis</i> spp. en poblaciones de perros y tlacuaches de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y de la Reserva de la Biósfera Los Petenes.....	41
Cuadro 6. Frecuencia de <i>Leptospira interrogans</i> en perros de libre rango.....	42
Cuadro 7. Evaluación de las serovariedades de <i>Leptospira</i> spp. en perros de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y en la Reserva de la Biósfera Los Petenes.....	42
Cuadro 8 Frecuencia de <i>Leptospira interrogans</i> en tlacuaches (<i>Didelphis</i> spp.).....	43

Cuadro 9. Frecuencia de *Leptospira* spp en perros de libre rango y tlacuaches por edades en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y en la Reserva de la Biósfera Los Petenes.....43

Cuadro 10. Frecuencia de *Leptospira* spp en perros de libre rango y tlacuaches por sexo en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y en la Reserva de la Biósfera Los Petenes.....44

Lista de figuras

Figura 1. Mapa de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel.....29

Figura 2. Mapa de la Reserva de la Biósfera Los Petenes.....31

Abreviatura y siglas

AM	Aglutinación microscópica
ABLV	Australian bat Lyssavirus
ARN	Ácido ribonucleico
ARAV	Aravan virus
BHK	Células de riñón de ratón lactante
CDC	Centro para el control y prevención de enfermedades
CONANP	Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas
DUVV	Duvenhage virus
EBLV	European bat Lyssavirus
EIE	Enfermedad infecciosa emergente
FITC	Anticuerpos antirrábicos conjugados con fluoresceína
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
IC	Intervalo de confianza
IM	Intramuscular
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IKOV	Ikoma virus
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
LLEBV	Lleida Bat Lyssavirus
MEM	Medio mínimo esencial
MOKV	Mokola virus
OD	Odds Ratio
PV	Pasteur virus
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
RR	Riesgo relativo
RABV	Virus de la rabia
REPSA	Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel
RBLP	Reserva de la Biósfera Los Petenes

RFFIT	Reducción Rápida de Focos Fluorescentes
RVNA	Anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia
UI	Unidades Internacionales
UIM-I	Unidad de Investigación Médica en Inmunología
WCBV	West Caucasian Bat virus
WHO	Organización Mundial de la Salud

1. Introducción

1.1. Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes

Algunas enfermedades infecciosas se transmiten rápidamente entre animales domésticos, silvestres y humanos, generando preocupación con respecto a la salud pública y a la conservación de la vida silvestre. Muchas de estas enfermedades han existido por cientos de años, mientras que otras son consideradas emergentes/reemergentes y tienen la habilidad de infectar diferentes especies. Las enfermedades infecciosas emergentes (EIE) pueden ser definidas como infecciones que son nuevas en una población o que han existido previamente, pero con un incremento rápido en la incidencia o el rango geográfico y las enfermedades infecciosas reemergentes son aquellas que existieron en el pasado pero ahora tiene un incremento rápido en la incidencia, rango geográfico o tipo de huésped (Morens *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que los mismos factores que causan destrucción ambiental y el subsecuente declive de la biodiversidad también están relacionados con las enfermedades infecciosas. La conexión entre el daño al medio ambiente y la aparición de enfermedades zoonóticas y epizootias provee de un nuevo razonamiento para proteger y preservar la biodiversidad (Olival *et al.*, 2013). De 1415 patógenos conocidos en humanos, el 58% son considerados zoonóticos: 177 son considerados patógenos emergentes o reemergentes. (Cook y Karesh 2008). De las enfermedades infecciosas emergentes conocidas hoy en día predominan las zoonosis (60.3%), donde la mayoría de estas enfermedades (71.8%) son originadas en fauna silvestre (Jones *et al.*, 2008).

El aumento de estas enfermedades emergentes está teniendo un impacto dramático en la conservación y la salud pública (Olival *et al.*, 2013), lo que indica que la aproximación tradicional del manejo de enfermedades es deficiente. La estrategia básica para la investigación de enfermedades en la interfase entre los animales silvestres/animales domésticos y las actividades del ser humano requieren de un

estudio intensivo de campo para identificar los patógenos e integrar los índices de salud y enfermedad con observaciones individuales y de comportamiento animal. Además de esto, se requiere la caracterización de patógenos mediante nuevas técnicas de laboratorio y del desarrollo e integración de modelos relacionados con la dinámica y la ecología de la enfermedad (Cook y Karesh 2008).

El incremento de enfermedades infecciosas se puede asociar a la presión de las actividades antropogénicas, tales como el crecimiento de la población humana, cambios del uso de suelo, prácticas agrícolas, comercio globalizado y una débil infraestructura de instituciones y programas de salud pública, lo cual está generando la extinción de algunas especies (Olival *et al.*, 2013). Los cambios en el uso antropogénico de áreas protegidas permite brotes de enfermedades infecciosas, los cuales modifican la transmisión de infecciones endémicas. La fragmentación del hábitat altera la composición de especies en un medio ambiente y puede cambiar la ecología de los microorganismos. Por ejemplo, en la naturaleza de las redes tróficas, los organismos que ocupan los niveles altos de las mismas existen en bajas poblaciones y son sensibles a cambios en la disponibilidad de alimento. Los pequeños parches de hábitat remanentes después de la fragmentación de un ecosistema generalmente no satisfacen los requerimientos de los depredadores que se encuentran en los niveles tróficos más altos lo que da como resultado su desaparición y un incremento subsecuente de la densidad de otras especies (Patz *et al.*, 2004).

Es necesario mitigar las preocupaciones en relación al surgimiento e impacto de las enfermedades en la interfase entre la producción animal y la fauna silvestre y asegurar e implementar las políticas y medidas adecuadas para evitar la transmisión de enfermedades en estas zonas (Kock 2005).

1.2. Especies invasivas

Junto con las EIE, las especies invasivas/ferales (aquellas que afectan a los ecosistemas y a las especies nativas, provocan daños a los servicios ambientales y a la

salud pública, además de pérdidas económicas – CONANP, 2010), se han convertido en una amenaza para la fauna silvestre. Sin embargo, en México, se han realizado pocos estudios en donde se comparen ecosistemas, especies invasivas y enfermedades. Las especies invasivas representan un serio impedimento para la conservación y la sustentabilidad de la biodiversidad global, regional y local. En general, los impactos de las poblaciones invasoras sobre los ecosistemas y sus especies van a variar significativamente dependiendo de la especie invasora, la magnitud de la invasión y el tipo y vulnerabilidad de los ecosistemas. Desafortunadamente, la variabilidad de los impactos, en combinación con la falta de conocimiento sobre el establecimiento de las especies invasoras hace que las predicciones de los efectos reales sean muy difíciles de valorar (CONABIO 2010).

Los mamíferos ferales son capaces de sobrevivir a lugares extremos y áreas dominadas por humanos. Son capaces de reestructurar redes tróficas y amenazar a la fauna nativa y algunas veces endémica. Gatos, perros y ratas entre otros, son portadores de múltiples enfermedades y pueden contribuir a diseminarla en diferentes hábitats (Suzán y Ceballos 2005). El concepto *Una Sola Salud* permite abordar de modo colaborativo e integral la sanidad animal y a la salud pública a escala mundial a través de la prevención de enfermedades en las poblaciones animales en esta interfaz entre el ser humano, el animal y el medio ambiente con un enfoque multidisciplinario. Sin embargo, los estudios tradicionalmente se han enfocado en una sola especie sin contemplar la ecología de la enfermedad (OIE 2016).

Los perros, como cualquier otro animal, son susceptibles a un gran número de enfermedades infecciosas de las cuales algunas son compartidas con especies silvestres, animales domésticos y humanos (Brickner 2013). Hughes y MacDonald (2013) reportaron que la población mundial de perros es de aproximadamente 700 millones, de los cuales el 75% no tiene dueño. Esta cifra incluye los perros ferales y de libre rango que tienen la capacidad de propagar enfermedades, amenazar y matar fauna silvestre, además de competir con especies nativas. Los perros de libre rango/callejeros solo dependen de los humanos cuando necesitan comida o un lugar

donde resguardarse y no están restringidos permanentemente o bajo su control, los perros que no requieren el contacto humano o quedaron fuera del control del hombre, se denominan ferales ya que pasaron por un proceso de asilvestraje (Hughes y MacDonald 2013). A medida que aumenta la población de estos perros, aumenta el riesgo de transmisión de enfermedades y constituyen una amenaza significativa para especies silvestres susceptibles, debido a que pueden transmitir diversos patógenos como el virus de la rabia, parvovirus, distemper canino y bacterias como *Leptospira*.

Normalmente los animales silvestres conviven con densidades bajas de agentes causales de enfermedad, donde, después de un brote, el patógeno desaparece rápidamente. Estas densidades bajas pueden convertirse en persistentes cuando se registran altas densidades de perros, generando una circulación continua e infectando y re infectando poblaciones de animales silvestres con una mayor probabilidad de que nuevas enfermedades lleguen a especies en las que nunca se habían registrado (Brickner 2013). Las enfermedades pueden transmitirse no sólo a animales silvestres sino también a humanos. Aunque los casos de transmisión de enfermedades de perros a fauna silvestre son menores que los reportados en humanos es posible que los problemas en relación a fauna sean mayores (Jiménez-Coello *et al.*, 2010).

La prevalencia de muchas enfermedades zoonóticas como rabia y *Leptospira* concierne a la salud pública porque los perros pueden constituir un huésped de mantenimiento de estas enfermedades (Jittapalapong *et al.*, 2009). Los perros juegan un papel importante en el mantenimiento de diferentes enfermedades zoonóticas debido al contacto estrecho que tienen con los humanos (Young *et al.*, 2011). Los perros ferales y perros de libre rango (*Canis familiaris*) son un problema para la conservación, debido a que toman papeles ecológicos alternando funcionalidad como depredadores, presas o competidores del hábitat e hibridación con algún carnívoro silvestre. Así mismo son portadores de parásitos y enfermedades que afectan diferentes especies alrededor del mundo. Como consecuencia se pueden encontrar títulos de anticuerpos altos contra diferentes patógenos (Punjabi *et al.*, 2012; Hughes y Macdonald 2013).

Las teorías ecológicas y epidemiológicas predicen que la fauna silvestre nativa en lugares pequeños, fragmentados y aislados tiene más contacto con especies invasivas y enfermedades infecciosas. (Suzán y Ceballos 2005). El conocimiento de la dinámica de infección en los reservorios es crítico para el control de las enfermedades, pero la identificación del reservorio en patógenos que tienen varios huéspedes es difícil. Los patógenos que infectan muchos huéspedes son de importancia económica y constituyen un riesgo para la salud humana, causando enfermedades emergentes además de ser una amenaza para las especies silvestres (Lembo *et al.*, 2008).

El monitoreo de poblaciones invasivas deberá incluir evaluaciones de las diferentes enfermedades presentes. La persistencia ecológica de virus patógenos como la rabia y bacterias como *Leptospira* spp. han sido objeto de diversos estudios donde normalmente son introducidas/reintroducidas por poblaciones de especies invasivas (Bingham 2005, Jittapalapong *et al.*, 2009). Con respecto a la presencia de perros ferales o de libre rango se requieren estudios no sólo para entender el efecto de los perros en el ecosistema sino también para conocer las consecuencias de un control o exclusión de estos animales (Young *et al.*, 2011). Se deben registrar las interacciones entre los perros y la fauna silvestre, la densidad de animales, proporción sexual, impacto a la fauna local, mortalidad, tipo de presas y el valor de los perros en relación a las personas de las comunidades, antes de tomar cualquier decisión es necesario conocer cada potencial de conflicto y determinar el papel que juegan los perros en esa localidad (Hughes y Macdonald 2013).

1.3. Historia natural de la enfermedad. Rabia.

El virus de la rabia y los relacionados con éste pertenecen al orden *Mononegavirales*, familia Rhabdoviridae (en forma de bala) género *Lyssavirus*. Los miembros de este orden de virus se caracterizan por estar envueltos y tener genomas de ARN de cadena sencilla, de sentido negativo y no segmentado. El género se ha separado en 14 especies, con base en las secuencias nucleotídicas y la similitud de secuencias de aminoácidos (ICTV, 2015). El virón tiene una longitud de 180nm y un diámetro de

75nm. El ARN mensajero codifica sucesivamente 5 proteínas: nucleoproteína (N), proteína de matriz (M), fosfoproteína (P), glicoproteína (G) y la polimerasa (L), siendo dos de especial interés: la nucleoproteína ARN (N) y la glicoproteína (G) las cuales, son responsables de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes (Davlin y VonVille 2012).

El virus de la rabia es el virus que está más ampliamente distribuido en el mundo y tiene una gran importancia epidemiológica debido a la cantidad de casos que se presentan. Las 14 especies dentro del género *Lyssavirus* se clasifican en 3 filogrupos. La identificación de las especies se confirma mediante el análisis de las secuencias del gen que codifica para la glicoproteína y son: virus clásico de la rabia (RABV-especie 1), Lagos bat (LBV-especie 2), Mokola virus (MOKV-especie 3), Duvenhage virus (DUVV-especie 4), European bat Lyssavirus, (EBLV1-especie 5), European bat Lyssavirus (EBLV2-especie 6) y Australian bat Lyssavirus (ABLV-especie 7), Aravan virus (ARAV), Khujand virus (KHUV), Irkut virus (IRKV), Shimoni bat virus (SHIBV), West Caucasianbat virus(WCBV), Bokeloh y ellkoma virus. En relación al Llebv Bat Lyssavirus (LLEBV), es una especie que aún está pendiente de clasificación. Los filogrupos están divididos en: filogrupo I (RABV, DUVV, EBLV1-2, ABLV, ARAV, IRKV, BBLV, KHUV), filogrupo II (LBV, MOKV, y SHIBV). El filogrupo III está formado por el West Caucasian Bat virus (WCBV); Ikoma virus (IKOV) y el más reciente Lleida Bat Lyssavirus (LLEBV), estos dos últimos son los más divergentes miembros del género *Lyssavirus*, por lo que es importante realizar más estudios para determinar si forman parte del filogrupo III o representan un nuevo filogrupo (Aréchiga *et al.*, 2013). Cada grupo de virus difiere en propiedades biológicas tales como patogenicidad, inducción de apoptosis y reconocimiento del receptor celular, entre otras (Aréchiga 2010).

El virus de la rabia (RABV-especie I) es el único que se ha detectado en América. La epidemiología molecular sugiere que hay dos diferentes linajes de variantes circulantes del virus RABV asociadas a los cánidos y a los quirópteros. Son los responsables de la mayoría de las infecciones en humanos, transmitida principalmente por la variante asociada a los cánidos (Dyer *et al.*, 2014). En México, hasta el momento, se han

detectado 9 de las 11 variantes de la especie I reportadas en América. Estas variantes son: V1 perro, humano, zorros, V3, V5 y V11 murciélago vampiro (*Desmodus rotundus*), V4 y V9 murciélago insectívoro (*Tadarida brasiliensis*), V7 zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*), gato montés (*Lynx rufus*), V8 y V10 zorrillo (*Mephitis mephitis*) y vacas. Las variantes V4, V7, V8, V9, V10, V11 fueron aisladas de reservorios silvestres y V1, V3 y V5 fueron obtenidas de huéspedes que no son reservorios (Velasco-Villa *et al.*, 2002).

La rabia produce una encefalomielitis viral aguda que puede afectar a todos los mamíferos (Basurto y Marín 2011) y casi, invariablemente, conlleva a la muerte una vez que los signos son evidentes (Szanto *et al.*, 2011). Los mecanismos básicos que involucran la capacidad del virus de la rabia para generar una enfermedad aún no se conocen bien, pero se sabe que contribuyen a la disfunción del sistema nervioso central por la disminución de las funciones neuronales, particularmente mediante la alteración de la neurotransmisión (Aréchiga 2010).

El virus se elimina principalmente por la saliva, su periodo de incubación después de una exposición natural (por la mordedura de animales infectados o por la contaminación de una herida fresca) es muy variable; depende de la cantidad de virus infectante que haya penetrado y de la distancia que tenga que recorrer el virus desde el sitio de inoculación hasta el encéfalo. En términos generales puede variar desde una semana hasta un año. El virus permanece en el sitio de inoculación durante varias horas y luego se desplaza en dirección centrípeta por los axones de los nervios periféricos hasta la médula espinal (neuroinvasividad). La replicación inicial puede ocurrir en los tejidos adyacentes al sitio de inoculación, o bien, en los ganglios de la médula espinal. Después de esto, asciende rápidamente hasta el cerebro y se desplaza en movimiento centrífugo por los nervios hacia otros órganos (neurotropismo) (Basurto y Marín 2011).

Se conocen tres manifestaciones clínicas de la enfermedad en perros: la fase prodrómica, la fase furiosa y la fase paralítica. Los signos son muy variables: fiebre,

midriasis o miosis, micción frecuente, cambio en la conducta, las vocalizaciones se torna más agudas, paraparesis, incoordinación, parálisis de los músculos maseteros, la mandíbula caída, parálisis de la faringe y disfagia. Estas tres manifestaciones se han observado en perros; la forma más común es la furiosa. El desarrollo de la enfermedad puede tomar de 1 a 11 días (Basurto y Marín 2011; Acha 2001). Los signos clínicos en zorros, zorrillos y mapaches infectados experimentalmente son similares a los que se observan en perros (Acha 2001).

El virus RABV-especie 1 es el que tiene mayor distribución en el mundo. Es muy importante desde el punto de vista epidemiológico debido a su asociación con un gran número de casos de rabia tanto en el ser humano como en animales domésticos y silvestres, a diferencia de los otros genotipos, los cuales tienen una distribución geográfica más local y el espectro de las especies que afectan es más restringido (Aréchiga 2010). En poblaciones de animales silvestres, el virus clásico de la rabia es perpetuado de la misma forma que en las zonas urbanas, donde una o dos especies de mamíferos, típicamente carnívoros y murciélagos, son los responsables del mantenimiento del virus (Acha 2001).

Los datos experimentales y epidemiológicos de rabia junto con la tipificación molecular del virus han mostrado que existen varios reservorios para la especie I, cuyas variantes permanecen en la naturaleza en ciclos independientes (Basurto y Marín 2011). Muchas especies son susceptibles al virus de la rabia y se pueden dividir en dos categorías. La primera corresponde a los reservorios o animales que mantienen el virus y lo diseminan en forma eficaz. Estos animales son principalmente depredadores, como perros, zorros, lobos, coyotes, mapaches, mangostas, zorrillos y el murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*). La segunda corresponde a los animales susceptibles que pueden padecer la rabia pero no la diseminan en forma tan eficaz como los reservorios. Estos son bovinos, equinos, borregos, cabras, cerdos y el ser humano, especies que son generalmente omnívoras o herbívoras (Aréchiga 2010). En relación a la zarigüeya, considerado muy resistente al virus de la rabia, no se conoce el papel que desempeña en relación a la transmisión (Acha 2001). A pesar de que Beamer *et al.*, (1969)

demonstró la resistencia de los tlacuaches al virus de la rabia, estos animales son susceptibles a la enfermedad aunque sean animales extremadamente adaptables y sinantrópicos (Araujo *et al.*, 2014).

La ocurrencia de la enfermedad en cualquier ecosistema depende estrictamente de la coexistencia del reservorio y la variante específica del virus de la rabia. Dentro de cada ciclo, los diferentes reservorios juegan un papel central en el mantenimiento específico de las variantes. En algunas regiones de México y Latinoamérica, la transmisión de los ciclos de la rabia se sobrelapan (Loza-Rubio *et al.*, 1999; Velasco-Villa *et al.*, 2002), presentando episodios de rabia en perros (rabia urbana), la cual causa anualmente más de 55,000 muertes en humanos (Mollentze *et al.*, 2014) y en especies silvestres (rabia silvestre), lo que implica la presencia simultánea de más de un reservorio y más de una variante del virus (Aréchiga 2010).

La rabia en humanos continúa representando un gran problema en los países en desarrollo (Davlin y VonVille 2012). Debido a su gran biodiversidad, México presenta una situación especial en lo que se refiere a la rabia en animales silvestres. En nuestro país existen todos los vectores más importantes de la rabia descritos en Estados Unidos y Canadá como son los zorros, mapaches, coyotes, zorrillos y murciélagos, entre otros. Además, encontramos otros que no existen en aquellos países y que son propios de las regiones neotropicales como los murciélagos hematófagos (subfamilia *Desmodontinae*) (Aréchiga 2010). Estos murciélagos son la mayor amenaza de rabia en el Neotrópico y gracias a la facilidad en su movilidad han propagado la infección hacia nuevas áreas. De 1980 hasta el 2007, 61 de los 178 casos de rabia en humanos en Estados Unidos y Canadá fueron causados por la variante de los murciélagos (Greene 2011).

En México, la información sobre rabia está enfocada principalmente en quirópteros hematófagos por su impacto en la ganadería responsable de cuantiosas pérdidas económicas (Loza-Rubio *et al.*, 1999), y en perros por ser un problema de salud pública. En los últimos años se ha reportado rabia en otros mamíferos silvestres como:

zorrillos, coatíes, y en otras especies de murciélagos no hematófagos como *Tadarida brasiliensis* y *Lasiurus cinereus*, de las que poco se sabe sobre su participación en el mantenimiento y transmisión de la infección (Obregón *et al.*, 2014).

La vacunación de perros es el método de prevención más efectivo para evitar la transmisión de la rabia a humanos (Davlin y VonVille 2012). El principio de la vacunación contra la rabia es que una porción grande de la población sea vacunada, lo que generará una interrupción en el ciclo de transmisión de la rabia (Slate y Rupprecht 2012). En México, las campañas de vacunación canina han logrado con éxito generar una tendencia decreciente en los casos de rabia transmitida por perros. Debido a esto, la rabia transmitida por animales de vida silvestre ha cobrado mayor importancia (Aréchiga 2010).

Muchas veces el diagnóstico de la rabia se hace de manera errónea, y sin la confirmación de un diagnóstico adecuado en laboratorio; en consecuencia las autoridades de salud pública no conocen la prevalencia de rabia y la enfermedad no recibe la atención requerida (Hampson *et al.*, 2008).

La respuesta inmune individual a la infección natural contra el virus de la rabia puede incluir anticuerpos neutralizantes del virus, los cuales dependen de factores tales como la dosis viral, el grado de replicación en la periferia, la entrada exitosa y la replicación en el sistema nervioso central (Aréchiga 2010). Se han encontrado anticuerpos contra el virus de la rabia en diferentes especies silvestres como zorros, mapaches, mangostas y murciélagos, lo cual sugiere una infección a largo plazo que puede significar una memoria inmunológica y una reducción del virus de la rabia para generar infección (Turmelle *et al.*, 2010) o que la infección por el virus no siempre conlleva a la muerte (Acha 2001).

La prueba de reducción rápida de focos fluorescentes (RFFIT) es una prueba de seroneutralización del virus de la rabia, la cual se lleva a cabo usando células de cultivo para determinar el nivel de anticuerpos en suero de animales o humanos, teniendo a la

fluorescencia como indicador de crecimiento viral. Es una neutralización de suero (inhibición) la cual mide la habilidad de anticuerpos específicos de rabia para neutralizar el virus y prevenir que el virus infecte a las células. A estos anticuerpos se le conocen como anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia (RVNA) (WHO, 2011). La prueba se desarrolla mezclando diluciones de suero con una cantidad constante de virus de rabia. Esta neutralización de anticuerpos es inducida por las glicoproteínas en la membrana del virus (CDC, 2006). La prueba no puede diferenciar si la respuesta inmune es por una exposición al virus de la rabia o por la vacunación (WHO, 2013). La mayoría de los RVNA están dirigidos hacia los epitopes de la glicoproteína, aunque algunos reconocen especialmente a la nucleoproteína. Sin embargo, no se conoce con exactitud la forma en que neutralizan al virus o que subclase de inmunoglobulinas están involucradas (Moore y Hanlon 2010). Cuando los RVNA están presentes en el suero, tienden a aparecer de 7 a 8 días después de los signos clínicos (CDC, 2006).

1.4. Historia natural de la enfermedad. Leptospirosis.

La leptospirosis es la zoonosis que más se dispersa a nivel mundial, con una incidencia endémica anual de 5 casos por cada 100,000 personas (WHO, 2011), siendo los roedores el principal reservorio (Cosso *et al.*, 2014). El agente etiológico de la leptospirosis es una espiroqueta de la familia Leptospiraceae, género *Leptospira*, el cual se divide en dos especies: *L. interrogans*, patógena para los animales y el hombre, que a su vez se divide en más de 210 serovariedades y 23 serogrupos, y *L. biflexia* saprófita la cual se han asilado del medio ambiente (Levett 2001). Actualmente, *Leptospira* puede ser genéticamente clasificada con base en la técnica de hibridación del ADN en al menos 19 especies (Chirathaworn *et al.*, 2014).

La *Leptospira* tiene muchos huéspedes y puede ser altamente patógena y presentar implicaciones en la salud de los humanos y animales domésticos (Levett 2001). A nivel mundial, la infección ocurre en aproximadamente 160 especies de mamíferos, la mortalidad es de 10% y los animales silvestres se adaptan fácilmente a la *Leptospira*

sin revelar signos o lesiones. El hombre es huésped accidental y solo bajo condiciones específicas puede contribuir al mantenimiento de una epidemia. Cada serovariedad tiene su huésped preferido, pero una misma especie animal puede ser huésped de diferentes serovariedades (Acha 2001).

La transmisión se da a través del contacto con la orina principalmente (Cook y Karesh 2008). Puede ser ingerida en agua o alimento contaminado o transmitida por contacto directo de la piel a través de las mucosas o piel lacerada (Allen *et al.*, 2014). Simultáneamente, la transmisión y mantenimiento de *L. interrogans* depende de la densidad de la población del huésped y la frecuencia de contacto con huéspedes infectados (Montiel-Arteaga *et al.*, 2015). Después de que entra al organismo, se produce una leptospiremia, con diseminación a riñones e hígado principalmente. La infección tiene un periodo de incubación de 4 a 12 días. En perros se reconocen tres tipos de enfermedad: enfermedad hemorrágica (aguda), enfermedad icterica y enfermedad urémica. La infección puede ser asintomática o provocar una variedad de trastornos que incluyen fiebre, ictericia, hemoglobinuria, uremia. Además, en casos graves, la enfermedad se desarrolla súbitamente y se caracteriza por debilidad leve, anorexia, deshidratación y conjuntivitis (Basurto y Marín 2011). En estados subsecuentes se puede presentar gastroenteritis hemorrágica, nefritis aguda debido a que las bacterias se mantienen en los túbulos. Las serovariedades patogénicas más comunes asociadas a perros son *icterohaemorrhagiae* y *canicola*, las cuales son capaces de producir signos clínicos (Acha 2001).

Los hospederos infectados, como portadores, llegan a eliminar la bacteria por periodos prolongados. La recuperación eventual puede ocurrir una semana después de haber adquirido la infección. Los mecanismos por los cuales las *Leptospiras* causan enfermedad no se entiende con exactitud. Se han sugerido diferentes factores por los cuales causan la enfermedad, pero salvo en algunos casos, su rol en la patogénesis permanece incierto. La actividad endotóxica se ha reportado en diferentes serovariedades. Las cepas virulentas muestran quimiotaxis hacia la hemoglobina lo que genera una hemólisis. También se ha demostrado que las *Leptospiras* se fijan a las

células epiteliales renales y a las plaquetas, e inhiben la actividad de los macrófagos incrementando la sensibilidad a la infección (Levett 2001).

Los reservorios, los roedores, y algunos huéspedes de manteniendo como los perros, y algunas especies silvestres pueden esparcir las bacterias, donde en condiciones favorables (humedad, temperatura 28 °C-30 °C), pueden permanecer viables y causar infección hasta por 74 días (Jobbins *et al.*, 2013). En México se reconocen y diagnostican 13 serovariedades. En fauna silvestre diversos estudios experimentales y de vigilancia epidemiológica han identificado a las serovariedades *pomona*, *canicola*, *bratislava*, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae* y *hardjo* como causales de enfermedad. (Faine, 1994; Zamora y Riedemann, 1999 citado por: Guerrero-Sánchez 2011).

El estudio de la dinámica de los patógenos en metapoblaciones de ciertas especies es crítico para los programas de conservación, y la *Leptospira* ofrece un modelo ideal por su incremento reciente, aumentando la incidencia y su asociación con los problemas en la salud pública. Estudios realizados en la fauna silvestre muestran que algunos atributos ecológicos y ambientales pueden incrementar la prevalencia de infección con *Leptospira* spp., incluyendo atributos espaciales como áreas inhabitadas por huéspedes reservorios, presencia de asentamientos humanos y atributos ecológicos como densidad de la población, sexo, edad y peso. Sin embargo, se han realizado pocos estudios ecológicos de *Leptospira* enfocados a fauna silvestre y se conoce poco de su efecto (Montiel-Arteaga *et al.*, 2015).

Las leptospiras son excelentes antígenos, inducen la producción de anticuerpos aglutinantes, líticos y fijadores de complemento en títulos altos. Estos últimos persisten en los individuos recuperados de la infección, lo cual permite el diagnóstico de una infección pasada (Basurto y Marín 2011). La prueba de aglutinación microscópica (AM) es considerada la técnica de referencia para el diagnóstico, la cual detecta inmunoglobulinas, principalmente IgM (González *et al.*, 2012). Se realiza mediante la incubación del suero del animal con varias serovariedades de *Leptospira*. Los títulos son obtenidos probando varias diluciones de suero. La serovariedad que reacciona con

el suero del animal se toma como la serovariedad infectante. Aunque la AM ha sido utilizada como una prueba de referencia, se ha demostrado que tiene una sensibilidad relativamente baja ya que solo en el 33% de los casos puede predecir la serovariedad infectante (Smythe *et al.*, 2009).

1.5. Biología del tlacuache (*Didelphis spp.*)

Los marsupiales americanos (Ameridelphia) están asignados en dos familias: Didelphidae, orden Didelphimorphia (92 especies) presentes en toda América y la familia Caenolestidae (6 especies), orden Paucituberculata los cuales sólo se encuentran en Sur América. (Medina-Romero *et al.*, 2012). Los marsupiales del género *Didelphis* están ampliamente distribuidos en asentamientos humanos en México, es una especie común y localmente abundante en ciertos hábitats y no se encuentra en peligro de extinción. Hay 8 especies reconocidas siendo dos las más importantes para México: *Didelphis virginiana* la cual se extiende desde México hasta el Sur de Canadá y *Didelphis marsupialis* desde el norte de Brasil hasta México (Rademaker y Cerqueira 2006; Aranda 2012). Exhiben muchas características adecuadas que las hacen ideales para los ámbitos urbanos y peridomésticos. Son relativamente pequeñas, de hábitos nocturnos, arborícolas y terrestres y tiene una alta capacidad reproductiva. Se han beneficiado de las nuevas dinámicas encontradas en áreas urbanas, donde poseen el potencial de expandirse a nuevas áreas (Wright *et al.*, 2012).

Los tlacuaches son considerados como depredadores eventuales y consumidores de dietas altas en energía, son capaces de consumir casi cualquier fuente de comida disponible incluyendo carroña, basura e insectos, presentando un patrón altamente oportunista. En una noche pueden forrajear una distancia de 1.6 a 2.4km. Su periodo de mayor actividad es entre las 23:00 y 02:00 hrs (Ceballos y Oliva 2005). Como consecuencia, frecuentemente se perciben como especies que poseen una alta tolerancia a la fragmentación (Beatty *et al.*, 2012).

Sus refugios usualmente se encuentran al nivel del suelo, entre rocas, árboles huecos o usan madrigueras hechas por otros animales. Ocasionalmente emplean una táctica de defensa pasiva llamada tanatosis, que consiste en quedarse inertes simulando estar muertos (Ceballos y Oliva 2005). Su relación con otros organismos debe considerarse importante por su efecto epidemiológico sobre las poblaciones de depredadores. Aunque tiene una resistencia alta a diferentes enfermedades debido aparentemente a la baja temperatura corporal (Krause y Krause 2006), representan presas potenciales muy importantes de muchos depredadores, lo que los hace relevantes en la cadena de transmisión de enfermedades. Sin embargo, aunque los depredadores como los búhos grandes, zorros, coyotes, jaguares y animales domésticos (perros y gatos) pueden reducir el número de tlacuaches jóvenes, de alguna manera la depredación no parece ser una causa de mortalidad significativa (Krause y Krause 2006).

Los *Didelphis* spp. están catalogados como animales de vida corta (1-4 años en vida libre) y camadas grandes. La gestación varía de 13 a 15 días, tiene dos picos de apareamiento al año, enero-febrero y junio-julio y ocurren dos estros en cada época de apareamiento. La duración de la época de apareamiento es prácticamente todo el año cerca del Ecuador cambiando inversamente a medida que aumenta la latitud, siendo las horas luz el estímulo más favorable para la época reproductiva. El tamaño óptimo de la camada varía a diferentes latitudes: 4.2 en Sudamérica a 9.4 en Norteamérica (Rademaker y Cerqueira 2006).

Los marsupiales nacen sin un sistema inmune funcional o sin un desarrollo completo, con un número de linfocitos circulantes insuficientes. El marsupio contiene un rango de bacterias patogénicas potenciales y genera un reto inmunológico para el desarrollo de las crías, es por esto que se reproducen a través de grandes camadas como método para preservar la especie (Edwards *et al.*, 2012). Los juveniles son destetados aproximadamente a los 100 días de nacidos y alcanzan la pubertad a los 170 días coincidiendo con condiciones ambientales favorables para maximizar la supervivencia (Ferreira *et al.*, 2013).

La densidad poblacional promedio en México es de 1 a 23 ind/ha, con un ámbito hogareño en promedio de 20/ha. *D. virginiana* es nómada y permanece en un sitio entre seis meses y un año (Ceballos y Oliva 2005). No son territoriales, pero pueden defender el espacio ocupado en un tiempo determinado. Las hembras aparentemente tienen sólo dos años de actividad reproductiva, ya que muy pocos tlacuaches sobreviven más allá del tercer año de vida. No obstante que la ecología de los tlacuaches ha sido extensivamente estudiada, no ha sido evaluado el rol epidemiológico en relación a muchas enfermedades zoonóticas (Ruiz-Piña *et al.*, 2002).

2. Justificación

El entendimiento de la compleja ecología de las enfermedades es fundamental para el manejo, la prevención y el control de las mismas. La ecología de las zoonosis muestra dinámicas complejas en las que intervienen múltiples factores incluyendo, en muchas ocasiones, una gran variedad de huéspedes y reservorios (Mazet y Johnson, 2012). La mayoría de los principales patógenos infecciosos que afectan a los humanos (61%) constituyen zoonosis o se originaron como zoonosis antes de adaptarse al ser humano (Patz, *et al.*, 2004; Taylor, *et al.*, 2001). La presión de las actividades antropogénicas en áreas naturales protegidas desencadena la fragmentación del hábitat y altera la composición de especies, en especial, la aparición de animales ferales y de libre rango y puede cambiar la ecología de los agentes infecciosos. La aparición de especies de libre rango como los perros, juegan un papel fundamental en la dinámica de las diferentes zoonosis. Cuando se registran altas densidades de perros, los agentes infecciosos esporádicos pueden convertirse en persistentes, infectando y reinfectando poblaciones de animales silvestres con una mayor probabilidad de que nuevas enfermedades lleguen a especies en las que nunca se habían registrado (Brickner 2013). La rabia y la leptospirosis son zoonosis que se dispersan a nivel mundial y constituyen patógenos que están presentes en diversas poblaciones de animales domésticos, de libre rango y silvestres. Por esta razón es fundamental realizar estudios epidemiológicos y comparativos de diferentes áreas naturales protegidas. Los tlacuaches (*Didelphis* spp.) se encuentran ampliamente distribuidos en nuestro país y constantemente entran en contacto con poblaciones de humanos y de animales domésticos y ferales, lo que nos da la oportunidad de utilizarlos como monitores de las enfermedades que se transmiten en la interfase entre los humanos, animales domésticos y animales silvestres. El estudiar las enfermedades que son transmitidas entre animales domésticos y silvestres y el ser humano, asociado a las actividades antropogénicas, permitirá obtener mayor información de la dinámica de las mismas y conocer el impacto que tienen en las poblaciones silvestres.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar la seroprevalencia de rabia y *Leptospira* en poblaciones de perros de libre rango y marsupiales del género *Didelphis* que habitan en dos reservas ecológicas.

3.2 Objetivos específicos

1. Comparar la seroprevalencia de rabia en perros de libre rango y marsupiales del género *Didelphis* en dos reservas ecológicas: una reserva selvática y una reserva urbana.
2. Comparar la seroprevalencia de *Leptospira* en perros de libre rango y marsupiales del género *Didelphis* en dos reservas ecológicas: una reserva selvática y una reserva urbana.

4. Materiales y métodos

4.1. Descripción del área de estudio. Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA)

Esta reserva urbana se localiza al sureste de la Ciudad de México, dentro de la Universidad Nacional Autónoma de México (Figura 1). Su georreferenciación es la siguiente: 19°18'31"–19°19'17" latitud Norte y 99°10'20"–99°11'52" latitud Oeste. Está ubicada entre 2,200 y 2,277 metros sobre el nivel del mar (Castillo *et al.*, 2007). Es relativamente pequeña, tiene tres zonas núcleo que cubren 171 ha y 13 áreas de amortiguamiento que ocupan 66 ha. Su clima es templado subhúmedo, con un régimen de lluvias de junio a octubre, temperatura media anual de 16.1°C y precipitación pluvial de 870.2 mm anuales. Debido al estrecho contacto que tiene con la ciudad, ha sido sometida a perturbaciones de largo plazo (fragmentación y asilamiento) lo cual tiene un efecto decisivo en la estructura y composición de la fauna endémica (Suzán y Ceballos 2005).

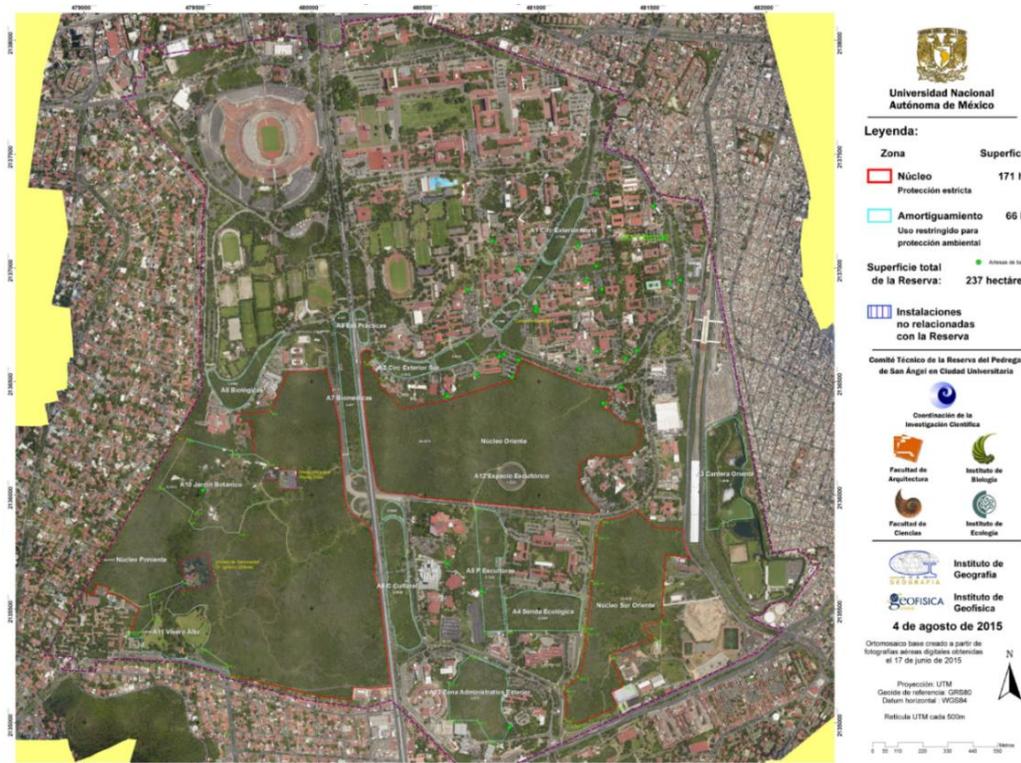


Figura 1. Mapa de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel

Las zonas bajas se encuentran dominadas por el matorral xerófilo que cubre la mayor parte de la reserva (Cano-Santana *et al.*, 2007). Históricamente se tienen registradas 33 especies de mamíferos agrupados en 28 géneros, 15 familias, y 6 órdenes entre ellos los cacomixtles (*Bassariscus astutus*), ardillón (*Otospermophilus variegatus*), conejo castellano (*Sylvilagus floridanus*), zorrillo (*Spilogale angustifrons*) siendo los tlacuaches (*Didelphis virginiana*) la especie más abundante. También se registra una abundancia importante de fauna nociva introducida como perros, gatos y ardillas arborícolas (*Sciurus aureogaster*) (Hortelano *et al.*, 2009).

4.2. Descripción del área de estudio. Reserva de la Biósfera Los Petenes (RBLP)

Esta reserva se localiza en la zona costera norte del Estado de Campeche. Ocupa una extensión de 282,858 ha y está constituida por una larga y estrecha franja costera, con porciones terrestre y marina. Queda comprendida entre los puntos 20°51'30" y 19°49'00" de latitud norte y los 90°45'15" y 90°20'00" de longitud oeste. Sus límites son: al norte la Reserva de la Biosfera Ría Celestún y el Golfo de México, al oeste, el Golfo de México; al este colinda con los municipios de Tenabo, Hecelchakán y Calkiní, y al sur con la ciudad de Campeche. La topografía tiene poco contraste en altitud y carece de una red fluvial superficial. El clima predominante en la zona centro-sur es Aw (cálido subhúmedo con lluvias en verano), mientras que en su extremo norte es del tipo BS'h'w (semiseco y seco cálido). La temperatura promedio anual es 26.4 °C y la precipitación pluvial de 1,050 mm anuales en el sur de la reserva. Se identifican dos épocas climáticas para la región, la época de secas, que abarca de noviembre a abril y la época de lluvias, de mayo a octubre (CONANP, 2006). Los registros de mamíferos para la RBLP indican que hay 47 especies correspondientes a ocho órdenes, 21 familias y 38 géneros. Entre los mamíferos más comunes se encuentran: el ocelote (*Leopardos pardalis*), jaguar (*Pantera onca*), jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*), puma (*Puma concolor*), tigrillo (*Felis wiedii*), pecarí (*Pecari tajacu*), venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), conejo (*Sylvilagus floridanus*), tlacuache (*Didelphis virginiana/marsupialis*) entre otros (CONANP, 2006) (Figura 2).

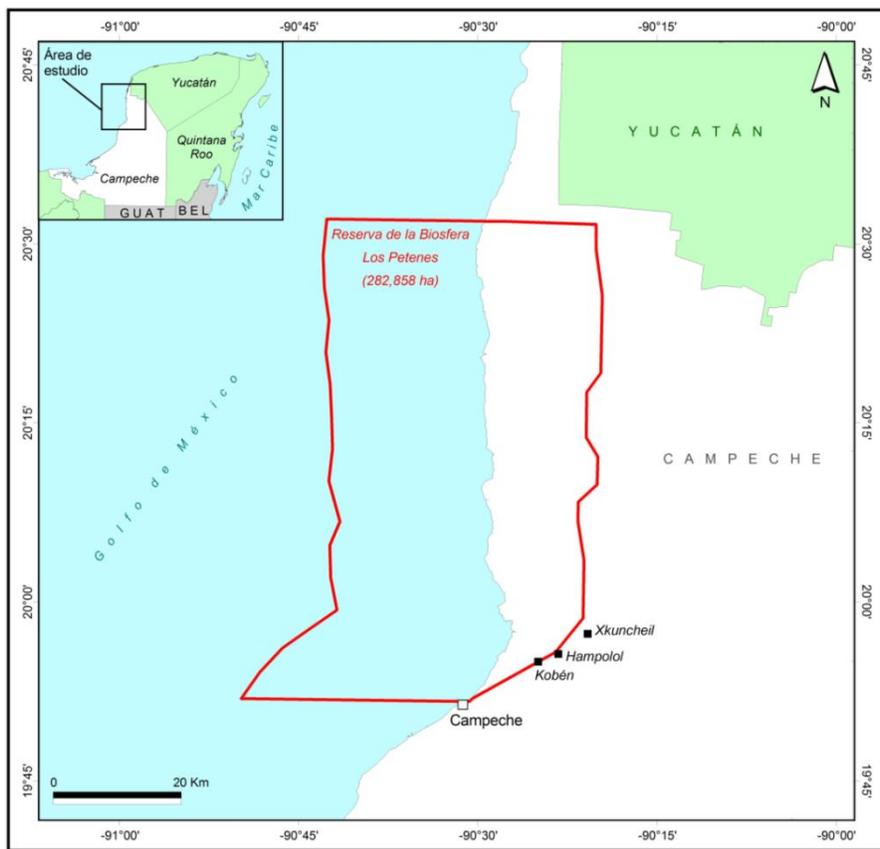


Figura 2. Mapa de la Reserva de la Biósfera Los Petenes

4.3. Capturas, toma de muestras y registro

Se realizaron muestreos de tipo transversal obteniendo muestras de sangre de perros de libre rango y tlacuaches. En la REPSA, se obtuvieron muestras de los perros de libre rango/callejeros que fueron encontrados en el campus universitario y dentro de la reserva. Para la toma de muestras en la mayoría de los casos, se utilizó la contención física usando laza perros o bozal. En caso de requerir contención química se utilizó una combinación de tiletamina/zolazepam a dosis de 6.6 a 9.9 mg/kg vía intramuscular o de ketamina/xilacina a dosis de 11 mg/kg y 2.2 mg/kg respectivamente (Plumb 2010).

En relación a los tlacuaches, los muestreos se realizaron en las tres zonas núcleo (Núcleo Poniente, Núcleo Oriente y Núcleo Sur Oriente) y en el área de amortiguamiento A3 (Cantera Oriente). Se utilizaron trampas Tomahawk®, cebadas

(atún, sardina, huevo, comida comercial para gato o pollo), plegables con una puerta abatible. Las trampas fueron colocadas a una distancia de 50-200 metros entre ellas. Se realizó un muestreo en cada lugar usando entre 8 y 10 trampas, las cuales fueron dejadas por 4-6 noches. Se realizaron recorridos dos veces al día para la revisión de las trampas, de las 7:00 a las 10:00 h verificando que tuvieran cebo y que no estuvieran activadas o con animales y de las 17:00 a 19:00 h para volverlas a cebar. Los marsupiales capturados (*Didelphis* spp.) fueron manejados mediante contención química y física. La contención física se realizó mediante guantes de carnaza y bolsa de tela para inmovilizar al animal y minimizar el riesgo de mordidas. La contención química, de ser requerida, se llevó a cabo con una combinación de ketamina/xilacina a dosis de 10 mg/kg y 2 mg/kg respectivamente, vía intramuscular.

En el caso de RBLP, se muestrearon perros de 3 comunidades aledañas a la reserva: Hampolol, Kobén y Xkuncheil. Se aplicaron cuestionarios a los propietarios de los perros para conocer la edad de los animales, si habían sido vacunados contra la rabia y saber cada cuánto los llevaba adentro de la reserva (perros con dueño y sin restricción para entrar a la reserva). Se obtuvieron las muestras de sangre únicamente a los perros que estuvieran en contacto con la reserva. El muestreo de tlacuaches se realizó en un parche de vegetación cercano a la RBLP. Para la captura y toma de muestras de sangre de perros y tlacuaches se utilizó la metodología previamente descrita.

Se elaboró un formato de registro individual de los animales muestreados/capturados (perros y tlacuaches) que incluía el nombre común, nombre científico, sexo, edad aproximada, sitio de captura. También se registraron los datos del proceso de anestesia, medidas morfométricas y muestras a recolectar. Cada individuo fue evaluado mediante un examen físico, el cual consistió en la evaluación de la condición corporal, del sistema tegumentario, ojos, cavidad oral, sistema respiratorio, cardiaco, muscular y nervioso. Adicionalmente se tomaron datos de las constantes fisiológicas (frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca, pulso, temperatura). Durante la anestesia, el animal se colocó bajo la sombra, en decúbito lateral monitoreando los siguientes signos: frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca, temperatura, color de mucosas y el

tiempo de llenado capilar. Cada animal muestreado se marcó con tinte para cabello, marcas naturales (cicatrices, amputación de falanges), muescas o microchips de acuerdo a la disponibilidad.

La edad de los perros se determinó mediante la encuesta que se aplicó a los propietarios de los animales. En caso de que los propietarios desconocieran la edad del perro, se calculó haciendo observaciones en la dentadura (presencia de dientes permanentes, el desgaste progresivo y cúmulo de sarro). Se consideró juvenil a los animales de menos de un año, animales adultos de 1 a 7 años aproximadamente, y animales seniles aquellos mayores de 8 años. En el caso de los tlacuaches, la edad aproximada se determinó mediante la erupción y el desgaste dentario. Una característica de interés es la de su tercer molar, el cual carece de raíz, y que es remplazado posteriormente por otro con la estructura propia de un premolar. La muda del molar (8 meses aprox.) se presenta en el momento en que el marsupial pasa de la etapa juvenil a la adulta (Gardner y Creighton, 2008). Se consideró que un tlacuache era senil cuando tenía un desgaste dental evidente y ausencia de piezas dentales junto con la acumulación de sarro (2.5-4 años).

Se obtuvieron de 1 a 5 ml de sangre de la vena coccígea en tlacuaches y de 5-10 ml en la vena yugular en perros. Las muestras fueron colectadas en tubos al vacío sin anticoagulante (Vacutainer® tapón rojo), se procesaron dentro de un periodo de 24 horas después de la toma. El suero fue separado mediante centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos y se almacenó a -4 a -20⁰C hasta el momento de realizar las pruebas para detección de anticuerpos contra rabia y *Leptospira*. Después de la toma de muestras, los animales anestesiados se colocaron en una jaula transportadora para su recuperación y sus signos vitales fueron monitoreados. Una vez recuperados de la anestesia cada animal fue liberado en la misma zona donde se capturó. Aquellos animales que no fueron anestesiados se liberaron lo más cercano posible al sitio de captura.

4.4. Análisis serológico

Para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes del virus de la rabia, se utilizó la prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes (RFFIT), adaptada de Smith *et al.*, 1996. El análisis de laboratorio se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología (UIM-I) en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en la Ciudad de México.

Antes de iniciar la prueba los sueros de los animales se inactivaron a 56°C durante 45 minutos para que no influyeran con el cultivo celular. La línea celular empleada en los ensayos realizados fue células BHK 21 (células de riñón de hámster lactante), las cuales se prepararon previamente con tripsina, medio mínimo esencial (MEM suplementado al 10% con suero fetal bovino) y solución amortiguadora (PBS). En una placa de 12 columnas y 8 hileras (96 pozos) se distribuyeron 100 µl de medio MEM sin suero fetal bovino. La primera columna fue dividida para el control de virus y control de células. En la segunda columna se agregaron 50 µl de suero de referencia con título conocido (10UI) y se hicieron diluciones seriadas. Posteriormente, se agregaron 50 µl del suero problema (perros y tlacuaches) desde la columna 3 hasta la 12, se homogenizó y se hicieron diluciones a partir de títulos 1:3. Después se adicionaron, a cada dilución de suero, 50 µL de una suspensión del virus de rabia PV (*Pasteur Virus*) con un título conocido y previamente determinado con 20-50 unidades formadoras de focos fluorescentes. La mitad de la primera columna, se dejó sin inóculo de virus como control de la viabilidad del cultivo celular (control de células) y se le agregaron 50 µl de medio MEM para que cada pozo tuviera la cantidad final de 100 µl. La placa se incubó por 1 hora a 37°C en atmósfera de CO₂. Una vez finalizada la hora se empleó un cultivo de células BHK-21 para ser infectadas con la cepa Pasteur (PV), se añadió el volumen necesario (50 µl) de cultivo celular para que cada pozo tuviera 40,000 células y se incubó en las mismas condiciones por 48 horas. Transcurrido este tiempo, se decantó el sobrenadante. Posteriormente se agregaron 50 µl de Cytifix (BD-Biosciences®, fijación y permeabilización de células) para fijar la placa y se colocó en el cuarto frío a 4°C durante 45 minutos. Luego se retiró el Cytifix por completo y la

placa se dejó secar al aire. Una vez seca, se añadieron 50 µl de conjugado anti-nucleocápside del virus de la rabia a cada pozo, el cual consiste en una mezcla de anticuerpos antirrábicos conjugados con fluoresceína (FITC). Se guardó en una bolsa de aluminio y se incubó por 1 hora a 37°C en la cámara de agitación a 100rpm. La placa se lavó con agua, se añadieron 100 µl de líquido de montaje (glicerina-PBS al 50%, pH 8.2-8.4) y se observó al microscopio invertido. Se contaron los focos fluorescentes presentes en cada uno de los pozos.

El virus de la rabia que no ha sido neutralizado por los RVNA (anticuerpos neutralizadores del virus de la rabia), infecta a las células y esto puede ser observado en el microscopio. Una reducción de 50% o más del número de campos que contengan células fluorescentes indica que hay suficiente anticuerpos presentes para neutralizar el virus. Los cálculos se realizaron mediante la observación de células infectadas, se contaron los focos fluorescentes en cada uno de los pozos y los resultados se expresaron en Unidades Internacionales (UI/mL), tomando como base la reducción de focos fluorescentes producida por el suero de referencia con título conocido (10 UI). El resultado de la prueba se puede expresar de dos maneras: por títulos o por unidades internacionales (UI/mL). Las unidades internacionales se calculan mediante la comparación de los títulos con el suero de referencia mediante el método de Reed y Muench (Habel 1996). Debido a que RFFIT es una prueba biológica que usa células vivas, virus infeccioso y anticuerpos, el suero de referencia puede variar en cada prueba, es por eso que para cada cálculo de UI/mL depende de los títulos que tenga el suero de referencia. De acuerdo con la organización Mundial de la Salud, los títulos de anticuerpos mayores o igual a 0.5 UI/mL demuestran una respuesta inmune robusta después de la vacunación (en perros y humanos) o es evidencia del contacto/infección con el virus y por consiguiente la producción de anticuerpos (Almeida *et al.*, 2001). Ajustamos el nivel de corte a 0.5 UI/ml debido a que da la posibilidad de que en el suero de los animales se encuentren inhibidores no específicos, lo que puede dar como resultado falsos positivos si el punto de corte es bajo (East *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2010).

En relación al análisis para *Leptospira*, se usó la técnica de aglutinación microscópica (AM) descrita por Alexander (1986) con una batería de 5 cepas de *Leptospira interrogans*. Las serovariedades utilizadas fueron: *canicola*, *pomona*, INIFAP (*hardjo*), Palo Alto (*icterohaemorrhagiae*) y *bratislava*. Cabe mencionar que las serovariedades INIFAP y Palo alto son cepas de aislamiento (en México), las demás son cepas de referencia. Todas las serovariedades pertenecen al laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Palo Alto).

Se utilizaron placas de 96 pozos. Se mezclaron 75µL de PBS y 75 µL de una mezcla del suero problema con el antígeno (serovariedades de *Leptospira*). Se homogenizaron y en las columnas de las placas se realizaron las diferentes diluciones dobles (1:20, 1:40, 1:80, 1:160 etc.). Cada una de las placas se incubaron durante 30 minutos a una temperatura de 37.5⁰C. El control consistió de 5 pozos (1 por serovariedad), la cual, tenía 75 µL de PBS y 75 µL del antígeno sin suero problema. La reacción del suero con el antígeno se comparó con el control mediante la observación en un microscopio de campo oscuro. La dilución más alta con aglutinación del 50% de *Leptospira* fue considerada positiva. Se consideró que los perros con títulos de 1:100 cursan una leptospirosis clínica. Los signos para fauna silvestre son diversos y para algunas especies desconocidos (Acha 2001). En estudios previos de leptospirosis en fauna silvestre han iniciado con títulos 1:10 para determinar la dilución final de cada una de la serovariedades (Montiel-Arteaga *et al.*, 2015). En el caso de los tlacuaches se utilizaron diluciones seriadas a partir de 1:20 para determinar la serovariedad infectante. Para la interpretación de los resultados de AM no se utilizó un punto de corte debido a que, los tlacuaches, como muchos animales silvestres en México, no se vacunan contra *Leptospira* (Ávalos-Téllez *et al.*, 2016). Las muestras que no cumplieron con esos criterios se consideraron negativas.

4.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se agruparon los animales usando varios criterios. Se compararon las frecuencias totales de anticuerpos contra ambos agentes patógenos en ambas reservas ecológicas. Posteriormente se hizo un análisis por lugar (RBLP y REPSA) analizando las dos especies (perros de libre rango y tlacuaches), las edades y el sexo. De igual forma se realizó el análisis de los datos de manera individual para cada especie, comparando edades y sexo mediante estadística no paramétrica expresando las proporciones con un intervalo de confianza del 95% utilizando el programa EpiInfo™ del CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Los resultados de las frecuencias fueron comparados categóricamente entre las dos comunidades estudiadas mediante pruebas: de Chi-Cuadrada (X^2), prueba logarítmica de G y prueba exacta de Fisher.

Se usó la prueba de Chi-cuadrada (X^2) cuando al menos el 80% de los valores esperados en las celdas de la tabla de contingencia fueron mayores a 5, debido a que si, el número esperado de observaciones en cualquier categoría es muy pequeño, la prueba puede dar resultados incorrectos (Pértega y Fernández 2004; McDonald 2014). Cuando no se pudo utilizar Chi-Cuadrada, se usó la prueba exacta de Fisher ya que esta permite analizar si dos variables dicotómicas están asociadas cuando la muestra a estudiar es demasiado pequeña (Pértega y Fernández 2004). La prueba logarítmica G se usó cuando se tenían dos variables nominales y cada una de éstas tenía dos o más valores (en el caso de la edad) y al ser una transformación logarítmica base 10, la hace independiente del tamaño de muestra. La posibilidad de ocurrencia y la asociación con los factores de riesgo de rabia y *Leptospira* en perros de libre rango y tlacuaches se determinó mediante el uso de razón de probabilidades (OR: *Odds Ratio*) midiendo de manera simultánea las variables lugar, sexo y edad. Se utilizó OR en lugar de riesgo relativo (RR), ya que OR constituyen una medida de efecto alternativa al RR, y permite expresar los resultados de estudios transversales. Un resultado igual o menor que 1 indica que la variable analizada no representa un riesgo en la transmisión pero el riesgo será mayor a medida que el valor de 1 aumente. (Cerdeira *et al.*, 2013).

5. Resultados

El estudio se llevó a cabo de septiembre a noviembre de 2014 y de mayo a octubre de 2015 en dos reservas ecológicas: Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) y La Reserva de la Biósfera Los Petenes (RBPL). Ambos muestreos fueron en época de lluvias.

5.1. Capturas

Se obtuvieron muestras de sangre de 121 animales (64 perros y 57 tlacuaches) en las dos reservas (Cuadro 1). Para la REPSA fueron 55 animales. Se registraron 6 perros adultos de libre rango/callejeros, 4 machos y 2 hembras. Un vez tomadas las muestras, los perros fueron remitidos al área de control de especies invasivas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM (FMVZ-UNAM). Se realizó un esfuerzo de captura de 1680 noches/trampa y se capturó un total de 49 tlacuaches (*Didelphis virginiana*), 27 machos y 22 hembras (33 adultos, 15 juveniles y 1 tlacuache senil). Cabe mencionar que 4 de los 49 tlacuaches fueron reportes dentro de edificios en Ciudad Universitaria (CU). Se tomaron las muestras de estos 4 tlacuaches y se liberaron en la zona núcleo más cercana a su captura. En RBPL se colectaron muestras de 66 animales. El conteo directo indicó que 58 perros son los que están en contacto con la reserva, 37 machos y 21 hembras (51 adultos, 5 juveniles y 2 seniles). Se capturaron 8 tlacuaches de dos especies (2 *Didelphis marsupialis* y 6 *Didelphis virginiana*) 4 machos y 4 hembras (5 adultos y 3 juveniles), teniendo un esfuerzo de captura de 1440 noches/trampa.

5.2. Evaluación serológica de Rabia

Se procesaron 30 sueros de animales procedentes de las dos reservas para el análisis de anticuerpos contra rabia mediante la prueba RFFIT. Se utilizó la totalidad de los sueros de los perros muestreados en REPSA (6) y de los tlacuaches muestreados en RBPL (8). Posteriormente se tomó una muestra aleatoria para perros en RBPL y para

tlacuaches en REPSA, debido a que el laboratorio donde se procesaron las muestras (Centro Médico) no tenía la disponibilidad para el análisis del total de los sueros (121).

Cuadro 1. Perros de libre rango (*Canis familiaris*) y tlacuaches (*Didelphis spp.*) muestreados en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y en la Reserva de la Biósfera Los Petenes

Localidad	Especie (n)	Machos (n=72)			Hembras (n=49)		
		Adulto	Juvenil	Senil	Adulto	Juvenil	Senil
RBLP	<i>Canis familiaris</i> (58)	34	2	1	17	3	1
	<i>Didelphis virginiana</i> (6)	1	2	0	2	1	0
	<i>Didelphis marsupialis</i> (2)	1	0	0	1	0	0
REPSA	<i>Canis familiaris</i> (6)	4	0	0	2	0	0
	<i>Didelphis virginiana</i> (49)	14	13	0	19	2	1

Se analizaron muestras de 12 perros adultos (6 de REPSA y 6 de RBLP) 8 machos y 4 hembras y 18 tlacuaches (8 de RBLP y 10 de REPSA) 9 machos y 9 hembras (9 adultos, 8 juveniles y 1 senil). Se encontraron títulos desde 0.07 hasta 7.6 UI en perros y desde 0.053 hasta 1.04 UI en tlacuaches. La evaluación serológica indicó que, de los 30 sueros de animales analizados, 15 (50% IC 95%: 32.1-67.89%) presentaron anticuerpos >0.5 UI (Cuadro 2), lo que indica que tuvieron suficiente contacto con el virus de la rabia para mostrar una respuesta inmunológica evidente.

Cuadro 2. Frecuencia de perros de libre rango y tlacuaches del género *Didelphis* expuestos al virus de la rabia en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y en la Reserva de la Biósfera Los Petenes

Animales	n	Frecuencia total de <i>rabia</i>			
		Expuesto	Frecuencia (%)	IC 95% menor	IC 95% mayor
Perros de libre rango	12	9	75	54.99	95
Tlacuaches (<i>Didelphis spp.</i>)	18	6	33.33	6.39	59.6
Total	30	15	50	32.1	67.89

IC: Intervalo de confianza al 95%

Se analizaron los sueros de 17 machos y 13 hembras de dos especies (12 perros y 18 tlacuaches). De los 15 animales que resultaron expuestos a rabia 5 eran machos y 10

hembras (Cuadro 3). Se encontró una frecuencia de anticuerpos contra rabia de 29.4% (IC 95%: 7.4-50.5%) en machos y de 76.92% (IC 95%: 52.78%-99.21%) para hembras. De las 12 muestras de perros analizadas (8 machos y 4 hembras), se encontró que 5 machos y todas las hembras presentaron anticuerpos ≥ 0.5 UI contra el virus de la rabia (frecuencia 62.5% IC 95%: 28.95-96.05%).

De las 18 muestras de tlacuaches en las dos reservas, 9 eran machos y 9 hembras. Ningún tlacuache macho presento anticuerpos contra el virus de la rabia (< 0.5 UI), pero si el 66.6% de las hembras (IC 95%: 35.05-96.94%).

Cuadro 3 Frecuencia de RVNA según el sexo en perros de libre rango y tlacuaches del género *Didelphis* en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y en la Reserva de la Biósfera Los Petenes

Sexo	Frecuencia total de rabia por sexo				
	n= 30	Expuestos	Frecuencia (%)	IC 95% menor	IC 95% mayor
Machos	17	5	29.4	7.4	50.5
Hembras	13	10	76.92	52.78	99.21

IC: Intervalo de confianza al 95%

De los 30 sueros de animales analizados 21 provenían de ejemplares adultos, 8 juveniles y solo 1 senil con una frecuencia de animales expuestos de 57.14% (IC 95% 35.8-78.1) y 25% (IC 95%: 0-55%) para adultos y juveniles respectivamente. El único animal senil analizado presentó anticuerpos > 0.5 UI contra el virus de la rabia (Cuadro 4).

5.3. Evaluación serológica de *Leptospira* spp.

Se analizó la totalidad de las muestras (121) y se encontró una frecuencia total de 16.52% (IC 95%: 9.88-23.11%) de *Leptospira interrogans* (20 animales positivos), con anticuerpos para las cinco serovariedades (*canicola*, *pomona*, *hardjo*, *icterohaemorrhagiae* y *bratislava*) en las dos reservas.

Cuadro 4 Frecuencia de RVNA según la edad en perros de libre rango y tlacuaches del género *Didelphis* en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y en la Reserva de la Biósfera Los Petenes

Edad	Frecuencia total de rabia por edad				
	n= 30	Expuestos	Frecuencia (%)	IC 95% menor	IC 95% mayor
Adultos	21	12	57.14	35.8	78.1
Juveniles	8	2	25	0	55
Seniles	1	1	100	-	-

IC: Intervalo de confianza al 95%

Los perros resultaron positivos a todas las serovariedades con una frecuencia del 25% (IC 95%: 14.39-35.6%) (16 animales positivos) con títulos desde 1:20 hasta 1:3200. Cabe mencionar que 8 de los 64 perros presentaron reacción para 2 o más serovariedades. 5 de estos 8 perros reaccionaron a 3 serovariedades, uno de ellos con títulos 1:3200 para las serovariedades *canicola*, *pomona* y *bratislava*. Los otros 4 perros tuvieron reacción a las mismas serovariedades pero con variación en los títulos, desde 1:40 hasta 1:800. Solo uno de los 64 perros (RBLP Kobén) presentó anticuerpos para 4 serovariedades con títulos 1:3200 para *canicola*, 1:1600 para *pomona*, 1:20 para *icterohaemorrhagiae* y 1:20 para *bratislava*. En el caso de los tlacuaches solo 4 de los 57 (7.01%, IC 95%: 4.8-13.91%) resultaron positivos con títulos 1:20 y 1:40 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Evaluación serológica de *Leptospira* spp. en poblaciones de perros y tlacuaches de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y de la Reserva de la Biósfera Los Petenes

Animales	Frecuencia total de <i>Leptospira</i> spp.				
	n	Positivos	Frecuencia (%)	IC 95% menor	IC 95% mayor
Perros de libre rango	64	16	25	14.39	35.6
Tlacuaches (<i>Didelphis</i> spp.)	57	4	7.01	4.8	13.91
Total	121	20	16.52	9.88	23.11

IC: intervalo de confianza al 95%

En relación a los perros de RBLP, se obtuvieron muestras de sangre en 3 comunidades: 21 perros en Hampolol, 22 en Kobén y 15 perros en Xkuncheil. En REPSA se obtuvieron muestras de sangre de 6 perros. La evaluación serológica indica que la frecuencia de *Leptospira* spp. fue de 14.2% para Hampolol, 36.3% en Kobén, 20% en Xkuncheil y 33.3% en REPSA (Cuadro 6).

Cuadro 6. Frecuencia de *Leptospira interrogans* en perros de libre rango

Frecuencia de <i>Leptospira</i> spp. en perros de libre rango					
Lugar	n	Positivos	Frecuencia (%)	IC 95% menor	IC 95% mayor
Hampolol	21	3	14.2	0	20.19
Kobén	22	8	36.3	16.2	56.39
Xkuncheil	15	3	20	0	40.24
REPSA	6	2	33.3	0	71.01
Total	64	16	25	7.02	24.98

IC: intervalo de confianza al 95%

La frecuencia *Leptospira* spp. en las comunidades adyacentes a RBLP fue del 24.14% (IC 95%: 13.09-35.11) (14 de 58 perros muestreados) con títulos para las 5 serovariedades. 8 perros reaccionaron contra *canicola* (13.79%. IC 95% 4.85-22.55%), 7 perros a *bratislava* y *pomona* (12.07%, IC 95%: 0-71.01%), 4 a *hardjo* (6.9% IC 95% 0-13.41%) y solo 2 perros a *icterohaemorrhagiae* (3.45% IC 95% 0-8.13%) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Evaluación de las serovariedades de *Leptospira* spp. en perros de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y de la Reserva de la Biósfera Los Petenes

Serovariedad	RBLP				REPSA			
	Positivos*	Frecuencia (%)	IC 95% menor	IC 95% mayor	Positivos*	Frecuencia (%)	IC 95% menor	IC 95% mayor
<i>canicola</i>	8	13.79	4.85	22.55	1	16.67	0	45.34
<i>pomona</i>	7	12.07	3.64	20.36	1	16.67	0	45.340
<i>hardjo</i>	4	6.90	0	13.41	0	-	-	-
<i>icterohaemorrhagiae</i>	2	3.45	0	8.13	1	16.67	0	45.34
<i>bratislava</i>	7	12.07	3.64	20.36	2	33.33	0	70.62
total perros	14**	24.14	13.09	35.11	2**	33.33	0	71.01

IC: Intervalo de confianza al 95%

*Ejemplares con títulos de anticuerpos contra *Leptospira*

**8 de los 16 perros positivos presentaron reacción para más de una serovariedad

En REPSA, la frecuencia en perros fue de 33.33% (IC 95%: 0-71.01%) y presentaron reacción para tres serovariedades. Un perro reaccionó para *canicola* 1:40, para *pomona* 1:80 y *bratislava* 1:200. El otro perro presentó títulos 1:80 para *icterohaemorrhagiae* y *bratislava* (Cuadro 7).

La frecuencia de seroprevalencia positiva de *Leptospira* spp. en tlacuaches fue de 7.02% (IC 95%: 4.9-13.91%). De los 49 tlacuaches muestreados en REPSA solo 3 (6.1% IC 95%: 0-12.8%) presentaron anticuerpos contra *Leptospira interrogans* con títulos 1:20 para *hardjo* y 1:20 y 1:40 para *icterohaemorrhagiae*. Solo uno de los 8 tlacuaches muestreados en RBLP (12.5% IC 95%: 0-35.41%) presentó títulos 1:20 para la serovariedad *bratislava* (Cuadro 8).

Cuadro 8. Frecuencia de *Leptospira interrogans* en tlacuaches (*Didelphis* spp.)

Frecuencia de <i>Leptospira</i> spp. en tlacuaches (<i>Didelphis</i> spp.)					
Lugar	n	Positivos	Frecuencia (%)	IC 95% menor	IC 95% mayor
RBLP	8	1	12.5	0	35.41
REPSA	49	3	6.1	0	12.8
Total	57	4	7.02	4.9	13.91

IC: Intervalo de confianza al 95%

De los 121 animales muestreados, 95 eran adultos, 23 juveniles y 3 animales seniles. Se encontró que, de los 20 animales positivos, 17 eran adultos (frecuencia de 14.05% IC 95%: 7.06-21.03%), 2 juveniles (1.65% IC 95%: 0-6.85%) y 1 senil (0.83% IC 95%: 0-11.02%) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Frecuencia de *Leptospira* spp en perros de libre rango y tlacuaches por edades en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y en la Reserva de la Biósfera Los Petenes

Frecuencia total de <i>Leptospira</i> spp. por edad					
Edad	n= 121	Positivos	Frecuencia (%)	IC 95% menor	IC 95% mayor
Adulto	95	17	14.05	7.06	21.03
Juvenil	23	2	1.65	0	6.85
Senil	3	1	0.83	0	11.02

IC: Intervalo de confianza al 95%

En relación al sexo de los animales, 71 eran machos de los cuales 15 eran positivos (Frecuencia de 14.05%, IC 95%: 7.06-21.03). Y 50 hembras: 5 animales positivos con una frecuencia del 4.3% (IC 95%: 0-9.59%) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Frecuencia de *Leptospira* spp en perros de libre rango y tlacuaches por sexo en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel y en la Reserva de la Biósfera Los Petenes

Sexo	Frecuencia total de <i>Leptospira</i> spp. por sexo				
	n= 121	Positivos	Frecuencia (%)	IC 95% menor	IC 95% mayor
Machos	71	15	12.3	4.66	19.93
Hembras	50	5	4.13	0	9.59

IC: Intervalo de confianza al 95%

6. Discusión y conclusiones

Este estudio confirma la exposición a rabia y *Leptospira interrogans* mediante la presencia de anticuerpos en poblaciones de perros y tlacuaches de REPSA y RBLP. Los resultados obtenidos sugieren la presencia de los agentes infecciosos en el hábitat y que éstos, en algún momento, tuvieron contacto con los animales. Sin embargo, ninguno de los individuos en los grupos de animales muestreados presentó signología compatible con estas enfermedades.

6.1. Serología Rabia

Se detectaron frecuencias de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia en las dos reservas. Sin embargo, es posible que la respuesta de anticuerpos esté relacionada a los índices de perturbación y la frecuente invasión de especies ferales en ambas reservas (Suzán y Ceballos 2005). Es por esto que, en animales silvestres, es difícil establecer el punto de corte pues no se cuenta con sueros de referencia para las diferentes especies (Moore y Hanlon 2010). Lo anterior representa un problema cuando se pretende determinar hasta donde los anticuerpos son inespecíficos o son producto de un contacto con el virus sin consecuencias fatales (Aréchiga 2010).

No se encontraron animales seropositivos con signos clínicos contra rabia, posiblemente por los diferentes periodos de incubación entre las especies (Suzán y Ceballos 2005), porque la dosis de virus fue insuficiente para producir la enfermedad, porque aún no había desarrollado la infección o puede indicar que la variante del virus es menos patógena en algunas especies (Almeida *et al.*, 2001). East *et al.*, (2001) determinaron que el 37% de hienas muestreadas presentaron anticuerpos contra el virus de la rabia, pero sólo el 13% ocurrió la infección, lo que indica que muchos animales eliminan el virus después de la exposición sin generar infección.

Se han demostrado rutas alternas en la trasmisión del virus de la rabia. La infección oral en carnívoros mediante la ingestión de cadáveres contaminados, la cual puede

llevar a una infección letal. Sin embargo, es posible que algunos animales solo generen una respuesta a través de la producción de anticuerpos neutralizantes debido a una carga viral baja o que la cepa de virus de la rabia esté adaptada a una especie en específico y podría ser menos patógena o más inmunogénica para ciertas especies, resultando en una alta proporción de animales de diferentes especies con anticuerpos neutralizantes (Silva *et al.*, 2010). En ambas reservas, la forma en que se presentó el contacto no está clara pero puede incluir: programas de vacunación en los perros o el contacto con animales de la misma o diferente especie que comen carroña de animales que murieron a causa del virus o un virus latente activado por el estrés causado por especies invasivas, alta densidad de población, migración o peleas para establecer dominancia de territorio. (Araujo *et al.*, 2014).

Debido a que el presente estudio se limita a un análisis serológico y no se aisló ni secuenció el virus no es posible determinar qué variante es la que circula en ambas reservas. Tampoco se puede saber si la frecuencia de anticuerpos contra el virus de la rabia se debe a un salto entre las especies o son diferentes variantes del virus de la rabia en los lugares de muestreo. Sin embargo, existe la evidencia que el virus de la rabia está presente en las dos reservas y es muy posible que circule en un mayor número de especies. Se compararon las frecuencias en ambas reservas pero no se encontraron diferencias significativas ($p=0.73$) siendo la posibilidad de ocurrencia OR: 0.77. Estos resultados podrían indicar que la respuesta inmune al virus de la rabia puede derivarse de un contacto sucesivo con el virus y que este contacto no siempre genera infección (Almeida *et al.*, 2001; East *et al.*, 2001).

La mayoría de los animales muestreados eran adultos y probablemente han tenido un mayor contacto con el virus de la rabia a lo largo de su vida. Sin embargo, se compararon las edades de los animales en las dos reservas y no se encontraron diferencias significativas ($G=4.55$, $p=0.10$). Los adultos normalmente presentan más seroreactividad y se ha reportado en diversos estudios. En el caso de los animales jóvenes, la presencia de anticuerpos neutralizantes podría indicar la presencia de anticuerpos maternos (Almeida *et al.*, 2001). Si la exposición fue consecuencia de una

infección intraespecífica vía oral o muconasal entre la misma especie, se deben tomar en cuenta patrones de tasas de contacto, patrones de seroprevalencia en las diferentes edades, sexo y jerarquías sociales (East *et al.*, 2001).

No se encontraron diferencias significativas en relación al sexo ($p=0.08$) con una posibilidad de ocurrencia de OR 4.1 para hembras. Debido a las características etológicas y patrones sociales, se tiene que los machos son más susceptibles a los ataques y enfrentamientos con otros animales sanos e infectados (East *et al.*, 2001).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) (2013) considera que, en el caso de los humanos y perros, se posee protección contra el virus de la rabia cuando se presenta un título de 0.5 unidades internacionales. En este trabajo el 75% de los perros de libre rango (9 de 12) presentaron anticuerpos ≥ 0.5 UI y debido a que se aplicó una pequeña encuesta (Anexo 2) a los propietarios de los perros en RBLP se pudo conocer si habían estado en contacto con programas de vacunación antirrábica. De los 12 perros muestreados en RBLP y REPSA, 5 nunca habían sido vacunados contra la rabia (4 presentaron RVNA), 4 fueron vacunados hace más de dos años y 3 se desconoce si alguna vez habían sido vacunados (Los 3 presentaron RVNA. Perros de Ciudad Universitaria). De estos 4 animales que fueron vacunados, 3 presentaron anticuerpos ≥ 0.5 UI. La presencia de anticuerpos neutralizantes del virus de la rabia indica que los demás animales han estado en contacto con el virus (Araujo *et al.*, 2014) y de manera adicional se puede inferir que la presencia de estos anticuerpos en algunos perros con antecedentes de vacunación es debido al efecto de la vacuna. De igual forma se compararon las frecuencias de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia en perros de RBLP y REPSA pero no se encontraron diferencias significativas ($G=0.45$ $p=0.50$), con una posibilidad de ocurrencia de OR 0.4. También se compararon las frecuencias en perros en relación al sexo, sin encontrar diferencias significativas ($p=0.49$).

Los tlacuaches son menos susceptibles que otras especies al virus de la rabia, aunque casualmente pueden contraer la infección y por lo tanto producir anticuerpos (Almeida

et al., 2001). Tienen un alta capacidad sinantrópica lo que les permite adaptarse a áreas urbanas o reservas fragmentadas. En este estudio el 44% de los tlacuaches presentaron anticuerpos contra el virus de la rabia ≥ 0.5 UI, se compararon las dos reservas REPSA (40%) y RBLP (37.5%) pero no se encontraron diferencias significativas ($p=0.91$) con una posibilidad de ocurrencia no significativa (OR: 0.9). Las características sinantrópicas de estas especies en combinación con los hallazgos de anticuerpos neutralizantes en ambas reservas, reflejan la importancia de estudios continuos de vigilancia epidemiológica del virus de la rabia en tlacuaches (*Didelphis* spp.), como monitores o centinelas del estado de salud de sus poblaciones y de las interacciones que se dan en la interfase entre las actividades humanas y las poblaciones de animales domésticos y silvestres.

En la REPSA, la frecuencia de RVNA fue mayor en comparación con los trabajos anteriores. Previamente Suzán y Ceballos (2005) reportaron una frecuencia del 18% de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia en tlacuaches. De igual forma Ramírez *et al.*, (2012) determinaron que 35 de 155 animales muestreados en REPSA (22.5%) presentaban RVNA, de los cuales 23 eran tlacuaches (21%). Tomando en cuenta que se llevó a cabo un programa de control de perros en Ciudad Universitaria, se puede sugerir que, esta disminución de perros ha provocado un cambio de reservorio primario de los perros hacia otras especies, en cuanto a las cadenas cortas de transmisión del virus (Dobson 2004). De igual forma, el contacto con el humano y sus actividades generan un estrés elevado, lo que podría comprometer la inmunidad e incrementar la posibilidad de una infección viral debido a la respuesta insuficiente del sistema inmune de los animales.

La presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia en tlacuaches puede ser consecuencia de una seroconversión aumentada por una exposición no infecciosa continua (East *et al.*, 2001), lo que genera complicaciones a la hora de identificar el papel independiente de los tlacuaches y otros animales silvestres en el mantenimiento del virus (Lembo *et al.*, 2008). Durante el periodo de 1993-2003 se diagnosticaron 57184 casos de rabia en fauna silvestre en América con una mayor

proporción en mapaches (22,902), zorrillos (12,964), murciélagos (9,232) y zorros (5,016). La mayoría de los casos fueron en Estados Unidos (86%) (Belotto *et al.*, 2005). En la actualidad, la mayoría de los casos de rabia reportados en Norte América se han presentado en animales silvestres. Durante el 2013, 92% de los animales con rabia eran silvestres de los cuales, 32.4% eran mapaches y 27.2% murciélagos (Dyer *et al.*, 2014). En México, durante el 2013 y 2014, 4140 muestras de encéfalo se sometieron para la detección del virus de la rabia en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). Del total de las muestras positivas a rabia (245) el 69% eran bovinos, 13% murciélagos, 4% perros y el resto de los animales con rabia reportados eran fauna silvestre (14%). En México desde el 2012 no se han reportado casos de rabia en humanos. La vigilancia epidemiológica de la rabia que se realiza en el InDRE se enfoca a humanos y animales domésticos. Sin embargo, también procesan muestras de animales silvestres. El porcentaje de fauna silvestre positivo a rabia en 2013 y 2014 fue de 60% y 68% respectivamente (Aréchiga *et al.*, 2015), lo que pudiera indicar un aparente incremento en el número de ejemplares de fauna silvestre positivos y/o un incremento en el número de muestras remitidas de estas especies.

En ambas reservas hay varias especies silvestres que pueden ser el reservorio principal de rabia. En el caso particular de la REPSA, los cacomixtles y murciélagos podrían tener un rol en la transmisión del virus. Los cacomixtles pertenecen a la familia Procyonidae, misma a la que pertenecen los mapaches (*Procyon lotor*) que son conocidos por ser reservorios del virus de la rabia y en consecuencia ser fuente de infección para otros animales de vida silvestre. En el caso de los murciélagos no hematófagos, a pesar de que no son agresivos, ocasionalmente son fuente de contagio para humanos y otros mamíferos (Morimoto *et al.*, 1993).

Encontrar más adultos seropositivos que juveniles es consistente con el lapso que pasa la población con riesgo de exposición al virus. Sin embargo, se compararon las edades en los tlacuaches, no se encontraron diferencias significativas ($G=2.69$, $p=0.25$). En el caso de las comparaciones respecto al sexo, no se encontraron diferencias

significativas en tlacuaches ($p=0.065$) pero la posibilidad de ocurrencia es mayor (OR: 10.5) para hembras.

6.2 Serología *Leptospira* spp.

En México la leptospirosis está ampliamente distribuida. Aunque los roedores son considerados el principal reservorio de *Leptospira*, los perros pueden tener una relevancia epidemiológica debido a su relación con los humanos y sus actividades en áreas protegidas. Se compararon las frecuencias totales de *Leptospira* en ambas reservas y no se encontraron diferencias significativas ($\chi^2=3.12$, gl 1, $p=0.077$). Sin embargo, la posibilidad de ocurrencia es mayor para RBLP (OR: 2.9). Pacheco *et al.*, 2010 reportaron que en poblaciones silvestres aisladas se favorecen las condiciones para que se presente la interfase entre animales domésticos, silvestres/ferales y humanos y como consecuencia se generen amenazas a mamíferos pequeños tales como los tlacuaches.

En RBLP, los perros tienen un contacto permanente con la reserva. El contacto se debe a que son utilizados para diferentes actividades antropogénicas, tales como la cacería y como protección. La frecuencia de *L. interrogans* en perros para RBLP fue de 24.13%, siendo la serovariedad *canicola* la más frecuente (57.14%). Este dato que concuerda con lo reportado por González *et al.* (2012) quienes indica que los carnívoros, como perros, zorros, coyotes y zorrillos, tienen frecuencias de *Leptospira* más altas, y éstas usualmente corresponden a la serovariedad *canicola*. De las 3 localidades muestreadas en Campeche, Kobén presentó la frecuencia más alta, con 8 animales positivos de 22 (36.3%). Las frecuencias de *Leptospira* para RBLP en este trabajo son similares a las reportadas por Blum *et al.*, (2013) en Campeche, quienes encontraron una frecuencia de 26.7% en perros callejeros.

En REPSA, se obtuvo una frecuencia de 33.33% de *L. interrogans* en perros, de las serovariedades *hardjo* e *icterohaemorrhagiae*, dato similar a lo encontrado por Rivera *et al.*, (1999) para perros callejeros en la Ciudad de México con una frecuencia de

38.51%. Aunque la frecuencia de *Leptospira interrogans* es mayor en perros de REPSA que RBLP no se encontraron diferencias significativas ($p=0.63$), pero la posibilidad de ocurrencia es igual en ambas reservas (OR: 0.63). Los muestreos en ambas zonas fueron realizados durante la época de lluvias, lo que potencialmente permite la transmisión indirecta mediante la contaminación ambiental. Esta transmisión indirecta es favorecida por factores relacionados al clima, como la humedad, temperatura, pH, las cuales son esenciales para la supervivencia de la bacteria (Levett, 2001; Cosso *et al.*, 2014).

De las muestras de perros analizadas (REPSA y RBLP), 6 reaccionaron a 3 serovariedades y una reaccionó a 4 serovariedades con títulos desde 1:100 hasta 1:3200. Levett (2001) menciona que las reacciones cruzadas con las diferentes serovariedades son comunes en muestras en fase aguda. Las reacciones cruzadas son el resultado de AM detectando ambos anticuerpos IgG e IgM, y también debido a la presencia de diferentes antígenos que comparten las leptospiras. Sin embargo, también existe la posibilidad de que el animal esté infectado con más de una serovariedad; es por esto que se ha sugerido que la serovariedad que tenga los títulos más altos pueda ser la variedad infectante (Chirathaworn *et al.*, 2014).

En este estudio, el 75% de los animales positivos (perros de libre rango y tlacuaches) a *L. interrogans* eran machos (15 animales). Se comparó el sexo de los animales pero no se encontraron diferencias significativas ($\chi^2=1.68$, gl 1, $p=0.19$) y la posibilidad de ocurrencia es igual en ambas reservas (OR: 0.43). De igual forma, no se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras de perros en ambas reservas ($p=0.37$) siendo la posibilidad de ocurrencia igual (OR: 0.5). Las diferencias debido al sexo, pueden ser resultado a interacciones inmunoendócrinas. Cosson *et al.* (2014) reporta en un estudio realizado con roedores, que los machos son más susceptibles a la infección que las hembras, lo que concuerda con otros estudios (Klein, 2000).

Se compararon las edades de todos los animales pero no se encontraron diferencias significativas entre adultos, juveniles y seniles ($G=1.83$, $p=0.4$). En relación a los

perros, también se realizó una comparación de edades pero no se encontraron diferencias significativas ($G= 0.65$, $p=0.72$). Ya que no se observó algún efecto en relación a la edad, se debe considerar que las regiones estudiadas son endémicas a infecciones por *Leptospira* y que los factores de riesgo relacionados a la exposición empiezan desde temprana edad (Leal-Castellanos *et al.*, 2003).

En una comparación con animales domésticos y peridomésticos, las especies silvestres son poco consideradas en vigilancia epidemiológica relacionada con *Leptospira* spp. (Jobbins y Alexander 2015). Aunque los muestreos se realizaron en época de lluvia, la frecuencia de *L. interrogans* fue relativamente baja en tlacuaches. De las 57 muestras analizadas, en 4 se detectaron anticuerpos (7.01%). lo que concuerda con estudios previos en tlacuaches. Ruíz-Piña *et al.*, (2002) reportaron 4.9% de frecuencia de *L. interrogans* en tlacuaches en la Península de Yucatán. En REPSA la frecuencia de anticuerpos contra *L. interrogans* en tlacuaches fue de 6.1% y en RBLP 12.5%, se compararon ambas frecuencias sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p=0.46$), pero la posibilidad de ocurrencia (OR) fue de 2.1.

La baja frecuencia de *Leptospira* en tlacuaches podría estar relacionada con el hecho que desde 2010 a la fecha la FMVZ y la Secretaria de la REPSA realizan en conjunto, el programa de reducción y control de fauna feral en Ciudad Universitaria. Con este programa se han atrapado más de 130 perros callejeros/ferales en el campus universitario. De igual manera, en la región aledaña a RBLP, donde se tomaron muestras de sangre de tlacuaches, tenían un contacto limitado con los perros de la zona. Hay que tomar en cuenta que los tlacuaches desempeñan un papel como huéspedes accidentales respecto a *Leptospira* spp. Observamos que el valor de la frecuencia total fue considerablemente más bajo que en estudios previos con tlacuaches. Herrejón y Gual en 2010 reportaron >43% de prevalencia de *Leptospirosis* sp. en la REPSA, lo cual pudo ser consecuencia de un contacto directo con los perros los cuales constituyen un reservorio de este organismo patógeno. Sin embargo, con las frecuencias encontradas en este estudio no se puede inferir que el contacto directo con los perros de libre rango juega un papel importante en la transmisión, por lo cual su

exposición pudo ser accidental y probablemente por el contacto con roedores (Jiménez-Coello *et al.*, 2010).

Al igual que en los perros se compararon las diferencias entre sexo y edades en tlacuaches. No se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras ($\chi^2=0.11$, $p=0.73$), con una posibilidad de ocurrencia de *L. interrogans* de 0.37. De igual manera, el factor de exposición para tlacuaches machos puede estar relacionado con interacciones del sistema inmune, como los esteroides sexuales, especialmente andrógenos ya que tiene un efecto inmunosupresor además de modular la susceptibilidad y resistencia del huésped (Klein, 2000).

Al comparar las edades no se encontraron diferencias significativas ($G=0.25$, $p=0.88$). Sin embargo, Eymann *et al.* 2007 sugiere que los adultos tienen una frecuencia más alta de anticuerpos debido a que tiene mayor riesgo acumulativo a la exposición por *Leptospira*.

Aunque los tlacuaches son considerados como el huésped primario de la serovariedad *ballum* (Richardson y Gauthier 2003), muy poca información se ha publicado con respecto al papel que tiene los tlacuaches en la transmisión de *L. interrogans* a los animales domésticos y humanos. En el pasado, las serovariedades *canicola* e *icterohaemorrhagiae* eran las más comúnmente asociadas a la leptospirosis, pero recientemente, la serovariedad *grippothyphosa*, *pomona* y *bratislava* se han convertido en una causa más frecuente en la leptospirosis. En nuestro estudio las serovariedades encontradas en tlacuaches en ambas reservas fueron *bratislava*, *hardjo* e *icterohaemorrhagiae* con títulos de 1:20 y 1:40 lo cual refleja una exposición al agente asintomática y posiblemente accidental (González *et al.*, 2012).

Estos resultados concuerdan con estudios previos que muestran que *Leptospira* circula principalmente en caninos y roedores. Tomando en cuenta que, en la vida silvestre, la serovariedad *icterohaemorrhagiae* es inusual (Gonzales *et al.*, 2012; Cosson *et al.*, 2014).

En general, a medida que la transmisión de virus y bacterias entre especies incrementa, más difícil será la identificación adecuada del reservorio. Es por esto que los estudios epidemiológicos derivan en información útil para proveer herramientas de prevención y control de las enfermedades.

La fragmentación ha alterado drásticamente la calidad de los hábitats lo que impacta fuertemente a las especies silvestres. El aumento de la intervención humana en áreas naturales, incluyendo reservas ecológicas, demuestra la necesidad de implementar estudios adicionales para entender el rol de las especies silvestres en relación a la circulación y transmisión de virus como la rabia y bacterias como la *Leptospira* a los animales domésticos y al humano.

Debido a que sólo se realizaron muestreos en dos especies es difícil obtener conclusiones acerca de la importancia de éstas y su rol en el mantenimiento del virus de la rabia. Se debe llevar a cabo un plan de vigilancia epidemiológica para determinar las variantes circulantes en los animales mediante la aplicación de técnicas moleculares y de tipificación con anticuerpos monoclonales, especialmente los carnívoros, murciélagos y en animales sacrificados o atropellados.

Considerando el riesgo potencial de transmisión de rabia de animales silvestres a los animales domésticos y humanos y el incremento de las poblaciones de tlacuaches en áreas urbanas es necesario incrementar el número de estudios epidemiológicos en mamíferos silvestres urbanos, toda vez que sus resultados proveen información valiosa acerca de la circulación del virus de la rabia en tlacuaches de ambas reservas. Es evidente que en México existe la necesidad de implementar un sistema de monitoreo de animales de vida silvestre que nos permita identificar pertinentemente el virus de la rabia. Se recomiendan estudios posteriores para conocer la variante del virus de la rabia que circula en ambas reservas mediante el aislamiento y secuenciación del virus.

Los resultados obtenidos mediante el uso de aglutinación microscópica demuestran su valor en la detección de *Leptospira interrogans* pero ofrecen solo un panorama debido

a las limitaciones en la prueba. La interpretación de esta prueba es complicada debido a las altas frecuencias de reacciones cruzadas que ocurren entre los serogrupos y a que la habilidad para determinar la serovariedad infectante es menor al 50%. Debido a esto, el aislamiento de la bacteria y su identificación mediante técnicas moleculares será esencial para estudios epidemiológicos posteriores en ambas reservas.

Las variaciones en el tamaño de las muestras hacen difícil las comparaciones, no obstante, nuestros resultados indican la circulación de *Leptospira* y rabia en ambas reservas. De igual forma, se puede concluir que los perros mantienen un contacto directo con los animales silvestres, en especial con los tlacuaches, formando una interfase en ambas reservas, ya que comparten similitudes en las frecuencias de anticuerpos que encontramos contra rabia y *Leptospira*. No podemos cuantificar la contribución de perros y tlacuaches en la transmisión de estas enfermedades.

Esta aproximación epidemiológica proporciona información importante por sus implicaciones en la salud pública ya que, en el caso de REPSA, las poblaciones de tlacuaches y otros animales silvestres urbanos se encuentran dentro de Ciudad Universitaria, lo que implica un riesgo potencial de transmisión de enfermedades zoonóticas debido al contacto indirecto y en ocasiones directo de estas especies con personas.

7. Referencias

Acha, P. 2001. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Third edition, Pan American Health Organization. Pp 175-186 y 351-378.

Allen, S., Ojkic, D., Jardine, C. 2014. Prevalence of antibodies to *Leptospira* in wild mammals trapped on livestock farms in Ontario, Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 50: 666-670.

Alexander, A. 1986. Serological diagnosis of leptospirosis. pp. 435-439. En: Rose, N., Friedman, H., and Fahey, J. Manual of clinical laboratory immunology, 3d edition. *American Society for Microbiology*, Washington, DC.

Almeida, M., Massad, E., Aguiar, E., Martorelli, L., Joppert, A. 2001. Neutralizing antibodies in urban terrestrial wildlife in Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*. 37: 394-398.

Aranda, J. 2012. Manual para el rastreo de mamíferos silvestres de México. México D.F. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). pp 39-51.

Araujo, D., Martorelli, L., Kataoka, A., Campos, A., Rodrigues, C., Sanfilippo, L., Cunha, E., Durigon, E., Favoretto, S. 2014. Antibodies to rabies virus in terrestrial wild mammals in native rainforest on the north coast of Sao Paulo state, Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*. 50: 469-477.

Aréchiga, N. 2010. Identificación de una nueva variante de virus de la rabia aislada en coatíes de nariz blanca (*Nasua narica*) de la Península de Yucatán relacionada con murciélagos no hematófagos. Tesis Doctorado. Instituto Politécnico Nacional. pp 81.

Aréchiga, N., Velasco, A., Shi, M., Flores, S., Barrón, B., Cuevas, E., Gonzales, A., Aguilar, A. 2010. New rabies virus variant found during an epizootic in White-nosed coatis from the Yucantan Peninsula. *Epidemiology and Infection*. 138:1586-9.

Aréchiga-Ceballos, N., Chávez-López, S. Sandoval-Borja, A. Padilla-Medina, I., Melo-Munguía, M., Martínez-Solís, D., Terán-Toledo, R., Animas, I., Gómez-Sierra, M., Gudiño-Vázquez, A., Escamilla-Ríos, A., Iguala-Vidaleslud, M. 2015. Rabies surveillance during 2013 and 2014 performed at InDRE. Laboratorio de Rabia. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Dirección General Adjunta InDRE. Secretaría de Salud.

Aréchiga, N., Ceballos, S., Vázquez, José., Berciano, O., Aznar, C., Juste, J., Rodríguez, C., Aguilar, A., Echevarría, J. 2013. Novel Lyssavirus in Bat, Spain. *Emerging Infectious Diseases*. 19: 793-795.

Avalos-Téllez, R., Carrillo-Casas, E., Atilano-López, D., Godínez-Reyes, C., Díaz-Aparicio, E., Ramírez-Delgado, D., Ramírez-Echenique, M., Leyva-Leyva, M., Suzán, G., Suárez-Guemes, F. 2016. Pathogenic *Leptospira* serovars in free-living sea lions in the Gulf of California and along the Baja California coast of Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*. 52: 199-208.

Basurto, F., Marín, J. 2011. Enfermedades infecciosas y vacunación. pp. 139-185. *En: Diplomado a distancia en medicina, cirugía y zootecnia en perros y gatos.* Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Beamer, P., Mohr, C., Barr, T. 1960. Resistance of the opossum to rabies virus. *American Journal of Veterinary Research*. 21: 507-510.

Beatty, W., Beasley, J., Dharmarajan, G., Rhodes, O. 2012. Genetic structure of a Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) population inhabiting a fragmented agricultural ecosystem. *Canadian Journal of Zoology*. 90: 101-109.

Belotto, A., Leanes, L., Schneider, M., Tamayo, H., Correa, E. 2005. Overview of rabies in the Americas. *Virus Research*. 111: 5-12.

Bingham, J. 2005. Canine rabies ecology in Southern Africa. *Emerging Infectious Diseases*. 11: 1137-1342.

Blum, S., Chi, M., Maldonado, M., Nuñez, L., Gómez, M., Caballero, R., Tamay, P 2013. Detection of reactive canines to *Leptospira* in Campeche City, Mexico. *Revista Argentina de Microbiología*. 45: 34-38.

Brickner, I. 2013. The impact of domestic dogs (*Canis familiaris*) on wildlife welfare and conservation: a literature review. With a situation summary from Israel.

Cano-Santana, Z., Castillo-Argüero, S., Martínez-Orea, Y., Juárez-Orozco, S. 2007. Análisis de la riqueza vegetal y el valor de conservación de tres áreas incorporadas a la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, Distrito Federal (México). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 82: 1-14.

Castillo, S., Martínez, Y., Romero, M., Guadarrama, P., Nunez, O., Sanchez, I., Meave, J. 2007. La Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel: aspectos florísticos y ecológicos. Departamento de Ecología y Recursos Naturales. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). pp 289.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2006. Standard operating procedure for the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus neutralizing antibody. pp 47.

Ceballos, G., Oliva, G. 2005. Los mamíferos de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad CONABIO. pp 106-110.

Cerda, J., Vera, C., Rada, G. 2013. Odds ratio: Theoretical and practical issues. *Revista Médica de Chile*. 141: 1329-1335.

Chirathaworn, C, Inwattana, R., Poovorawan, Y., Suwancharoen, D. 2014. Interpretation of microscopic agglutination test for leptospirosis diagnosis and seroprevalence. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*: 4S: 162-S164.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2010. Estrategia Nacional sobre especies invasoras en México: Prevención, control y erradicación. Comité Asesor Nacional sobre Especies Invasora.

Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). 2006. Programa de conservación y manejo de la Reserva de la Biosfera Los Petenes. 1ra edición. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). pp 204.

Cook, R., Karesh, W. 2008. Emerging Diseases at the Interface of People, Domestic Animals, and Wildlife. pp 55-80. *En: Fowler, M., Miller, E. 7 ed.* Zoo and Wild Animal Medicine. Saunders, St. Louis, Missouri.

Cosson, J., Picardeau M., Mielcarek, M., Tatard, C., Chaval, Y. 2014. Epidemiology of *Leptospira* transmitted by rodents in Southeast Asia. *Neglected Tropical Diseases*. 8: e2902.

Davlin, S., VonVille, H. 2012. Canine rabies vaccination and domestic dog population characteristics in the developing world: A systematic review. *Vaccine* 30: 3492-3502.

Dobson, A. 2004. Population Dynamics of Pathogens with Multiple Host Species *The American Naturalist*. 164S: 64-78.

Dyer, J., Yager, P., Orciari, L., Greenberg, L., Wallace, R., Hanlon, C., Blanton, J. 2014. Rabies surveillance in the United States during 2013. *Public Veterinary Medicine: Public Health*. 245: 1111-1123.

East, M., Hofer, H., Cox, J., Wulle, U., Wiik, H., Pitra, C. 2001. Regular exposure to rabies virus and lack of symptomatic disease in Serengeti spotted hyenas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98: 15026-15031.

Edwards, M., Hinds, L., Deane, E., Deakin, J. 2012. A review of complementary mechanisms which protect the developing marsupial pouch young. *Developmental and Comparative Immunology*. 37: 213–220.

Eymann, J., Smythe, L., Symonds, M., Dohnt, M., Barnett, L., Cooper, D., Herbert, C. 2007. Leptospirosis serology in the common brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) from urban Sydney, Australia. *Journal of Wildlife Diseases*. 43: 492-497.

Faine, S. 1994. *Leptospira* and leptospirosis. CRC Press, London.

Ferreira, M., Kajina, M., Vinícius, M., Lóra, P., Cerqueiraa, R., Gentile, M. 2013. Life history of a neotropical marsupial: Evaluating potential contributions of survival and reproduction to population growth rate. *Mammalian Biology*. 78: 406-411.

Gardner, A., Creighton, G. 2008. Genus *Micoureus* Lesson, 1842:74-82 *En* Gardner, A. (ed.) *Mammals of South America. Volume 1. Marsupials, xenarthrans, shrews, and bats*. Chicago: The University of Chicago Press.

González, V., Wehdeking, D., Peña, J., Arias, L., Lombo, D., Astudillo, M. 2012. Comparative seroprevalence of *Leptospira interrogans* in Colombian mammals along a climatic gradient. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 43:768-775.

Greene, C. 2011. Infectious diseases of the dog and cat. Cuarta edición. Elsevier. pp 179-200.

Guerrero-Sánchez, S. 2011. Riesgo zoonótico y antropozoonótico en carnívoros silvestres pequeños y medianos en Calakmul, Campeche. Tesis de Maestría. El Colegio de la Frontera Sur. pp: 106.

Habel, K. 1996. Calculating 50% end-point dilutions by the method of Reed & Muench. *En: Meslin, F., Kaplan, M., Koprowski, H. Laboratory techniques in Rabies, 4th edition,* pp. 371-373. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Hampson, K., Dobson, A., Kaare, M., Dushoff, J., Magoto, M. 2008. Rabies exposures, post-exposure prophylaxis and deaths in a region of endemic canine rabies. *Neglected Tropical Diseases. 2: e339.*

Hortelano-Moncada, Y., Cervantes, F., Trejo-Ortiz, A. 2009. Wild mammals of Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, Ciudad Universitaria, UNAM, México, D.F. *Revista Mexicana de Biodiversidad. 80: 507-520.*

Hughes, J., Macdonald, D. 2013. A review of the interactions between free-roaming domestic dogs and wildlife. *Biological Conservation. 157: 341-351.*

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2015. Virus Taxonomy: 2015 Release. Virology Division - IUMS

Jiménez-Coello, M., Ortega-Pacheco, A., Guzman-Marin, E., Guiris-Andrade, D., Martínez-Figueroa, L., Acosta-Viana, K. 2010. Stray Dogs as Reservoirs of the Zoonotic Agents *Leptospira interrogans*, *Trypanosoma cruzi*, and *Aspergillus* spp. in an Urban Area of Chiapas in Southern Mexico. *Vector-borne and Zoonotic Diseases. 10: 135-141.*

Jittapalapong, S., Sittisan, P., Sakpuaram, T., Kabeya, H. Maruyama, S., Inpankaew, T. 2009. Coinfection of *Leptospira* spp and *toxoplasma gondii* among stray dogs in Bangkok, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health.* 40: 247-52.

Jobbins, S., Sanderson, C., Alexander, K. 2013. *Leptospira interrogans* at the human–wildlife interface in Northern Botswana: A newly identified public health threat. *Zoonoses and Public Health.* pp 1-11.

Jobbins, S. and Alexander, K. 2015. Evidence of *Leptospira* sp. infection among a diversity of African wildlife species: beyond the usual suspects. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 10: 1093, 1-3.

Jones, K., Patel, N., Levy, M., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J., Daszak, P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature.* 451: 21.

Krause, W., Krause, W. 2006. The oposum: its amazing story. University of Missouri.

Klein S. 2000. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 24: 627-638.

Kock, R. 2005. Conservation and development interventions at the wildlife/livestock interface implications for wildlife, livestock and human health. What is this infamous “wildlife/livestock interface? International Union for Conservation of Nature and Natural Resources.

Leal-Castellanos, C., García-Suárez, R., González-Figueroa, E., Fuentes-Allen, J., Escobedo-de la Peña, J. 2003. Risk factors and the prevalence of leptospirosis infection in a rural community of Chiapas, Mexico. *Epidemiology and Infection.*131: 1149-1156.

Lembo, T., Hampson, K., Haydon, D., Craft, M., Dobson, A., Dushoff, J., Ernest, E., Hoare, R., Kaare, M., Mlengeya, T., Mentzel, C., Cleaveland, S. 2008. Exploring reservoir dynamics: a case study of rabies in the Serengeti ecosystem. *Journal of Applied Ecology*. 45: 1246–1257.

Levett, P. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*. pp. 296-326.

Loza-Rubio, E., Mattos, C., Aguilar, A., Mattos, C. 2000. Aislamiento y caracterización molecular de un virus rábico, obtenido de un murciélago no hematófago en la ciudad de México. *Veterinaria. México*. 31: 147-152.

Loza-Rubio, E., Aguilar-Setién, A., Bahloul, C., Brochier, B., Pastoret, P., Tordo, N. 1999. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in Mexico. *Archives of Medical Research*. 30: 144-149.

Mazet, J., Johnson, C. 2012. Approaching Health Problems at the Wildlife–Domestic Animal Interface. pp 153-160. En: Fowler, M., Miller, E. *Zoo and Wild Animal Medicine* 7 ed. Saunders, St. Louis, Missouri.

McDonald, J.H. 2014. Handbook of Biological Statistics (3rd ed.). Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland. Pp: 53-58.

Medina-Romero, M., Goyenechea, I., Castillo-Cerón, J. 2012. Phylogenetic measures applied to the conservation of Mexican marsupials. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 83: 1215-1226.

Mena, H., Brousset, D., Cuarón, A. 2007. Presencia de *Leptospira* spp. y moquillo canino en poblaciones de perros y carnívoros silvestres en la Isla Cozumel. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Montiel-Arteaga, A., Atilano, D., Ayanegui, A., Ceballos, G., Suzán, G. 2015. Risk factors associated with prevalence of antibodies to *Leptospira interrogans* in a metapopulation of black-tailed prairie dogs in México. *Journal of Wildlife Diseases*. 51: 28-35.

Mollentze, N., Biek, R., Streicker, D. 2014. The role of viral evolution in rabies host shifts and emergence. *Current Opinion in Virology*. 8: 68-72.

Moore, S. y Hanlon, C. 2010. Rabies-specific antibodies: measuring surrogates of protection against a fatal disease. *Neglected Tropical diseases*. 4: e595.

Morens, D., Folkers, G., Fauci, A. 2004. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*. 430: 242-250.

Obregón, C. 2014. Detección del virus de la rabia en tejidos no nerviosos de murciélagos frugívoros *Artibeus spp.* inoculados experimentalmente. Tesis Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). pp 113.

Olival, K., Hogue, R., Daszak, P. 2013. Reconciling the historical roots of environmental conservation via human and wildlife health. *Ecohealth*: 10: 224-227.

Patz, J., Daszak, P., Tabor, G., Aguirre, A., Pearl, M., Epstein, J., Wolfe, N., Kilpatrick, M., Foufopoulos, J., Molyneux, D. 2004. Unhealthy landscapes: policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environmental Health Perspectives* 112: 1092-1098.

Pacheco, N., Quiroz, H., Cruz, I., Correa, M., Montiel, G., Osorio, D. 2010. Estudio piloto de la frecuencia de parásitos en mamíferos ferales y silvestres en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. Tesis Maestría UNAM-FMVZ.

Pérttega Díaz, S.; Pita Fernández, S. 2004. Asociación de variables cualitativas: El test exacto de Fisher y el test de McNemar. *Cuadernos de. Atención. Primaria*: 11: 304-308.

Plumb, D. 2010. Manual de Farmacología veterinaria. 6ta edición. Indermédica. pp: 777-1353.

Punjabi, G., Athreya, V., Linnell, J. 2012. Using natural marks to estimate free-ranging dog *Canis familiaris* abundance in a MARK-RESIGHT framework in suburban Mumbai, India. *Tropical Conservation Science*. 5: 510-520.

Ramírez, C. 2012. Rabies antibodies in wild mammals of the Pedregal Ecological Reserve in Mexico City. Tesis Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Rademaker, V. y Cerqueira, R. 2006. Variation in the latitudinal reproductive patterns of the genus *Didelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae). *Austral Ecology*. 31: 337-342.

Richardson, D., Gauthier, J. 2003. A Serosurvey of Leptospirosis in Connecticut Peridomestic Wildlife. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*. 3: 187-193.

Rivera, A., de la Peña, A., Roa, M., Ordoñez, M. 1999. Seroprevalencia de leptospirosis en perros callejeros del norte de la ciudad de México. *Veterinaria México*. 30: 105-107.

Ruiz-Piña, H., Puc-Franco, M., Flores-Abuxapqui, J., Vado-Solís, I., Cárdenas-Marrufo, M. 2002. Isolation of *Salmonella enterica* and serologic reactivity to *Leptospira interrogans* in opossums (*Didelphis virginiana*) from Yucatán, México. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 44: 235-237.

Secretaría de Salud. 2012. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Leptospirosis. Dirección General de Epidemiología. pp 14-16.

Shakespeare, M. 2009. Zoonoses (2nd Edition), Pharmaceutical Press. Padstow, Cornwall, U.K.

Silva, R., Silva, M., Goncalves, R., Scheffer, C., Carnieli Jr, P., Ferreira, F., Malzoni, M., Kayo, C., Silveira, L., Jacomo, A., Souza, E., Cunha de Paula, R., Adenilson, J. 2010. Detection of rabies virus antibodies in brazilian free-ranging wild carnivores. *Journal of Wildlife Diseases*. 46: 1310-1315.

Slate, D., Rupprecht, C. 2012. Rabies Management in Wild Carnivores. pp 366-384. *En: Fowler, M., Miller, E. 7 ed.* Zoo and Wild Animal Medicine. Saunders, St. Louis, Missouri.

Smith, J. S., Yager, P. A., Baer, G. M. 1996. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibodies. pp 181-191.. *En: Meslin IX, Kaplan MM, Koprowski H.* Laboratory techniques in rabies, 4th ed. Geneva: World Health Organization

Smythe, L., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Suputtamongkol, Y., Tiengrim, S, Dohnt, M. 2009. The microscopic agglutination test (MAT) is an unreliable predictor of infecting *Leptospira* serovar in Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 81: 695-697.

Suzán, G., Ceballos, G. 2005. The role of feral mammals on wildlife infectious disease prevalence in two nature reserves within Mexico City limits. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 36: 479–484.

Szanto, A., Nadin-Davis, S., Rosatte, R., White, B. 2011. Genetic tracking of the raccoon variant of rabies virus in Eastern North America. *Epidemics*. 3: 76-87.

Taylor, L., Latham, S., Woolhouse, M. 2004. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 356: 983-989.

Turmelle, A., Jackson, F., Green, D., McCracken, G., Rupprecht, C 2010. Host immunity to repeated rabies virus infection in big brown bats. *Journal of General Virology*. 91: 2360-2366.

Velasco-Villa, A., Gómez-Sierra, M., Hernández-Rodríguez, G., Juárez-Islas, V., Meléndez-Félix, A., Vargas-Pino, F., Velázquez-Monroy, O., Flisser, A. 2002. Antigenic diversity and distribution of rabies virus in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*. :951-958.

Velasco-Villa, A., Reeder, A., Orciari, L., Yager, P., Franka, R., Blanton, J., Zuckero, L., Hunt, P., Oertli, E., Robinson, L., Rupprecht, C. 2008. Enzootic Rabies Elimination from Dogs and Reemergence in Wild Terrestrial Carnivores, United States. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 14, No. 12.

Wright, J., Scott, M., Jackson, V. 2012. Influences of an urban environment on home range and body mass of Virginia Opossums (*Didelphis virginiana*). *Northeastern Naturalist*. 19:77-86.

World Health Organization (WHO). 2011. Report of the Second Meeting of Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. World Health Organization, Department of Food Safety and Zoonoses, Geneva, Switzerland.

World Health Organization (WHO). 2013. Expert Consultation on Rabies Second report. pp 23-31.

Young, J., Olson, K., Reading, P., Amgalanbaatar, S., Berger, J. 2011. Is wildlife going to the dogs? Impacts of feral and free-roaming dogs on wildlife populations. *BioScience*. 61:125-132.

Zamora, J., Riedemann, S. 1999. Animales silvestres como reservorios de leptospirosis en Chile. Una revisión de los estudios efectuados en el país. *Archivos de medicina Veterinaria*. 31: 151-156.

8. Anexos

Anexo 1. Detección de RVNA en perros de libre rango (*Canis familiaris*) y tlacuaches (*Didelphis* spp.) usando la técnica RFFIT en la Reserva de la Biósfera Los Petenes y la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel.

Presencia de anticuerpos contra el virus de la rabia usando la técnica RFFIT en perros de libre rango (*Canis familiaris*) y tlacuaches (*Didelphis* spp.) en RBLP y REPSA

I.D	Especie	Sexo	Edad	Vacuna	Fecha de captura	Lugar	títulos (UI)
P-7	<i>Canis familiaris</i>	Hembra	Adulto	No	02/10/2014	RBLP	4.3
P-21	<i>Canis familiaris</i>	Hembra	Adulto	2 años	07/10/2014	RBLP	5
P-27	<i>Canis familiaris</i>	Macho	Adulto	No	10/10/2014	RBLP	0.24
P-28	<i>Canis familiaris</i>	Macho	Adulto	No	10/10/2014	RBLP	1.3
P-29	<i>Canis familiaris</i>	Macho	Adulto	No	10/10/2014	RBLP	2.75
P-42	<i>Canis familiaris</i>	Macho	Adulto	No	13/10/2014	RBLP	0.07
P-60	<i>Canis familiaris</i>	Macho	Adulto	Desconocido	06/08/2015	REPSA	6
P-61	<i>Canis familiaris</i>	Hembra	Adulto	Desconocido	11/08/2015	REPSA	1.88
P-62	<i>Canis familiaris</i>	Macho	Adulto	Si (2 años)	28/08/2015	REPSA	0.16
P-63	<i>Canis familiaris</i>	Hembra	Adulto	Si (2 años)	01/09/2015	REPSA	1.6
P-64	<i>Canis familiaris</i>	Macho	Adulto	Si (2 años)	02/09/2015	REPSA	7.6
P-65	<i>Canis familiaris</i>	Macho	Adulto	NA	28/09/2015	REPSA	4.9
T-194	<i>Didelphis virginiana</i>	Hembra	Adulto	No	21/10/2014	RBLP	0.97
T-195	<i>Didelphis virginiana</i>	Macho	Juvenil	No	21/10/2014	RBLP	0.21
T-196	<i>Didelphis virginiana</i>	Hembra	Juvenil	No	21/10/2014	RBLP	0.66
T-197	<i>Didelphis marsupialis</i>	Macho	Adulto	No	22/10/2014	RBLP	0.07
T-198	<i>Didelphis virginiana</i>	Hembra	Adulto	No	22/10/2014	RBLP	0.85
T-199	<i>Didelphis virginiana</i>	Macho	Juvenil	No	25/10/2014	RBLP	0.23
T-200	<i>Didelphis marsupialis</i>	Hembra	Adulto	No	25/10/2014	RBLP	0.47
T-201	<i>Didelphis virginiana</i>	Macho	Adulto	No	27/10/2014	RBLP	0.3
T-5	<i>Didelphis virginiana</i>	Hembra	Adulto	No	14/07/2015	REPSA	0.23
T-18	<i>Didelphis virginiana</i>	Macho	Juvenil	No	16/07/2015	REPSA	0.11
T-25	<i>Didelphis virginiana</i>	Hembra	Juvenil	No	30/07/2015	REPSA	0.23
T-29	<i>Didelphis virginiana</i>	Macho	Juvenil	No	30/07/2015	REPSA	SA
T-30	<i>Didelphis virginiana</i>	Macho	Adulto	No	06/08/2015	REPSA	0.053
T-40	<i>Didelphis virginiana</i>	Hembra	Adulto	No	13/08/2015	REPSA	0.57
T-43	<i>Didelphis virginiana</i>	Macho	Adulto	No	27/08/2015	REPSA	1.04
T-44	<i>Didelphis virginiana</i>	Hembra	Senil	No	27/08/2015	REPSA	0.57
T-46	<i>Didelphis virginiana</i>	Hembra	Juvenil	No	01/09/2015	REPSA	0.57
T-49	<i>Didelphis virginiana</i>	Macho	Juvenil	No	03/09/2015	REPSA	0.28

Anexo 2. Encuesta realizada a los propietarios de los perros en las comunidades adyacentes a la Reserva de la Biósfera Los Petenes, Campeche, México.

1. ¿Tiene perros? ¿Cuántos?
2. ¿Cada cuánto lleva los perros a la reserva?
3. ¿Qué actividades realiza con los perros en la reserva?
4. ¿Cuándo fue la última vez que vacunó a su perro? ¿Contra qué enfermedad lo vacunó?