



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

**SEROPREVALENCIA DE *Mycobacterium bovis* EN
GRUPOS DE MONO AULLADOR NEGRO (*Alouatta
pigra*), EN ÁREAS CON DISTINTOS GRADOS DE
FRAGMENTACIÓN DE HÁBITAT EN CAMPECHE,
MÉXICO**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

EDUARDO ENRIQUE YARTO JARAMILLO

TUTOR: Dr. Gerardo Suzán Azpiri

COMITÉ TUTORAL: M. en C. Domingo Canales Espinosa

Dra. Clara Espitia Pinzón

MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Posiblemente no es suficiente decir muchas gracias a quienes estuvieron interesados en este proyecto desde un inicio, pero es la forma más concreta y sencilla de expresar mi respeto, y empatía con todos ellos.

Gracias a los asesores de esta tesis: Gerardo Suzán, Domingo Canales (“Goche”) Espinosa, Clara Espitia; a los sinodales, en especial a Heliot Zarza por todas sus atenciones y el tiempo dedicado, y a Dulce Brousset porque después de muchos años nos reencontramos para trabajar de una nueva manera.

Mi agradecimiento al equipo de trabajo e investigación de Neurootología de la Universidad Veracruzana (MVZ. Javier Hermida, Antr. Pedro A. Dias, Alex y todos los responsables de las capturas) por hacer nuestro trabajo más sencillo a través de su gran experiencia.

Agradezco enormemente a Michele Miller, PhD (*very many thanks my dear*) por el incondicional apoyo para la obtención de las muestras comerciales para la monitorización serológica de tuberculosis, así como a Diorene Smith (Parque Summit, Ciudad de Panamá, Panamá) por las facilidades para obtener un control positivo para el presente estudio.

Mil gracias a Clara Aguillón por tener una mente abierta al cambio y confiar en que hay muchas formas de lograr un objetivo. Todos los estudiantes de Posgrado lo celebramos!

No se me olvida, sino que es un agradecimiento mayor...Un millón de gracias a mi querida amiga Salomé...sabes que sin tu ayuda y apoyo no lo habría logrado. En las buenas y no tan buenas, estamos juntos.

Gracias también a Regina (“Regine de France”) Goirand y a Samantha Maerker por unirse al equipo y encontrarnos en la selva con refrescantes noticias!!!

DEDICATORIAS

Al mejor ejemplo que pude encontrar en este maravilloso viaje....mis padres.

No imagino cómo sería no ser hijo de alguien como ustedes.

Mi máximo reconocimiento, amor y gratitud por ser los mejores padres, los más fuertes y con una entereza fuera de toda imaginación.

A mis hermanos: Manuel, Delia, Araceli y Alberto (mi chavo) porque son un ejemplo de unidad, valor y coraje en sus distintas modalidades.

Especial dedicatoria a Mi Chavo y a Mich (Michele Suárez): pensé que después de la experiencia pasada no podría seguir, pero al tenerlos a mi lado todo se volvió más sencillo.

A mis sobrinos, que iluminan mi camino y dan una fuerza especial a mi vida: Karina (tú sabes que somos inseparables, y gracias por el apoyo cuando más lo he necesitado, o sea siempre), Karen (qué puedo decirte además de te adoro y gracias por dejarme estar cerca de Dan), Dorian, Kristian, Daniel, Diego, Santiago, Regina (la princesa amada).

A mis verdaderos amigos. Samantha (ya comprobé que estaremos juntos hasta el último suspiro), Claudia Lewy, Ibeth Gaitán, Jorge Alanis, Regina Goirand, Rosalía Pastor.

A mis mejores maestros: María Luisa, Jorge y Roberto Yarto y Canek Picazo (te dije que no se me olvidaría) por permitirme ser compañeros de viaje.

Dedicatoria especial a José Carlos Martínez: Charly gracias por mostrarme la forma más digna de vivir, disfrutar y partir.

Eso es lo que yo llamo ser UN GRAN MAESTRO!...un abrazo eterno, allá nos vemos.

Con esto cierro este capítulo, te dije que lo lograría.

ÍNDICE

	Página
Referencia de cuadros y figuras	iii
Resumen	iv
<i>Abstract</i>	v
Introducción general	1
Capítulo I. Revisión bibliográfica del diagnóstico de tuberculosis en primates cautivos y silvestres y de la fragmentación con pérdida de hábitat y su relación con la tuberculosis en los primates silvestres	10
1.1 Diagnóstico de la tuberculosis en primates cautivos y silvestres	10
1.1.1 La tuberculosis en los primates	10
1.1.2 Técnicas de diagnóstico de la tuberculosis en primates cautivos	12
1.1.3 Discusión y conclusiones de la revisión bibliográfica sobre el diagnóstico la tuberculosis en los primates	19
1.2 Fragmentación con pérdida de hábitat y su relación con la tuberculosis en los primates silvestres	24
1.2.1 Fragmentación y pérdida del hábitat	24
1.2.2 Efecto de la fragmentación en poblaciones de mono aullador (<i>Alouatta spp</i>) sobre la posible manifestación de enfermedades	26
1.2.3 El estudio de las enfermedades emergentes en los primates en vida silvestre y su relación con la salud pública	32
1.2.4 Discusión y conclusiones sobre la fragmentación del bosque tropical y la aparición de enfermedades emergentes	37
Trabajo de investigación	
Capítulo II. Seroprevalencia de <i>Mycobacterium bovis</i> en grupos de mono aullador negro (<i>Alouatta pigra</i>) en áreas con distintos grados de fragmentación en Campeche, México	40

2.1	Introducción	40
2.2	Material y métodos	45
2.2.1	Técnicas serológicas usadas para la detección	50
	de anticuerpos anti -complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
2.3	Resultados	54
2.4	Discusión y conclusiones del capítulo II	55
2.5	Literatura citada	62
2.6	<i>Short communications</i>	67

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro	Página
1.- Sitios de muestreo catalogados con base en el tamaño del fragmento	47
Figura	
1.- Fotografía de la muestra control positivo usando la técnica comercial rápida de flujo lateral PrimaTB-STAT Pak	52

I Resumen

La emergencia de algunas enfermedades infecciosas que se comparten entre el ganado, los animales silvestres y el humano se presenta en la actualidad con mayor facilidad, debido a las elevadas tasas de deforestación, la pérdida del hábitat y la fragmentación del mismo. En el estado de Campeche, México, se ha observado que el ganado ha invadido el hábitat natural de los monos aulladores negros (*Alouatta pigra*). De la misma forma, se ha atestiguado que algunos de estos primates se desplazan sobre la superficie terrestre entre un árbol o un remanente de bosque, con el objetivo de alcanzar otro árbol.

La fragmentación del hábitat en esta zona y el fenómeno antes descrito en este estado Mexicano pueden haber forzado a esta especie de primate a entrar en contacto con las heces del ganado bovino doméstico.

En el año 2006, dos grupos (n=14) de monos aulladores fueron reubicados en otras áreas protegidas similares de hábitat en la misma región geográfica, y al parecer, el 64.2 % (n=9) de esas muestras de suero fueron positivas a anticuerpos anti-complejo *Mycobacterium tuberculosis*, lo cual indujo al grupo de investigadores a suponer que podría estar relacionado con *M bovis*. Por esta razón se decidió incluir en el presente estudio dos capítulos. El primero, destaca la revisión bibliográfica tanto del diagnóstico de la tuberculosis en primates como de la fragmentación con la pérdida del hábitat y su relación con la tuberculosis en los primates silvestres. El segundo capítulo se enfoca en el estudio de investigación en el cual utilizamos tres técnicas diferentes de monitoreo serológico (ELISA indirecta, Inmunoblot y una prueba comercial

rápida de flujo lateral: PrimaTB-STAT Pak) para 47 muestras de suero de individuos del género y especie antes mencionados, las cuales se colectaron en dos salidas de campo en Campeche. Elegimos los métodos de diagnóstico que estaban disponibles en el momento de llevar a cabo nuestro estudio en México, ya sea a través de un laboratorio de referencia para la vigilancia de la tuberculosis en el ganado bovino doméstico, otro en un laboratorio de investigación, además de una prueba comercial donada generosamente por el fabricante de los Estados Unidos de América.

A pesar que con la técnica de ELISA indirecta aparentemente tres (6.3%) de las 47 muestras de suero fueron positivas, concluimos que los resultados de seroprevalencia de anticuerpos anti-*M bovis* en estos grupos de monos aulladores silvestres fueron negativos, al interpretar los tres métodos de diagnóstico en conjunto. Cabe mencionar que en la actualidad la investigación sobre las técnicas diagnósticas y la estandarización de los métodos que pudieran indicar con mayor certeza que los primates a ser reubicados fueran negativos a esta enfermedad emergente, aún es insuficiente.

La conclusión antes mencionada podría ser una de las claves para programas futuros de conservación en las áreas fragmentadas donde los animales requieren ser reubicados.

Palabras clave: infecciones emergentes, enfermedades zoonóticas, tuberculosis, monos aulladores, fragmentación.

II ABSTRACT

The emergence of some infectious diseases shared among cattle, wildlife and humans is particularly feasible given the high rates of deforestation, habitat loss and fragmentation which could have a negative impact on populations by favoring epizootic disease outbreaks. In the state of Campeche, Mexico it has been observed that cattle have invaded the natural habitat of wild Black Howler monkeys (*Alouatta pigra*). It has also been recorded that between a forest remnant or a tree, some of these primates walk on the ground in order to reach another tree. This phenomenon along with fragmentation of forest areas in that Mexican state, may have forced this species of primates to have increased contact with cattle feces. In 2006 two groups (n=14) of howler monkeys were translocated to other protected habitat patches in the same area, and apparently 64.2 % (n=9) of the serum samples belonging to those individual were positive to anti-*Mycobacterium tuberculosis* complex antibodies which led to the assumption that it could be related to *M bovis*. Due to this fact in this research study we included two different chapters. The first chapter highlights the literature search both from the current tuberculosis diagnostic methods and from the fragmentation with habitat loss and its relationship with tuberculosis in wild non-human primates. The second chapter focuses on the research protocol in which we utilized 47 sera of Black Howler monkeys which were screened with three different serologic tests (Indirect ELISA, Immunoblot and PrimaTB-STAT Pak). Samples were collected in two different field trips in fragmented areas in Campeche. We chose the methods available at the time of

our study and sample running in Mexico, either through a domestic bovine surveillance laboratory, another at a research institute, and also a commercial test generously facilitated by the US manufacturer. In spite that with indirect ELISA technique apparently three (6.3 %) out of 47 samples were positive, we concluded that results for seroprevalence of antibodies anti- *M bovis* in these wild groups of black howler monkeys (n=47) were negative interpreting the three different diagnostic methods altogether. It is worthy to mention that field research is still insufficient as for the standardization of field diagnostic tuberculosis methods which could indicate for certain that translocated primates are negative for this emerging disease.

The aforementioned conclusion could be the one of the keys for future conservation programs in fragmented areas where animals need to be relocated.

Key words: emerging infectious, zoonotic diseases, tuberculosis, howler monkeys, fragmentation

Introducción general

En los últimos años se han reportado innumerables enfermedades emergentes y reemergentes, las cuales representan un problema global de gran magnitud que afecta a las poblaciones humanas y a los animales tanto domésticos como silvestres. Gran parte de la emergencia y reemergencia de estas enfermedades se debe a factores socioeconómicos, ambientales y ecológicos.^{1, 2, 3, 4}

Se cuentan entre los factores ecológicos a la alteración del hábitat y la fragmentación, como causas primarias de la pérdida de la diversidad biológica.⁵ lo cual ha propiciado cambios drásticos en las tasas de contacto entre animales silvestres, domésticos y el hombre.^{6, 7, 8}

Existen pocos programas de manejo de vida silvestre que consideren el estudio de las enfermedades infecciosas en los primates, lo que puede ocasionar un aumento en el riesgo de los problemas de salud, tanto para los animales como para el humano.^{6, 7, 9, 10} A pesar de su importancia, tanto teórica como práctica, pocos estudios se han enfocado de manera explícita en la salud de las poblaciones silvestres de primates.¹¹

Existen varias preocupaciones entre los científicos acerca de la conservación de especies en vida silvestre, como por ejemplo: a) el conocimiento de los parámetros biológicos relacionados con el estado de salud de las poblaciones

animales en su estado natural, como prerrequisito para desarrollar estrategias de conservación; b) los agentes infecciosos se vinculan naturalmente a las dinámicas de las poblaciones animales, pero afectan la ecología, el comportamiento, el éxito reproductivo y la demografía de las especies; c) la degradación del hábitat y la presión demográfica también participan en el incremento en las interacciones entre los humanos y las especies silvestres, aumentando los riesgos zoonóticos/antropozoonóticos, así como la introducción de patógenos o bien la exposición a estos de los animales reubicados.¹²

La fragmentación del hábitat significa la reducción de la cobertura vegetal o deforestación sectorial, lo cual provoca la formación de parches más pequeños del mismo, quedando éstos desprovistos de árboles y plantas. Este fenómeno provoca una distancia incrementada entre las nuevas secciones formadas.⁵

La fragmentación también puede estar vinculada con la pérdida total del hábitat, convirtiéndose así en una de las alteraciones medioambientales más severas, ya que genera cambios en el ambiente físico y biológico, provocando la extinción de especies⁹ modificando la dinámica de las infecciones, incluyendo las zoonosis como la tuberculosis bovina, tópico que ha recibido poca atención en las investigaciones de algunas especies silvestres.⁵

De acuerdo con la literatura, las especies susceptibles a esta enfermedad son el humano, los bovinos domésticos y silvestres, los primates no humanos y otras especies entre las que destacan los roedores, algunos marsupiales como el oposum cola de cepillo (*Trichosurus vulpecula*) y los tejones (*Meles meles*).^{10, 13, 14}

Actualmente en vida silvestre existen reservorios del *Mycobacterium bovis*, el agente causal de la tuberculosis bovina en varias especies animales como los ungulados, e incluso, algunos carnívoros silvestres. Este agente es considerado un serio problema zoonótico en varias partes del mundo.^{14, 15}

La presencia de estos reservorios silvestres como los bóvidos y otras especies arriba mencionadas, se atribuye a un resultado directo de saltos taxonómicos (cruzar la barrera entre diferentes taxa) del ganado doméstico a otras especies incluyendo el humano, en combinación con los factores antropogénicos.¹⁵

Entre las principales acciones causadas por el hombre se destacan la reubicación de animales silvestres, la complementación de alimentos a algunas especies en vida libre ya que las poblaciones silvestres están alcanzando densidades que sobrepasan la capacidad de carga en los hábitats.¹⁵

La interacción incrementada de la fauna silvestre con los animales domésticos debido a los cambios ocasionados por el hombre en diversas regiones del planeta, ha provocado alteraciones complejas en la tuberculosis, especialmente en lo referente al control de la misma. Además, su potencial zoonótico representa una preocupación adicional, por lo que el diagnóstico certero y rápido de esta enfermedad en los animales silvestres es de gran importancia para prevenir el contagio a los animales domésticos¹⁶ y promover la protección misma de las poblaciones silvestres.

De acuerdo con la literatura, la tuberculosis es una enfermedad que afecta principalmente a los primates cautivos ya que existe poca evidencia de su prevalencia en primates de vida libre¹⁰ aunque hay casos reportados de *Mycobacterium bovis* en babuinos oliva silvestres (*Papio cynocephalus*)¹⁷ y comparativamente con los monos del Viejo Mundo, la enfermedad es rara en aquellos del Nuevo Mundo,¹⁰ como el mono aullador (*Alouatta spp*).

Mientras que los hallazgos de diversos estudios en primates cautivos han desempeñado un papel importante en varios aspectos de la medicina en el siglo XX, este mismo periodo se ha visto marcado por una notable ausencia de investigación sobre la ecología básica de las enfermedades en animales silvestres.¹⁷

Sin embargo, se sabe que, en general, los primates comparten con frecuencia una serie de enfermedades de origen bacteriano, viral, fúngico y parasitario con el ser humano, por lo que es de gran importancia comprender la ecología de las enfermedades en estas especies y su impacto potencial en la salud humana.^{7, 11}

En México habitan tres especies de primates, pertenecientes a los géneros *Ateles* y *Alouatta*. El primero corresponde al mono araña (*Ateles geoffroyi*), y el segundo al mono aullador café, *Alouatta palliata* y al mono aullador negro *Alouatta pigra*.¹⁸

Por otro lado, todos los primates enfrentan severos problemas de conservación como resultado de la fragmentación y transformación de su hábitat, además del tráfico ilegal en el sureste mexicano.²⁰ Particularmente, en Campeche la especie de mono aullador negro (*Alouatta pigra*) en la actualidad presenta una distribución restringida en la mayoría de las regiones del hábitat original en ese estado.^{18, 19}

Es importante resaltar que la salud y la enfermedad juegan papeles importantes, aunque poco conocidos, en la evolución del comportamiento, la

organización social y la demografía de los primates, además de representar las principales preocupaciones en cuanto a su conservación.²⁰

Como hipótesis en el presente trabajo, se establece que el incremento en el contacto de los monos aulladores negros (*Alouatta pigra*) que se encuentran distribuidos de forma natural en las zonas de muestreo con el ganado doméstico, podría desencadenar la infección de los primates por *Mycobacterium bovis*.

El estado de Campeche se encuentra clasificado por la SAGARPA como de alta prevalencia en cuanto a la tuberculosis bovina, por lo que la hipótesis del presente trabajo de investigación sugiere que las alteraciones en el hábitat natural y los cambios climáticos pueden ocasionar la infección por este microorganismo en los monos de este estudio y en otras zonas similares.

En el campo del diagnóstico de las enfermedades infecciosas emergentes en especies de zoológico y silvestres en México, existe una gran diversidad de opiniones, aunque por desgracia aún no hay métodos estandarizados para especies no domésticas.

Por esta razón, se decidió llevar a cabo una búsqueda bibliográfica que permitiera esclarecer las mejores alternativas para el diagnóstico serológico en campo del agente bacteriano en cuestión, información que forma el capítulo I de esta tesis, aunada al apoyo bibliográfico de la relación que existe entre la fragmentación y la pérdida de hábitat con la aparición de enfermedades infecciosas como la tuberculosis en los primates.

El género *Mycobacterium spp.* está compuesto por el complejo *M. tuberculosis* en el que se encuentran clasificadas las siguientes especies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae* y *M. pinnipedi*, así como por otras especies que no son productoras de tuberculosis.

Algunas de las especies del complejo *M. tuberculosis*, en particular el *M. bovis* que produce la tuberculosis del ganado bovino, entre otros grupos animales, han sido reportadas en un gran número de especies silvestres, incluyendo al menos un primate (*Papio cynocephalus*; mono babuino oliva) en África, por lo que es factible que, de continuar la destrucción y la alteración de los hábitats naturales, la presencia de enfermedades emergentes y reemergentes sea cada vez más común en diversos taxones, incluidos los monos del Nuevo Mundo.

De acuerdo con la literatura más reciente y específica en el tema de la tuberculosis, no existe ningún método *antemortem* que sea 100% específico y sensible para detectar por sí solo la infección por el complejo *M. tuberculosis*, y además, la mayoría de esas técnicas de diagnóstico no están validadas en especies no domésticas cautivas o silvestres.

Por ello dentro del capítulo II se incluye el trabajo de investigación de campo, en el cual se utilizaron tres técnicas serológicas de diagnóstico del complejo *M. tuberculosis* en 47 muestras de monos aulladores (*A. pigra*), colectadas de animales que habitan áreas con distintos grados de fragmentación en Campeche, México, obtenidas en dos salidas de campo (2007 y 2008).

Los tres métodos serológicos para la detección de anticuerpos anti-complejo *M. tuberculosis*; que se usaron en esta investigación fueron ELISA indirecta, Inmunoblot y un método comercial de flujo lateral aprobado para su uso en diferentes especies de primates en los Estados Unidos de América, conocido como PrimaTB Stat-Pak (Chembio Diagnostic Systems, Inc, Medford, NY).

También se incluye en el segundo capítulo el resumen en inglés de esta investigación, en forma de *short communications* para remitirlo al *Journal of Wildlife Diseases*,

A pesar de no encontrar individuos positivos con ninguna de las técnicas usadas, resulta importante haber empleado el método comercial de flujo lateral y utilizar como control positivo el suero de un mono araña (*Ateles fusciceps*), con el cual se pudo corroborar la reacción positiva de un suero infectado por *M. tuberculosis* diagnosticado por cultivo; este último sí es el método de elección para cualquier individuo sospechoso de padecer esta infección/enfermedad.

Sabemos también, por la revisión bibliográfica, que la tuberculosis es una enfermedad emergente que puede infectar a un gran número de especies silvestres, con mayor incidencia cuando éstas se distribuyen en zonas que han sufrido fragmentación y pérdida del hábitat.

Es por ello que se considera importante para esta investigación que el diagnóstico serológico de la tuberculosis en especies de primates mexicanos se incluya como un patógeno factible de aparecer, establecerse y causar la enfermedad, principalmente cuando varios de esos grupos de monos se reubican para su protección en zonas de hábitat fragmentadas y con la intromisión del ganado doméstico.

Capítulo I

Revisión bibliográfica del diagnóstico de tuberculosis en primates cautivos y silvestres y de la fragmentación con pérdida del hábitat y su relación con la tuberculosis en los primates silvestres

1.1 Diagnóstico de la tuberculosis en primates

1.1.1 La tuberculosis en los primates

El término micobacteriosis describe la enfermedad causada por las micobacterias no tuberculosas (MNT), también conocidas como micobacterias atípicas.²¹

En cambio, el término tuberculosis (Tb) define a la enfermedad causada por los organismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual incluye: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae* y *M. pinnipedii*.^{14, 21}

Las especies susceptibles a contraer la tuberculosis (con diferentes géneros del complejo *M. tuberculosis*), son el humano, los primates, los bóvidos

silvestres y domésticos y otras especies entre las que destacan los roedores y los tejones europeos (*Meles meles*) e inclusive algunos marsupiales.^{10, 13, 14}

Haciendo referencia particularmente a los primates cautivos, éstos adquieren la tuberculosis (*M. tuberculosis*) por el contacto directo con otros primates infectados por contacto con los humanos a través de la inhalación o a través de la ruta digestiva y, desde luego, actuando como reservorios de este mismo agente infeccioso.¹⁰

A pesar de que es un tópico de gran importancia, según muchos epidemiólogos poco se sabe del papel que juegan los primates en vida silvestre en el mantenimiento y distribución de la tuberculosis en las zonas tropicales del mundo.¹⁰

Mycobacterium tuberculosis históricamente ha causado severa mortalidad y morbilidad en brotes no controlados en colecciones cautivas de primates. Sin embargo, la infección con *M. bovis* puede resultar de igual forma en la enfermedad con manifestaciones pulmonares en este grupo animal.^{10, 14}

En la actualidad, varias especies silvestres han emergido como reservorios del *M. bovis* al ser infectados por el ganado doméstico en diferentes países, como

es el caso del búfalo del Cabo (*Syncerus caffer caffer*) y el Kudú menor (*Tragelaphus imberbis*) en Sudáfrica, el tejón (*Meles meles*) en el Reino Unido e Irlanda, y el oposum cola de cepillo (*Trichosurus vulpecular*) en Nueva Zelanda, entre otros.^{13, 15}

Los métodos de monitoreo de la Tb bovina, utilizados para la vigilancia en el ganado, tales como la prueba de inyección intradérmica o la prueba de liberación del interferón gamma (IFN- γ), son altamente efectivos en animales domésticos; sin embargo, no están validadas en su totalidad para otras especies.²²

Por otro lado, actualmente se sabe que se requieren nuevas herramientas diagnósticas para la Tb en especies silvestres y de zoológico, las cuales deben ser sencillas de realizar, rápidas, acertadas, de bajo costo y no especie-específicas.²²

1.1.2 Técnicas de diagnóstico de la tuberculosis en primates cautivos

Debido a que los primates se pueden infectar por varias especies de *Mycobacterium*, es muy importante realizar los exámenes diagnósticos específicos para diferenciar entre las infecciones por micobacterias

patogénicas de las reacciones cruzadas por la exposición a otras micobacterias no productoras de tuberculosis.^{10, 16, 21}

Pruebas inmunológicas mediadas por células

La prueba de tuberculina intradérmica es ampliamente utilizada para el monitoreo del *M. tuberculosis* en los primates cautivos, empleando para ello la tuberculina vieja de mamífero (TVM); sin embargo, este biológico manifiesta una alta reacción cruzada, debido a su composición de antígenos micobacterianos pobremente definidos.^{22, 23}

En la actualidad, en los primates cautivos se recomienda que todos los animales importados ya sean prosimios, callitricidos, o monos del Nuevo y del Viejo Mundo, gibones y grandes simios, sean monitoreados al menos dos a tres veces a intervalos de 2 a 4 semanas durante la cuarentena.^{13, 16}

Es muy importante emplear los productos de manufactura especial para los primates no humanos, con una dosis mínima de 1,500 unidades de tuberculina/0.1 mL, aplicando ésta en el párpado superior de forma intradérmica. La lectura se realiza a las 24, 48 y 72 horas para evaluar el grado de inflamación y eritema.^{13, 16}

Además de ser una prueba logísticamente difícil de llevar a cabo a veces, aun en condiciones de cautiverio, no es un método de diagnóstico práctico para primates en vida silvestre.

Es importante mencionar que la mayoría de las pruebas diagnósticas para Tb no están validadas para animales de zoológico, y menos para especies silvestres, y aquéllas basadas especialmente en respuestas inmunológicas pueden mostrar una importante variabilidad entre especies.^{13, 16}

Las pruebas de diagnóstico que identifican a los organismos micobacterianos o a los componentes de ellos, son los métodos definitivos para detectar la infección.

El cultivo y la especiación (es decir, la identificación de la especie del *Mycobacterium*) son considerados las pruebas estándar de oro, aunque son también las que más tiempo tardan en arrojar resultados (más de 8 semanas, y aún más para la especiación).¹⁶

Los análisis de muestras que miden la producción de las citocinas como el IFN- γ y la interleucina-2 (IL-2), parecen ser más sensibles que las pruebas de reacción de la piel. Las citocinas están en general mayormente conservadas

entre las especies, por lo que el uso de estos métodos de detección puede resultar de mayor aplicación en el caso de la tuberculosis.¹⁶

El inmunoensayo desarrollado para el IFN- γ del humano, pudo detectar el IFN- γ de chimpancé (*Pan troglodytes*), orangután (*Pongo pygmaeus*), gibón (*Hylobates spp*) y mono ardilla (*Saimiri sciureus*), y se correlacionó con la reactividad de la prueba dérmica de la tuberculina.¹⁶ Esta prueba comercialmente es llamada Primagam (CSL, Veterinary, Australia), y ha sido aprobada para uso en gorilas (*Gorilla spp*), orangutanes (*Pongo spp*), chimpancés (*Pan spp*), gibones (*Hylobates spp*), mandriles (*Mandrillus spp*), mono Guereza (*Colobus guereza*), mono ardilla (*Saimiri sciureus*), marmosetas (*Callithrix spp*) y babuinos (*Papio spp*).^{13, 16}

Pruebas basadas en la detección de organismos micobacterianos

Los métodos de amplificación de los genes como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y la prueba directa de *M. tuberculosis* amplificada (MTD, por sus siglas en inglés) arrojan resultados rápidos.¹⁶

Por otro lado, la PCR se usa para ayudar en la identificación de especies de los patógenos, así como para evaluar muestras de cultivos negativos. Al elegir los

cebadores adecuados, las pruebas de PCR pueden distinguir entre el complejo *M. tuberculosis* y *M. avium* (este último una MNT).¹⁶ Tanto la MTD como la PCR, son útiles para distinguir infecciones por micobacterias patógenas de aquéllas atípicas que pudieran causar una respuesta dermatológica positiva a la tuberculina, en caso de que esta última se empleara.¹⁶

Pruebas serológicas

Anteriormente, se consideraba que las pruebas de detección de la respuesta humoral eran un pobre indicador de la tuberculosis en la mayoría de las especies animales, debido a la creencia que la respuesta humoral a los antígenos micobacterianos era pobre.^{13, 24} Sin embargo, en los últimos años las pruebas de serología han demostrado un potencial diagnóstico promisorio para la evaluación de la Tb en los primates, los elefantes y otras especies de zoológico.²²

Este tipo de examen diagnóstico, también es más útil cuando se trata de especies exóticas y de vida silvestre, en las que se prefiere la muestra del suero, en lugar de sangre completa o el análisis *in vivo*.²⁴

La prueba de Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), ha sido la prueba serológica más frecuentemente usada para el diagnóstico de la Tb en muchas especies animales.

Este tipo de análisis incorpora varias formas de antígenos micobacterianos para la detección de anticuerpos sobre una base sólida, y son un componente de la prueba de tuberculosis bovina (BTb, por sus siglas en inglés). La especificidad y la sensibilidad de la prueba de ELISA, depende de los antígenos usados y la especie evaluada¹⁶ por lo que es necesario entender la respuesta inmunológica a Tb de cada especie, siendo éstas sus principales limitantes.²⁴

Se ha demostrado que algunos primates del Viejo Mundo (mono rhesus, *Macaca mulatta*; cynomolgus, *Macaca fascicularis*; y mono verde africano, *Cercopithecus aethiops sabaues*) infectados con *M. bovis*, desarrollaron anticuerpos que se detectaron por medio de ELISA usando el ESAT-6 como antígeno.²⁵

Recientemente, se han desarrollado tres inmunoensayos innovadores basados en técnicas de membrana (Chembio Diagnostic Systems, Inc, Medford, NY), que son: inmunoensayo de impresión multiantígeno (MAPIA, por sus siglas en

inglés), la prueba rápida (RT, por sus siglas en inglés) de flujo lateral, y la plataforma de vías duales (DPP, por sus siglas en inglés).^{22, 24}

Además, cabe mencionar que existen dos versiones de la RT, PrimaTB STAT-PAK y Elephant-TB STAT-PAK, validadas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA, por sus siglas en inglés) para primates y elefantes, respectivamente.²²

La prueba de MAPIA, se diseñó como una herramienta de monitoreo para identificar los antígenos serorreactivos para la Tb humana,²² e incluye la aplicación de antígenos a membranas de nitrocelulosa, seguido de incubación con suero de prueba, y la detección usando el inmunodesarrollo cromogénico estándar. Puede aportar un método de monitoreo diagnóstico para situaciones de campo. Es una prueba cuyas más recientes aplicaciones incluyen la caracterización de anticuerpos y el reconocimiento de patrones del antígeno en varias especies animales.^{16, 22}

Otro método de evaluación serológica es el Western blot (inmunoblot), el cual ha demostrado ser una prueba sensible para detectar y monitorizar el desarrollo de respuesta serológica a proteínas de antígenos micobacterianos específicos.¹⁶

1.1.3 Discusión y conclusiones de la revisión bibliográfica sobre el diagnóstico de la tuberculosis en primates

La tuberculosis sigue siendo una de las enfermedades bacterianas más importantes en primates no humanos (PNH) en cautiverio, debido a la elevada frecuencia con la que ocurre, su habilidad para diseminarse, las altas tasas de mortalidad que provoca y el potencial zoonótico.^{10, 16, 21}

Sin embargo, y a pesar de su importancia, los métodos aprobados para su detección por la administración de alimentos y fármacos (FDA, por sus siglas en inglés), de los EUA, que se basan en la inyección intradérmica de la TVM, son poco precisos aun para animales cautivos, debido a los antígenos micobacterianos pobremente definidos, que además se sabe presentan una elevada reacción cruzada.^{16, 25}

Las micobacterias tuberculosas presentan una amenaza zoonótica para la salud pública, particularmente en áreas de alta prevalencia en el ganado.

La Tb por *M. bovis* no se distingue clínicamente de la Tb por *M. tuberculosis* en los humanos, por lo que la importancia de reforzar los programas de control animal de la Tb en las zonas de prevalencia, es una prioridad.^{14, 16, 22}

En la actualidad se sabe por confirmación molecular, que la transmisión zoonótica incidental de la Tb pulmonar del humano al ganado puede ser bidireccional (Ocepek, *et al.*, 2005), así como de casos de infección por Tb bovina en trabajadores que cuidan al ganado.^{22, 24}

La prueba de ELISA ha sido utilizada para evaluar la respuesta serológica en primates no humanos en diferentes especies de macacos (*Macaca spp*), infectados con el *M. bovis*, y aunque han sido detectados los anticuerpos por esta prueba usando el ESAT-6 como antígeno, esta prueba no está validada para especies silvestres.^{16, 26}

Por otro lado, en especies como cérvidos y marsupiales, la sensibilidad/especificidad de la prueba de ELISA para evaluar la infección por *M. bovis* ha sido de 78.6%/70.0% y 45%/96%, respectivamente, lo que refleja que tal vez en primates tampoco sea del todo sensible ni específica.^{16, 26}

Otro método de evaluación serológica para la detección de Tb en animales cautivos, es el Western blot (Inmunoblot), el cual ha demostrado ser una prueba sensible para detectar y monitorizar el desarrollo de respuesta serológica a proteínas de antígenos micobacterianos específicos en varias especies¹⁶ aunque los primates no se encuentran reportados en particular con esta prueba.

Por otro lado, son varias las especies silvestres que pueden ser un reservorio para la Tb bovina en todo el mundo, especialmente cuando sus áreas naturales de distribución se han visto severamente modificadas por actividades antropogénicas como el pastoreo del ganado en zonas circunvecinas de poblaciones animales de diferentes órdenes taxonómicos.^{14, 15}

Por ello, la vigilancia epidemiológica de enfermedades infecciosas compartidas entre las especies silvestres y domésticas en zonas de contacto como la Tb, requiere de métodos precisos de diagnóstico que sean de uso más fácil en campo para especies silvestres, ya que los métodos actuales de diagnóstico como la prueba intradérmica de tuberculina o el IFN- γ , por mencionar sólo algunos, no están validados para otras especies que no sean ganado doméstico.

Es necesaria la utilización de un importante número de técnicas de diagnóstico en conjunto para diferentes patógenos, que nos permitan conocer la dinámica de las infecciones, la ecología y la epidemiología de las bacterias del complejo *M. tuberculosis* en las poblaciones de animales silvestres.²⁷

Si bien es cierto que ningún método *antemortem* es 100% confiable para detectar la Tb en animales de zoológico, y menos silvestres, la aproximación a

la monitorización rutinaria de estas especies requiere la aplicación de múltiples modalidades de diagnóstico.¹⁶

A pesar que la información publicada hasta el momento no ha vinculado especies silvestres de monos del Nuevo Mundo con la Tb bovina, no existen investigaciones antecedentes específicas a este respecto en los primates mexicanos que son estudiados en campo.

Es importante destacar que en México, y en lo que se refiere a la investigación de la Tb tanto en animales silvestres cautivos como en vida libre, en la actualidad se emplean técnicas de diagnóstico que no son las más sensibles ni específicas.

Aunque los métodos basados en la detección serológica tienen muchas ventajas en términos de logística, menor costo y facilidad en su aplicación, muy pocos de ellos han sido evaluados para la monitorización bajo condiciones de campo.¹³

Las técnicas de diagnóstico rápidas y precisas que puedan emplearse en una variedad de mamíferos silvestres susceptibles al *M. bovis* bajo condiciones de campo, mejorarán significativamente los esfuerzos de vigilancia y monitoreo de

la Tb en especies silvestres a nivel global.^{13, 28} Los métodos de detección de anticuerpos en general son simples, rápidos y relativamente no costosos.

La prueba comercial de flujo lateral ofrece una herramienta interesante para la aplicación en campo si se cuenta con un control positivo apropiado, específicamente en especies de primates.²⁸ Por otro lado, según lo reporta el fabricante, este equipo desechable individual se nota afectado mínimamente por temperaturas ambientales extremas, y además presenta una precisión general del 98.5%.

El uso de esta técnica rápida y fácil de realizar en el campo puede ser de gran utilidad para la vigilancia de las especies silvestres y las estrategias de control de la Tb bovina en áreas donde esta enfermedad es persistente.^{13, 28}

Sin embargo, con respecto a la prueba comercial de flujo lateral, las anteriores son solamente las conclusiones del fabricante, lo cual requiere un mayor número de investigaciones con especies neotropicales, de primates, antes de determinar que sea de uso general en estos grupos animales

Aparte, es importante mencionar que es recomendable el uso de varios métodos de diagnóstico para Tb bovina en conjunto, en particular cuando se refiere a especies en vida silvestre.

1.2 Fragmentación con pérdida del hábitat y su relación con la tuberculosis en los primates silvestres

1.2.1 Fragmentación y pérdida del hábitat

La fragmentación del hábitat significa la pérdida de la cobertura vegetal o deforestación, creándose nuevos fragmentos pequeños, desprovistos de árboles y plantas, y por lo tanto provocando una distancia incrementada entre las nuevas secciones formadas quedando aislados de la vegetación original.^{5,}

29

Con frecuencia, se menciona que la fragmentación del hábitat provoca un efecto negativo a gran escala sobre la biodiversidad, y entonces se conceptualiza como un aspecto de la degradación del hábitat, aunque se dice que este marco conceptual es válido si la fragmentación está relacionada con la pérdida del hábitat.²⁹

La desaparición del hábitat o la fragmentación del hábitat remanente, es la principal causa de pérdida de la biodiversidad, considerada el factor causante más importante de la disminución de las poblaciones animales.³⁰

Además, se ha publicado que la fragmentación de los bosques tropicales reduce la diversidad de los primates, así como su demografía y comportamiento.³¹

Aunque la deforestación ha ocurrido a lo largo de la historia en las regiones tropicales y templadas, se sabe que en las últimas dos décadas se ha perdido más del 50% de la cobertura vegetal total en los bosques tropicales, y tal vez más del 70% de la Amazonia desde la década de 1980.³²

De hecho, los artículos publicados en el último lustro señalan que a nivel global la deforestación de los bosques tropicales era de alrededor de 70,000 km² por año a inicios de 1980, y se incrementó a 100,000-165,000 km² por año a finales de la misma década.³²

Algunas teorías como la de las metapoblaciones sugieren que conforme se reduce el tamaño de los parches y se incrementa el aislamiento en los hábitats fragmentados, aumenta la probabilidad de las extinciones locales de especies.

Cabe mencionar que, por desgracia, la deforestación de los bosques tropicales mexicanos no es la excepción, y por lo tanto las poblaciones de la mayoría de las especies que los habitan se encuentran en riesgo de desaparecer tanto de

forma local como global. Este es el caso de los primates mexicanos como el seriamente amenazado mono aullador de manto *Alouatta palliata mexicana* en la reserva de la biósfera de Los Tuxtlas, en donde se sabe que las poblaciones de este género han reducido drásticamente debido a la fragmentación del hábitat natural.³³

1.2.2 Efecto de la fragmentación en poblaciones de mono aullador (*Alouatta* spp) sobre la posible manifestación de enfermedades

La capacidad para predecir la manera en que se alterarán los procesos ecológicos y cuáles serán los grupos taxonómicos que resultarán principalmente afectados durante el proceso de fragmentación del hábitat, aún es poco factible^{5,19} y esta dificultad también se presenta en el caso de los primates que habitan fragmentos de bosque.³⁴

La fragmentación del hábitat genera una declinación de las poblaciones de primates, lo cual aunado al continuo deterioro, la cacería y la invasión humana, colocan en una situación de riesgo a estas poblaciones.^{18, 19}

La mayoría de los primates en la actualidad viven en un mosaico heterogéneo dominado por actividades antropogénicas, y rodeados por tierras de cultivos, ganaderías y asentamientos humanos.^{35, 36}

Sin embargo, se desconoce qué especies de primates son más susceptibles a la fragmentación y cuáles son las características mínimas que debe tener un fragmento para garantizar la permanencia de los primates.³⁴

La falta de capacidad para evaluar el potencial de los fragmentos de bosques para la conservación de los primates, se asocia a varios factores, entre los que destacan la ausencia de medidas de protección, lo cual permite el acceso para la utilización de los recursos madereros, consumo de carne selvática o uso de plantas y animales como productos medicinales.³⁴

Dentro del género *Alouatta*, existen 2 especies que se distribuyen en México; el mono aullador café (*Alouatta palliata*) y el mono aullador negro (*Alouatta pigra*), las cuales se encuentran catalogadas como en peligro de extinción por la IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales, por sus siglas en inglés),³⁷ y la NOM-059-SEMARNAT-2001 (SEMARNAT 2002) .

Alouatta palliata, se distribuye en 10 países de América;¹⁸ sin embargo, su hábitat en México y Guatemala se encuentra seriamente fragmentado y amenazado.

La distribución de *A pigra* está restringida a una pequeña área de Mesoamérica, comprendida entre México, Belice y Guatemala. México alberga cerca del 80% de la distribución geográfica de *A pigra*.¹⁸

En México *A. pigra* se distribuye en los estados de Veracruz, Tabasco, Campeche, Chiapas, Yucatán, Quintana Roo, y algunas regiones de Oaxaca.³⁸ *A pigra* ocupa algunas áreas de parches de bosques estacionalmente inundados en ranchos de ganado.¹⁹ En el año de 1987, este mismo reporte indicó²⁰ que solo el 21 % de las áreas de bosque naturales fragmentadas en México, aún contaban con poblaciones de primates.¹⁹

Entre los factores que han colocado a esta especie en esa categoría se menciona la pérdida y fragmentación de sus hábitats. Los cambios en el hábitat que afectan mayormente a estas especies son: la perturbación mayor del hábitat (como la deforestación e inundaciones por la construcción de presas), así como la cacería furtiva.³⁷

Los primates pueden adaptarse a la fragmentación del hábitat, por varios factores como: a) capacidad para consumir diferentes especies de plantas, b) incrementar la cantidad de hojas en su dieta; c) consumir especies exóticas y secundarias de plantas en los hábitats perturbados; d) consumir otras plantas que están asociadas con la vegetación secundaria; e) utilizar rangos hogareños pequeños, y f) minimizar el gasto de energía al ajustar sus patrones de actividad.¹⁹

Se ha comentado en algunos reportes científicos, que los monos aulladores pueden subsistir en hábitats con un alto grado de fragmentación, porque pueden explotar varias opciones de dietas a base de hojas, en áreas pequeñas, pero lo que no soportan es la exposición incrementada debida a esa pérdida de hábitat, y que trae como consecuencia la cacería.³⁷

Por otro lado, también se ha publicado que una dieta altamente frugívora podría limitar la posibilidad de una especie para vivir en fragmentos de bosque, lo cual es contrario a un reporte de 1997, en donde se comenta que varias especies frugívoras se encontraban en densidades mayores o similares en fragmentos de bosque que en bosques intactos en la Reserva de Lopé, en Gabón.³⁴

El género *Alouatta* spp, ha sido ampliamente estudiado en este tipo de hábitats perturbados, pero no se conocen los efectos reales de la fragmentación sobre las especies de *A. pigra* y *A. palliata*.³⁹

En estudios recientes se ha demostrado que tanto el tamaño del parche como el aislamiento del mismo afectan la presencia y la abundancia de los monos aulladores.³³

En un estudio publicado en el año 2008, se utilizó una valoración regional analizando paisajes con cantidades distintas de cobertura vegetal, usando también referencia con variables adicionales como la forma del parche, la distancia a los caminos y poblados.³³

Esta aproximación, según los autores, permite entender cómo los primates responden a la fragmentación del hábitat, porque es seguro que existen diferentes asociaciones con las variables mencionadas y que se relacionan tanto con los recursos alimenticios como con la estructura de la vegetación, porque conforme los fragmentos se vuelven más pequeños, la estructura de la vegetación se modifica. Esto provoca la disminución de la calidad y la cantidad de recursos alimenticios para los monos aulladores, lo cual podría afectar la supervivencia en este tipo de hábitat.³³

En cuanto a las poblaciones de *A pigra* en la Península de Yucatán, se ha observado la disminución en el tamaño y el número de tropas restantes en fragmentos del bosque, resultado de la presión de cacería. Por ello, se asume que los monos aulladores en fragmentos pequeños de bosque, pueden estar bajo estrés crónico debido a cambios en su dieta, y que esto podría predisponer a un mayor riesgo de infestación parasitaria, lo cual podría resultar en una alta mortalidad, sugiriendo que aunque puedan vivir en islas de hábitat, esto no garantiza las condiciones adecuadas a largo plazo.¹⁹

Por otra parte, el tamaño del parche parece ser el factor principal que determina la presencia de los monos aulladores en Los Tuxtlas, Veracruz, México, y este resultado coincide con las teorías de metapoblación, y con otros estudios de especies de primates del Viejo Mundo y del Nuevo Mundo.³³

En las áreas de bosque fragmentadas del estado de Campeche como en las que hemos colectado muestras para este estudio, los monos en ocasiones tienen que cruzar los potreros para desplazarse de un parche arbóreo a otro. Estos desplazamientos pueden promover el contacto con las heces del ganado y de otras especies, siendo esta una posible vía de infección para las micobacterias y otros patógenos (comunicación personal, MC Domingo Canales E).

La fragmentación puede ejercer una influencia negativa sobre el riesgo de la infección de los primates, al incrementar las tasas de transmisión de los patógenos entre este grupo animal y otras especies.³¹

Por lo tanto, es importante considerar que para algunas enfermedades como la Tb en áreas de prevalencia de *M bovis* en ganado en pastoreo, y donde confluyen varias especies de mamíferos, ésta y otras enfermedades pueden persistir y transferirse entre animales domésticos y silvestres (mapaches, coatíes, zarigüeyas, ciervos, entre otros), lo que garantiza la necesidad de una monitorización epidemiológica que incluya a las diferentes poblaciones animales de esas zonas.²⁷

1.2.3 El estudio de las enfermedades infecciosas emergentes en los primates en vida silvestre, y su relación con la salud pública

El interés por la epidemiología de las enfermedades emergentes en los humanos y el ganado, y su relación con la fauna silvestre, se ha incrementado en las últimas décadas.⁴⁰

La frecuencia en la emergencia y reemergencia de enfermedades infecciosas

en reservorios de vida silvestre, se ha incrementado, pero por desgracia en pocos casos se conoce acerca de la ecología de esas enfermedades.⁴¹

Los animales y los agentes patógenos interactúan de forma conjunta, ya que los factores medioambientales pueden afectar a unos, a los otros o a ambos al mismo tiempo, y dicha acción puede ocasionar la modificación de la abundancia y la densidad poblacional, el grado y tipo de exposición al agente, el grado de resistencia del hospedero, y también la virulencia del agente.²⁷

Debido a que la mayoría de las especies de primates habitan los bosques tropicales, una gran cantidad de las interacciones entre los humanos y los primates no humanos en vida silvestre ocurren en esta interfaz de alto riesgo, la cual se ha incrementado en épocas recientes a razón de la reducción del tamaño de los bosques.¹⁷

Por otra parte, ya que se conoce la imperiosa necesidad de mejorar la vigilancia epidemiológica y la investigación básica sobre la ecología de las enfermedades infecciosas, los primates en vida silvestre son modelos ideales, porque bajo esas condiciones, estas especies actúan como centinelas para señalar los patógenos que significan riesgo para la salud humana y animal.²⁷

La idea falsa de una tendencia evolutiva hacia el aumento en la especificidad del hospedero, ha contribuido a la creencia que el intercambio de los patógenos debería ser raro. En muchos casos, los cambios ecológicos pueden

hacer más amplio el rango del hospedero para un patógeno, como por ejemplo en el caso del gusano filaroide *Loa loa*, (el cual reside fuera de poblaciones humanas, entre otras causas por el comportamiento del vector y los cambios en la ecología, expandiendo su rango patogénico), o en la emergencia de un rango importante de flavivirus (fiebre amarilla, dengue, y encefalitis Japonesa, entre otras), a partir de ciclos de primates terrestres.¹⁷

Además, identificar si una especie tiene el estatus de mantenimiento o de salto taxonómico es importante para determinar si es necesario el control de la enfermedad dentro de una especie hospedera, o en la predicción de si la infección persistirá una vez que la fuente de la infección se remueva, o los cambios de comportamiento se reviertan. Tanto los hospederos de mantenimiento como los de salto taxonómico, pueden actuar como reservorios de la enfermedad para otras especies, como es el caso de la tuberculosis en especies no bovinas en distintas regiones del mundo.²⁶

La vigilancia epidemiológica para cierto tipo de contacto de humanos con primates no humanos, puede ser de gran utilidad; por ejemplo, la cacería de primates, la cual involucra persecución, captura, manejo, transporte, preparación y consumo de la carne, puede jugar un papel muy importante en el intercambio de patógenos, como ocurre en casos de virus del Ébola, o viruela del mono (“monkeypox”), en África. Por ello, para la mayoría de los patógenos, el objetivo central de investigación debe ser la epidemiología básica y no el tratamiento del agente causal.

Los esfuerzos para conservar a las poblaciones silvestres de primates y monitorizar la emergencia de las enfermedades, tienen objetivos comunes.¹⁷ La Tb es una enfermedad frecuentemente fatal para los primates, y es prevalente en poblaciones silvestres de varias especies estudiadas de otros órdenes taxonómicos, la cual es causada por el *Mycobacterium bovis*, un patógeno que se originó del ganado doméstico.^{17, 42} Es factible que el orden de los primates con varias de sus especies pueda verse afectado por esta enfermedad en vida silvestre.

En el caso específico del mono aullador de manto (*Alouatta palliata*), se ha reportado que el aislamiento de las poblaciones de estos primates y la presencia de otras especies de primates incluyendo al ser humano, influyen en los patrones de la prevalencia de los parásitos estudiados, pero también se concluye que este hecho se conocerá de forma más clara si se llevan a cabo estudios longitudinales de grupos de primates silvestres para otras enfermedades e infecciones potenciales²⁶ como podría ser la tuberculosis.

Un ejemplo documentado de una enfermedad emergente tanto en humanos como en animales (aunque su estatus real en vida silvestre se desconoce para la mayoría de los primates) es la tuberculosis causada por *M. tuberculosis*. La mayoría de los mamíferos son susceptibles a la infección por este organismo, y por ello la Tb ocasionada por este género y especie se ha reportado en

colecciones zoológicas y poblaciones de primates cautivos, frecuentemente por contagio de los cuidadores.²⁷

En este mismo estudio se describen hechos relevantes que refieren epizootias de infección por *M tuberculosis* en suricatas (*Suricata suricatta*) y mangostas rayadas (*Mungos mungo*) en Sudáfrica. En esta área local estaban presentes humanos, y la transmisión se creyó vinculada a la exposición de los animales al esputo y secreciones de los humanos.²⁷

De acuerdo con algunos investigadores, si usamos un abordaje tipo ecológico en lo que respecta a la transmisión de los patógenos, esto puede beneficiar el conocimiento que tenemos sobre las enfermedades emergentes, ya que al determinar la manera en la que los humanos se convierten en parte del ciclo de vida de los patógenos, en lugar de cómo los patógenos entran en las poblaciones humanas, puede hacernos entender mejor los factores asociados con la emergencia de las enfermedades y mejorar la calidad de las respuestas a la salud pública.¹⁷

1.2.4 Discusión y conclusiones sobre la fragmentación del bosque tropical y la aparición de enfermedades emergentes

Las oportunidades para la transmisión de agentes infecciosos entre el ganado y las especies silvestres, dependen de varios factores entre los que destacan los comportamientos específicos de especies, las prácticas de manejo de los animales domésticos, los eventos fisiológicos y las características medioambientales de vida tanto de las especies silvestres como de las domésticas, y desde luego de los atributos de los organismos infecciosos.⁴³

Los primates que viven en poblaciones fragmentadas pueden sufrir efectos devastadores en presencia de varias enfermedades, por lo que según varios autores, la valoración de incidencia y prevalencia de dichas enfermedades es determinante para decidir las estrategias de manejo y conservación que se llevarán a cabo en cada caso.²⁰

La medicina de animales silvestres nos ayuda a conocer y con ello a promover la salud de las especies amenazadas, y también disminuye el impacto de patógenos de los humanos y los animales domésticos sobre las especies en vida libre.

Además, en las fases del diagnóstico y del tratamiento, los veterinarios se han vuelto pieza clave como investigadores de campo. En el pasado, los primates cautivos han sido invaluable para el estudio de enfermedades a nivel de organismos, pero en la actualidad, las poblaciones silvestres de este orden animal pueden aportar una oportunidad única para la investigación de los fenómenos de las enfermedades infecciosas a niveles de poblaciones y ecosistemas, y con ello facilitar las posibilidades de conservación de primates y evitar la propagación de enfermedades fatales para el hombre y los animales.²⁶

En la actualidad, uno de los fenómenos más importantes en la emergencia y reemergencia de enfermedades en especies silvestres, domésticas y el ser humano, es el aumento de contacto entre estas especies, debido principalmente a las actividades inducidas por el hombre que incluyen la destrucción de los ambientes naturales.

Por ello, la investigación científica en muchos campos debe enfocarse en los siguientes puntos: los aspectos inherentes a las habilidades de los agentes infecciosos para infectar nuevos huéspedes, las formas como esos microorganismos ingresan y salen de esos huéspedes, el curso de las enfermedades en vida silvestre y la morbilidad (o sea la recuperación de la infección o la muerte del individuo, o bien la capacidad para eliminación

constante del agente), el comportamiento y la densidad de la especie hospedera, las condiciones climáticas, el tiempo que puede durar la eliminación del agente y el traslape del rango hogareño con otras especies susceptibles a la infección/enfermedad, entre otros.

De esta manera, los veterinarios de vida silvestre y los ecólogos podrán conocer si los nuevos hospederos de las enfermedades emergentes pudieran actuar como hospederos finales (que son aquellos que no son capaces de mantener la infección por lo que no la pueden transmitir a otras especies y por ello no tendría consecuencias en las poblaciones residentes), o bien si determinada especie se puede convertir en un hospedero de mantenimiento, el cual puede mantener la infección con o sin la introducción a otras especies.

Estos hallazgos podrían indicar la factibilidad de transmisión a otras especies, y cabe destacar que en el caso del hospedero de mantenimiento esa posibilidad es mayor, por lo que se convierten en las poblaciones de estudio más importantes para la epidemiología de las enfermedades. Esto sin duda sería de un valor incalculable para conocer la verdadera importancia de las enfermedades emergentes relacionadas con la fragmentación de los bosques tropicales, lo cual permitiría llevar a cabo modelos de predicción de las mismas para coadyuvar en los proyectos de conservación de especies y la salud del ecosistema.

Trabajo de investigación

Capítulo II

SEROPREVALENCIA DE *Mycobacterium bovis* EN GRUPOS DE MONO AULLADOR NEGRO (*Alouatta pigra*), EN ÁREAS CON DISTINTOS GRADOS DE FRAGMENTACIÓN DE HÁBITAT EN CAMPECHE, MÉXICO

2.1 Introducción

En los últimos años la tasa de contacto entre el ser humano, el ganado doméstico y la fauna silvestre se ha debido a los cambios ocasionados por el ser humano en los sistemas naturales.¹⁶ Estos cambios han provocado la aparición de enfermedades infecciosas como la tuberculosis, la cual impacta la salud del ganado y del hombre.¹⁶ El potencial zoonótico de esta enfermedad representa una preocupación adicional, por lo que el diagnóstico certero y rápido de la tuberculosis en los animales silvestres, es de gran importancia para prevenir contagios a los animales domésticos.¹⁶

La tuberculosis bovina (TB b) es una causa importante de enfermedad en el ganado bovino doméstico, pero puede afectar también a otros animales de granja, especies silvestres y al humano. Esta enfermedad es causada por el

Mycobacterium bovis, y a pesar que en el ganado bovino se inició una campaña de erradicación en los años 1950, lo cual disminuyó su diseminación hacia los años 1960, en la actualidad se ha incrementado de nuevo su aparición tanto en el ganado como en varias especies silvestres en todo el mundo, considerándose por ello una enfermedad emergente⁴⁴

En mayo del 2007, el estado de Campeche se catalogaba como en fase de erradicación de la Tb bovina, lo cual significa que existía una prevalencia <2% con distribución conocida (NOM-031-ZOO-1995).⁴⁵ En concordancia con la modificación de la Norma Oficial Mexicana contra la tuberculosis bovina, las actividades sanitarias de prevención, control y erradicación a nivel nacional, han permitido reducir y/o establecer prevalencias menores al 0.5% en diferentes zonas productivas.⁴⁵

Lo anterior significa también que el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA, por sus siglas en inglés), reconoció entonces avances en el control de esta enfermedad en las regiones de baja prevalencia, permitiéndose la exportación del ganado bovino, con una sola prueba de tuberculina para varios estados mexicanos, entre ellos Campeche.⁴⁵

En un comunicado de prensa emitido en San Francisco, Campeche, el 10 de abril del 2008, se recordó que un año antes la Comisión Binacional México-Estados Unidos reclasificó el estatus de la región "A", que comprende únicamente al Municipio de Palizada en Campeche, pasando de Acreditado Modificado a Acreditado Preparatorio, y suspendió temporalmente las exportaciones ganaderas a Norteamérica, recomendando a la vez establecer un estricto control de las movilizaciones de los animales, tanto hacia el interior como al exterior del Estado de Campeche.⁴³

Sin embargo, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria de la Dirección General de Salud Animal, Dirección de Vigilancia Epidemiológica, en el reporte llamado Situación Zoonositaria en los Estados de la República Mexicana del 9 de noviembre del 2009, cataloga como en estado de control (prevalencia >2% o desconocida) a la Tb bovina en el estado de Campeche.⁴⁶

Por otra parte, es importante comentar que de acuerdo con el boletín (No. 11, Vol, 27, Semana 11, del 14-20 de marzo del 2010), del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud, México 2010, se reportaron de 7 casos de tuberculosis pulmonar en humanos (2 de ellos en

municipios indígenas) en el estado de Campeche, México durante el año 2009 (Fuente: Plataforma única de información módulo de Tuberculosis).⁴⁷

Debido a que el estado de Campeche ha sufrido la fragmentación de los hábitats naturales donde habitan especies silvestres, y a la prevalencia de la tuberculosis bovina en el ganado doméstico en esta zona, existe la preocupación acerca de la posibilidad de transmisión de esta enfermedad del ganado doméstico a los monos aulladores. La reubicación de grupos de monos aulladores en otras zonas dentro del mismo estado de Campeche con el objetivo de conservación de los mismos, podría incrementar la posibilidad de introducir algunas enfermedades como la tuberculosis bovina a zonas donde los primates sean reubicados.

En el año 2006, un grupo de 14 monos aulladores negros (*Alouatta pigra*) se capturó de dos sitios fragmentados donadores en el Municipio de Escárcega en Campeche, México, para ser reubicado en otras zonas de hábitat similar en el mismo estado, debido a la construcción y colocación de torres de transmisión eléctricas de la Comisión Federal de Electricidad (CFE) en esas áreas.

La captura y el movimiento de los animales incluyó la toma de muestras sanguíneas, y los sueros de estos individuos se enviaron al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad

Nacional Autónoma de México, para su evaluación por medio de la técnica de Inmunoblot para la detección de anticuerpos anti- *Mycobacterium spp.*

De estas muestras, 9 (64.28 %) resultaron positivas a *Mycobacterium spp.*, lo cual atrajo la atención del grupo de trabajo de la Universidad Veracruzana, para desarrollar el presente proyecto de investigación. Este hecho se vinculó con la probable seroprevalencia de *Mycobacterium bovis* en poblaciones silvestres de esta especie de primate en Campeche, México, debido principalmente a la cercanía con hatos de ganado bovino doméstico, provocada por el deterioro y la fragmentación del hábitat de los monos aulladores en la zona mencionada.

Por lo anteriormente descrito, la hipótesis de este trabajo de investigación se establece con base en que la fragmentación de las áreas naturales ha provocado el aumento en las tasas de contacto entre los primates y el ganado bovino doméstico, por lo que es factible encontrar individuos positivos a anticuerpos anti-complejo *M tuberculosis* (que incluye al *M bovis*) en ambientes fragmentados.

Se espera encontrar mayor prevalencia en fragmentos chicos y aislados cerca de zonas ganaderas, que en áreas grandes y conectadas de hábitat.

Por ello, el objetivo central de este estudio es determinar la seroprevalencia del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en las poblaciones de primates en áreas con distintos grados de fragmentación en los municipios de Escárcega y del Carmen, y un área continua (Calakmul), en el estado de Campeche, México, a través de tres métodos serológicos de diagnóstico.

2.2 Material y métodos

Área de estudio y sitios de colecta

El área de estudio del presente trabajo se localiza en el Estado de Campeche, México (17°48' y 20°52' N, y 89°06' y 92°45' W), el cual posee clima cálido clasificado también como húmedo, con lluvias presentes durante el verano, alcanzando una precipitación pluvial que fluctúa entre los 900-2000 mm al año.

48

El tipo de vegetación en el estado de Campeche es: vegetación primaria del 60 %, mientras que la vegetación secundaria comprende el 34 % y el restante 6 % es catalogada como vegetación antropogénica.⁴⁹

En este estudio utilizamos 47 muestras de suero de monos aulladores negros (*Alouatta pigra*) cuyos sitios de colecta se encuentran en el Municipio de

Escárcega, Ciudad del Carmen y Calakmul, en el mismo estado de Campeche.

Los sitios de muestreo se seleccionaron con base en el tamaño, e incluyeron un área de selva continua (Reserva de la Biósfera de Calakmul) y 6 fragmentos de selva, de los cuales 2 fueron clasificados como chicos, 2 medianos y 2 grandes.

Los sitios de muestreo se eligieron de acuerdo al conocimiento previo del grupo de trabajo del Instituto de Neuroetología en Xalapa, Veracruz, perteneciente a la Universidad Veracruzana quienes llevan a cabo trabajos etológicos y antropológicos en dichas zonas,

Cuadro 1.- Sitios de muestreo catalogados con base en el tamaño del fragmento

Nombre del sitio de Captura	Clasificación del fragmento por tamaño	Identificación del grupo	Mes y año de captura
Oxcabal	Chico	OXC	Noviembre del 2007
Emiliano Zapata	Chico	EMZ	Noviembre del 2007
			Noviembre del 2008
Álamo	Mediano	ALM	Noviembre del 2007
Manantiales	Mediano	MAN	Noviembre del 2008
Calax	Grande	CHIL-T61	Noviembre del 2007
		CHIL	Noviembre del 2008
Tormento	Grande	TOR 1 y 2	Noviembre del 2007
		TOR 1 y 2	Noviembre del 2008
Calakmul	Grande Selva continua	CLK	Noviembre del 2008

Es importante mencionar que las capturas en ambas salidas de campo se realizaron durante el mes de noviembre, que es el final de la época de lluvias en estas zonas, el cual era un punto importante para otra investigación relacionada con el virus del Dengue, la cual se llevó a cabo de manera conjunta con la nuestra.

Captura de animales

Este estudio contempla las muestras de suero de las capturas de monos aulladores negros, (*Alouatta pigra*) realizadas en noviembre de 2007 y en noviembre del 2008.

En el muestreo del 2007 se capturaron 25 individuos, mientras que en el muestreo del 2008, el número total de individuos capturados fue de 22. A todos los animales se les tomó muestra de suero. La inmovilización química se llevó a cabo con el anestésico disociador Ketamina (1000 mg/ 100 mL;), la cual se administró a través de un dardo mediante el uso de un rifle, a base de CO₂ con aguja de 3/8 pulgada, a dosis estándar de 1.5 mL (150 mg) para cada animal adulto.

Se utilizaron como objetivo blanco los músculos de los miembros posteriores, para evitar golpear partes vitales del cuerpo como la cara, el tórax o el abdomen. Después de haber disparado el dardo, se monitorizaban de forma visual los movimientos de cada individuo, pero no se aproximaba nadie del equipo técnico hasta que el anestésico iniciaba su efecto, el cual en todos los casos se manifestaba como falta de coordinación motriz, balanceo sobre las

ramas, colocación en posición horizontal sobre la rama del árbol, y debilidad en la sujeción.

Una vez que el animal mostraba torpeza y retraso en los movimientos, se tendía una hamaca de plástico debajo del árbol donde se encontraba el individuo anestesiado, o bien un miembro específico del equipo entrenado para esta labor escalaba el árbol y sujetaba al individuo por la cola o alguno de los miembros apendiculares para descender él mismo con el animal.

Se verificaba entonces la condición física del individuo y sus signos vitales, para proceder a la toma de muestras.

Toma de muestras sanguíneas

Las muestras de sangre se colectaron de la vena ventral coccígea, a razón de $\leq 1\%$ del peso corporal (1 mL / 1000 g de masa corporal), para proceder a colocar sangre completa en un tubo sin anticoagulante y la otra porción en un tubo con anticoagulante ácido etilen-diamino-tetracético (EDTA, por sus siglas en inglés).

Posteriormente, la sangre coagulada se colocaba en una centrífuga para la separación del suero, mismo que se dividió en 2 viales de 0.5 mL cada uno, los cuales se usaron uno para el presente estudio, y el otro para un estudio alterno referente al virus del dengue.

2.2.1 Técnicas serológicas usadas para la detección de anticuerpos anti complejo *Mycobacterium tuberculosis* en esta investigación

Debido específicamente a la poca disponibilidad de métodos diagnósticos comerciales específicos para la TB en los primates en México, se decidió emplear dos pruebas accesibles que son ELISA indirecta en un laboratorio de referencia para la vigilancia de la Tb bovina en la Ciudad de México, y el Inmunoblot por las facilidades otorgadas por el laboratorio de estudio de la TB del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Como primer paso, las 47 muestras se enviaron al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en la Ciudad de México, para conocer la prevalencia de anticuerpos anti -complejo *M. tuberculosis* con una prueba serológica de ELISA indirecta, utilizando un antígeno contra *Mycobacterium bovis*. Lo anterior es lo único reportado por el

laboratorio de referencia, sin aportar mayores datos sobre el antígeno específico ni acerca del punto de corte para la interpretación de las lecturas.

Por otro lado, y con la finalidad de comparar tres diferentes métodos de diagnóstico para el complejo *M tuberculosis*, por los antecedentes bibliográficos

publicados de que ninguna prueba por sí sola a excepción del cultivo / especiación, es capaz de determinar si una muestra animal es positiva o no a la presencia de anticuerpos contra este complejo bacteriano, se decidió utilizar la prueba de Inmunoblot, utilizando para ella antígenos positivos reactores bovinos (PPD-B, PPD-A, proteína ESAT-6).

Como complemento de estas pruebas inmunológicas, se realizó una prueba serológica comercial llamada PrimaTB Stat Pak (Chembio Diagnostic Systems, Inc. Medford, New York), la cual es un método de diagnóstico cualitativo inmunocromatográfico, de un solo uso y en dos pasos para la detección de anticuerpos a *M. tuberculosis* y *M. bovis* en suero, plasma o sangre completa,²² misma que utiliza tecnología de color basada en látex, de flujo lateral, y un coctel de antígenos seleccionados de *M bovis* incluyendo el ESAT-6, CFP10 y el MPB83.⁵⁰

La lectura de esta prueba se realiza 20 minutos después de agregar al equipo individual el suero a evaluar y la sustancia amortiguadora que contiene cada grupo de muestras.^{28, 50}

Esta técnica se ha empleado en varias especies de primates del Viejo Mundo,^{22, 28} y para el control positivo en este estudio se usó una muestra de suero de un mono araña (*Ateles fusciceps*) el cual fue diagnosticado con *M. tuberculosis* por medio de cultivo bacteriano y especiación.

En esta prueba comercial, si existen anticuerpos específicos en los sueros contra *M tuberculosis* o *M bovis*, el resultado esperado es reactivo (Fig 1); esto significa que la muestra es sugerente a un proceso de tuberculosis activa.

Figura 1.- Fotografía de la muestra control positivo usando la técnica comercial rápida de flujo lateral PrimaTB-STAT Pak.



La aparición de la línea azul en la letra T significa que el suero es positivo a la presencia de anticuerpos anti-complejo *M. tuberculosis*.

En ausencia de anticuerpos, el resultado esperado es no reactivo. Como control de calidad de este equipo individual comercial, siempre deberá aparecer una línea de color azul como el de la figura anterior en el área del CONTROL (C), si es que la prueba se llevó a cabo de forma correcta y si el equipo funciona adecuadamente, lo cual se corrobora con el suero positivo de un primate diagnosticado como positivo por medio del cultivo bacteriano para el complejo *M tuberculosis*.^{28, 50}

Es posible también, que una prueba realizada de forma errónea no muestre ninguna línea azul en el área del control (C), dando un resultado inválido, por lo que esa muestra deberá ser repetida con otro equipo individual nuevo, según lo indican las instrucciones impresas del fabricante que acompañan el grupo de equipos comerciales.^{28, 50}

2.3 Resultados

De las 47 muestras de suero pertenecientes a los animales utilizados en esta investigación, los cuales presentaban diferentes rangos etarios (juveniles, subadultos y adultos), y de ambos sexos, la prueba de ELISA indirecta mostró resultados de 3 (6.7 %) muestras con niveles altos (según el reporte del laboratorio de referencia) de anticuerpos contra el complejo *M tuberculosis*, específicamente empleando antígenos del *M bovis*, según el reporte del INIFAP.

El punto de corte sugerente según los resultados obtenidos, pero no especificado por el laboratorio en cuestión para la detección de los niveles de anticuerpos, es de 0.223 de densitometría óptica (DO), el cual se dedujo simplemente por los valores reportados en las muestras que ellos reportan como negativas y la diferencia con los niveles de anticuerpos que son considerados como altos en el mismo documento. Cabe mencionar que las tres muestras positivas son de 3 sitios diferentes de colecta.

Por otro lado, el total de las muestras (n=47) sometidas a la prueba de Inmunoblot arrojó resultados negativos a la presencia de anticuerpos anti-

complejo *M. tuberculosis*, ya que ninguna lectura mostró reactividad a los anticuerpos bovinos.

De la misma manera, al llevar a cabo la evaluación de los sueros utilizando el equipo comercial PrimaTB STAT-PAK, ninguno de ellos fue positivo a la presencia de anticuerpos anti-complejo *M tuberculosis*. Pero cabe destacar que el resultado del control positivo fue notorio, haciendo válida la prueba al suero positivo de un primate de la Familia Cebidae, a la que pertenece el mono aullador. Lo anterior según la experiencia de quienes han utilizado esta prueba en diferentes especies de primates, nos permite suponer fuertemente la ausencia de una infección activa por el complejo *M. tuberculosis* en las

muestras de suero de nuestro estudio (comunicación personal, Michele Miller, PhD)

2.4 Discusión y conclusiones del capítulo II

La acelerada destrucción de los ecosistemas tropicales generada principalmente por las actividades antropogénicas, ha dado como resultado la emergencia y reemergencia de enfermedades infecciosas como la tuberculosis bovina en todo el planeta.^{1, 17, 40}

Las poblaciones de primates en el sureste mexicano se ven amenazadas con frecuencia por diversos factores entre los que destacan la pérdida del hábitat, la cacería furtiva, la invasión de los fragmentos de bosque por los humanos y el ganado bovino doméstico, por mencionar sólo algunos.^{19, 37}

La ocupación de las tierras y espacios naturales de los primates por el ganado bovino, ha ocasionado el aumento en las tasas de contacto entre ambas especies, lo cual puede ser un factor de riesgo tanto para la conservación de los primates, como para la salud del ganado destinado a satisfacer las necesidades de producción de carne, debido al intercambio de patógenos que afectan de forma bidireccional a las especies en cuestión.^{15, 17, 40}

No se han llevado a cabo investigaciones previas para determinar si la tuberculosis bovina está presente o ausente en primates silvestres en México,

que habitan zonas fragmentadas, con altas tasas de contacto con el ganado doméstico. Estos individuos suelen ser reubicados con la intención de promover su protección en hábitats naturales similares a su rango original de distribución.

Por ello, estos grupos deben ser monitorizados para asegurar que algunos de los parásitos de mayor riesgo (inclusive por su potencial zoonótico como la Tb bovina), no sean transportados por los mismos individuos e infectar a otras poblaciones simpátricas de primates y de otras especies.

En la actualidad no existe un método de diagnóstico único que sea 100 % sensible y específico para la tuberculosis (bovina o humana), en especial cuando hablamos de muestras serológicas, las cuales se consideran las más útiles en el campo, gracias a su accesibilidad, simplicidad, bajos costos e incluso el hecho que ya existen algunas de ellas que son comerciales.^{16, 23, 25}

Los métodos usados en la vigilancia y monitorización para la Tb en zoológicos (y en la investigación en fauna silvestre) en México requieren ser actualizados y combinados para obtener resultados más precisos tanto para los protocolos de medicina preventiva, como en los casos en los que existan animales sospechosos. Cabe mencionar que se recomienda que estas técnicas de diagnóstico se utilicen en conjunto con el cultivo bacteriano y la identificación del ADN de la micobacteria.^{23, 25}

El estado de Campeche se cataloga como en fase de control de la tuberculosis bovina en el ganado productor de carne, y por ello algunas zonas aún

presentan riesgo para la aparición de casos de esta enfermedad en los animales domésticos. En las áreas fragmentadas las especies silvestres pueden resultar infectadas por el aumento en las tasas de contacto con el ganado doméstico.^{45, 46, 47}

A pesar que en el año 2009 se reportaron 7 casos de tuberculosis pulmonar en humanos provocada por *M. tuberculosis* en el estado de Campeche, es posible que el incremento en las tasas de contacto del humano con el ganado bovino infectado pueda ocasionar también la infección del ser humano con el agente causal de la tuberculosis bovina.^{43, 45, 46}

Ningún método antemortem es 100% específico para el diagnóstico de la tuberculosis en ninguna especie animal incluido el ser humano. Por ello, las muestras pertenecientes a los animales capturados para reubicación en el 2006 y que dieron origen al presente estudio, pudieron ser positivos a la presencia de anticuerpos anti-*Mycobacterium spp* como tal, posiblemente porque los animales expresaran una respuesta serológica contra micobacterias no productoras de tuberculosis (NTM, por sus siglas en inglés), y no necesariamente al complejo *M. tuberculosis*.

La tuberculosis bovina se ha comprobado en al menos una especie de primate silvestre en África, la cual se corroboró había sido infectada por el *M. bovis*.

A pesar de que no fue posible comprobar la seroprevalencia del complejo *M. tuberculosis* en los animales muestreados con las tres técnicas serológicas, es importante continuar con la realización de protocolos de diagnóstico de enfermedades emergentes de riesgo potencial para los primates, el ganado doméstico y el ser humano, dada la fragmentación continua de las zonas de distribución natural del género *Alouatta* como lo es el estado de Campeche.

En particular se considera importante indagar sobre la presencia y prevalencia de diferentes enfermedades infecciosas en animales que habitan fragmentos chicos donde existe la interacción con los animales domésticos y con el ser humano, debido a que éstas podrían ser las zonas de mayor prevalencia de patógenos infecciosos.

En México es indispensable desarrollar protocolos de vigilancia epidemiológica para animales silvestres, especialmente para las enfermedades infecciosas emergentes antes del proceso de reubicación, como en el caso de los primates. Esto se sugiere como una estrategia de conservación para las subpoblaciones

en peligro de extinción. Lo anterior puede ser usado como una herramienta de prevención para evitar la transmisión y acarreamiento de patógenos de un área geográfica a otra, donde tal vez no existían con anterioridad.

Este estudio de investigación es pionero para los primates en México, por lo que destacamos la importancia de la estandarización de los métodos de diagnóstico y la monitorización constante de la tuberculosis y otras enfermedades emergentes en las poblaciones de primates que habitan las áreas fragmentadas de bosque como ocurre en el estado de Campeche.

Es necesario continuar investigando sobre distintos tópicos que atañen a la salud de los monos aulladores en el sureste mexicano, en particular la de aquellos que son manejados y muestreados para cualquier propósito, ya que esta es una oportunidad única de obtener información valiosa e incrementar nuestros conocimientos y bases de datos particulares de las especies silvestres, cuya supervivencia se encuentra en riesgo o amenazada por diversos factores.

Es un hecho que la sobrevivencia de esas especies depende de la investigación y los protocolos continuos basados en la ciencia. Por ello, es muy importante conocer y utilizar el conjunto de pruebas diagnósticas más efectivas

para cualquier enfermedad en primates silvestres, a través de la generación de información de punta, usando todo tipo de técnicas disponibles. De la misma manera, se requiere una mayor investigación al respecto en grupos de animales cautivos que después pueda ser traspolada a poblaciones silvestres.

Es sabido que las tasas de destrucción de los hábitats tropicales en la actualidad no han tenido paralelo en la historia del hombre, y por ello se cree que el panorama de la conservación de los animales silvestres debe incluir información extensa y multidisciplinaria, con un abordaje holístico para comprender el origen de las enfermedades infecciosas en este tipo de especies.

De la misma manera, se debe conocer la ecología de las enfermedades emergentes si pretendemos dar los primeros pasos en materia de conservación de fauna silvestre en México, y afrontar con hechos el gran reto que significa la Medicina de la Conservación en el presente siglo.

2.5 Literatura citada

- 1.- DASZAK PA, CUNNINGHAM A, HYATT AD. Wildlife ecology - Emerging infectious diseases of wildlife - Threats to biodiversity and human health, Science 2000; 287:443-449.
- 2.- DASZAK PA, ET AL. Global trends in emerging infectious diseases, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2007; 77:284-285.
- 3.- DOBSON A, FOUFOPOULOS D. Emerging infectious pathogens of wildlife, Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 2001; 356:1001-1012.
- 4.- FELDMANN H, ET AL. Emerging and re-emerging infectious diseases, Medical Microbiology and Immunology 191:63-74. OPS. 2002. Organización Panamericana de la Salud. Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes. En: La salud en las Américas. Washington, D.C.: OPS; 2002. Publicación Científico y Técnica No. 587.
- 5.- MCCALLUM H, DOBSON A; Disease, habitat fragmentation and conservation. The Royal Society. 2002; On line access publication.
- 6.- FENTON A, PEDERSEN AB; Community Epidemiology Framework for Classifying Disease Threats. Emerging Infectious Diseases, December 2005; Vol 11. No. 12.
- 7.- FRANZMANN AW. Veterinary contributions to international wildlife management. In: Fowler M, editor. Zoo and Wild Animal Medicine Current therapy 4. 1999; WB Saunders Company.
- 8.- LERCHE NW. Emerging viral diseases of nonhuman primates in the wild. In: Fowler M, editor. Zoo and Wild Animal Medicine, Current therapy 3. 1993; WB Saunders Company.
- 9.- SUZÁN G, GALINDO F, CEBALLOS G. La importancia del estudio de las enfermedades en la conservación de fauna silvestre.
- 10- ISAZA R; Tuberculosis in all taxa. In: Fowler M and Miller E, editors. Zoo and wild animal medicine, Current therapy. 5th edition. 2003; WB Saunders.
- 11.- MONTALI R, BUSH M. Some diseases of golden lion tamarins acquired in captivity and their impact on reintroduction. Proceedings Joint Conference American Association of Zoo Veterinarians and the American Association of Wildlife Veterinarians 1992. Oakland, Cal.

- 12- CUNNINGHAM A. Disease risks of wildlife translocations. *Conservation Biology* 1996; Vol. 10. No.2: 349-353
- 13- COUSINS DV, FLORISOON V. A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2005; 24 (3), 1039-1059
- 14- DELISLE GW, BENGIS RG, SCHMITT SM, O`BRIEN DJ. Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection, diagnosis and management. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2002; 24 (3), 1039-1059
- 15- PALMER MV. Tuberculosis: A Reemerging Disease at the Interface of Domestic Animals and Wildlife. *CTMI* 2007; 315:195-215. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 16- MILLER MA. Current diagnostic methods for tuberculosis in zoo animals. In: Fowler ME, Miller RE, editors. *Zoo and Wild Animal Medicine. Current therapy* 6. 2008. WB Saunders.
- 17- WOLFE ND, ESCALANTE AA, KARESH WB, KILBOUM A, SPIELMAN A, AND LAL AA. Wild Primate Populations in Emerging Infectious Disease Research: The Missing Link?. *CDC Journal of Emerging Infectious Diseases* 1998; Vol 4, No.2.
- 18- ESTRADA A, LUECKE L, VAN BELLE S, BARRUETA, E, ROSALES-MEDA M. Survey of black howler (*Alouatta pigra*) and spider (*Ateles geoffroyi*) monkey in the Mayan sites of Calakmul and Yaxchilan, Mexico and Tikal, Guatemala. *Primates* 2004; 45 :33-39
- 19- ESTRADA A, MENDOZA A, CASTELLANOS L, PACHECO R, VAN BELLE S, GARCÍA Y, MUÑOZ D. Population of the black howler monkey (*Alouatta pigra*) in fragmented landscape in Palenque, Chiapas, Mexico. *American Journal of Primatology* 2002; 58:45-55
- 20- CROFOOT MC, NORTON TM, LESSNAU RG, VINER TC, CHEN TC, MAZZARO LM, YABSLEY MJ. Field Anesthesia and Health Assessment of Free-ranging *Cebus capucinus* in Panama. *Int J Primatol* 2009; 30:125-141
- 21- MIKOTA SK. Tuberculosis in Elephants. In: Fowler ME, Miller RE, editors. *Zoo and Wild Animal Medicine. Current therapy* 6, 2008. WB Saunders.
- 22- LYASHCHENKO K. Serologic screening and diagnosis of tuberculosis in elephants, hoofstock and primates-an edge over the skin test. In *North American Veterinary Conference. Proceedings.* Orlando, FL 2009; 1921-1924.

- 23- GEOROFF TA, CALLE PP, MCALOOSE D. Evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* rapid lateral-flow test (RT) for assessment of non-specific tuberculin responses in silvered leaf monkeys (*Trachypithecus cristatus ultima*). Proceedings of the AAZV Annual Meeting 2008. Los Angeles, C.A
- 24- MILLER M. Clinical application of MAPIA and RT for TB diagnosis in exotic species. In North American Veterinary Conference. Proceedings. Orlando, FL 2009; 1925-1928.
- 25- KANAUIA GV, GARCÍA MA, BOULEY DM. Detection of anti-ESAT-6 antibody for diagnosis of tuberculosis in non-human primates. *Comp Med* 2003; 43:472-476.
- 26- WALLIS J, RICK L D. Primate Conservation: The Prevention of Disease Transmission. *International Journal of Primatology* 1999; Vol. 20, No. 6.
- 27- WOBESER GA. Disease Shared with Humans and Domestic Animals. In: *Essentials of Disease in Wild Animals* 2006. Blackwell Publishing.
- 28- LYASHCHENKO KP, GREENWALD R, ESFANDIARI J, ET AL. PrimaTB STAT-PAK Assay, a Novel, Rapid Lateral-Flow Test for Tuberculosis in Nonhuman Primates. *Clinical and Vaccine Immunology*, Sept 2007; p. 1158-1164
- 29- FAHRIG L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecological Evolutionary Systems* 2003; 34: 487-515.
- 30- MCCALLUM H, DOBSON A. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *TREE* 1995. Vol 10, no. 5
- 31- GOLDBERGTL, GILLESPIE T R, RWEGO I B, ESTOFF E L, CHAPMAN C A. Forest fragmentation as cause of bacterial transmission among nonhuman primates, humans, and livestock, Uganda. *Emerging Infectious Diseases*, September 2008; Vol 14, No. 9: 1375-1382.
- 32- SKOLE D, TUCKER C. Tropical deforestation and habitat fragmentation in the Amazon: Satellite data from 1978-1988. *Science* 1993; New Series, Vol 260, No. 5116: pp.1905-1910
- 33- ARROYO-RODRIGUEZ V, MADUJANO S, BENITEZ-MALVIDO J. Landscape Attributes Affecting Patch Occupancy by Howler Monkeys (*Alouatta palliata mexicana*) at Los Tuxtlas, Mexico. *American Journal of Primatology* 2008; 70:69-77.

- 34- GILLESPIE T, CHAPMAN C. Prediction of parasite infection dynamics in primate metapopulations based on attributes of forest fragmentation. *Conservation Biology* 2006; Vol 20, No. 2: 441-448.
- 35- CHAPMAN CA, BALCOMB SR. Population characteristics of howlers: ecological conditions of group history. *International Journal of Primatology* 1998; 19(3): 385-403
- 36- CHAPMAN CA, GILLESPIE TR, GOLDBERG TL. Primates and the ecology of their infectious diseases: how will anthropogenic change affect host-parasite interactions?. *Evolutionary Anthropology* 2005; 14:134-144
- 37- CROCKETT MC. Conservation biology of the genus *Alouatta*. *International Journal of Primatology* 1998; 19 (3): 549-578
- 38- NAVARRO FE, POZO TC, ESCOBEDO CE. Afinidad ecológica y distribución actual de primates (Cebidae) en Campeche, Mexico. *Revista de Biología Tropical* 2003; 51 (2):591-600
- 39- CRISTOBAL-AZKARATE J, ARROYO-RODRÍGUEZ V. Diet and activity pattern of howler monkeys (*Alouatta palliata*) in Los Tuxtlas, Mexico: Effects of habitat fragmentation and implications for conservation. *American Journal of Primatology* 2007; 69:1013-1029
- 40- THOEN C O, LO BUE PA, ENARSON DA, KANEENE JB, DE KANTOR IN. Tuberculosis: A re-emerging disease in animals and humans. *Veterinaria Italiana*, 2009: 45 (1), 135-181
- 41- RHYAN JC, SPRAKER TR. Emergence of Diseases of Wildlife Reservoirs. *Veterinary Pathology* 2010; 47 (1) 34-39
- 42- ARRIVILLAGA J, CARABALLO V. Medicina de la Conservación. *Rev Biomed* 2009; 20: 55-67
- 43- VAN CAMPEN H, RHYAN J. The Role of Wildlife in Diseases of Cattle. *Vet Clin Food Anim*, 2010; 26: 147161.
- 44- Department for Environment Food and Rural Affairs. Veterinary Surveillance Strategy. 2006: vetsurveillance@defra.gsi.gov.uk
- 45- Dirección General de Sanidad Animal. Sistema Producto Bovino de Carne, Coordinación General de Ganadería. Informe de la Vocalía de Sanidad. SENASICA / SAGARPA. Mayo 29, 2007.
<http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/publicaciones/Lists/Sistemas>

46- SENASICA. La vigilancia epidemiológica nacional en México: actualidad, fortalezas y debilidades. Dirección de Epidemiología y Análisis de Riesgo (DEAR), 4 de diciembre del 2009.

47- Secretaría de Salud. Programa nacional de salud. Vigilancia Epidemiológica, Semana 11, 2010.

<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2010/sem11/pdf/edit1110.pdf>

48- NAVARRO FE, POZO DE LA TIJERA C, ESCOBEDO CE. Afinidad ecológica y distribución actual de primates (Cebidae) en Campeche, México. Rev. Biol. Trop 2003; 51: 591-600.

49- CHIAPPY C, GAMA L. Modificaciones y fragmentación de los geocomplejos tropicales de la Península de Yucatán. Universidad y Ciencia 2004. 17-25

50- LYASHCHENKO K P, GREENWALD R, ESFANDIARI J, ET AL. Animal-side serologic assay for rapid detection of *Mycobacterium bovis* infection in multiple species of free-ranging wildlife. Veterinary Microbiology, 132 2008; 283-292

2.6 Short Communications

Journal of Wildlife Diseases

Seroprevalence of *Mycobacterium tuberculosis*-complex antibodies in groups of Black Howler Monkeys (*Alouatta pigra*) in fragmented areas in Campeche, Mexico

E. Enrique Yarto-J¹, Gerardo Suzán A¹, Domingo Canales E², Clara Espitia P³, Michele Miller⁴ and Heliot Zarza.⁵

¹Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio (DEFSAL), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria No. 3000, Colonia Copilco Universidad, Delegación Coyoacán. México, D.F., C.P. 04360; ² Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana; ³ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria No. 3000, Colonia Copilco Universidad, Delegación Coyoacán. México, D.F., C.P. 04360. ⁴ Palm Beach Zoo, Florida. 1301 Summit Blvd, West Palm Beach, Florida 33405. USA. ⁵ Corresponding author (email: eyarto@imfac.net)

ABSTRACT: The emergence of infectious diseases shared among cattle, wildlife and humans is feasible given the high rates of deforestation, habitat loss and fragmentation. In the state of Campeche, Mexico cattle have encroached upon the natural habitat of wild black howler monkeys (*Alouatta pigra*). It has also been recorded that between a forest remnant or a tree, some of these primates walk on the ground in order to reach out another tree. This might have forced this species of primates to have increased contact with cattle feces. In 2006 two groups (n=14) of howler monkeys were translocated to other protected habitat patches, and apparently 64.2 % (n=9) of their serum samples were positive to anti-*Mycobacterium tuberculosis* complex antibodies using the Immunoblot test. In our research we used three serologic techniques to screen the sera of 47 individuals collected from six different size (small, medium and large) fragmented areas in Campeche and one from a non-disturbed forest, the Biosphere Reserve of Calakmul.. We chose the methods available at the time of our study and sample running in Mexico. In spite that with indirect ELISA technique apparently three (6.3%) out of 47 samples were positive, we concluded that results for seroprevalence of antibodies anti- *M. tuberculosis* in these wild groups of black howler monkeys (n=47) were negative interpreting the results of the three different diagnostic methods altogether. Field research is still insufficient as for the standardization of field diagnostic tuberculosis techniques which could be the key for future conservation programs in fragmented areas where susceptible species need to be relocated.

Key words: emerging infections, zoonotic diseases, tuberculosis, howler monkeys, fragmentation.

Fragmentation and habitat loss are the primary causes of reduction of biological diversity which also promotes changes on the dynamics of pathogens, in a fashion that could impact the conservation of wildlife populations due to the incidence of some emerging infectious diseases (Goldberg et al, 2008; Fahrig, 2003; McCallum and Dobson, 1995).

The increase in wildlife-domestic animals contact rates, is a unique opportunity for transmission of infectious agents between both ranges of species given some specific environmental circumstances and some attributes of many infectious organisms (van Campen H, Rhyan J, 2010).

Some drivers for disease emergence are deforestation, bush-meat hunting and wildlife trade (Dazsak et al., 2007) so the interest in epidemiology on the emergence of infectious diseases shared between humans and livestock, and the way they relate to wildlife species has increased during the last few decades (Rhyan and Spraker, 2010).

This is the case with bovine tuberculosis (BTb) which is caused by *M. bovis*, another zoonotic disease that originated in cattle, infected wildlife, and now in some areas could re-infect cattle via wildlife reservoirs (Van Campen and Rhyan, 2010).

In 2006 a total of 14 black howler monkeys (*Alouatta pigra*) were captured in two different donating areas in the Municipality of Escarcega in the State of

Campeche, Mexico with the aim of translocating them to other similar protected habitat areas in the same state that was a larger fragment in a protected area (one of our study sites) to guarantee their survival.

The serum samples were collected from animals for a health surveillance protocol, and the group of researchers was offered to get these serum samples screened for anti-*M. tuberculosis* complex antibodies using Immunoblot at the Pathology Department at the Faculty of Veterinary Medicine from the National Autonomous University of Mexico (UNAM). This was part of the first-time medical and preventive medicine approach to these monkeys ever.

Apparently, 64.2 % (n=9) of those serum samples tested positive for anti-*M. tuberculosis* complex antibodies, which led to the assumption that if any species of the bacteria could be present in those monkey populations, it was possible to be *M. bovis* due to the encroaching of the forest remnants and the domestic bovines intrusion as well as the increase in contact rates between cattle and primates in that area.

Also, a walking -on-the- ground behavior of these arboreal primates from a tree or fragment to another forest area in order to get more options to climb and

seek for food leaves has been observed in as much as 150-200 meters distance (Canales D. Personal communication).

We looked up the published information concerning *M. tuberculosis*- complex prevalence in wild non- human primate populations possibly related to increase contact with cattle, which was scarce with the exception of the statement of Wolff et al, "Tuberculosis has been demonstrated in wild olive baboons (*Papio cynocephalus*) due to the presence of *Mycobacterium bovis* infection that most likely originated from cattle" (Wolfe et al, 1998).

Apparently, Tb is a disease of captive primates with little evidence of prevalence in wild populations (Isaza, 2003), although it is known that primates are susceptible to the infection with both *M tuberculosis* and *M. tuberculosis* (Miller, 2008).

Considering the mode of transmission of BTb along with the knowledge that Campeche is a state with high (>2%) prevalence of this disease in domestic cattle, we assumed that whether the primates from those fragmented areas sometimes had to utilize the ground to move from one tree or fragment to

another, that could be an opportunity of infection with *M. bovis* and other mycobacterias.

In our literature search, we found the current information on tuberculosis diagnosis on captive primates, stating that no antemortem test is 100 % reliable for detecting TB in zoo animals (Miller, 2008).

Another issue is that the approach to routine screening requires application of multiple testing modalities (Miller, 2008), so we decided to contact experts on BTb diagnosis in our country, but they were not related to zoo or wild animal research.

At the time of planning the research protocol we chose to use serological methods because according to the literature they constitute a feasible alternative as they are simple, inexpensive, and less invasive than other methods and they are performed on the basis of antibody detection and not on detection of mycobacteria. Those considerations we thought to be acceptable for field conditions as were the case of this study.

Field-trip schedules were set up to collect as many samples as possible during November 2007 and November 2008. We selected six sampling areas. Twenty-five black howler monkeys (n=25 serum samples) were anesthetized in 2007

and in 2008, twenty-two primates (n=22 serum samples) were captured with the same procedure for a total of 47 serum samples (N=47). We used Ketamine (Imalgen 1000; 1000 mg/mL) at a standard dose of 1.5 mL [150 mg] total for each adult male or female) administered through a CO2 dart rifle.

The collaborative group of people included a laboratory technician that separated serum by centrifugation, placing each sample in a separate identified plastic tube which was immediately kept in a freezing container. After the capture process was completed sera samples were frozen at the appropriate freezer up until their processing in Mexico City.

After the sampling, and once the animals were totally recovered from the anesthesia they were released and properly cared for according to the guidelines of the American Society of Mammalogists (ASM) and those of the Animal Welfare Act of the School of Veterinary Medicine, National Autonomous University of Mexico (UNAM).

Samples were sent out to one of the official domestic bovine surveillance laboratories (INIFAP, Mexico City) where they performed indirect ELISA test on the 47 samples..

Apparently, results to indirect ELISA indicated that 3 (6.4%) out of 47 samples had presented high levels of anti-*M. tuberculosis* complex antibodies specifically against *M. bovis* according to the laboratory report.

Unfortunately, the results from the domestic bovine surveillance laboratory were not clear since they did not report the cut-off point for optic densitometry they

used to consider normal, low or high levels of antibodies, nor the exact type of *M bovis* antigen they utilized to test the samples. For that reason, the test was considered neither sensitive nor specific for any of the reported results.

We were offered the Immunoblot test at the Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM). Sera screening was performed using PPD-B, PPD-A, ESAT-6 protein as positive controls, obtaining a 100 % negative result to anti-*M. tuberculosis*- complex antibodies.

PrimaTB-STAT-PAK (Chembio Diagnostic Systems, Inc, Medford, NY) test was utilized and all samples also tested negative to anti-*M tuberculosis* complex antibodies.

As a positive control for this commercial testing method a serum sample of another member of the Cebidae monkey family, belonging to a spider monkey

(*Ateles fusciceps*) was used which at culture and speciation was positive to *M. tuberculosis*.

This commercial test is useful for the diagnosis of active tuberculosis in conjunction with other diagnostic methods, so if antibodies are present in the sample, the expected result is reactive (Lyashchenko, 2007, 2008 y 2009).

Assessing the samples with the three diagnostic serologic methods above mentioned altogether, we can now infer that our study individuals were negative for anti-*M. tuberculosis* antibodies, but they could have been infected by NTM (non-tubercular mycobacterias) since the Immunoblot test used on the first collection samples from the donor areas that gave rise to the present study is not specific to *M tb*, but reacts with the presence of the genus *Mycobacterium* as such.

We concluded that several points were weak from the beginning of our study: 1) the first samples from the translocated animals could have been tested positive to *Mycobacterium* antibodies since animals could have mounted a serologic response against a NTM, and not necessarily to *M tb*- complex mycobacteria; 2) the current diagnostic methods for Tb surveillance in zoos (and wildlife research) in Mexico need to be updated and combined among them in order to get more accurate results, both for preventive medicine protocols and when suspect cases are present; it must be highlighted that these diagnostic

techniques are recommended to be used along with culture and speciation; 3) protocols for diseases in wild animals, specially for primate infectious emerging diseases urge to be set up in Mexico, and the proper and most accurate methods for field disease surveillance need to be researched beforehand a translocation process is taken as a population conservation strategy for threatened subpopulations.

Although at the beginning of this research the possibility of finding out serologic evidence of infection of howler monkeys with *M. tuberculosis*-complex pathogens (and it was highly suspected to be *M. bovis*) was hypothesized, due to the intrusion of domestic livestock into the forest fragments where primates inhabit, and probably even more in those smaller, more disturbed fragmented areas, no individuals were serologically positive. However, this type of surveillance protocols could be used as a preventive useful tool for avoidance of infectious pathogens transmission, and also to prevent carrying them from one geographic area to another, where it could possibly have not existed before.

This is a pioneer research protocol in wild non-human primates in Mexico, so we highlight the importance of standardization and constant monitoring of tuberculosis and other emerging diseases in primate populations that inhabit fragmented forest areas.

As it is the case with BTb in at least one wild primate species that has proven to become infected with *M. bovis* disease surveillance prior to translocation projects of animals is of utmost importance to protect subpopulations and so metapopulations of primates whose survival depends upon the research and continuum of science- based protocols.

2.10 LITERATURE CITED

DASZAK P., ET AL. 2007. Global trends in emerging infectious diseases, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 77:284-285.

FAHRIG, L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. Annual Review of Ecological Evolutionary Systems.34: 487-515

GOLDBERG, T. L., GILLESPIE, T. R., RWEGO, I. B., ESTOFF, E. L., CHAPMAN, C. A. 2008. Forest fragmentation as cause of bacterial transmission among nonhuman primates, humans, and livestock, Uganda. Emerging Infectious Diseases. Vol 14, No. 9: 1375-1382.

ISAZA, R. 2003. Tuberculosis in all taxa. In: Zoo and wild animal medicine, Current therapy. 5th edition. Fowler, M (ed). WB Saunders.

LYASHCHENKO, K. 2009. Serologic screening and diagnosis of tuberculosis in elephants, hoofstock and primates-an edge over the skin test. In North American Veterinary Conference. Proceedings. Orlando, Fl. 1921-1924.

LYASHCHENKO, K.P., GREENWALD, R., ESFANDIARI, J., et al. 2007. PrimaTB STAT-PAK Assay, a Novel, Rapid Lateral-Flow Test for Tuberculosis in Nonhuman Primates. *Clinical and Vaccine Immunology*;, p. 1158-1164

LYASHCHENKO, K. P., GREENWALD, R., ESFANDIARI, J., et al. 2008. Animal-side serologic assay for rapid detection of *Mycobacterium bovis* infection in multiple species of free-ranging wildlife. *Veterinary Microbiology*, 132; 283-292

MCCALLUM, H., DOBSON, A. 1995. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *TREE*. Vol 10, no. 5

MILLER, M.A. 2008. Current diagnostic methods for tuberculosis in zoo animals. In: *Zoo and Wild Animal Medicine. Current therapy 6*. Fowler, M., Miller, E. (eds) WB Saunders.

MILLER, M. 2009. Clinical application of MAPIA and RT for TB diagnosis in exotic species. In North American Veterinary Conference. Proceedings. Orlando, Fl. 1925-1928.

RHYAN, J.C., SPRAKER, T.R. 2010. Emergence of Diseases of Wildlife Reservoirs. *Veterinary Pahtology* 47 (1) 34-39.

THOEN, C. O., LOBUE, P.A., ENARSON, D.A., KANEENE, J.B., DE KANTOR.,
I.N. 2009. Tuberculosis: A re-emerging disease in animals and humans.
Veterinaria Italiana, 45 (1), 135-181.

VAN CAMPEN, H., RHYAN, J. 2010. The Role of Wildlife in Diseases of Cattle.
In Vet Clin Food Anim 26 (2010) 147–161

WOLFE, N.D., ESCALANTE, A.A., KARESH, W.B., KILBOUM, A., SPIELMAN,
A., and LAL, A.A. 1998. Wild Primate Populations in Emerging Infectious
Disease Research: The Missing Link?. *CDC Journal of Emerging Infectious
Diseases*; Vol 4, No.2.