

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL LEGAL

ESTUDIO SEROLÓGICO PARA DETECTAR ANTICUERPOS CONTRA *Leptospira* sp
EN HURONES DOMÉSTICOS (*Mustela putorius*)

Proyecto Genérico: Tecnología de la Producción Agropecuaria
(Aprobado por Consejo Divisional, sesión 5/91)

Prestadora del Servicio Social:
MORALES UENO KARINA
202227545

Asesores:
Dr. Héctor Castillo Juárez
Dr. Jorge Isaac Torres Barranca

Lugar de realización:

Laboratorio de *Leptospira*, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Fechas de inicio y terminación:

Del 01 de marzo al 31 de agosto del 2006.

Fecha de entrega: 31 de octubre del 2006.

Dedicatoria

A mi adorado Gaspar, por todo el apoyo a cada paso del camino.

A todos los huroncitos y sus propietarios.

Agradecimientos

Al Dr Héctor Castillo, quien desde el curso de genética modular me indico el camino a seguir y, desde aquel primer momento, nunca ha dejado de iluminar este camino con sus comentarios y consejos.

Al Dr. Jorge Torres, por su constante apoyo en todos los sentidos, por sus consejos, por la confianza depositada en mi persona y por todas las horas que me permitió permanecer en el laboratorio.

Al Dr. Luis Pedro Moles, por su apoyo, por suministrarme la bibliografía necesaria, por su colaboración en esclarecer mis dudas y por su revisión crítica del manuscrito en diferentes momentos de su elaboración.

A Paty Meléndez, por su paciencia, gran corazón, enseñanzas y todo el apoyo en el trabajo de laboratorio.

A Katinka Arteaga, por la maravillosa oportunidad que me diste para ayudar, por ser fuente de inspiración y por tu amistad.

A Edgardo y Maribel Eslava, por su apoyo desinteresado.

A todos los huris participantes y sus propietarios.

ÍNDICE

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
INTRODUCCIÓN	6
OBJETIVOS	7
GENERAL	7
ESPECÍFICO	7
MARCO TEÓRICO	8
EL HURÓN	8
LA LEPTOSPIROSIS	10
METODOLOGÍA UTILIZADA	15
ACTIVIDADES REALIZADAS	20
OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS	20
RESULTADOS Y CONCLUSIONES	21
DISCUSIÓN Y RECOMENDACIONES	24
LITERATURA CITADA	25
ANEXO I	28
ANEXO II	30
ANEXO III	31

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la prueba de aglutinación microscópica (AM) en los sueros de 20 hurones domiciliados radicados en el Distrito Federal, Estado de México y Querétaro, con la finalidad de detectar en éstos anticuerpos antileptospira. Para tal efecto, se colectaron muestras sanguíneas de los hurones para obtener el suero, se efectuó un cuestionario a sus propietarios. Como antígenos se utilizaron cultivos vivos de las siguientes serovariedades de *Leptospira*: Bratislava, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Tarassovi, Perameles y Patoc.

La población muestreada se conformó de siete hembras y 13 machos, con una edad de dos años cinco meses y un peso de un kilo en promedio. La mayoría de los hurones presentaba una condición corporal de tres (medida en escala del uno al cinco), y tenían como sitio de procedencia un bioterio establecido en el estado de Nueva York (EUA). Los propietarios de los hurones son adultos entre los 25 y 35 años de edad, y en promedio cada hurón convive con 2.25 personas. El 85% de los hurones son vacunados contra los virus de moquillo canino y rabia utilizando biológicos específicos para la especie, y son alimentados con croquetas específicas para hurón. A todos los hurones se les proporciona agua purificada para consumo humano y a ninguno se les permite realizar actividades en el exterior de sus hogares, como caminar por las aceras, nadar o excavar; manteniéndose apartados de otras especies de animales domésticos. No fueron detectados anticuerpos antileptospira en ninguno de los veinte hurones muestreados. Lo que sugiere que la leptospirosis no es una infección de importancia en hurones que son mantenidos en condiciones domiciliadas y por lo tanto no representan un riesgo para la salud pública.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una de las zoonosis de mayor importancia en el continente americano (WHO/FAO/OIE, 2004) ya que es una infección que se presenta en la mayoría de los mamíferos, los cuales pueden actuar como fuente de infección hacia los humanos cuando eliminan al agente causal a través de la orina, contaminando el ambiente al llegar éste al agua en donde puede permanecer viable durante largos periodos de tiempo.

A pesar de su importancia en salud pública, es común que su diagnóstico sea pasado por alto (Smith, n.d.); y en general no se menciona como factor de riesgo en los hurones domésticos ya que existe poca información acerca de si éstos pueden o no ser portadores potenciales en la transmisión de esta enfermedad (Chomel, 1992; Sager, 1998).

Una de las mejores herramientas para prevenir la leptospirosis en los animales es la inmunización utilizando biológicos que contengan serovariedades presentes en la unidad de producción o región. En los hurones existen discrepancias sobre el uso de bacterinas para poder prevenir su infección, ya que se desconocen cuales son las serovariedades de leptospiras que los pueden infectar (Shotts, 1981; Junge, 1995; Gillis, 1999; McDonald y Larivière, 2001).

La leptospira puede ser transmitida por animales sinantrópicos y domésticos infectados, productos de desecho o agua contaminada, y los hurones que estén en contacto con estos agentes podrían estar en riesgo no sólo de contraer la enfermedad, sino también de transmitirla a los seres humanos con los cuales conviven (Sager, 1998; William, 1998; Martino *et al.*, 2000; Smith, n.d.).

Debido a que esta enfermedad no ha sido estudiada en el hurón, es posible que no se le diagnostique, en especial en los casos de procesos patológicos y en decesos no identificados en hurones (Sager, 1998; Smith, n.d.), por lo que se requiere de conocer por principio si estos animales son susceptibles de contraer la enfermedad.

OBJETIVOS

General

Determinar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* sp en hurones (*Mustela putorius*) utilizados como mascotas.

Específico

Determinar los anticuerpos antileptospira predominantes en los hurones utilizados como mascotas.

MARCO TEÓRICO

EL HURÓN

Taxonomía de los hurones

El Hurón doméstico (*Mustela putorius*) es un carnívoro que pertenece a la familia Mustelidae, que alberga a 68 especies, las cuales a su vez se agrupan en 5 subfamilias:

- Mefitinae Mofetas
- Lutrinae Nutrias
- Melinae Tejones
- Mellivorinae Ratel
- Mustelinae Comadreja, visones, martas, turones, etc.

Los mustélidos presentan características físicas en común como tamaño reducido, patas cortas y robustas, 5 dedos en cada pata, cráneo alargado y cara corta. El género *Mustela* a su vez se subdivide en 5 subgéneros:

- *Mustela* Comadreja
- *Lutreola* Mink europeo
- *Vison* Mink americano
- *Putorius* Hurones
- *Grammogale* Comadreja sudamericana

En el sistema taxonómico de Linneo, el hurón doméstico fue clasificado como *Mustela furo*, pero dado que no es posible establecer diferencias físicas entre los hurones salvajes y los domesticados (*M. putorius* y *M. furo*) se considera que la denominación correcta de su nombre científico es *Mustela putorius*, aunque se ha sugerido (y algunos autores utilizan) la de *Mustela putorius furo* cuando se refieren al hurón doméstico (Moody *et al.*, 1985; MacDonald, 1991; Fox, 1998; Woodford, 2000).

Origen del hurón doméstico

Se desconoce la fecha exacta de su domesticación, pero se reporta su uso para el exterminio de ratas y serpientes desde el siglo 4 A.C. En el siglo XIV fueron introducidos a Inglaterra, en donde fueron empleados en la cacería de conejos, al ser éstos su presa natural y en la industria peletera por la demanda de sus pieles y la facilidad que presentaban de ser reproducidos en cautiverio. Más tarde fueron empleados como mascotas y finalmente fueron introducidos al continente Americano en 1875 para el control en la población de roedores (Ryland y Gorham, 1978; Moody *et al.*, 1985; Fox, 1998; Packer y Birks, 1999; Norbury, 2001; Brown, 2002).

Usos

Exterminio de roedores

Los hurones domésticos han sido utilizados como sistema de control de roedores en Inglaterra y Estados Unidos de América (EUA) debido a que los roedores experimentan un

temor natural a los hurones y a su aroma, por lo que sólo se requiere de un pequeño número de hurones para dispersar grandes cantidades de roedores. Posteriormente, la aparición de rodenticidas comerciales disminuyó el uso de los hurones como sistemas de control (Fox, 1998; Masini *et al.*, 2005; Masini *et al.*, 2006).

Cacería

En Inglaterra se siguen utilizando hurones para la cacería de conejos. En el resto de Europa y gran parte de los EEUU esta práctica ha sido prohibida. Además, los sistemas de crianza actuales han seleccionado animales tan dóciles que su naturaleza depredadora se ha reducido notablemente (Apfelbach, 1981; Fox, 1998).

Industria

Gracias a su fisonomía y a su habilidad para transitar por los túneles, los hurones se utilizaron como ayuda para la colocación de cables en barcos y aviones (Fox, 1998).

Peletería

Los hurones han sido utilizados en la industria peletera en lugares como Europa, EU, Canadá y Nueva Zelanda; ya como especie única o como parte de programas de hibridación, realizando cruces con otros mustélidos como el turón europeo (*Mustela putorius* silvestre) y el mink europeo (*Mustela lutreola*) de manera que se lograba obtener mejoras en rubros como prolificidad y facilidad de manejo en estas granjas, aunque con mermas variables en homogeneidad y calidad de las pieles (Fox, 1998; Lindeberg, 2003).

Mascotas

En la década de los 80's, los hurones alcanzaron gran popularidad como mascotas en EU, aunque existe gran controversia de si son o no animales domésticos ya que algunos estados de la Unión Americana los clasifican como animales silvestres y la Sociedad Humanitaria de EUA los considera animales exóticos y no los recomienda como animales de compañía. Sin embargo en otros países como Inglaterra, España, Japón y México han alcanzado una notoria popularidad y son reconocidos como animales de compañía (Hillyer y Queenberry, 1997; Fox, 1998).

Los hurones son animales curiosos y propensos a los accidentes domésticos, es por ello que resulta una práctica habitual el mantenerlos la mayor parte del día encerrados en su jaula, permitiéndoles andar libremente por la casa únicamente bajo supervisión. Esta práctica no perjudica en lo absoluto el temperamento del hurón, ya que la especie acostumbra dormir de 14 a 16 horas al día.

En investigación

El hurón es una alternativa al uso de roedores, que es la especie que más se utiliza como modelo para la investigación. Presentan notables ventajas sobre otras especies muy utilizadas diferentes a los roedores (perros y monos) tales como menor peso corporal (500

g), requerimiento de un área menor en cautividad (753.9 cm²) y superficie corporal menor (32.5 cm²) por lo que requiere del uso de dosis de medicamentos reducidas. Además, la relación existente entre el peso y la superficie corporal es menor (Gad, 2000b).

Resulta interesante constatar que los hurones no sólo son animales de fácil manejo, una ventaja en ellos es que permiten el manejo repetido sin importar que hayan sido sometidos a experiencias desagradables previas. Una ventaja adicional es que si el animal no muere en el transcurso de la investigación, no hay razón para que sea sacrificado y puede ser utilizado después de un lapso de “purificación”, para probar la toxicidad de diversos agentes. La investigación en hurones abarca una gran variedad de categorías, repercutiendo de manera importante en el conocimiento de la salud humana y en especial en el estudio de la toxicidad de diversos agentes. Se han utilizado hurones en investigaciones biomédicas, en disciplinas como cardiología, oftalmología, reproducción, teratología, neurología, embriología, patología y fisiología pulmonar, virología, bacteriología, toxicología, etc. Los hurones han sido utilizados desde 1980 por la industria farmacéutica, tal como lo reportan publicaciones realizadas por compañías como Pfizer, Hoffman LaRoche, Gilead, Bristol Myers Squibb, Merck, Yamanouchi, Procter & Gamble, Glaxo Wellcome y Abbot (Lockard, 1985; McLain *et al.*, 1985; Vinegar *et al.*, 1985; Wen *et al.*, 1985; Arlock *et al.*, 1998; Doherty, 1999; Gad, 2000a; Richards *et al.*, 2000; Lipsitz *et al.*, 2001; Solnick y Schauer, 2001; Tsuchiya *et al.*, 2002; Hasling *et al.*, 2003; Endo *et al.*, 2004; Govorkova *et al.*, 2005).

México

En México la mayor parte de los hurones provienen de un bioterio estadounidense ubicado en el estado de Nueva York (Marshall Farms), el cual provee de hurones destinados como mascotas. Tanto hembras como machos son castrados a temprana edad y son identificados con dos puntos tatuados en el vértice de la oreja derecha.

Existen unos pocos criadores particulares que crían hurones en territorio nacional, quienes comercializan hurones castrados como mascotas o enteros para ser usados como pie de cría. La mayoría de los negocios establecidos entregan a los hurones para venta entre los tres y seis meses de edad con su correspondiente cartilla de salud, la cual certifica que estos animales se encuentran inmunizados contra los virus de la rabia y del moquillo canino, pero lo común es que después de la compra, sea el propietario quien tenga la responsabilidad de consultar con el Médico Veterinario acerca de las vacunas y desparasitaciones necesarias para el animal.

LA LEPTOSPIROSIS

La leptospirosis es una zoonosis con distribución mundial. En los mamíferos puede ser transmitida por contacto directo con los animales o por contacto con agua o suelos contaminados por la orina de animales infectados (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001; Koizumi y Watanabe, 2005)

Es causada por espiroquetas patógenas pertenecientes al género *Leptospira*, las cuales han sido clasificadas en serovariedades a partir de sus características antigénicas. Esta bacteria

puede sobrevivir por largos periodos de tiempo en el agua, suelos mal drenados, vegetación y lodo. Los humanos y animales pueden ser contagiados cuando la piel o las mucosas con abrasiones entran en contacto con el agua, lodo o vegetales contaminados con orina proveniente de animales infectados. Durante la fase de bacteremia las espiroquetas se diseminan por todo el organismo y ello provoca los signos de la enfermedad. El espectro de estos signos puede ser muy amplio, dependiendo del animal infectado (Levett, 2001; Ahmad *et al.*, 2005).

Taxonomía y clasificación

Clasificación serológica (*Sensu lato*)

Hasta 1989, el género *Leptospira* se dividía sólo en dos especies, *L. interrogans*, que agrupaba a las cepas patógenas, y *L. biflexa*, que agrupaba a las cepas saprofitas. Ambas a su vez se dividían en numerosas serovariedades definidas por su aglutinación con antígenos homólogos. Si más del 10% del título homólogo permanece en al menos uno de los dos antisueros en pruebas continuas, se dice entonces que las dos cepas pertenecen a serovariedades diferentes. Se han registrado más de 60 serovariedades para *L. biflexa*, en tanto que se han reconocido más de 250 para *L. interrogans*. A las serovariedades que están antigénicamente relacionadas se las agrupa dentro de diversos serogrupos, los cuales no tienen relevancia taxonómica pero sí epidemiológica (Levett, 2001; Peacock, 2005).

Clasificación genómica (*Sensu stricto*)

El genoma de las leptospiras tiene un tamaño aproximado de 5,000 kb, el cual está compuesto de dos secciones, un cromosoma grande de 4,400 kb y otro pequeño de 350 kb. Las genoespecies de las leptospiras no corresponden a las dos especies mencionadas anteriormente (*L. interrogans* y *L. biflexa*), y de hecho, las serovariedades patógenas y no patógenas pueden clasificarse dentro de la misma especie genómica. En este caso, ni el serogrupo ni la serovariedad puede predecir con seguridad la especie de *Leptospira*. Más aun, estudios recientes han incluido a varias cepas de algunas serovariedades y han demostrado heterogeneidad genética entre las mismas. Además, la caracterización fenotípica anteriormente utilizada para diferenciar a la *L. interrogans sensu lato* de la *L. biflexa sensu lato* no las diferencia de la genoespecie. La reclasificación de las leptospiras en términos genómicos es taxonómicamente correcta y nos brinda bases sólidas para su clasificación futura, pero hasta que se desarrollen y validen métodos de clasificación sencillos utilizando ADN, es necesario que los laboratorios clínicos mantengan en uso la clasificación serológica (Levett, 2001).

Biología

Las leptospiras son espiroquetas que miden de ancho de 0.1 a 6 μm y hasta 20 μm de largo, aunque a veces existen cultivos que presentan células mucho más largas. La amplitud existente entre las ondas helicoidales es de aproximadamente 0.1 a 0.15 μm , y la longitud de la onda es de aproximadamente 0.5 μm . Estas células cuentan con puntas en los extremos en los cuales pueden presentarse sus ganchos distintivos. Dos filamentos axiales (flagelos periplásmicos) insertados en los polos están localizados en el espacio

periplásmico. Las leptospiras presentan dos formas distintivas de movimiento, translacional y no translacional (Levett, 2001).

Morfológicamente no pueden ser distinguidas, pero existen algunas variedades que pueden ser diferenciadas después de ser cultivadas *in vitro* restaurándolas con varios pasajes en hamsters. Presenta una estructura típica de doble membrana común a la que presentan otras espiroquetas, en la cual la membrana citoplasmática y el peptidoglicano de la pared celular están estrechamente asociados y se encuentran cubiertos a su vez por una membrana externa. Los lipopolisacáridos de las leptospiras tienen una composición similar a la de otras bacterias Gram (-), pero su actividad endotóxica es menor. Estas bacterias son aerobias obligadas, presentando un crecimiento óptimo a temperaturas de entre 28 y 30° C (Levett, 2001).

Epidemiología

Se piensa que la leptospirosis es la zoonosis más difundida a nivel mundial, con una incidencia significativamente mayor en los países que presentan climas templados. Su vía más común de entrada al organismo es a través de abrasiones o cortes en la piel o por las conjuntivas y otras mucosas; la infección pudiera también darse a través de la piel intacta que ha permanecido un tiempo prolongado sumergida en agua y la inhalación de agua o aerosoles puede derivar en infección a través de las membranas mucosas del tracto respiratorio. Rara vez se establece la infección a consecuencia de la mordida de un animal (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001; Hartskeerl, 2005).

Todos los animales y el hombre, pueden ser clasificados como hospederos de mantenimiento y hospederos accidentales. Esta enfermedad se mantiene en la naturaleza mediante la infección crónica en los túbulos renales de los hospederos de mantenimiento, los cuales se definen como una especie en la cual la infección es endémica y por lo general transmitida de un animal a otro por contacto directo. La infección por lo regular se adquiere a temprana edad y la excreción urinaria aumenta conforme se incrementa la edad del animal. Otros animales, incluyendo al humano, pueden infectarse por transmisión indirecta con el hospedero de mantenimiento. Los animales pueden ser hospederos de mantenimiento para unas serovariedades, pero hospederos accidentales de otras, de estos los de mayor importancia son los pequeños mamíferos, los cuales pueden transmitir la infección a otros animales domésticos o a los seres humanos (Levett, 2001).

Faine (1999) ha descrito tres patrones epidemiológicos. El primero se da en lugares con climas templados en los cuales están involucradas unas pocas serovariedades y la infección en los humanos ocurre invariablemente por contacto con animales infectados como es la que sucede a través de la crianza de reses y cerdos. El control mediante la inmunización de los animales y/o humanos es potencialmente posible. La segunda se da en áreas del trópico húmedo, en las cuales se presentan muchas más serovariedades y donde existe un mayor número de especies que actúan como reservorios. No se limita a la exposición ocupacional, también involucra a la contaminación ambiental, en particular durante la época de lluvias. El control se efectúa reduciendo el número de roedores, drenando las áreas encharcadas y aumentando las medidas de higiene. Este patrón también incluye áreas afectadas por

inundaciones, huracanes y otros desastres. El tercer patrón se basa en la infección proveniente de roedores en ambientes urbanos, y a pesar de ser poco significativo, resulta potencialmente importante si la infraestructura urbana es afectada por fenómenos de guerra o desastres naturales (Levett, 2001).

Patogénesis

Los mecanismos por los cuales las leptospiras causan la enfermedad no se comprenden bien todavía y se han sugerido una gran cantidad de factores que afectan su virulencia, aunque su papel en la patogénesis aun se desconoce. A continuación se detallan de manera breve algunos de estos mecanismos (Levett, 2001).

Producción de toxinas

Los lipopolisacáridos (LPS) de las leptospiras tienen actividad endotóxica, pero su potencia es mucho menor, comparada con la que exhiben otras bacterias Gram (-). Se han caracterizado hemolisinas en la mayoría de las serovariedades de leptospiras, pero su capacidad de producirlas varía mucho entre éstas y las cepas virulentas que exhiben una quimiotaxis mayor hacia la hemoglobina (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

Adhesión

Se ha demostrado que las leptospiras se adhieren a las células epiteliales, y que esta adhesión se ve potenciada por concentraciones subaglutinantes del anticuerpo homólogo. Las leptospiras son fagocitadas por macrófagos sólo en presencia del anticuerpo específico. Las leptospiras virulentas se pueden encontrar asociadas a los neutrófilos, pero estos no las matan. La fagocitosis se da únicamente en presencia de suero y complemento, lo que sugiere que la envoltura exterior de las leptospiras cuenta con un componente antifagocítico. El LPS de las leptospiras estimula la adherencia de los neutrófilos a las células endoteliales y plaquetas, causando agregación, lo que sugiere que tiene un papel en el desarrollo de la trombocitopenia (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

Mecanismos de inmunidad

La segunda fase de la leptospirosis aguda es también conocida como la fase inmune, en la cual la desaparición del organismo del torrente sanguíneo coincide con la aparición de anticuerpos. La severidad de la enfermedad a menudo parece no guardar proporción con los hallazgos histopatológicos. Se ha propuesto la reacción inmunomediada como un factor que influye en la severidad de los síntomas (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

La patogénesis en la uveítis recurrente equina parece estar asociada a la producción de anticuerpos contra antígenos leptospirales, los cuales presentan reacción cruzada contra los tejidos oculares. Se ha demostrado la presencia de anticuerpos antiplaquetas en la leptospirosis humana, pero estos actúan contra plaquetas dañadas y no tienen un rol causal en el desarrollo de la trombocitopenia (Faine *et al.*, 1999).

Proteínas de superficie

La membrana externa de las leptosiras contiene LPS y muchas lipoproteínas (proteínas de la membrana externa [OMPs]), la LPS es altamente inmunogénica y es la responsable de la especificidad entre serovariedades (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

Inmunidad

La inmunidad a la leptospirosis es principalmente humoral y fuertemente restringida a serovariedades homólogas cercanamente relacionadas. La especificidad antigénica es establecida por los antígenos LPS (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001).

METODOLOGÍA UTILIZADA

ANIMALES MUESTREADOS

Para el presente estudio se realizó un muestreo aleatorio en una población abierta de hurones domiciliados en diferentes zonas de la Ciudad de México, Estado de México y Querétaro. Se consideraron 20 hurones en la muestra final. Se efectuó una toma de suero sanguíneo proveniente cada uno de los hurones clínicamente saludables y mayores a seis meses de edad. Se trabajó con una población abierta proveniente de casas particulares y sin historia clínica con precedentes de vacunación contra ninguna de las serovariedades de *Leptospira*.

Con la finalidad de enriquecer la presente investigación, se aplicó una encuesta en todos los individuos, misma que constaba de 16 preguntas y cuyo formato puede consultarse en el Anexo I.

TOMA DE LA MUESTRA

Para coleccionar y examinar los sueros, los animales fueron inmovilizados tomándolos de la piel de la nuca y puncionando la vena cefálica con una aguja de 23G x 25mm pediátrica sin jeringa para así obtener por goteo de 0.5 a 1 ml de sangre, evitando mediante éste procedimiento el colapso de la vena cefálica, tomando antes y después del procedimiento las medidas asépticas pertinentes (Otto *et al.*, 1993; Hillyer y Queenberry, 1997; Fox, 1998; Anzalone Cantoni *et al.*, 2004).

Material utilizado

- Tubos vacuteiner estériles sin anticoagulante.
- Ligadura de goma.
- Aguja de 23G x 25mm.
- Gasas estériles.
- Guantes estériles.
- Torundas de algodón.
- Alcohol etílico al 70%.
- Yodopovidona al 10%.
- Congelantes.
- Hielera.
- Gradilla.

Obtención de la muestra

Para la realización del procedimiento de extracción de sangre, se siguió el procedimiento que se describe a continuación:

1. Lavado de manos.
2. Colocación de la ligadura.
3. Palpación de la vena a puncionar.

4. Realización de antisepsia con alcohol 70% en una zona de piel de unos 2 cm de diámetro alrededor del sitio de punción. Comenzando por el centro y haciendo círculos concéntricos hacia el exterior.
5. Repetición del procedimiento utilizando Yodopovidona al 10%. Dejando actuar 1-2 minutos, esto es: hasta que se seque el antiséptico sobre la piel. Mientras actuaba el iodóforo, se preparó la aguja y se retiró el tapón de goma del tubo.
6. Se procedió a la colocación de los guantes estériles y en seguida se colocó la aguja para extraer la sangre, sin tocar el campo desinfectado, permitiendo que la sangre cayera por goteo dentro del tubo vacuteiner, cuidando que la gota rodara por las paredes del tubo.
7. Una vez colectada la cantidad de sangre necesaria, la aguja fue retirada y se mantuvo presión sobre la zona puncionada utilizando para ello un trozo de gasa estéril.
8. Se tapó e identificó el tubo donde se realizó la colecta y se colocó en posición horizontal a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Para su transporte, los tubos fueron colocados en una gradilla, dentro de una hielera con congelantes.

Volumen de la muestra

Los hurones cuentan con un volumen sanguíneo total de 60 a 70 ml por kilo de peso vivo, y utilizando la técnica anteriormente descrita para la toma de la muestra, fue posible obtener de 0.5 a 1 ml por ejemplar.

Transporte

Las muestras fueron transportadas en forma inmediata al Laboratorio de Leptospira de la Universidad Autónoma Metropolitana, plantel Xochimilco una vez finalizada su colecta. Durante el transporte, la sangre obtenida fue conservada a 4° C.

Separación del suero

Una vez en el laboratorio, la muestra fue centrifugada a 1500 rpm durante 15 minutos. El suero fue separado y colocado en microtubos previamente identificados y se congelaron a -20° C hasta el momento en el que se realizó la prueba de aglutinación microscópica (AM).

SELECCIÓN, PREPARACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS ANTÍGENOS

Dado que la prueba de AM es específica para la serovariedad infectante y para las serovariedades antigénicamente relacionadas, en el presente estudio se utilizó la mayor cantidad de antígenos posible, considerando el utilizar los serogrupos más representativos, así como las cantidades de suero con las que se contaba, pues no existen antecedentes documentados de los anticuerpos antileptospira que pudieran ser encontrados ni de especies de leptospiras aisladas en hurones (Hathaway y Blackmore, 1981; Faine *et al.*, 1999). Como referencia, fueron consultadas las baterías de antígenos utilizadas en poblaciones de animales silvestres, y se incluyeron los serogrupos que de manera más frecuente son

encontrados localmente (Everard *et al.*, 1983; Bourque y Higgins, 1984; Zarnke y Ballard, 1987; New *et al.*, 1994; Khan *et al.*, 2001; Calle *et al.*, 2002).

Cuadro 1. Cepario utilizado

Especie	Serogrupo	Serovariedad	Cepa
<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jes-Bratislava
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGa
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
<i>L. meyeri</i>	Mini	Perameles	Bandicoot 343
<i>L. biflexa</i>	Semaranga	Patoc	Patoc 1**

Basado en Faine *et al.*, 1999.

**No patógena.

Para la preparación y mantenimiento de los antígenos, las serovariedades seleccionadas (ver Cuadro 1) se cultivaron en medio de Cox modificado (Consultar Anexo II), al cual se agregó 10% de suero de conejo estéril y descomplementado.

Los cultivos se incubaron a $29 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 7 días y su crecimiento se determinó por observación en un microscopio de campo oscuro (120x). Todo el procedimiento fue realizado en el Laboratorio de Leptospira de la Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco.

TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN MICROSCÓPICA

Cada una de las lecturas realizadas fue probada contra un control negativo, es decir, una serovariedad a la que sólo se agregó solución amortiguadora de fosfatos (SAF) para determinar la escala de negativo, sin aglutinación.

El suero diluido al que se le agregó una parte proporcional de antígeno fue incubado a temperatura ambiente durante una hora en condiciones de humedad.

Para realizar la lectura de la prueba, se utilizó un microscopio con condensador de campo oscuro y magnificación de 120 diámetros. Se colocó con un asa bacteriológica una pequeña cantidad de la suspensión de cada uno de los pozos con el suero y el antígeno en un portaobjetos, y sin usar cubreobjetos se enfocó el campo.

Se realizaron diluciones dobles del suero problema, empezando con una dilución en tubo de 1:25. Posteriormente en una placa de microtitulación de 96 pozos, se colocó una parte de cada una de las diluciones del suero y otra parte igual del antígeno. Las diluciones finales del suero fueron, por lo tanto, de 1:50 en adelante. El título de anticuerpos se consideró como la dilución máxima del suero en donde se observó el 50% o más de aglutinación.

Material y equipo utilizados

- Tubos de ensaye
- Cajas y tapas
- Microplacas de 96 pozos
- Pipetas y gradilla
- Micropipeta multicanal y puntas
- Campana de flujo laminar
- Cepario
- Solución de alcohol al 66 %
- Portaobjetos
- Asas bacteriológicas
- Solución amortiguadora de fosfatos
- Mechero

Procedimiento para prepara la prueba de AM

1. El suero problema se diluyó 1:25 en un tubo de ensaye; agregando 0.1 ml del suero a estudiar y 2.4 ml de SAF. Se homogenizó la mezcla.
2. Con una micropipeta multicanal se tomaron 50 microlitos (μl) de SAF que se depositaron en segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo y octavo pozos, dejando el primero vacío, también se vierten 50 μl de SAF en los pozos destinados como controles (uno por cepa utilizada).
3. Se depositó en el primer pozo 50 μl del suero problema diluido.
4. Se depositó en el segundo pozo 50 μl del suero problema diluido, homogenizando el contenido y retirando de ese pozo 50 μl , mismos que fueron colocados en el tercer pozo en donde se repitió el procedimiento de homogenización retirando 50 μl . Se continuaron realizando las diluciones en los pozos sucesivos hasta completar el octavo pozo, de donde se desecharon los 50 μl sobrantes, dejando al finalizar 50 μl en cada pozo.
5. Se agregó a cada pozo un volumen igual de cada una de las serovariedades a probar. De esta manera se obtuvo una dilución final de 1:50.
6. El control negativo se realizó agregando en los pozos destinados a ello únicamente 50 μl de SAF sin suero.
7. Se desinfectó la campana de flujo con una solución de alcohol, y se encendió la luz ultravioleta durante 20 minutos.
8. Una vez transcurridos los 20 minutos, se apagó la luz ultravioleta pero dejando encendido el filtro de la campana y se trasladaron a ésta área las microplacas preparadas y el cepario de diagnóstico.
9. Se tomó con una pipeta y de manera aséptica la cantidad necesaria de la cepa a estudiar, vaciándola en una tapa de plástico (se utilizó una pipeta diferente para la toma de cada cepa).
10. Utilizando una micropipeta multicanal, se tomaron 50 μl de la primera cepa vertiéndose en los pozos correspondientes, incluyendo el control, sin revolver. Se realizó el mismo procedimiento para cada una de las cepas a analizar, cambiando las puntas para cada una.

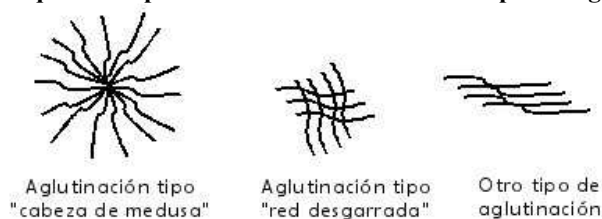
Terminado el vaciado de las cepas, se incubó a temperatura ambiente durante una hora en condiciones de humedad.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a realizar la lectura de la prueba de AM.

LECTURA DE LAS MUESTRAS

La lectura se realiza calculando la desaparición de células libres en el campo, así como la detección de la aglutinación, misma que puede ser en forma de "cabezas de medusa", como "red desgarrada" o de otro tipo (ver Figura 1).

Figura 1. Esquemas representativos de los diferentes tipos de aglutinación.



La valoración de los títulos de anticuerpos producidos fue realizada a partir de los sueros obtenidos empleando la técnica de AM, iniciando con una dilución de 1:50 y finalizando en 1:6400.

Con un asa bacteriológica se tomó una muestra de cada control negativo y contrastando con éste se observaron cada una de las muestras en sus diferentes diluciones empleando para ello el microscopio de campo oscuro.

Para la interpretación de la prueba de AM, al observar aglutinación en el microscopio de campo oscuro (120x), se utilizó una escala arbitraria (Cuadro 2) que recibió un puntaje, según el grado de aglutinación o desaparición de células y el porcentaje de leptospiras libres.

Cuadro 2. Escala utilizada para el puntaje de aglutinación

0	Negativo sin aglutinación	100% de Leptospiras libres
1	25% de aglutinación	75% de Leptospiras libres
2	50% de aglutinación	50% de Leptospiras libres
3	75% de aglutinación	25% de Leptospiras libres
4	100% de aglutinación	0% de Leptospiras libres

ACTIVIDADES REALIZADAS

Búsqueda de literatura referente a la leptospirosis en general y en particular artículos científicos con casos de leptospirosis documentados en hurones y otros mustélidos.

Obtención de muestras en hurones domiciliados radicados en la Ciudad de México, Estado de México y Querétaro. Total de muestras colectadas: 20 sueros.

Traslado de las muestras colectadas al Laboratorio de *Leptospira* de la UAM-X.

Preparación y mantenimiento de las serovariedades de *Leptospira* utilizadas como antígenos.

Realización de la prueba de aglutinación microscópica en los sueros obtenidos, utilizando para ello una batería de diez antígenos vivos pertenecientes a distintas serovariedades de *Leptospira*.

Análisis de los resultados obtenidos.

Elaboración del reporte final.

OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS

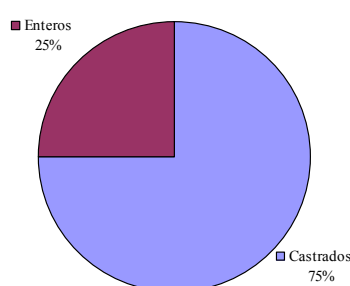
Se logró realizar el muestreo en un total de 20 hurones domiciliados, realizándose en éstos la prueba de AM, utilizando para ello diez serovariedades de *Leptospira*.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

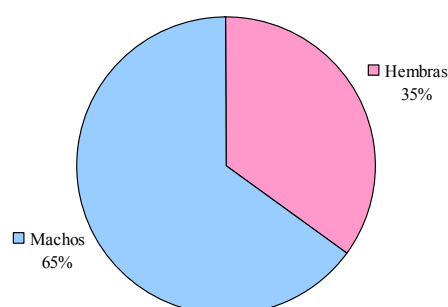
Población muestreada

Se tomaron muestras de un total de 20 hurones domiciliados provenientes del Distrito Federal, Estado de México y Querétaro. Se evaluaron los sueros de siete hembras y 13 machos con una edad promedio de dos años con cinco meses. En la Gráfica 1 se muestra la distribución del estatus reproductivo de los animales y en la Gráfica 2 se presenta su distribución según el género.

Gráfica 1. Distribución del estatus reproductivo de los hurones.



Gráfica 2. Distribución de género.



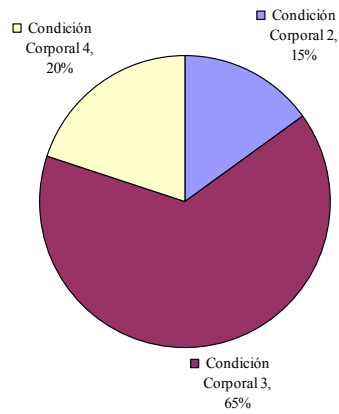
En el Cuadro 3 se presentan los parámetros generales correspondientes al peso y edad de la población estudiada.

Cuadro 3. Parámetros de peso y edad.

Parámetro	Promedio	Coefficiente de Variación	Varianza	Desviación estándar
Peso	1 kg	20.6%	0.42	0.206
Edad	2.5 años	94.7%	5.37	2.32

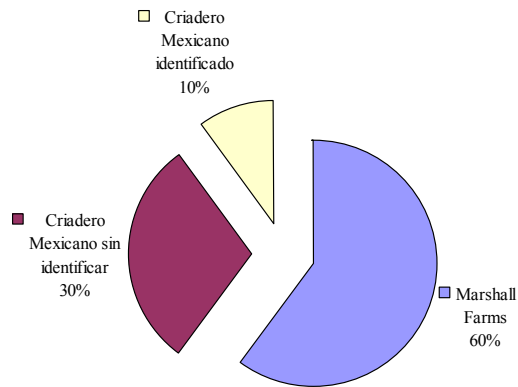
Del total de hurones muestreados, tres presentaban condición corporal 2, 13 condición corporal 3 y cuatro condición corporal 4 (Gráfica 3). La técnica utilizada para asignar el puntaje de la condición corporal puede ser consultada en el Anexo III.

Gráfica 3. Distribución de la condición corporal.



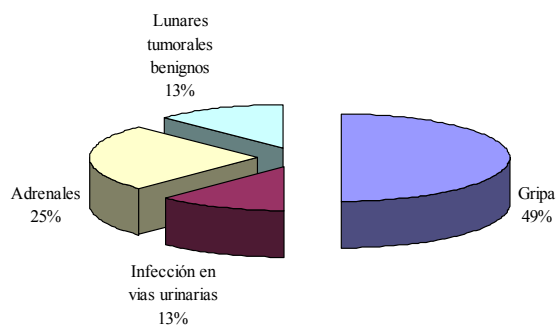
En la gráfica 4 es posible observar la distribución de procedencia de los animales.

Gráfica 4. Procedencia de los hurones.

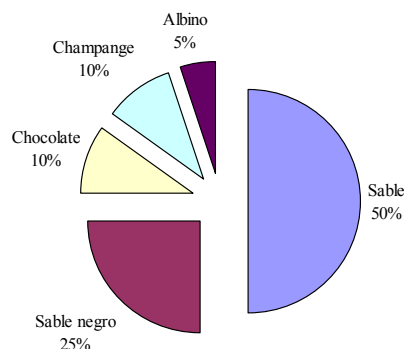


La Gráfica 5 muestra la incidencia de enfermedades padecidas en la población estudiada.

Gráfica 5. Frecuencia de enfermedades padecidas.



En lo que respecta al color de los animales muestreados, su distribución fue la siguiente: diez color sable (el color más común en los hurones), cinco sable negro, dos chocolate, dos champagne y uno albino. Se muestra a continuación una representación gráfica de la proporción de los colores registrados.



Los propietarios de los hurones son adultos entre los 25 y 35 años de edad, y en promedio cada hurón convive con 2.25 personas. El 85% de los hurones son protegidos contra los virus de moquillo canino y rabia utilizando vacunas específicas para la especie, mientras que al 15% restante se les inocula con biológicos equivalentes usados en perros. En cuanto a los productos utilizados en su alimentación, 17 animales son alimentados con croquetas específicas para hurón y tres con alimento comercial formulado para gatos en crecimiento. La fuente de agua para bebida para todos los hurones es agua purificada para consumo humano.

A ninguno de los hurones encuestados se les permite realizar actividades al aire libre como caminar por las aceras, nadar, jugar con lodo o excavar. A los hurones que cohabitan con otras especies de animales no se les permite interactuar con éstas, manteniéndose en todo momento en áreas separadas.

Hallazgos serológicos

De los 20 sueros obtenidos, ninguno presentó títulos positivos en la prueba de AM en la dilución 1:50.

Éstos resultados negativos no demuestran que los hurones sean inmunes o resistentes a la infección por leptospira, ni descarta a la especie como una fuente potencial de leptospirosis dado que se ha observado que algunos animales pueden ser portadores y excretores a pesar de tener títulos séricos muy bajos (1:10) o no detectables (Feigin *et al.*, 1973; Faine *et al.*, 1999).

Cabe recalcar que la prueba de AM no distingue a los animales portadores excretores de los curados e inmunes. Además se debe considerar la posibilidad de que la especie pudiera estar infectada con leptospiras no incluidas en la batería de antígenos utilizados, o por serovariedades de leptospiras todavía no descubiertas (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001; Peacock, 2005).

Dado que la transmisión por vía urinaria es el método principal de diseminación de leptospiras entre los animales y el hombre. Los animales portadores excretores diseminan leptospiras localmente, considerando que la cantidad de orina excretada por un hurón es de 70 a 100 ml por día, no queda descartada la especie como potencial fuente de leptospirosis (Fox, 1998).

DISCUSIÓN Y RECOMENDACIONES

La información existente respecto a la leptospirosis en hurones es escasa a nivel internacional y nula a nivel nacional (Hathaway y Blackmore, 1981; Gillis, 1999). El no haber encontrado resultados positivos a la dilución 1:50 no exenta a la especie de susceptible al contagio o transmisión de la bacteria. Por ello es importante continuar con estudios sobre este tema, aumentando el tamaño de muestra e incluyendo animales tanto clínicamente sanos como enfermos, de manera que sea posible en el futuro determinar la importancia clínica que representa la leptospirosis en ésta especie y el posible riesgo que pudieran representar para la salud pública, dado el papel que un animal sano puede representar en la transmisión de la enfermedad.

La transmisión de la enfermedad de los hurones a los seres humanos no se ha demostrado natural o artificialmente, sin embargo la ausencia de evidencia no demuestra evidencia de ausencia.

Por lo pronto no será posible descartar a los hurones como potenciales fuentes de leptospirosis, si bien cabe considerar lo dicho por Smith (Smith, 1972), quien señaló que antes de considerar a cualquier especie como agente de infección, debe tenerse en cuenta que algunos animales se encuentran lejos de zonas en donde habitan otros animales infectados, y que incluso, muchos de los animales domésticos que les rodean están libres de leptospirosis. En el caso particular de la población muestreada, todos los animales son mantenidos en estrictas condiciones de vigilancia y confinamiento, por lo que las probabilidades de ser infectados por leptospiras es muy baja. Sin embargo, resultaría interesante el realizar el muestreo en una población de hurones que vivan bajo diferentes condiciones de confinamiento e higiene o realizar la prueba de AM iniciando con diluciones más bajas a la utilizada en ésta investigación.

L I T E R A T U R A C I T A D A

- Ahmad, S.N., S. Shah y F.M.H. Ahmad. 2005. Laboratory diagnosis of Leptospirosis. *Journal of Postgraduate Medicine*. 51:195-200.
- Anzalone Cantoni, L., C. Arenas Giménez, R. Ballesté Alaníz, C. Bazet Ugalde, J. Blanco Toloza, M. Legnani Cardoso, G. Rodríguez Cuns, R. Salvatella Agrelo y V. Seija Scarone. 2004. Manual de toma de muestras para estudio bacteriológico, parasitológico y micológico. Selección, recolección, conservación y transporte. Departamento de Laboratorio Clínico. Hospital de Clínicas, Montevideo, Uruguay.
- Apfelbach, R. 1981. Instinctive predatory behavior of mustelids (*Mustela putorius f. furo*, *Mustela vison f. dom.*) modified by benzodiazepine derivatives. *Pharmacol Biochem Behav*. 14 Suppl 1:43-6.
- Arlock, P., B. Wohlfart y M. Noble. 1998. Potentiation of the contraction following a prolonged depolarization in isolated ferret myocardium. *Acta Physiol. Scand*. 163:3-11.
- Bourque, M. y R. Higgins. 1984. Serologic studies on brucellosis, leptospirosis and tularemia in moose (*Alces alces*) in Quebec. *Journal of Wildlife Disease*. 20 (2):95-99.
- Brown, D. 2002. The foulmart: what's in a name? *Mammal Rev*. 32 (2):145-149.
- Calle, P.P., D.J. Seagars, C. McClave, D. Senne, C. House y J.A. House. 2002. Viral and bacterial serology of free-ranging pacific Walrus. *Journal of Wildlife Disease*. 38 (1):93-100.
- Chomel, B.B. 1992. Zoonoses of house pets other than dogs, cats and birds. *Pediatr Infect Dis J*. 11 (6):479-87.
- Doherty, P. 1999. Burnet oration: Living in the Burnet lineage. *Immunology and Cell Biology*. 77:167-176.
- Endo, T., M. Minami, M. Hirafuji, N. Hamaue y N.H. Parvez. 2004. The ferret: a cytotoxic drug-induced emesis model. *Biogenic Amines*. 18 (3-6):419-434.
- Everard, C.O.R., G.M. Fraser-Chanpong, L.J. Bhagwandin, M.W. Race y J.A. C. 1983. Leptospire in wildlife from Trinidad and Grenada. *Journal of Wildlife Disease*. 19 (3):192-199.
- Faine, S., B. Adler, C.A. Bolin y P. Perolat. 1999. *Leptospira and Leptospirosis*. CRC Press Inc, USA.
- Feigin, R.D., L.A. Lobes, Jr., D. Anderson y L. Pickering. 1973. Human leptospirosis from immunized dogs. *Ann Intern Med*. 79 (6):777-85.
- Fox, J.G. 1998. *Biology and Disease of the Ferret*. Lea & Febiger, Philadelphia, EU.
- Gad, S.C. 2000a. Large animal toxicology: Introduction and general principles. *International Journal of Toxicology*. 19:129-132.
- Gad, S.C. 2000b. Pigs and ferrets as models in toxicology and biological safety assessment. *International Journal of Toxicology*. 19:149-168.
- Gillis, A. 1999. Vaccine reactions: Treatment and prevention. *American Ferret Report*. 10 (3):9-13.
- Govorkova, E.A., J.E. Rehg, S. Krauss, H.L. Yen, Y. Guan, M. Peiris, T.D. Nguyen, T.H. Hanh, P. Puthavathana, H.T. Long, C. Buranathai, W. Lim, R.G. Webster y E. Hoffmann. 2005. Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004. *J Virol*. 79 (4):2191-8.
- Hartskeerl, R.A. 2005. Human leptospirosis: Current status and future trends. *En 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society, Thailand*.
- Hasling, T.A., M. Gierdalski, B. Jablonska y S.L. Juliano. 2003. A radialization factor in normal cortical plate restores disorganized radial glia and disrupted migration in a model of cortical dysplasia. *European Journal of Neuroscience*. 17:467-480.
- Hathaway, S.C. y D.K. Blackmore. 1981. Failure to demonstrate the maintenance of leptospire by free-living carnivores. *N Z Vet J*. 29 (7):115-6.
- Hillyer, E.V. y K.E. Queenberry. 1997. *Ferrets, Rabbits, and Rodents*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania. USA. pp 432.

- Junge, R.E. 1995. Guidelines for zoo and aquarium veterinary medical programs and veterinary hospitals. Vol. Appendix 4: preventative medicine recommendations. St. Louis Zoological Park. St. Louis, M.E., editor. American Association of Zoo Veterinarians (AAZV), Infectious Disease Committee.
- Khan, S., Y.C. Liu, A.M. Khawaja, S. Manzini y D.F. Rogers. 2001. Effect of the long-acting tachykinin NK(1) receptor antagonist MEN 11467 on tracheal mucus secretion in allergic ferrets. *Br J Pharmacol.* 132 (1):189-96.
- Koizumi, N. y H. Watanabe. 2005. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. *Journal of Postgraduate Medicine.* 51:210-214.
- Levett, P.N. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews.* 14 (2):296–326.
- Lindeberg, H. 2003. Embryo technology in the farmed european polecat (*Mustela putorius*). *En Institute of Applied Biotechnology.* Vol. PhD. University of Kuopio, Helsinki, Finland. 112.
- Lipsitz, L., D.T. Ramsey, J.A. Render, S.J. Bursian y R.J. Auelrich. 2001. Persistent fetal intraocular vasculature in the European ferret (*Mustela putorius*): clinical and histological aspects. *Vet Ophthalmol.* 4 (1):29-33.
- Lockard, B.I. 1985. The forebrain of the ferret. *Lab Anim Sci.* 35 (3):216-28.
- MacDonald, D. 1991. *Enciclopedia del Mundo Animal. Mamíferos carnívoros.* Grupo Libro. pp 18-25.
- Martino, P.E., N.O. Stanchi, D.O. Arias y E.M. Gatti. 2000. Riesgo de la salud publica por exposición a animales de peletería. *Analecta Veterinaria.* 20 (1):14-19.
- Masini, C.V., S. Sauer y S. Campeau. 2005. Ferret odor as a processive stress model in rats: neurochemical, behavioral, and endocrine evidence. *Behav Neurosci.* 119 (1):280-92.
- Masini, C.V., S. Sauer, J. White, H.E. Day y S. Campeau. 2006. Non-associative defensive responses of rats to ferret odor. *Physiol Behav.* 87 (1):72-81.
- McDonald, R.A. y S. Larivière. 2001. Diseases and pathogens of *Mustela* spp., with special reference to the biological control of introduced stoat *Mustela erminea* populations in New Zeland. *Journal of The Royal Society of New Zeland.* 31 (4):721-744.
- McLain, D.E., J.G. Babish y D.A. Roe. 1985. Pharmacokinetics of ethanol in the ferret. *Alcohol Clin Exp Res.* 9 (2):138-42.
- Moody, K.D., T.A. Bowman y C.M. Lang. 1985. Laboratory management of the ferret for biomedical research. *Lab Anim Sci.* 35 (3):272-9.
- New, J.C., K. Delozier, C.E. Barton, P.J. Morris y P.L.N. D. 1994. A Serologic Survey of Selected Viral and Bacterial Diseases of European Wild Hogs, Great Smoky Mountains National Park, USA. *Journal of Wildlife Disease.* 30 (1):103-106.
- Norbury, G. 2001. Conserving dryland lizards by reducing predator-mediated apparent competition and direct competition with introduced rabbits. *Journal of Applied Ecology.* 38:1350–1361.
- Otto, G., W.D. Rosenblad y J.G. Fox. 1993. Practical venipuncture techniques for the ferret. *Lab Anim.* 27 (1):26-9.
- Packer, J.J. y J.D.S. Birks. 1999. An assessment of British farmers' and gamekeepers' experiences, attitudes and practices in relation to the European Polecat *Mustela putorius*. *Mammal Rev.* 29 (2):75–92.
- Peacock, S. 2005. Typing of leptospiras: What method, and what does it tell us? *En 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society, Thailand.*
- Richards, C.A., D. Carr, L. Spitz, P.J. Milla y P.L. Andrews. 2000. Nissen-type fundoplication and its effects on the emetic reflex and gastric motility in the ferret. *Neurogastroenterol Motil.* 12 (1):65-74.
- Ryland, L.M. y J.R. Gorham. 1978. The ferret and its diseases. *J Am Vet Med Assoc.* 173 (9):1154-8.
- Sager, W.C. 1998. Zoonotic and other diseases shared among people, common pets, and ferrets. *American Ferret Report.* 9 (5):1-2.

- Shotts, E.B. 1981. Leptospirosis. Infectious Diseases of Wild Animals. Iowa State University Press, EEUU. pp 323-331.
- Smith, N. n.d. What can we do about ferrets? Department of Conservation Head Office, Wellington, New Zealand. Public discussion document.
- Smith, R.E. 1972. Bovine leptospirosis in Massachusetts. Research Bulletin. University of Massachusetts. 600.
- Solnick, J.V. y D.B. Schauer. 2001. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. Clinical Microbiology Reviews. 14 (1):59–97.
- Tsuchiya, M., Y. Fujiwara, Y. Kanai, M. Mizutani, K. Shimada, O. Suga, S. Ueda, J.W. Watson y A. Nagahisa. 2002. Anti-Emetic Activity of the Novel Nonpeptide Tachykinin NK₁ Receptor Antagonist Ezlopitant (CJ-11,974) against Acute and Delayed Cisplatin-Induced Emesis in the Ferret. Pharmacology. 66:144–152.
- Vinegar, A., E.E. Sinnott, P.C. Kosch y M.L. Miller. 1985. Pulmonary physiology of the ferret and its potential as a model for inhalation toxicology. Lab Anim Sci. 35 (3):246-50.
- Wen, G.Y., J.A. Sturman y J.W. Shek. 1985. A comparative study of the tapetum, retina and skull of the ferret, dog and cat. Lab Anim Sci. 35 (3):200-10.
- WHO/FAO/OIE. 2004. Emerging Zoonotic Diseases, Geneva, Switzerland.
- William, C.S. 1998. Zoonotic and other diseases shared among people, common pets, and ferrets. American Ferret Report. 9 (5):19-21.
- Woodford, M.H. 2000. Quarantine and Health Screening Protocols for Wildlife prior to Translocation and Release into the Wild. Woodford, M.H. IUCN Species Survival Commission's Veterinary Specialist Group. Office International des Epizooties (OIE), USA/UK/Switzerland/France.
- Zarnke, R.L. y W.B. Ballard. 1987. Serologic survey for selected microbial pathogens of wolves in alaska, 1975-1982. Journal of Wildlife Disease. 23 (1):77-85.

Anexo I

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LABORATORIO DE LEPTOSPIRA



Folio _____

- 1) Propietario

- 2) Dirección

- 3) Teléfono

- 4) Nombre del hurón _____
- 5) Edad _____
- 6) Género
 - a) Macho
 - b) Hembra
- 7) Estado Reproductivo
 - a) Castrado
 - b) Entero
- 8) Peso _____
- 9) Condición Corporal 1 2 3 4 5
- 10) Procedencia _____
- 11) Color _____
- 12) Patrón de color _____
- 13) Antifaz
 - a) “V”
 - b) “T”
 - c) Ninguno
- 14) Patrones en blanco _____
- 15) Historia Médica (breve)
 - a) Enfermedades bacterianas _____
 - b) Enfermedades virales _____
 - c) Enfermedades metabólicas _____
 - d) Enfermedades endocrinas _____
 - e) Otras _____

16) Vacunas Recibidas

- a) Específicas para hurón
- b) Para perros
- c) Para gatos
- d) Mixtas

17) Tipo de Alimentación

- a) Alimento comercial específico para hurón
- b) Alimento comercial para gato
- c) Alimento comercial para perro
- d) Alimentos elaborados en casa
- e) Otros

18) Convivencia con humanos (especificar número y edad en cada caso)

- a) Adultos ____
- b) Niños ____
- c) Adultos mayores de 60 años ____

19) Convivencia con animales

- a) Hurones
- b) Perros
- c) Gatos
- d) Aves
- e) Otros

20) Fuente del agua de bebida

- a) Grifo
- b) Botella
- c) Otra

21) Actividades ¿le ha permitido?

- a) Nadar
 - i) Piscinas
 - ii) Agua dulce
 - iii) Agua salada
- b) Jugar en el lodo
- c) Excavar
- d) Caminar por la calle

A n e x o I I

Procedimiento para la preparación del Medio de Cox Modificado

El medio de cultivo utilizado para el mantenimiento de las leptospiras utilizadas en este trabajo fue Medio de Cox Modificado.

Material utilizado para elaborar el medio

Solución A

- 1.- $(\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ M}/15) \text{ KH}_2\text{PO}_4 \text{ 15 H}_2\text{O} \rightarrow 9.078 \text{ g}$
- 2.-Aforar un litro de agua destilada

Solución B

- 1.- $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ M}/15) + 12 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 23.883 \text{ g}$ ó $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ M}/15) \text{ Anhidro} \rightarrow 9.27 \text{ g}$
- 2.-Aforar un litro de agua destilada

Procedimiento

1. Mezclar 27 ml de solución A con 63 ml de solución B
2. A la mezcla anterior agregar 504 ml de agua destilada
3. Verificar pH a 7.2 - 7.4, en caso necesario ajustarlo utilizando para ello la adición de Sosa.
4. Esterilizar solución a 15 lb de presión, 121° C durante 15 minutos.
5. Conservar a temperatura ambiente en un lugar fresco y oscuro hasta el momento de su utilización.

A n e x o III

Procedimiento para el cálculo de la condición corporal

El cálculo de condición corporal es una herramienta utilizada para ajustar la alimentación y las prácticas de manejo en muchas especies domésticas. Para efectos de ésta investigación, fueron tomados de manera arbitraria ciertos parámetros generales para la asignación del puntaje, tal como se muestra en la siguiente tabla.

Condición Corporal	Parámetros
1	Se pueden apreciar desde lejos las costillas, vértebras lumbares, pelvis y otras prominencias óseas. No hay grasa subcutánea y se nota pérdida evidente del tejido muscular.
2	Las costillas, vértebras lumbares, caudales, apófisis espinosas y huesos pélvicos son visibles y se palpan con facilidad. Poca grasa subcutánea.
3	Es posible palpar las costillas a pesar de notar algo de grasa subcutánea, no se sienten las prominencias óseas de la pelvis o el cráneo. Se nota algo de grasa subcutánea acumulada en el abdomen y la base de la cola.
4	Las costillas y huesos de las extremidades se palpan con dificultad debido a la capa de de grasa subcutánea, es notable el crecimiento de la papada y el abdomen. No hay cintura o es muy poco visible. El abdomen está poco retraído.
5	Existen depósitos masivos de grasa sobre el abdomen, columna y base de la cola. Son notorios los depósitos de grasa en la región anterior y posterior del cuello y los miembros. El hurón presenta dificultades para moverse, y no le es posible caminar sin apoyar el abdomen en el suelo.