

Análisis post mortem de causas de enfermedad en mamíferos, reptiles y aves silvestres de vida libre de Costa Rica remitidos por el sistema de vigilancia epidemiológica (SIVE) del Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA).

Ubicación y área geográfica: Área de Conservación Central, Área de Conservación Osa, Área de conservación Arenal Tempisque, Área de Conservación Guanacaste, Áreas Silvestres Protegidas del Área de Conservación La amistad- Pacífico, Área de Conservación Arenal Huetar Norte, Área de Conservación Tortuguero, Área de Conservación Tempisque, Área de Conservación Pacífico Central, Centros de Rescate ubicados dentro del área administrativa de las Área de Conservación, así como tierras del agro paisaje, Caminos Públicos y Orillas de Carretera sin involucrar propiedad privada.

Investigadores: Fernando Aguilar Vargas y Tamara Solorzano Scott.

Institución vinculada: Universidad Nacional de Costa Rica y Servicio Nacional de Salud Animal.

Fecha: 2019-2020

Introducción/antecedentes

Las enfermedades zoonóticas representan una amenaza directa para los sistemas de salud pública, generando costos en términos de tratamiento médico, control de brotes y sobrecargando los sistemas de salud. Además, genera importantes pérdidas por sacrificio de ganado y afectación de otros animales domésticos [1,2]. Ejemplos de cómo estas enfermedades pueden impactar en la salud pública, la salud animal y la vida silvestre han sido los recientes brotes de fiebre amarilla y del virus del Nilo Occidental, que muestran la necesidad de contar con infraestructura y capacidad de diagnóstico para asegurar una vigilancia constante de agentes potencialmente zoonóticos [3,4].

Las poblaciones de vida silvestre actúan como reservorios y pueden desempeñar varios roles en la epidemiología de numerosos patógenos [5–7]. Estos roles asignan a la vida silvestre la importante función de centinelas de la salud de los ecosistemas, y permiten la detección temprana de alteraciones en el medio ambiente; así como la distribución, el resurgimiento o emergencia de ciertos patógenos en una región específica [8,9].

Las regiones tropicales se encuentran entre las áreas de diversidad natural más extraordinaria con una alta diversidad concomitante de patógenos y, por lo tanto, un alto potencial para la aparición de enfermedades [10,11]. Este riesgo ha aumentado drásticamente debido a las presiones antropogénicas vinculadas a la sobreexplotación de los recursos naturales y al aumento del cambio de uso del suelo, lo que a su vez aumenta la posibilidad de contacto entre la vida silvestre, los animales domésticos y los humanos [12,13].

Una de las estrategias preventivas ante el riesgo de eventos epidémicos, impulsada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), es incrementar los esfuerzos para establecer mecanismos de detección temprana de patógenos, tanto zoonóticos como de importancia para la conservación, a través de los Programas de Monitoreo de la Salud de la Vida Silvestre (WHMP) [14–16].

Uno de los primeros pasos para conocer el estado de salud de la fauna silvestre en una región es el seguimiento a través de la vigilancia pasiva, que identifica las causas de mortalidad en una variedad de especies en función de sus perfiles patológicos a través de exámenes post-mortem. Este enfoque ofrece ventajas como la rentabilidad y la capacidad de realizar muestreos de conveniencia, aprovechando la infraestructura establecida y la capacidad de diagnóstico. Además, cuando estos esquemas se establecen en el largo plazo, se ha demostrado que brindan la información central para la toma de decisiones y el establecimiento de políticas, normas y estrategias, priorizando la prevención de enfermedades, aun cuando el muestreo sea sesgado y con datos incompletos de cobertura geográfica [17–20].

En América Latina se han realizado importantes esfuerzos para mejorar los sistemas de vigilancia epidemiológica dirigidos a la fauna silvestre, incluso existen algunos programas nacionales actualmente instalados y funcionando perfectamente

donde los animales silvestres son utilizados como centinelas para la vigilancia de algunas enfermedades específicas [21,22]. Sin embargo, aún no existen programas de monitoreo del estado general de salud de la vida silvestre, lo que deja en claro la necesidad de optimizar y ampliar la cobertura de estos esquemas [23,24]. Por ejemplo, según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Costa Rica cuenta con la infraestructura y mantiene programas de vigilancia adecuados para detectar y controlar enfermedades zoonóticas en el ganado [25]. Sin embargo, no contempla la vida silvestre local dentro de su esquema como debería ser [26].

Varios patógenos como parásitos zoonóticos, agentes infecciosos transmitidos por vectores y virus de transmisión directa han sido identificados en la vida silvestre de Costa Rica [27–38]. Esto refleja la urgencia de establecer un WHMP permanente, donde se consideren aspectos como el estado de salud general y el monitoreo de patógenos zoonóticos en la vida silvestre, facilitando el conocimiento de la eco epidemiología de estos agentes a nivel local.

Los países con recursos limitados (LMIC) como Costa Rica enfrentan severas restricciones financieras y logísticas para monitorear la salud y la circulación de patógenos en la vida silvestre. Sin embargo, es necesario en el corto plazo extender la cobertura de este tipo de programas a las regiones tropicales. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es evaluar la factibilidad técnica e infraestructural para establecer este tipo de esquemas en Costa Rica mediante la implementación de un programa piloto de vigilancia epidemiológica pasiva en vida silvestre. Si bien encontramos obstáculos como la falta de legislación para la recopilación de datos y la voluntad de cooperación entre las agencias, nuestra investigación demostró que existe la capacidad logística y que es posible adaptar la infraestructura establecida para implementar este programa. Esto permitió que se analizaran canales de animales silvestres, detectando patógenos zoonóticos y patógenos de importancia para la conservación de especies.

Objetivo general

Evaluar la factibilidad técnica e infraestructural para establecer un programa de vigilancia epidemiológica pasiva en vida silvestre en Costa Rica mediante la implementación de un esquema piloto.

Objetivos específicos

Determinar las principales causas de enfermedad en mamíferos terrestres y aves silvestres de vida libre en Costa Rica.

Realizar un registro digital y mapeo de los sitios de recolección de los cadáveres analizados incluyendo provincia, cantón y georreferenciación.

Establecer las patologías más frecuentes en cada especie analizada, su potencial zoonótico y riesgo para la fauna silvestre

Duración del proyecto de investigación

1 año trabajo de campo (2019-2020), y un año en tabulación y análisis de datos (afectación por la pandemia).

Materiales y métodos

Área de estudio: El estudio se realizó a nivel nacional. Cada caso recibido fue geocodificado usando la latitud y longitud generada por GPS del punto donde el personal de campo encontró el espécimen. Cuando el GPS no estaba disponible, se geocodificaban usando la latitud y longitud de la ubicación aproximada donde se encontraban, y esto fue generado por Google Earth Pro v7.3 (2021, Google Inc.). Con los puntos georreferenciados de cada muestra admitida se elaboró un mapa utilizando ArcGIS 10.7 (ERSI), según la división territorial del SINAC por área de conservación: Área de Conservación Arenal Huetar Norte (ACAHN); Área de Conservación Arenal Tempisque (ACT); Área de Conservación Central (ACC); Área de Conservación Guanacaste (ACG); Área de Conservación La Amistad Caribe (ACLAC); Área de Conservación La Amistad Pacífico (ACLAP); Área de Conservación Osa (ACOSA); Área de Conservación Pacífico Central (ACOPAC); Área de Conservación Tempisque (ACT); Área de Conservación Tortuguero (ACTo).

Informe de colecta científica: Para la implementación de un WHMP se planteó un esquema de vigilancia epidemiológica pasiva, adecuando los recursos técnicos de diagnóstico y la infraestructura con la que cuenta el país. Para crear una red de detección de animales silvestres muertos y enfermos, se solicita a los funcionarios de los centros de manejo de vida

silvestre y funcionarios de la autoridad de vida silvestre, reportar casos y enviar voluntariamente especímenes. Se establecieron como casos para recibir, canales completas de vertebrados en libertad después de la muerte por cualquier enfermedad o traumatismo asociado, tanto encontrados muertos en el campo como fallecidos en los centros de manejo. Se excluyeron las canales de animales que permanecieron más de 48 horas en los centros de manejo antes de fallecer, las que recibieron medicación, y aquellas canales que estuvieron congeladas por más de una semana cuando fue necesario almacenarlas. El esquema WHMP propuesto se muestra en la Fig. 1.

Cantidades: Se recibieron 96 carcasas. Las canales recibidas fueron clasificadas por su grado de autólisis según una escala establecida de uno a cinco [39]. Así, desde un cadáver fresco o un animal muerto recientemente (grado 1) hasta descomposición avanzada (grado 4) y cadáveres parciales, momificados o restos óseos (grado 5). Solo se incluyeron canales con grados 1 a 3 en el estudio para análisis post-mortem y muestreo de tejido [439]. Por lo tanto, 85 canales fueron admitidos en el estudio. Estos se dividieron por clase taxonómica en 9 aves y 76 mamíferos. 10 carcasas de aves y 1 de mamífero no fueron admitidos para el estudio por grado avanzado de autólisis.

Uso y destino del material: Los cadáveres utilizados en este estudio eran todos de vertebrados en libertad con cualquier condición clínica aparente o después de la muerte debido a cualquier enfermedad o trauma asociado. Se solicitó y registró información básica en el Sistema de Información de Vigilancia Epidemiológica (SIVE) del Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) para cada envío de muestra: ubicación geográfica, el nombre estándar y científico del animal, signos clínicos y cualquier información que se considere relevante para el caso, siguiendo el esquema recomendado por la OIE para la notificación de casos para el sistema de vigilancia de enfermedades en animales silvestres [16,40]. Todas las canales se enviaron en condiciones de refrigeración a 2-8 °C.

Las carcasas recibidas se les realizó un análisis anatomopatológico y se registraron todos los hallazgos morfológicos. Además, se tomaron muestras de tejido para análisis histopatológicos y microbiológicos de rutina, según fuera necesario. Las muestras de tejido para histopatología se procesaron de acuerdo a los protocolos estándar [41]. Los segmentos de tejidos y órganos no utilizados posterior al análisis post-mortem, fueron descartados cumpliendo las medidas de bioseguridad y posteriormente incinerados.

Los virus y protozoos se identificaron en las muestras de tejidos frescos recolectados de manera estéril durante el análisis post-mortem. Según hallazgos sugestivos de lesión, se tiñeron segmentos de los órganos afectados y se observaron en microscopia de luz, detectando cuerpos de inclusión en células diana, permitiendo establecer diagnósticos presuntivos.

Detección bacteriológica: Se cultivaron muestras de tejido de animales con procesos inflamatorios (supurativos o abscesos) siguiendo procedimientos bacteriológicos estándar. Para el aislamiento bacteriano, las muestras se inocularon en medios de agar no selectivos y selectivos. Se identificó un crecimiento bacteriano significativo utilizando el sistema automatizado VITEK-2 Compact, versión de software 8.02 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Se utilizaron tarjetas de prueba VITEK para Gram-negativo [GN], Gram-positivo [GP] y anaerobios [ANC] para la identificación de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Identificación de parásitos metazoarios: Todos los parásitos presentes en las canales fueron recolectados y lavados con suero fisiológico, conservados en solución de alcohol, ácido acético y formalina (AFA). No más de una semana después de la recolección se sometieron a identificación a nivel de género a través de características morfométricas [42]. Las características físicas y morfométricas se reconocieron después de la fijación y clarificación con solución de Hoyer mediante microscopía óptica [43–45]. Además, los cestodos procesados se tiñeron con solución diluida de hematoxilina de Harris.

Informe de Investigación científica

Participación en el WHMP y distribución de casos por edad, sexo y clasificación taxonómica

La notificación de casos fue realizada por funcionarios de la autoridad de vida silvestre, con el 24.7% (21/85) de los casos y el 75.3% (64/85) por funcionarios de los centros de manejo de vida silvestre, solo cuatro centros de manejo reportaron y enviaron casos para análisis. Las áreas de conservación con mayor participación en el WHMP fueron las mismas donde

se ubicaron los centros de manejo de vida silvestre participantes. La ubicación geográfica de los centros de manejo, laboratorio de diagnóstico y casos analizados se muestra en la Fig. 1. Las áreas de conservación donde no hubo participación son aquellas ubicadas más alejadas del laboratorio de diagnóstico y con obstáculos importantes para el envío.

De los 85 ejemplares admitidos al estudio, hubo una distribución por edades de 27,1% (23/85) animales jóvenes y 72,9% (62/85) adultos. La distribución por sexo fue 56,5% (48/85) machos y 43,5% (37/85) hembras. Según el orden taxonómico recibimos 29,4% (25/85) Carnívora, 29,4% (25/85) Primate, 12,9% (11/85) Pilosa, 5,9% (5/85) Didelphimorphia, 4,7% (4/85)) Roedores, 4,7 % (4/85) Artiodáctilos, 2,3 % (2/85) Cingulados, 2,3 % (2/85) Pelecaniformes, 2,3 % (2/85) Accipitriformes, 2,3 % (2/85) Anseriformes, 1,2 % (1/85) Ciconiiformes, 1,2% (1/85) Piciformes y 1,2% (1/85) Coraciiformes.

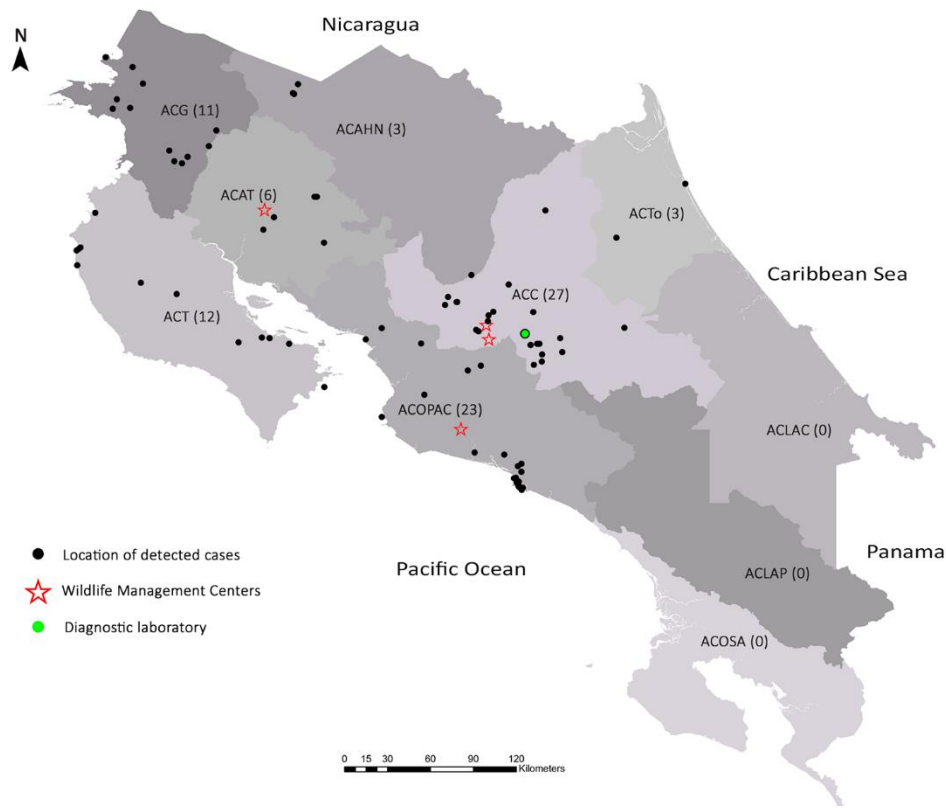


Fig 1. Geocodificación de los casos analizados por área de conservación. El número corresponde a los casos analizados en cada área de conservación. Los centros de manejo de vida silvestre que se muestran son aquellos que colaboraron con el WHMP.

Distribución de causas de muerte y lesiones según etiología

La distribución de la causa presuntiva de muerte según hallazgos patológicos correspondió a 54,1% (46/85) asociada a eventos traumáticos (atropello y electrocución principalmente), 27,1% (23/85) a muertes directamente relacionadas con agentes infecciosos y 2,4% (2/85) con enfermedad degenerativa. Además, en el 3,5% (3/85) de los casos la muerte se asoció presuntamente a intoxicación y en el 12,9% (11/85) no se determinó la causa de la muerte. De los individuos con causa de muerte traumática, el 67,4% (32/85) presentó concomitantemente algún agente infeccioso con o sin enfermedad asociada (24 con parásitos gastrointestinales y pulmonares, tres con bacterias, uno con protozoos y cuatro con múltiples microorganismos). De los ejemplares con causa de muerte infecciosa, diez presentaron lesiones asociadas a virus, cinco a parásitos, dos a protozoos, uno a bacterias y cinco presentaron lesiones asociadas a múltiples etiologías. Los valores absolutos y relativos de las causas de muerte para cada uno de los grupos taxonómicos según la presencia de agentes infecciosos se especifican en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores absolutos y relativos de las causas de muerte para cada uno de los grupos taxonómicos.

Causas de muerte / Taxón	DAIA	DNAIA-PD	DNAIA-IAD	DNAIA	UD
Mamíferos					
Carnívora	40% (10/25)	28% (7/25)	16% (4/25)	8% (2/25)	8% (2/25)
Primate	32% (8/25)	36% (9/25)	16% (4/25)	8% (2/25)	8% (2/25)
Pilosa	0% (0/11)	9.1% (1/11)	27.3% (3/11)	45.4% (5/11)	18.2% (2/11)
Didelphimorphia	20% (1/5)	0% (0/5)	60% (3/5)	0% (0/5)	20% (1/5)
Rodentia	25% (1/4)	0% (0/4)	0% (0/4)	25% (1/4)	50% (2/4)
Artiodactyla	25% (1/4)	0% (0/4)	0% (0/4)	75% (3/4)	0% (0/4)
Cingulata	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	100% (2/2)	0% (0/2)
Aves					
Pelecaniformes	100% (2/2)	0% (2/2)	0% (2/2)	0% (2/2)	0% (2/2)
Accipitriformes	0% (0/2)	0% (0/2)	50% (1/2)	50% (1/2)	0% (0/2)
Anseriformes	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	100% (2/2)	0% (0/2)
Ciconiiformes	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	100% (1/1)
Piciformes	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	100% (1/1)	0% (0/1)
Coraciiformes	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	100% (1/1)
Total	27.1% (23/85)	20% (17/85)	17.6% (15/85)	22.4% (19/85)	12.9% (11/85)

DAIA: Muerte asociada con agente infeccioso; DNAIA-PD: Muerte no asociada con agente infeccioso, con un agente infeccioso preexistente; DNAIA-IAD: Muerte no asociada con agente infeccioso, con detección de agente infeccioso; DNAIA: Muerte no asociada con agente infeccioso; UD: Muerte con causa indeterminada.

Agentes infecciosos detectados en el WHMP

Se identificaron diez virus, siete protozoos y siete bacterias en muestras de mamíferos. En 22 casos, estos patógenos estaban involucrados con lesiones o enfermedad sistémica, de los cuales, 19 estaban directamente asociados con la causa de muerte de los mamíferos. Sólo *Sarcocystis* spp. detectado en dos casos fue un hallazgo incidental. Además, 38 mamíferos tenían parásitos internos. Se observó multiparasitosis en el 15,3% (13/85) de los casos. Parásitos como *Prosthenorchis* spp. (n=15), *Angiostrongylus* spp. (n=6), y *Cilycospirura* spp. (n=1) fueron responsables de parasitosis severa con enfermedad sistémica. Algunas de las lesiones como la bronconeumonía abscedada piogranulomatosa y la gastritis nodular y esclerosante asociada a agentes infecciosos se observan en la figura 2 (ver leyenda). En el 50,6% (43/85) de los casos, los mamíferos presentaron agentes infecciosos con potencial zoonótico como *Klebsiella pneumoniae*, *Toxoplasma gondii*, *Angiostrongylus* spp. Los agentes etiológicos identificados por grupos taxonómicos y el número de ejemplares analizados se especifican en la Tabla 2.

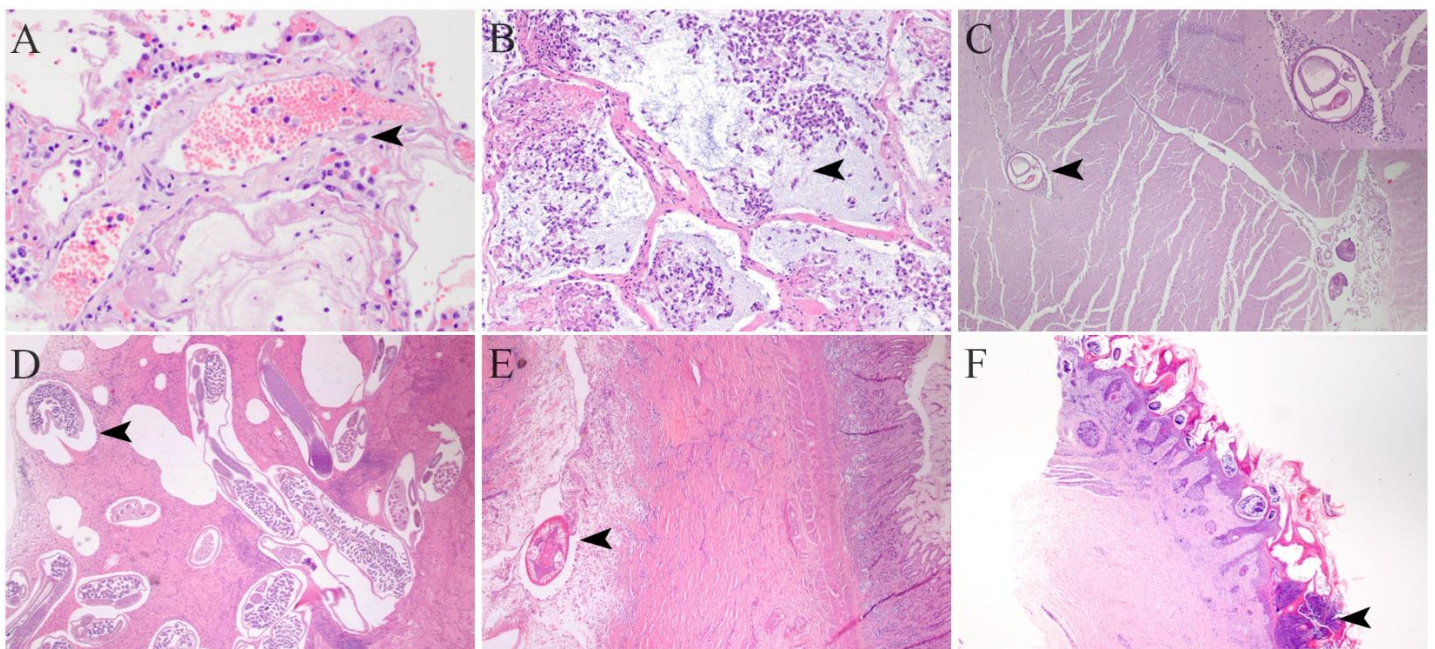


Fig 2. Agentes infecciosos en lesiones identificadas en animales silvestres. A) Pulmón (*Alouatta palliata*-mono aullador). Neumonía linfoplasmocítica con presencia de quiste tisular, morfología compatible con *Toxoplasma gondii* (punta de flecha; H&E 600x). B) Pulmón (*Alouatta palliata*-mono aullador). Bronconeumonía abscedada piogranulomatosa con bacteria intralesional *Klebsiella pneumoniae*, confirmación por cultivo (punta de flecha; H&E 200x). C) Cerebro (*Didelphis marsupialis*-zarigüeya). Presencia del nematodo *Angiostrongylus* spp. identificado por morfología (punta de flecha; H&E 400x). Recuadro: Ampliación de nematodos (H&E 200x). D) Pulmón (*Cebus imitator*-mono cariblanco). Bronconeumonía asociada a múltiples Nematodos, *Filariopsis* spp. identificado por morfología (más cortes de la hembra en microfotografía) (punta de flecha; H&E 40x). E) Estómago (*Herpailurus yagouaroundi*-jaguarundi). Gastritis nodular y esclerosante asociada a múltiples *Cylicospirura* spp. Nematodos identificados por morfología (punta de flecha; H&E 40x). F) Piel (*Sphiggurus mexicanus*-puercoespín) Dermatitis piogranulomatosa y eosinofílica asociada a infestación masiva por *Sarcoptes* spp. (punta de flecha; H&E 400x).

Tabla 2: Número de agentes infecciosos testeados y positivos en mamíferos según etiología.

Grupo taxonómico / agente infeccioso		Primate	Carnívora	Pilosa	Didelphimorphia	Rodentia	Artiodactyla	Cingulata
Virales	CDV (n=18)	0	10	0	0	0	0	0
	Alfavirus (n=9)	0	0	0	0	0	0	0
	Flavivirus (n=9)	0	0	0	0	0	0	0
	Influenza virus (n=8)	0	0	0	0	0	0	0
	Rabia (n=76)	0	0	0	0	0	0	0
Bacterias	<i>C. perfringens</i> (n= 18)	0	0	0	0	0	1	0
	<i>E. coli</i> (n=18)	1	0	0	0	0	0	0
	<i>K. pneumoniae</i> (n=18)	1	0	0	0	0	0	0
	<i>T. pyogenes.</i> (n=18)	0	0	0	0	1	0	0
	<i>S. aureus</i> (n=18)	1	1	1	0	0	0	0
	<i>Mycobacterium</i> spp. (n=18)	0	0	0	0	0	0	0
Protozoarios	<i>Toxoplasma gondii</i> (n=4)	2	0	0	0	0	0	0
	<i>Trypanosoma</i> spp. (n=14)	0	0	0	3	0	0	0
	<i>Leishmania</i> spp. (n=8)	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Sarcocystis</i> spp. (n=5)	0	1	0	0	0	1	0
Parásitos metazoarios ¹	<i>Angiostrongylus</i> spp.	0	5	0	1	0	0	0
	<i>Dirofilaria</i> spp.	0	4	0	0	0	0	0
	<i>Dipetalonema</i> spp.	5	0	2	0	0	0	0
	<i>Gnathostoma</i> spp.	0	0	0	1	0	0	0
	<i>Baylisascaris</i> spp.	0	1	0	0	0	0	0
	<i>Ancylostoma</i> spp.	0	1	0	0	0	0	0
	<i>Cylicospirura</i> spp.	0	1	0	0	0	0	0
	<i>Prosthenorchis</i> spp.	10	5	0	0	0	0	0
	<i>Macracanthorhynchus</i> spp.	0	1	0	0	0	0	0
	<i>Spirometra</i> spp.	0	2	0	0	0	0	0

n: número de testeados;

¹ solo se muestran los parásitos zoonóticos

Se evaluó la presencia de virus en todas las aves enviadas (n=9), dos de las cuales dieron positivo para flavivirus. Además, tres aves tenían parásitos internos. La mayoría de los patógenos identificados se asociaron directamente como causa de muerte de las aves. Sólo *Procyrnea* spp. identificado en un caso fue un hallazgo incidental. En el 2,3% (2/85) de los casos, las aves presentaron agentes infecciosos con potencial zoonótico como *Contracaecum* spp. Los agentes etiológicos identificados en aves y el número de muestras analizadas se especifican en la Tabla 3.

Tabla 3: Número de agentes infecciosos testeados y positivos en aves según etiología.

Grupo taxonómico / agente infeccioso		Pelecaniformes	Accipitriformes	Anseriformes	Ciconiiformes	Piciformes	Coraciiformes
Virales	Alphaviruses (n=3)	0	0	0	0	0	0
	Flaviviruses (n=3)	2	0	0	0	0	0
	Influenza virus (n=9)	0	0	0	0	0	0
	Newcastle virus (n=9)	0	0	0	0	0	0
Bacterias	<i>C. perfringens</i> (n=1)	0	0	0	0	0	0
	<i>E. coli</i> (n=1)	0	0	0	0	0	0
	<i>K. pneumoniae</i> (n=1)	0	0	0	0	0	0
	<i>Salmonella</i> spp. (n=1)	0	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i> (n=1)	0	0	0	0	0	0
Parásitos metazoarios ¹	<i>Contracaecum</i> spp.	2	0	0	0	0	0

n: número de testeados;

¹ solo se muestran los parásitos zoonóticos

Distribución geoespacial de los agentes infecciosos detectados y su acumulación por región geográfica

Establecimos una distribución de los agentes infecciosos identificados con mayor frecuencia en las muestras analizadas (Fig. 3). En primer lugar, se evidenció una amplia distribución de parásitos zoonóticos en el país. Luego, hubo una acumulación en la región del Pacífico Central de ejemplares con acantocefaliasis (12 con *Prosthenorchis* spp., uno con *Macracanthorhynchus* spp.), y una acumulación de ejemplares con nematodos gastrointestinales en la gran área metropolitana y zonas turísticas de Guanacaste (seis con *Angiostrongylus* spp., uno con *Baylisascaris* spp., uno con *Ancylostoma* spp.). Además, las enfermedades transmitidas por vectores se produjeron exclusivamente en especímenes de regiones costeras y altitudes inferiores a los 300 metros sobre el nivel del mar (11 con filarias, dos con flavivirus). El CDV presente en carnívoros de diversas zonas del país no mostró un patrón específico de distribución (n=10).

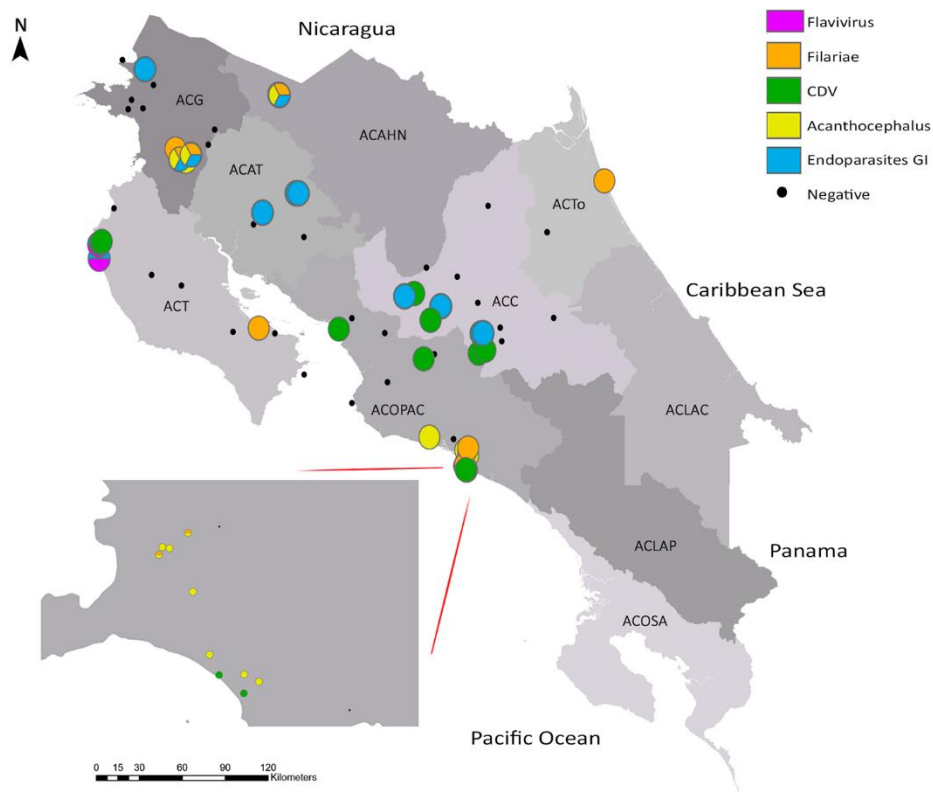


Fig 3. Distribución geográfica de los agentes infecciosos identificados con mayor frecuencia en los especímenes referidos. Los individuos reportados como negativos fueron representados a pesar de que no se detectó el agente infeccioso en los análisis complementarios o no se encontraron lesiones sugestivas de la enfermedad en el análisis anatomopatológico.

Discusión

Los esquemas WHMP han demostrado ser una herramienta fundamental en el monitoreo de patógenos de importancia zoonótica [46–48]. Estos sistemas de vigilancia son aún más críticos en áreas geográficas donde las altas tasas de biodiversidad son prominentes [10]. Por ejemplo, Costa Rica depende económicamente de sus servicios de ecoturismo, y su fauna es uno de sus activos más importantes [49]. Sin embargo, actualmente no existe un sistema de vigilancia epidemiológica dirigido a la vida silvestre para estudiar cualquier brote u otro evento de salud que los involucre.

Además, implementar este tipo de esquemas es fundamental para un país considerado un "punto caliente" para la aparición o emergencia de nuevos agentes infecciosos, sin embargo, encontramos durante esta investigación algunos obstáculos para la implementación en Costa Rica [11,15]. Estos obstáculos se relacionan principalmente con la falta de legislación para la recolección de datos, voluntad de cooperación entre agencias, desincentivos financieros y problemas logísticos para el almacenamiento y transporte de canales, dificultades similares a las descritas por algunos autores [50,51].

La capacidad de almacenamiento y la logística de transporte impactan directamente en los WHMP. Las áreas urbanas con medios de transporte reportaron y despacharon más cadáveres, en contraste con las regiones remotas o de difícil acceso, que tuvieron una menor participación. Estos patrones concuerdan con informes previos que indican que la notificación de la mortalidad o morbilidad de la vida silvestre generalmente depende de la detección inicial de casos por parte del público en general, por lo tanto, los casos detectados están sesgados hacia eventos en áreas pobladas o de fácil acceso [17,52,53]. Sin embargo, esto demuestra que la logística existente en ACC y ACOPAC (áreas urbanas con mayor número de casos notificados) puede utilizarse para mantener el WHMP al menos a nivel regional. Asimismo, es necesario ampliar la red de laboratorios para incluir otras instituciones que tengan capacidad de diagnóstico patológico dentro del esquema WHMP, para reducir la dependencia del almacenamiento y transporte de canales. Se ha demostrado que esta medida mejora la cobertura en regiones distantes y aumenta la notificación de casos [20,46,47,54].

La participación y detección de casos también estuvo limitada por la falta de lineamientos y legislación. Esto significa que el sistema se mantiene por el interés propio de cada funcionario, así como por las relaciones interpersonales de los funcionarios de las diferentes instituciones, lo cual es consistente con los hallazgos de evaluaciones previas de los servicios veterinarios de Costa Rica [29]. Para garantizar la sostenibilidad a largo plazo del WHMP, se necesitan leyes y reglamentos que brinden apoyo financiero y aclaren las funciones específicas de cada institución. Esto podría facilitar la coordinación y cooperación entre instituciones para la notificación y transporte de especímenes [20,46,47,54].

La notificación y derivación de casos dependía en gran medida de los centros de gestión que brindan atención veterinaria a los animales salvajes. Otros estudios han propuesto a estas instituciones como una herramienta indispensable dentro de los WHMP debido a la gran cantidad de información que pueden generar para el sistema [55–57]. La realización de necropsias por parte de los médicos veterinarios de los centros de gestión apoyaría en gran medida la eficiencia y sostenibilidad de este WHMP, reduciendo la demanda de transporte (solo se transportarían muestras, no canales completas) y eliminaría la congelación, facilitando así el diagnóstico. Esto podría incentivar la participación de centros de gestión de regiones lejanas sin capacidad de almacenamiento, aumentando así la cobertura. Sin embargo, son necesarias las normas, manuales y procedimientos previos para los procedimientos de análisis y toma de muestras post mortem, como ocurre con otros esquemas de vigilancia, para no afectar el diagnóstico, ya que el análisis patológico es vital en los esquemas de vigilancia pasiva [17,19,20].

Carnívoros y primates fueron los taxones con mayor representación. Estos datos se pueden asociar a que son animales de tamaño mediano a grande, más carismáticos y con un contacto más significativo de estas especies con los ambientes humanos, facilitando el reconocimiento de las morbilidades y mortalidades por parte de la población [53]. Estos taxones deben ser priorizados en los WHMP, ya que permite optimizar el uso de los recursos porque, además de su fácil detección, son taxones en los que pueden circular diversos agentes patógenos [58,59].

Por el contrario, fue difícil obtener cadáveres de aves viables para el análisis post-mortem debido al grado avanzado de autólisis, desperdiciando importantes recursos de transporte y almacenamiento, un obstáculo experimentado en otros estudios [60]. Las aves silvestres deben ser incluidas en los programas de vigilancia del virus de la influenza y del virus de la enfermedad de Newcastle que se mantiene en los sistemas de producción avícola del país. Esto mantendría el monitoreo como se hace en otros WHMP sin la necesidad de un análisis post-mortem, evitando así el desperdicio de recursos [54].

Además, la mayoría de los casos con causa traumática de muerte presentaban alguna patología infecciosa preexistente. Los animales que viven en libertad están frecuentemente expuestos a agentes infecciosos de forma natural, por lo que es común encontrar lesiones incidentales asociadas en el análisis post-mortem [61–63]. Estos casos permiten la detección de agentes infecciosos en vigilancia pasiva, estén o no asociados con la causa de la muerte [61,64–66]. Por lo tanto, deben mantenerse dentro de los casos a analizar.

La capacidad de diagnóstico previamente implementada, permitió al WHMP detectar agentes infecciosos que pudieran afectar la salud de los animales domésticos, la salud pública y la conservación de especies silvestres, con diversas vías de transmisión como contacto directo, alimentos, agua y vectores. Por ejemplo, nuestro estudio muestra la presencia de agentes infecciosos bacterianos potencialmente zoonóticos clasificados como enfermedades emergentes en algunas regiones [67–69]. Los más relevantes son *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, que se asociaron con enfermedad primaria en algunos de los especímenes analizados. Evidenciando un riesgo latente para la salud pública por el contacto directo o indirecto que se produce a través del manejo de estos animales silvestres. Además, estas bacterias actualmente encabezan la lista de agentes infecciosos con genes de resistencia a antibióticos, por lo que se debe mantener el seguimiento de este tipo de agentes, avalado por la academia, al menos con fines investigativos [28,70–72].

También detectamos enfermedades transmitidas por vectores, que son reconocidas como agentes con potencial epidémico en América Latina debido a las condiciones climáticas, sanitarias y socioeconómicas de las regiones tropicales que favorecen su propagación [73–75]. Identificamos primates, carnívoros y aves con agentes infecciosos de transmisión vectorial, por ejemplo, *Dirofilaria* spp., *Dipetalonema* spp. y flavivirus presentes principalmente en la costa. La mayoría de estos casos provienen de regiones ya definidas como áreas endémicas para estos agentes infecciosos en animales domésticos, lo que revela una posible transmisión por esta vía y un riesgo potencial para la conservación de la especie [76–79].

La detección de estos patógenos transmitidos por vectores también revela un riesgo potencial para la salud pública en lugares con una alta tasa de visitas turísticas en Costa Rica. Este riesgo se ve reforzado por los informes del sistema de salud, que mostraron al menos tres casos de enfermedad en humanos asociados con *Dirofilaria immitis* y casos aislados de filariasis subcutánea [80-82]. Además, detectar mortalidades relacionadas con virus como el del Nilo Occidental en aves silvestres (como posiblemente fue nuestro caso) permite alertas tempranas. Se ha demostrado que existe un mayor riesgo de exposición para las poblaciones humanas cercanas a las regiones donde se produce la mortalidad de las aves silvestres [83,84].

El CDV se detectó con frecuencia en nuestro estudio, lo que refleja la relevancia de este virus en el papel del contagio hacia las especies carnívoras y posiblemente las implicaciones de un contagio hacia los caninos domésticos susceptibles o no vacunados [85–87]. Se han informado brotes endémicos de CDV a lo largo de Costa Rica y América en poblaciones de perros y, más recientemente, se han registrado brotes esporádicos en carnívoros salvajes de áreas urbanas y suburbanas del país [85,88]. Costa Rica no cuenta con datos oficiales sobre la población de perros domésticos. Los datos de inmunidad colectiva en esta población son inciertos, especialmente para perros sin dueño o en áreas no urbanas. De hecho, esto representa un riesgo para los carnívoros salvajes, especialmente en áreas urbanas con poblaciones caninas susceptibles. Además, la posibilidad de transmisión de este virus a otras especies más allá de los carnívoros es una hipótesis que se ha investigado [89]. Dada la alta diversidad de vertebrados presentes en Costa Rica y la alta circulación de CDV detectada, este virus debe ser considerado dentro de los programas de vigilancia epidemiológica.

Además, los parásitos gastrointestinales y pulmonares detectados en este estudio son relevantes para la salud pública y los programas de conservación de la vida silvestre. Por ejemplo, detectamos los nematodos *Angiostrongylus* spp., *Baylisascaris* spp., *Ancylostoma* spp. y *Cylicospirura* spp. en especies de mamíferos ubicadas en áreas densamente pobladas. Detectamos casos con acantocéfalos (*Prosthenorchis* spp., *Macracanthorhynchus* spp.) concentrados en la región del Pacífico Central, y parásitos transmitidos por agua o alimentos acuáticos como el cestodo *Spirometra* spp. en la región norte del país. Este resultado demuestra una herramienta rentable para el WHMP, que no requiere recursos financieros más allá de personal calificado para la identificación morfológica de gusanos y permite la detección de agentes patógenos que afectan principalmente a los niños [90–91]. Este diagnóstico se puede mantener en LANASEVE sin mayores requerimientos económicos.

Este estudio no detectó infecciones por el virus de la rabia. Estos hallazgos están respaldados por estudios previos en animales salvajes en Costa Rica [29]. Sin embargo, se han informado muertes humanas y de ganado asociadas con infecciones de rabia, lo que enfatiza la relevancia de su monitoreo continuo [35,92]. Una situación similar se aplica al virus de Newcastle y la influenza. En nuestras muestras, ninguna de las aves presentó evidencia de enfermedad o signos clínicos asociados, sin embargo, dada la gran relevancia de estas enfermedades para el país y el riesgo para la producción nacional, es recomendable establecer un seguimiento de rutina por parte del organismo de salud animal bajo la responsabilidad de esquema WHMP [32,93]. Incluso sería recomendable incluir en el esquema el seguimiento serológico de tuberculosis y brucelosis de especies silvestres. Estos programas nacionales de vigilancia epidemiológica ya incluyen algunas especies silvestres y la cobertura podría ampliarse [94].

Finalmente, no pudimos identificar la causa de la muerte en algunas de las muestras analizadas. Aunque hicimos pruebas de los principales agentes infecciosos circulantes en Costa Rica, no se obtuvieron datos concluyentes. Se han reportado rangos de 17-22% en estudios patológicos en especies silvestres, donde no se puede determinar el agente causal de la enfermedad, asociado principalmente al grado de autólisis y la complejidad diagnóstica [17,49,59,61]. Estos resultados son consistentes con los porcentajes de ausencia de identificación del agente etiológico en nuestras muestras. Demostrando que, aunque la capacidad de diagnóstico es aceptable, se necesita más trabajo para desarrollar técnicas de diagnóstico sólidas para animales silvestres y que los esfuerzos e incentivos financiados por las autoridades gubernamentales son necesarios para la vigilancia de patógenos en la vida silvestre a través de la implementación consistente de herramientas como la metagenómica de nueva generación [95–98].

Conclusiones y recomendación

Este estudio se realizó como piloto y fue el primer intento estructurado de probar el establecimiento de un esquema de vigilancia epidemiológica pasiva para enfermedades en vertebrados silvestres. Se pudo evidenciar que existe una buena infraestructura dedicada al monitoreo de enfermedades en animales productivos que puede ser utilizada para establecer un WHMP, también que existe suficiente capacidad diagnóstica para la detección de agentes infecciosos en animales silvestres. Y que el país cuenta con herramientas como el SIVE, que le permite al Programa de Vida Silvestre del SENASA

ordenar y administrar la información que genera el WHMP. Este esquema, de mantenerse en el tiempo, permite la toma de decisiones para promover la conservación de las especies, la salud animal y la salud pública al conocer la circulación y comportamiento de estos patógenos, monitorear el estado de salud general de los animales silvestres, así como brindar una alerta temprana de eventos epidémicos [52].

Sin embargo, destaca la necesidad de un compromiso interinstitucional y transinstitucional con la sostenibilidad en el tiempo de este esquema de vigilancia, manteniendo a cada una de las instituciones motivadas y enfocadas en los beneficios más allá de la parte económica. La información generada debe compartirse con las agencias de vida silvestre y salud pública, para que se utilice junto con una estrategia preventiva y un enfoque ONE HEALTH para abordar las enfermedades zoonóticas, facilitando intervenciones de salud pública más específicas, implementando medidas para reducir el riesgo de propagación [20,47,52]. La retroalimentación al personal de campo es crucial para mantener la motivación y la red de detección, como fue en nuestro caso. Esta información generada en este estudio es crítica en regiones con recursos limitados y establecidas como hotspots para las enfermedades infecciosas emergentes debido a su gran biodiversidad y condiciones sociales [10].

Estrategias de comunicación y seguimiento.

- Se dio retroalimentación al personal de centros de manejo y personal de campo, según cada caso remitido por medio de informes con los hallazgos más relevantes.
- Divulgación de los resultados obtenidos por medio de charlas en centros de estudio.
- Presentación en congresos internacionales afines al tema.

Referencias Bibliograficas

1. Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*. 2004; 430:242–9. doi: 10.1038/nature02759 PMID: 15241422.
2. Bloom DE, Cadarette D. Infectious Disease Threats in the Twenty-First Century: Strengthening the Global Response. *Front Immunol*. 2019; 10:549. doi: 10.3389/fimmu.2019.00549 PMID: 30984169.
3. Bakonyi T, Haussig JM. West Nile virus keeps on moving up in Europe. *Euro Surveill*. 2020; 25. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.46.2001938 PMID: 33213684.
4. Barrett ADT. The reemergence of yellow fever. *Science*. 2018; 361:847–8. Epub 2018/08/23. doi: 10.1126/science.aau8225 PMID: 30139914.
5. Viana M, Mancy R, Biek R, Cleaveland S, Cross PC, Lloyd-Smith JO, et al. Assembling evidence for identifying reservoirs of infection. *Trends Ecol Evol (Amst)*. 2014; 29:270–9. doi: 10.1016/j.tree.2014.03.002 PMID: 24726345.
6. Hassell JM, Begon M, Ward MJ, Fèvre EM. Urbanization and Disease Emergence: Dynamics at the Wildlife-Livestock-Human Interface. *Trends Ecol Evol (Amst)*. 2017; 32:55–67. doi: 10.1016/j.tree.2016.09.012 PMID: 28029378.
7. Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging Infect Dis*. 2002; 8:1468–73. doi: 10.3201/eid0812.010317 PMID: 12498665.
8. Reif JS. Animal sentinels for environmental and public health. *Public Health Rep*. 2011; 126 Suppl 1:50–7. doi: 10.1177/003335491112605108 PMID: 21563712.
9. Kowalewski MM, Salzer JS, Deutsch JC, Raño M, Kuhlenschmidt MS, Gillespie TR. Black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) as sentinels of ecosystem health: patterns of zoonotic protozoa infection relative to degree of human-primate contact. *Am J Primatol*. 2011; 73:75–83. doi: 10.1002/ajp.20803 PMID: 20084672.
10. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008; 451:990–3. doi: 10.1038/nature06536 PMID: 18288193.
11. Walsh MG, Sawleshwarkar S, Hossain S, Mor SM. Whence the next pandemic? The intersecting global geography of the animal-human interface, poor health systems and air transit centrality reveals conduits for high-impact spillover. *One Health*. 2020; 11:100177. Epub 2020/10/08. doi: 10.1016/j.onehlt.2020.100177 PMID: 33052311.
12. Engering A, Hogerwerf L, Slingenbergh J. Pathogen-host-environment interplay and disease emergence. *Emerg Microbes Infect*. 2013; 2:e5. Epub 2013/06/02. doi: 10.1038/emi.2013.5 PMID: 26038452.
13. Altizer S, Bartel R, Han BA. Animal migration and infectious disease risk. *Science*. 2011; 331:296–302. doi: 10.1126/science.1194694 PMID: 21252339.
14. Petrovan SO, Aldridge DC, Bartlett H, Bladon AJ, Booth H, Broad S, et al. Post COVID-19: a solution scan of options for preventing future zoonotic epidemics. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2021. Epub 2021/07/07. doi: 10.1111/brv.12774 PMID: 34231315.
15. World Health Organization. Anticipating Emerging Infectious Disease Epidemics. Switzerland: WHO 2015. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/252646/WHO-OHE-PED-2016.2-eng.pdf>.
16. World Organisation for Animal Health. Training manual on surveillance and international reporting of diseases in wild animals second cycle. Workshop for OIE National Focal Points for Wildlife. Paris: OIE 2015. Available from: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/International_Standard_Setting/docs/pdf/WGWildlife/A_Training_Manual_Wildlife_2.pdf.
17. Jonathan M. Sleeman. Strategies for Wildlife Disease Surveillance. United States: U.S. Geological Survey National Wildlife Health Center 2012. Available from: <https://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1981&context=usgsstaffpub>.
18. Vittorio Guberti. Surveillance, monitoring and surveys of wildlife diseases: a public health and conservation approach. Italy: Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy 2014. Available from: <http://www.italian-journal-of-mammalogy.it/Surveillance-monitoring-and-surveys-of-wildlife-diseases-a-public-health-and-conservation,77207,0,2.html>.
19. Lamarque F. Le reseau sagir, reseau national de suivi sanitaire de la faune sauvage française. Paris: Epidémiol. et santé anim 2000. Available from:

https://www.researchgate.net/profile/Marc_Artois/publication/237744255_Le_reseau_SAGIR_reseau_national_de_suivi_sanitaire_de_la_faune_sauvage_francaise/links/00b7d529709d2110a0000000/Le-reseau-SAGIR-reseau-national-de-suivi-sanitaire-de-la-faune-sauvage-francaise.pdf.

20. Leighton FA, Wobeser GA, Barker IK, Daoust PY, Martineau D. The Canadian Cooperative Wildlife Health Centre and surveillance of wild animal diseases in Canada. *Can Vet J.* 1997; 38:279–84.
21. Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela. 2nd ed. Brasília, D.F.: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis; 2014.
22. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Informe de Notificaciones de Enfermedades Denunciadas. Trichinellosis. Argentina: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca 2019. Available from: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/informe_trichinellosis_2010_2019.pdf.
23. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Veterinary public health: progress report on the secretariat's compliance with the mandates of the PAHO governing bodies. México: organización panamericana de la salud 2005. Available from: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/40542/rimsa14-03-e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
24. Rojas H, Romero JR. Where to next with animal health in Latin America? The transition from endemic to disease-free status. *Rev - Off Int Epizoot.* 2017; 36:331–48. doi: 10.20506/rst.36.1.2633 PMID: 28926004.
25. USDA. Report on the Review of Costa Rica's Animal Health Statuses. Estados Unidos: United States Department of Agriculture 2019. Available from: https://www.aphis.usda.gov/import_export/downloads/costarica-status-review.pdf.
26. World Organisation for Animal Health. Informe de Misión Piloto Evaluación PVS “Una Salud”. Paris: OIE 2011. Available from: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Support_to_OIE_Members/pdf/InterimReport-Costa_Rica.pdf.
27. Baldi M, Alvarado G, Smith S, Santoro M, Bolaños N, Jiménez C, et al. *Baylisascaris procyonis* Parasites in Raccoons, Costa Rica, 2014. *Emerging Infect Dis.* 2016; 22:1502–3. doi: 10.3201/eid2208.151627 PMID: 27433741.
28. Baldi M, Barquero Calvo E, Hutter SE, Walzer C. Salmonellosis detection and evidence of antibiotic resistance in an urban raccoon population in a highly populated area, Costa Rica. *Zoonoses Public Health.* 2019; 66:852–60. Epub 2019/07/29. doi: 10.1111/zph.12635 PMID: 31359623.
29. Baldi M, Hernández-Mora G, Jimenez C, Hutter SE, Alfaro A, Walzer C. Leptospira Seroprevalence Detection and Rabies Virus Absence in an Urban Raccoon (*Procyon lotor*) Population in a Highly Populated Area, Costa Rica. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2019; 19:889–95. Epub 2019/08/13. doi: 10.1089/vbz.2019.2444 PMID: 31407956.
30. Chaves A, Piche-Ovares M, Ibarra-Cerdeña CN, Corrales-Aguilar E, Suzán G, Moreira-Soto A, et al. Serosurvey of Nonhuman Primates in Costa Rica at the Human-Wildlife Interface Reveals High Exposure to Flaviviruses. *Insects.* 2021; 12. Epub 2021/06/15. doi: 10.3390/insects12060554 PMID: 34203687.
31. Dolz G, Chaves A, Gutiérrez-Espeleta GA, Ortiz-Malavasi E, Bernal-Valle S, Herrero MV. Detection of antibodies against flavivirus over time in wild non-human primates from the lowlands of Costa Rica. *PLoS One.* 2019; 14:e0219271. doi: 10.1371/journal.pone.0219271 PMID: 31276532.
32. Dubey JP, Morales JA, Sundar N, Velmurugan GV, González-Barrientos CR, Hernández-Mora G, et al. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from Costa Rica. *J Parasitol.* 2007; 93:710–1. doi: 10.1645/GE-1120R.1 PMID: 17626370.
33. Fuentes-Ramírez A, Jiménez-Soto M, Castro R, Romero-Zuñiga JJ, Dolz G. Molecular Detection of *Plasmodium malariae/Plasmodium brasilianum* in Non-Human Primates in Captivity in Costa Rica. *PLoS One.* 2017; 12:e0170704. doi: 10.1371/journal.pone.0170704 PMID: 28125696.
34. González K, Calzada JE, Saldaña A, Rigg CA, Alvarado G, Rodríguez-Herrera B, et al. Survey of wild mammal hosts of cutaneous leishmaniasis parasites in Panamá and Costa Rica. *Trop Med Health.* 2015; 43:75–8. Epub 2014/12/06. doi: 10.2149/tmh.2014-30 PMID: 25859156.
35. Hutter SE, Brugger K, Sancho Vargas VH, González R, Aguilar O, León B, et al. Rabies in Costa Rica: Documentation of the Surveillance Program and the Endemic Situation from 1985 to 2014. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016; 16:334–41. Epub 2016/03/16. doi: 10.1089/vbz.2015.1906 PMID: 26982168.

36. Patiño W LC, Monge O, Suzán G, Gutiérrez-Espeleta G, Chaves A. Molecular Detection of *Mycobacterium avium avium* and *Mycobacterium genavense* in Feces of Free-living Scarlet Macaws (*Ara macao*) in Costa Rica. *J Wildl Dis.* 2018; 54:357–61. doi: 10.7589/2017-05-124 PMID: 29286261.
37. Pérez-Gómez G, Jiménez-Rocha AE, Bermúdez-Rojas T. Parásitos gastrointestinales de aves silvestres en un ecosistema ribereño urbano tropical en Heredia, Costa Rica. *RBT.* 2018; 66:788. doi: 10.15517/rbt.v66i2.33409.
38. Rojas-Jiménez J, Morales-Acuña JA, Argüello-Sáenz M, Acevedo-González SE, Yabsley MJ, Urbina-Villalobos A. Histopathological findings of infections caused by Canine Distemper virus, *Trypanosoma cruzi*, and other parasites in two free-ranging White-nosed Coatis *Nasua narica* (Carnivora: Procyonidae) from Costa Rica. *J Threat Taxa.* 2021; 13:17521–8. doi: 10.11609/jott.5907.13.1.17521-17528.
39. McAloose D, Colegrove KM, Newton AL. *Wildlife Necropsy. Pathology of Wildlife and Zoo Animals.* Elsevier; 2018. pp. 1–20.
40. World Organisation for Animal Health. Training manual on wildlife diseases and surveillance. Workshop for OIE National Focal Points for Wildlife. Paris: OIE 2010. Available from: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/International_Standard_Setting/docs/pdf/WGWildlife/A_Training_Manual_Wildlife.pdf.
41. Woodford MH, Bengis RG, Keet DF. *Post-mortem procedures for wildlife veterinarians and field biologists.* Paris: OIE; 2000.
42. Mehlhorn H. Methods to Diagnose Parasites. In: Mehlhorn H, editor. *Animal Parasites.* Cham: Springer International Publishing; 2016. pp. 23–32.
43. Mehlhorn H. Worms (Helminths). In: Mehlhorn H, editor. *Animal Parasites.* Cham: Springer International Publishing; 2016. pp. 251–498.
44. Mehlhorn H. Worms of Humans. In: Mehlhorn H, editor. *Human Parasites.* Cham: Springer International Publishing; 2016. pp. 135–298.
45. Salfelder K, Liscano TR de, Sauerteig E. Helminthic diseases. In: Salfelder K, Liscano TR de, Sauerteig E, editors. *Atlas of Parasitic Pathology.* Dordrecht: Springer Netherlands; 1992. pp. 96–172.
46. Childs JE, Krebs JW, Real LA, Gordon ER. Animal-based national surveillance for zoonotic disease: quality, limitations, and implications of a model system for monitoring rabies. *Prev Vet Med.* 2007; 78:246–61. Epub 2006/11/28. doi: 10.1016/j.prevetmed.2006.10.014 PMID: 17129622.
47. Moede Rogall G, Sleeman JM. *The USGS National Wildlife Health Center: Advancing wildlife and ecosystem health.* Reston, VA; 2017.
48. Craig Stephen. CWHC annual report 2019/2020. Canada: Canadia Wildlife Health Cooperative 2020. Available from: http://www.cwhc-rcsf.ca/docs/annual_reports/2019_2020_CWHC_Annual_Report_EN.pdf?v=20201207.
49. Benavides Vindas S. El aporte del turismo a la economía costarricense: más de una década después. *Econom y Socied.* 2020; 25:1–29. doi: 10.15359/eyes.25-57.1.
50. Stitt T, Mountifield J, Stephen C. Opportunities and obstacles to collecting wildlife disease data for public health purposes: results of a pilot study on Vancouver Island, British Columbia. *Can Vet J.* 2007; 48:83-7, 89-90. doi: 10.4141/cjas68-011 PMID: 17310627.
51. Don Bamunusinghage Nihal P, Dangolla A, Hettiarachchi R, Abeynayake P, Stephen C. Challenges and opportunities for wildlife disease surveillance in Sri Lanka. *J Wildl Dis.* 2020; 56:538–46. Epub 2020/01/09. doi: 10.7589/2019-07-181 PMID: 31917632.
52. Pewsner M, Origgi FC, Frey J, Ryser-Degiorgis M-P. Assessing Fifty Years of General Health Surveillance of Roe Deer in Switzerland: A Retrospective Analysis of Necropsy Reports. *PLoS One.* 2017; 12:e0170338. Epub 1/19/2017. doi: 10.1371/journal.pone.0170338 PMID: 28103325.
53. Stallknecht DE. Impediments to wildlife disease surveillance, research, and diagnostics. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2007; 315:445–61. doi: 10.1007/978-3-540-70962-6_17 PMID: 17848074.
54. Terrier P, Picard E, Barrat J, Guibe A, Cliquet F. Health monitoring of wildlife in france: SAGIR network and epidemiological monitoring of chiroptera rabies. *France: Académie Vétérinaire de France* 2006. Available from: http://documents.irevues.inist.fr/bitstream/handle/2042/47859/AVF_2006_5_383.pdf?sequence=1.

55. Cox-Witton K, Reiss A, Woods R, Grillo V, Baker RT, Blyde DJ, et al. Emerging infectious diseases in free-ranging wildlife-Australian zoo based wildlife hospitals contribute to national surveillance. PLoS One. 2014; 9:e95127. Epub 2014/05/01. doi: 10.1371/journal.pone.0095127 PMID: 24787430.
56. Gourlay P, Decors A, Moinet M, Lambert O, Lawson B, Beaudeau F, et al. The potential capacity of French wildlife rescue centres for wild bird disease surveillance. Eur J Wildl Res. 2014; 60:865–73. doi: 10.1007/s10344-014-0853-9.
57. Forster G. Evaluating the feasibility of using data and samples provided by wildlife organisations to develop a national wildlife surveillance scheme in Costa Rica. Master Thesis, Univerity of London. 2020.
58. Han BA, Kramer AM, Drake JM. Global Patterns of Zoonotic Disease in Mammals. Trends Parasitol. 2016; 32:565–77. Epub 2016/06/14. doi: 10.1016/j.pt.2016.04.007 PMID: 27316904.
59. Plourde BT, Burgess TL, Eskew EA, Roth TM, Stephenson N, Foley JE. Are disease reservoirs special? Taxonomic and life history characteristics. PLoS One. 2017; 12:e0180716. Epub 2017/07/13. doi: 10.1371/journal.pone.0180716 PMID: 28704402.
60. Balseiro A, Espí A, Márquez I, Pérez V, Ferreras MC, Marín JFG, et al. Pathological features in marine birds affected by the prestige's oil spill in the north of Spain. J Wildl Dis. 2005; 41:371–8. doi: 10.7589/0090-3558-41.2.371 PMID: 16107672.
61. Pedro Enrique Navas-Suárez. Características e possíveis fatores de risco em cervos neotropicais com histórico de trauma e encaminhados ao Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens – LAPCOM, FMVZ, USP, Brasil. Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP. 2016; 14:51–2. Available from: <https://www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/31101>.
62. Lempp C, Jungwirth N, Grilo ML, Reckendorf A, Ulrich A, van Neer A, et al. Pathological findings in the red fox (*Vulpes vulpes*), stone marten (*Martes foina*) and raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*), with special emphasis on infectious and zoonotic agents in Northern Germany. PLoS One. 2017; 12:e0175469. Epub 2017/04/11. doi: 10.1371/journal.pone.0175469 PMID: 28399176.
63. Navas-Suárez PE, Díaz-Delgado J, Fernandes-Santos RC, Testa-José C, Silva R, Sansone M, et al. Pathological Findings in Lowland Tapirs (*Tapirus terrestris*) Killed by Motor Vehicle Collision in the Brazilian Cerrado. J Comp Pathol. 2019; 170:34–45. Epub 2019/06/12. doi: 10.1016/j.jcpa.2019.05.004 PMID: 31375157.
64. Navas-Suárez P, Díaz-Delgado J, Matushima ER, Fávero CM, am Sánchez Sarmiento, Sacristán C, et al. A retrospective pathology study of two Neotropical deer species (1995-2015), Brazil: Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) and brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). PLoS One. 2018; 13:e0198670. Epub 2018/06/07. doi: 10.1371/journal.pone.0198670 PMID: 29879222.
65. Navas-Suárez PE, Sacristán C, Díaz-Delgado J, Yogui DR, Alves MH, Fuentes-Castillo D, et al. Pulmonary adiaspiromycosis in armadillos killed by motor vehicle collisions in Brazil. Sci Rep. 2021; 11:272. Epub 2021/01/11. doi: 10.1038/s41598-020-79521-6 PMID: 33432031.
66. Nettles VF, Quist CF, Lopez RR, Wilmers TJ, Frank P, Roberts W, et al. Morbidity and mortality factors in key deer (*Odocoileus virginianus clavium*). J Wildl Dis. 2002; 38:685–92. doi: 10.7589/0090-3558-38.4.685 PMID: 12528433.
67. Rodriguez-Villar S, Fife A, Baldwin C, Warne RR. Antibiotic-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* causing community- acquired liver abscess: an emerging disease. Oxf Med Case Reports. 2019; 2019:omz032. Epub 2019/05/31. doi: 10.1093/omcr/omz032 PMID: 31198568.
68. Greig J, Rajić A, Young I, Mascarenhas M, Waddell L, LeJeune J. A scoping review of the role of wildlife in the transmission of bacterial pathogens and antimicrobial resistance to the food Chain. Zoonoses Public Health. 2015; 62:269–84. Epub 2014/08/30. doi: 10.1111/zph.12147 PMID: 25175882.
69. Heaton CJ, Gerbig GR, Sensius LD, Patel V, Smith TC. *Staphylococcus aureus* Epidemiology in Wildlife: A Systematic Review. Antibiotics (Basel). 2020; 9. Epub 2020/02/18. doi: 10.3390/antibiotics9020089 PMID: 32085586.
70. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. Front Microbiol. 2019; 10:539. Epub 2019/04/01. doi: 10.3389/fmicb.2019.00539 PMID: 30988669.

71. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018; 18:318–27. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
72. Blanco-Peña K, Esperón F, Torres-Mejía AM, La Torre A de, La Cruz E de, Jiménez-Soto M. Antimicrobial Resistance Genes in Pigeons from Public Parks in Costa Rica. *Zoonoses Public Health*. 2017; 64:e23-e30. Epub 2017/02/24. doi: 10.1111/zph.12340 PMID: 28233464.
73. Grillet ME, Hernández-Villena JV, Llewellyn MS, Paniz-Mondolfi AE, Tami A, Vincenti-Gonzalez MF, et al. Venezuela's humanitarian crisis, resurgence of vector-borne diseases, and implications for spillover in the region. *The Lancet Infectious Diseases*. 2019; 19:e149-e161. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30757-6.
74. World Health Organization. A global brief on vector-borne diseases. Switzerland: WHO 2014. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/111008/WHO_DCO_WHD_2014.1_eng.pdf.
75. Dujardin J-C, Herrera S, do Rosario V, Arevalo J, Boelaert M, Carrasco HJ, et al. Research priorities for neglected infectious diseases in Latin America and the Caribbean region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4:e780. Epub 2010/10/26. doi: 10.1371/journal.pntd.0000780 PMID: 21049009.
76. Montenegro VM, Bonilla MC, Kaminsky D, Romero-Zúñiga JJ, Siebert S, Krämer F. Serological detection of antibodies to *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia canis* and of *Dirofilaria immitis* antigen in dogs from Costa Rica. *Vet Parasitol*. 2017; 236:97–107. Epub 2017/02/14. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.02.009 PMID: 28288773.
77. Rojas A, Rojas D, Montenegro VM, Baneth G. Detection of *Dirofilaria immitis* and other arthropod-borne filarioids by an HRM real-time qPCR, blood-concentrating techniques and a serological assay in dogs from Costa Rica. *Parasit Vectors*. 2015; 8:170. Epub 2015/03/23. doi: 10.1186/s13071-015-0783-8 PMID: 25851920.
78. León B, Käsbohrer A, Hutter SE, Baldi M, Firth CL, Romero-Zúñiga JJ, et al. National Seroprevalence and Risk Factors for Eastern Equine Encephalitis and Venezuelan Equine Encephalitis in Costa Rica. *J Equine Vet Sci*. 2020; 92:103140. Epub 2020/06/02. doi: 10.1016/j.jevs.2020.103140 PMID: 32797803.
79. Calderón-Arguedas O, Troyo A, Solano ME, Avendaño A, Beier JC. Urban mosquito species (Diptera: Culicidae) of dengue endemic communities in the Greater Puntarenas area, Costa Rica. *Rev Biol Trop*. 2009; 57:1223–34. doi: 10.15517/rbt.v57i4.5459 PMID: 20073347.
80. Brenes R, Beaver PC, Monge E, Zamora L. Pulmonary dirofilariasis in a Costa Rican man. *Am J Trop Med Hyg*. 1985; 34:1142–3. doi: 10.4269/ajtmh.1985.34.1142 PMID: 3834799.
81. Rodríguez B, Arroyo R, Caro L, Orihel TC. Human dirofilariasis in Costa Rica. A report of three new cases of *Dirofilaria immitis* infection. *Parasite*. 2002; 9:193–5.
82. Olivo CA, Gundacker ND, Murillo J, Weiss SD, Suarez D, Suarez JA. Subcutaneous Dirofilariasis in a Returning Traveler From Costa Rica. *Infect Dis Clin Pract*. 2019; 27:58–60. doi: 10.1097/IPC.0000000000000679.
83. Johnson G, Nemeth N, Hale K, Lindsey N, Panella N, Komar N. Surveillance for West Nile virus in American white pelicans, Montana, USA, 2006–2007. *Emerging Infect Dis*. 2010; 16:406–11. doi: 10.3201/eid1603.090559 PMID: 20202414.
84. Johnson G, Panella N, Hale K, Komar N. Detection of West Nile virus in stable flies (Diptera: Muscidae) parasitizing juvenile American white pelicans. *J Med Entomol*. 2010; 47:1205–11. doi: 10.1603/ME10002 PMID: 21175073.
85. Piche M, Alfaro A, Jiménez-Soto M, Murcia P, Jiménez C. Caracterización molecular de dos brotes de Distemper Canino en animales de vida silvestre en Costa Rica. *Ciencias Veterinarias*. 2019; 36:38. doi: 10.15359/rcv.36-3.27.
86. Kapil S, Yeary TJ. Canine Distemper spillover in domestic dogs from urban wildlife. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2011; 41:1069–86. doi: 10.1016/j.cvsm.2011.08.005 PMID: 22041204.
87. Viana M, Cleaveland S, Matthiopoulos J, Halliday J, Packer C, Craft ME, et al. Dynamics of a morbillivirus at the domestic-wildlife interface: Canine Distemper virus in domestic dogs and lions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112:1464–9. Epub 2015/01/20. doi: 10.1073/pnas.1411623112 PMID: 25605919.
88. Rendon-Marin S, Martinez-Gutierrez M, Suarez JA, Ruiz-Saenz J. Canine Distemper Virus (CDV) Transit Through the Americas: Need to Assess the Impact of CDV Infection on Species Conservation. *Front Microbiol*. 2020; 11:810. Epub 2020/05/21. doi: 10.3389/fmicb.2020.00810 PMID: 32508760.

89. Beineke A, Baumgärtner W, Wohlsein P. Cross-species transmission of Canine Distemper virus-an update. *One Health*. 2015; 1:49–59. Epub 2015/09/13. doi: 10.1016/j.onehlt.2015.09.002 PMID: 28616465.
90. Stunkard hw. New intermediate hosts in the life cycle of *Prosthenorchis Elegans* (diesing, 1851), an acanthocephalan parasite of primates. *J Parasitol*. 1965; 51:645–9.
91. Mathison BA, Bishop HS, Sanborn CR, Dos Santos Souza S, Bradbury R. *Macracanthorhynchus ingens* Infection in an 18-Month-Old Child in Florida: A Case Report and Review of Acanthocephaliasis in Humans. *Clin Infect Dis*. 2016; 63:1357–9. Epub 2016/08/07. doi: 10.1093/cid/ciw543 PMID: 27501844.
92. Badilla X, Pérez-Herra V, Quirós L, Morice A, Jiménez E, Sáenz E, et al. Human rabies: a reemerging disease in Costa Rica. *Emerging Infect Dis*. 2003; 9:721–3. doi: 10.3201/eid0906.020632 PMID: 12781014.
93. Hernandez SM, Peters VE, Weygandt PL, Jimenez C, Villegas P, O'Connor B, et al. Do shade-grown coffee plantations pose a disease risk for wild birds. *Ecohealth*. 2013; 10:145–58. Epub 2013/05/02. doi: 10.1007/s10393-013-0837-3 PMID: 23636482.
94. Hernández-Mora G, Bonilla-Montoya R, Barrantes-Granados O, Esquivel-Suárez A, Montero-Caballero D, González-Barrientos R, et al. Brucellosis in mammals of Costa Rica: An epidemiological survey. *PLoS One*. 2017; 12:e0182644. Epub 2017/08/09. doi: 10.1371/journal.pone.0182644 PMID: 28793352.
95. Lipkin WI. The changing face of pathogen discovery and surveillance. *Nat Rev Microbiol*. 2013; 11:133–41. Epub 2013/01/03. doi: 10.1038/nrmicro2949 PMID: 23268232.
96. Gardy JL, Loman NJ. Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system. *Nat Rev Genet*. 2018; 19:9–20. Epub 2017/11/13. doi: 10.1038/nrg.2017.88. PMID: 29129921.
97. Mishra N, Fagbo SF, Alagaili AN, Nitido A, Williams SH, Ng J, et al. A viral metagenomic survey identifies known and novel mammalian viruses in bats from Saudi Arabia. *PLoS One*. 2019; 14:e0214227. Epub 2019/04/10. doi: 10.1371/journal.pone.0214227. PMID: 30969980.
98. Gu W, Deng X, Lee M, Sucu YD, Arevalo S, Stryke D, et al. Rapid pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids. *Nat Med*. 2021; 27:115–24. Epub 2020/11/09. doi: 10.1038/s41591-020-1105-z PMID: 33169017.