



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Prevalencia de *Salmonella* spp. en tlacuaches (*Didelphis virginiana*) en zonas urbanas y periurbanas de la ciudad de Santiago de Querétaro.

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

MVZ Gabriela Arteaga Salazar

Dirigido por

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Santiago de Querétaro, Querétaro

Diciembre del 2017



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Biológicas

Prevalencia de *Salmonella* spp. en tlacuaches (*Didelphis virginiana*) en zonas urbanas y periurbanas de la ciudad de Santiago de Querétaro.

Opción de titulación
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biológicas

Presenta:
MVZ Gabriela Arteaga Salazar

Dirigido por:
Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez
Presidente

Firma

Dr. Carlos Alberto López González
Secretario

Firma

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales
Vocal

Firma

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú
Suplente

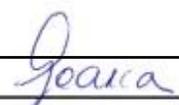
Firma

M. en C. Alejandra Sánchez Cervantes
Suplente

Firma

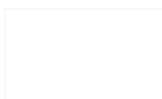


Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Directora de la Facultad de Ciencias Naturales



Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre del 2017



RESUMEN

El objetivo de este proyecto fue determinar la prevalencia de *Salmonella* spp. en tlacuaches (*Didelphis virginiana*) de zonas urbanas y periurbanas de la ciudad de Santiago de Querétaro. Se capturaron 45 ejemplares de agosto a diciembre del 2016, en zonas periurbanas ("Zibatá" y Parque Nacional El Cimatario), y en zona urbana (campus Centro Universitario de la UAQ "CU" y Cerro de las Campanas "CC"). La contención física se hizo con trampas Tomahawk, utilizando como atrayente sardina comercial; y la contención química mediante Tiletamina/Zolazepam (Zoletil®). A cada uno se le tomó frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, temperatura, sexo, peso y longitudes total, corporal, del pie y de la oreja. Se determinó la edad de cada individuo utilizando fórmula dentaria, talla y peso; se obtuvieron hisopados cloacales y heces. Al terminar los animales fueron liberados en el sitio de captura. La identificación del microorganismo se hizo por PCR en punto final y aislamiento microbiológico. Como resultado, sin incluir a PANEC por ser muy pequeño el número de ejemplares capturados (n=5), 23 individuos fueron positivos, correspondiendo a una prevalencia general de *Salmonella* spp. de 57.5 %, sin embargo Zibatá y CU-CC tuvieron diferencias significativas ($P < 0.05$) con 40 % (8/20) y 75 % (15/20) respectivamente. No obstante, la excreción de *Salmonella* spp. no está relacionado con el peso, la talla, la edad o el sexo de los individuos ($P > 0.05$). Así mismo las constantes fisiológicas no tienen diferencias significativas entre individuos positivos y negativos. Más del 50 % de los tlacuaches excretan *Salmonella*, siendo mayor la prevalencia en zona urbana.

(Palabras clave: *Salmonella*, patógenos zoonóticos, tlacuache, prevalencia, urbano, periurbano)

SUMMARY

The objective of this project was to determine the prevalence of *Salmonella* spp. in opossums (*Didelphis virginiana*) from urban and periurban areas of the city of Santiago de Querétaro. A total of 45 specimens were collected from August to December of 2016 in periurban areas ("Zibatá" and Parque Nacional El Cimatario), and in urban areas (Centro Universitario of the UAQ "CU" and Cerro de las Campanas "CC"). The physical containment was made with Tomahawk traps, using as attractant commercial sardine; and chemical containment by Tiletamine / Zolazepam (Zoletil®). Each was given heart rate, respiratory rate, temperature, sex, weight and total length, body length, foot length and ear length. The age of each individual was determined with the dental formula, body length and weight; cloacal swabs and feces were obtained. At the end the animals were released at the capture site. Identification of the microorganism was done by end-point PCR and microbiological isolation. As a result, not including a PANEC because the number of specimens captured was small (n=5), 23 individuals were positive, corresponding to a general prevalence of *Salmonella* spp. of 57.5%, however, Zibatá and CU-CC had significant differences ($P < 0.05$) with 40% (8/20) and 75% (15/20) respectively. However, the excretion of *Salmonella* spp. is not related to weight, body length, age or sex of the individuals ($P > 0.05$). Also the physiological constants do not have significant differences between positive and negative individuals. More than 50% of the tlacuaches excrete *Salmonella*, being the greater the prevalence in urban zone.

(**Key words:** *Salmonella*, zoonotic pathogens, opossum, prevalence, urban, peri-urban)

DEDICATORIA

A mis padres Rocío Salazar Cambrón y Juan Arteaga Banda.

A Alejandra, Liliana, Eduardo, Beatriz, Luis Eduardo, Miguel Ángel, Emiliano, María Helena, Irina Almudena, Mariana y Diego, con cariño.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que siempre me impulsan a ser una mejor persona, me brindan su amor y apoyo incondicionales en cada paso de mi vida, guiándome con su ejemplo.

A Ale, Lilí, Lalo, Bety y compañía por su amor, apoyo y ejemplo que me transmiten diariamente.

A MVZ Diego Aguillón por ser parte de mi vida, por el apoyo e impulso que me da tanto en el plano personal como profesional, así como por su invaluable participación durante todo el trabajo de campo.

A la Dra. Andrea M. Olvera Ramírez por confiar en mí para la realización de este proyecto que dirigió y financió, así como todo el conocimiento que me ha transmitido sin recelo.

A mi comité tutorial: Dr. Carlos A. López González, Dr. Gerardo M. Nava González, Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú y M. en C. Alejandra Sánchez Cervantes por apoyarme durante el desarrollo del proyecto que culmina con esta tesis, sus enseñanzas se quedan conmigo.

A Carlos Molina y Luz Salas por su apoyo incondicional e innumerables consejos durante la aplicación de las técnicas moleculares, así como por hacer muy agradable el trabajo en laboratorio.

A los alumnos voluntarios, MSPAS Xiao Puón y MVZ Ricardo García por su apoyo durante el trabajo de campo.

A Ricardo Ahumada y Yajaira Esquivel por sus enseñanzas y apoyo durante la aplicación de las técnicas microbiológicas y moleculares.

A M. en C. Adriana González Gallardo, Unidad de Proteogenómica, Instituto de Neurobiología-UNAM, por su apoyo durante la estandarización de las técnicas moleculares.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por ser mi alma máter y por permitir las capturas en las instalaciones del Centro Universitario.

A los maestros que me brindaron su conocimiento y contribuyeron a mi formación académica en las distintas materias que me impartieron.

Al personal del Parque Nacional El Cimatario, por permitir las capturas en las instalaciones y por todo el apoyo otorgado durante ellas.

Al grupo PANGEA-SUPRATERRA, por permitir las capturas en Zibatá.

A la Secretaría de Servicios Públicos Municipales por permitir las capturas en el Cerro de las Campanas.

A la Red Temática: Biología, Manejo y Conservación de la Fauna Nativa en Ambientes Antropizados (REFAMA) por su apoyo durante las capturas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar mi maestría.

CONTENIDO

RESUMEN	1
SUMMARY	2
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
I. INTRODUCCIÓN	14
II. REVISIÓN DE LITERATURA	16
2.1 MEDICINA DE LA CONSERVACIÓN	16
2.2 ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN FAUNA SILVESTRE	17
2.3 TLACUACHES (<i>DIDELPHIS VIRGINIANA</i>)	19
2.3.1 Clasificación taxonómica (Cuarón <i>et al.</i> , 2008)	19
2.3.2 Generalidades	20
2.3.3 Distribución.....	20
2.3.4 Hábitat	20
2.3.5 Alimentación	21
2.3.6 Tracto gastrointestinal y microbiota	21
2.3.7 Comportamiento reproductivo.....	24
2.3.8 Relevancia de la especie	24
2.3.9 Aislamiento de <i>Salmonella</i> spp. en tlacuaches	25
2.4 GÉNERO <i>SALMONELLA</i>	26
2.4.1 Etiología y clasificación.....	26
2.4.2 Características del género <i>Salmonella</i>	28
2.4.3 Salmonelosis	29
2.4.4 Epidemiología.....	30
2.4.5 Hospederos	32
2.4.6 Factores de virulencia.....	32

2.4.7	Patogenia	37
2.4.8	Diagnóstico de <i>Salmonella</i> spp.....	39
III.	JUSTIFICACIÓN	45
IV.	HIPÓTESIS.....	47
V.	OBJETIVOS	48
5.1	OBJETIVO GENERAL:	48
5.2	OBJETIVOS PARTICULARES:	48
5.2.1	Detectar la presencia de <i>Salmonella</i> spp. en los individuos muestreados mediante técnicas microbiológicas y moleculares.....	48
5.2.2	Obtener información general sobre el estado de salud de los tlacuaches.....	48
5.2.3	Determinar si hay diferencia en la prevalencia de <i>Salmonella</i> spp. en zona urbana respecto a la zona periurbana.	48
VI.	METODOLOGÍA.....	49
6.1	ÁREA DE ESTUDIO.....	49
6.2	MODELO DE ESTUDIO	49
6.3	CAPTURAS.....	50
6.4	MANEJO INICIAL.....	50
6.5	TOMA DE MUESTRAS	51
6.6	MANEJO PRE-LIBERACIÓN.....	52
6.7	MANEJO DE HEMBRAS CON CRÍAS.....	52
6.8	ANÁLISIS DE LABORATORIO.....	53
6.8.1	Pre enriquecimiento de los hisopos cloacales	53
6.8.2	Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> spp. a partir de pre enriquecimientos.....	54
6.8.3	Extracción de ADN de muestras fecales, preenriquecimientos, cultivos bacterianos y muestras sanguíneas.....	54
6.8.4	Estandarización de PCR en punto final.....	57

6.8.5	Amplificación por PCR en punto final de <i>Salmonella enterica</i>	60
6.8.6	Visualización de DNA y productos de PCR.....	65
6.8.7	Secuenciación de productos de PCR obtenidos	66
6.8.8	Procesamiento de muestras sanguíneas	66
6.9	MANEJO DE RESIDUOS PELIGROSOS, BIOLÓGICO-INFECIOSOS	66
6.10	DETERMINACIÓN DE LA EDAD	67
6.11	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	68
VII.	RESULTADOS.....	69
7.1	PROPORCIÓN DE SEXOS	69
7.2	MORFOMETRÍA Y CONSTANTES FISIOLÓGICAS	70
7.3	PREVALENCIA DE <i>SALMONELLA</i> SPP.....	79
7.4	HEMOGRAMAS.....	85
VIII.	DISCUSIÓN	91
IX.	CONCLUSIONES	99
X.	RECOMENDACIONES.....	99
XI.	LITERATURA CITADA.....	100
XII.	APÉNDICES	110
12.1	GELES.....	110
12.2	DETERMINACIÓN DE POSITIVOS	113
12.3	SECUENCIACIÓN.....	114
12.4	MORFOMETRÍA Y CONSTANTES FISIOLÓGICAS	116
12.5	HEMOGRAMAS.....	119

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Determinación de la edad en tlacuaches de acuerdo a la fórmula dentaria.....	23
Cuadro 2. Serogrupos y serotipos de las cepas de <i>Salmonella</i>	28
Cuadro 3. Pruebas bioquímicas para identificación del género <i>Salmonella</i>	40
Cuadro 4. Comparación de diversas técnicas para identificación de <i>Salmonella</i> spp.....	42
Cuadro 5. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para cada gen amplificado.....	60
Cuadro 6. Mezcla por reacción de PCRpf con kit Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA).....	61
Cuadro 7. Mezcla por reacción de PCRpf con kit Maxima Hot Start PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, USA).....	62
Cuadro 8. Mezcla por reacción de PCRpf con kit Phusion Hot Start II (Thermo Scientific, USA).....	63
Cuadro 9. Programa de amplificación de PCRpf para gen 16S rRNA, con kit Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA).	63
Cuadro 10. Programa de amplificación de PCRpf para gen <i>invA</i> , con kit Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA).....	64
Cuadro 11. Programa de amplificación de PCRpf para gen <i>invA</i> , con kit Maxima Hot Start PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, USA).....	64
Cuadro 12. Programa de amplificación de PCRpf para gen <i>invA</i> , con kit Phusion Hot Start II (Thermo Scientific, USA).....	65

Cuadro 13. Erupción dentaria en <i>Didelphis virginiana</i> con detalle de reemplazo del tercer premolar desiduo (D) para clasificación, en juveniles y adultos, de los ejemplares capturados.....	67
Cuadro 14. Media y desviación estándar de medidas corporales y del peso de tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) para Zibatá, CU-CC y en ambos sitios (General) de acuerdo a categorías de sexo y edad.	71
Cuadro 14.1 Valores de <i>P</i> obtenidos para las medidas corporales y el peso de tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) de acuerdo a categorías de sitio, sexo, edad, lesiones así como las interacciones entre ellas.....	72
Cuadro 15. Media y desviación estándar (DE \pm) de constantes fisiológicas de tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) de acuerdo al sexo.....	78
Cuadro 16. Prevalencia y frecuencias de positivos y negativos a <i>Salmonella</i> spp. en tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) para Zibatá, CU-CC y en ambos sitios (General)....	79
Cuadro 17. Relación entre la presencia de <i>Salmonella</i> spp. y lesiones en tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) hembras y machos en general.	80
Cuadro 18. Relación entre la presencia de <i>Salmonella</i> spp. y lesiones en tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) adultos y juveniles en general.	80
Cuadro 19. Relación entre la presencia de <i>Salmonella</i> spp. y lesiones en tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) de CU-CC y de Zibatá.	81
Cuadro 20. Media y desviación estándar del peso, las medidas corporales, la temperatura y las constantes fisiológicas de los tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) positivos y negativos a <i>Salmonella</i> spp. en Zibatá, en CU-CC y en ambos sitios (General).	82
Cuadro 21. Media y desviación estándar de los valores obtenidos de los hemogramas de los tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) positivos y negativos a <i>Salmonella</i> spp. en Zibatá, en CU-CC y en ambos sitios (General).	83

Cuadro 21.1 Valores de <i>P</i> obtenidos para los valores obtenidos en las biometrías de los tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) de acuerdo a categorías de sitio, sexo, edad, lesiones así como las interacciones entre ellas.....	84
Cuadro 22. Media y desviación estándar de valores obtenidos en los hemogramas de tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) hembras y machos de Zibatá, CU-CC y en ambos sitios (General).....	86
Cuadro 22.1 Media y desviación estándar de valores obtenidos en los hemogramas de tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) hembras y machos de Zibatá, CU-CC y en ambos sitios (General).	87
Cuadro 23. Determinación de positivos por comparativo de resultados de la detección molecular en las distintas muestras.	113
Cuadro 24. Relación del sexo, edad, constantes fisiológicas, presencia de lesiones y detección de <i>Salmonella enterica</i> obtenidos de los tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) capturados.....	116
Cuadro 25. Relación del peso y longitudes obtenidos de los tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) capturados.....	117
Cuadro 26. Relación de los valores de los eritrogramas obtenidos de los tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) capturados.	119
Cuadro 27. Relación de los valores de los leucogramas obtenidos de los tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) capturados.	120

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del tracto gastrointestinal de <i>Didelphis virginiana</i> (Armati <i>et al.</i> , 2006).....	22
Figura 2. Esquema de especies y subespecies de <i>Salmonella</i> , por clasificación Kauffmann-White (Lim y Thong, 2009).....	27
Figura 3. Distribución entre los animales de los serotipos de <i>Salmonella</i> más comunes aislados en humanos en Estados Unidos. Modificado de Hoelzer <i>et al.</i> (2011).	31
Figura 4. Factores de virulencia de <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Salmonella</i> Typhi (de Jong <i>et al.</i> , 2012).	34
Figura 5. Diseminación de <i>Salmonella</i> Typhi durante una infección sistémica (de Jong <i>et al.</i> , 2012).	38
Figura 6. Gradiente de temperatura de 55 a 65 °C con oligonucleótidos invA y ADN de <i>Salmonella</i> Typhimurium.	58
Figura 7. Gradiente de temperatura de 55 a 64.5 °C con oligonucleótidos invA y ADN de heces An 1 y 2.	59
Figura 8. Resultados PCR en punto final con oligonucleótidos invA, controles positivos y pool de ADN de heces de tlacuache.	59
Figura 9. Porcentaje (%) de hembras y machos de tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) en ambos sitios (General) y para cada sitio de captura (Zibatá, CU-CC).	69
Figura 10. Peso promedio en gramos (A) y Longitud corporal promedio en mm (B) de tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) para Zibatá, CU-CC y en ambos sitios (General)....	73
Figura 11. Relación del peso y la longitud (Long.) corporal de tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) hembras (A) y machos (B) en Zibatá y CU-CC.	75
Figura 12. Frecuencias.....	76

Figura 13. Frecuencia de ejemplares <i>D. virginiana</i> adultos y juveniles con lesiones en la piel (laceraciones y abrasiones) para Zibatá, CU-CC y en ambos sitios (General).....	76
Figura 14. Número de tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) positivos y negativos para Zibatá, CU-CC y en ambos sitios (General).	80
Figura 15. Promedios obtenidos en los eritogramas de tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) positivos y negativos en cada sitio de captura y en general.	89
Figura 16. Promedios obtenidos en los leucogramas de tlacuaches (<i>D. virginiana</i>) positivos y negativos en cada sitio de captura y en general.	90
Figura 17. Resultados de la PCR en punto final con oligonucleótidos invA (A) y MIN (B), de los aislamientos presuntamente positivos a partir de hisopados cloacales de Tlacuaches.	110
Figura 18. Resultados de la PCR en punto final utilizando oligonucleótidos invA3 en las muestras sanguíneas de PANEC.	111
Figura 19. Resultados de la PCR en punto final utilizando oligonucleótidos invA3 de las muestras sanguíneas.	111
Figura 20. Resultados de la PCR en punto final utilizando oligonucleótidos invA3 en las muestras fecales de los tlacuaches capturados en Zibatá.	112
Figura 21. Resultados de la PCR en punto final utilizando oligonucleótidos invA3 en las muestras fecales de los tlacuaches capturados en PANEC y CU-CC.....	112
Figura 22. Representación gráfica de los resultados de la búsqueda en la base de datos de GenBank mediante el uso del algoritmo BLAST.	115

I. INTRODUCCIÓN

El aumento de la población humana, especialmente en las zonas urbanas, ha derivado en la ocupación de áreas naturales. De esta manera se ha incrementado el contacto entre la fauna nativa desplazada, los animales domésticos y el hombre. En consecuencia, el riesgo de transmisión de enfermedades entre ellos se ha elevado, pues la relación entre los múltiples factores propios del agente causal, el hospedero susceptible y el hábitat se ven afectados por el impacto antropogénico (Weiss, 2001; Medina-Vogel, 2010).

Con el fin de prevenir enfermedades que puedan representar un problema para la salud pública en un futuro, es importante generar información sobre los agentes patógenos presentes en la fauna silvestre. Todo el conocimiento obtenido al respecto es relevante debido a que de 1415 especies de organismos infecciosos identificados como patógenos para los humanos, 868 (61 %) son zoonóticos (que se pueden transmitir de los animales domésticos o silvestres a los humanos), de los cuales 31 % son bacterias (Taylor *et al.*, 2001).

Entre los agentes infecciosos de carácter zoonótico más importantes se encuentra *Salmonella* spp. y se ha estimado que 93.8 millones de casos de gastroenteritis debidos a las especies de *Salmonella* ocurren a nivel mundial cada año, con 155,000 muertes (Majowicz *et al.*, 2010). Esta bacteria es de especial importancia por su capacidad de mantenerse en múltiples hospederos, que incluyen animales tanto domésticos como silvestres, entre ellos el tlacuache, *Didelphis virginiana* (Hoelzer *et al.*, 2011). Esta especie silvestre de hábitos de alimentación generalistas se ha adaptado muy bien al entorno humano, lo que lo hace un modelo muy apropiado para este estudio.

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y de acuerdo al esquema Kauffmann-White se divide en dos especies *S. bongori* y *S. enterica*, que cuenta con 6 subespecies. Se han registrado más de 2,600 serotipos (Barrow y Methner, 2013) que pueden ser de hospedador restringido, de hospedador específico o generalistas (Murray *et al.*, 2009; Hoelzer *et al.*, 2011).

Los serotipos más frecuentes aislados en humanos en México son: Typhimurium, Enteritidis, Derby, Agona y Anatum (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000).

El presente trabajo tuvo la finalidad de obtener la prevalencia de *Salmonella* spp. En *Didelphis virginiana* que habitan en zonas urbanas y periurbanas de la ciudad de Santiago de Querétaro.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Medicina de la conservación

La medicina de la conservación es la unión de las disciplinas de la salud y la ecología, por ello se enfoca en el estudio del contexto ecológico de la salud y la solución de sus problemas. Examina la relación entre el cambio climático, la calidad del hábitat, el uso del suelo, el impacto de la diversidad y rareza de las especies sobre el mantenimiento y transmisión de enfermedades así como la emergencia y re-emergencia de agentes infecciosos, parásitos y contaminantes ambientales y desde luego, el mantenimiento de la biodiversidad y funciones de los ecosistemas, dado que son el sustento de la salud de las comunidades de plantas y animales incluyendo a los humanos (Aguirre *et al.*, 2012).

En este sentido, es importante el estudio de las enfermedades infecciosas, que son aquellas causadas por microorganismos patógenos que pueden ser bacterias, virus, parásitos u hongos (OMS, 2017). Éstas son transmisibles cuando el agente o sus productos tóxicos, pueden pasar de una persona, animal o reservorio a un hospedero susceptible, en forma directa o indirecta (Uribarren, 2016).

Thruessfield (2007) indica que la transmisión de las enfermedades infecciosas puede ser de manera horizontal o vertical. La primera es la que ocurre de cualquier segmento de la población a otro y puede ser de forma directa, por contacto físico de un hospedero susceptible con uno infectado o con sus descargas infectadas, o indirecta, cuando existe un intermediario vivo o inanimado. La segunda es la que se da de una generación a la siguiente y puede ser hereditaria, portada dentro del genoma de cualquiera de los padres, o congénita, presente al momento del nacimiento, es decir adquirida en el útero o en el huevo.

2.2 Enfermedades infecciosas en fauna silvestre

Las enfermedades infecciosas en especies silvestres existen debido a la relación de factores climáticos, geográficos y ecológicos específicos, que al ser alterados tienen el potencial de modificar su epidemiología (Medina-Vogel, 2010). El impacto ambiental antropogénico ocasiona la fragmentación del hábitat, lo que puede influir en la transmisión de agentes patógenos.

En México existe poca información sobre la prevalencia de infecciones en el ámbito silvestre y no están consideradas dentro de los programas gubernamentales de monitoreo sistemático; no obstante deberían formar parte de ellos y de los programas de conservación de la fauna silvestre, ya que los agentes patógenos están integrados a los ecosistemas y tienen efectos reguladores sobre las poblaciones de sus huéspedes (Ruiz *et al.*, 2011). Además, existen epidemias, que son ocurrencias de una enfermedad infecciosa o no infecciosa a un nivel que excede el esperado (Thrusfield, 2007), que han causado reducciones dramáticas en las poblaciones de especies silvestres como distemper en focas, parvovirus en leones, micosis en anfibios, tuberculosis en mustélidos entre otras (Daszak y Cunningham, 2002).

Cabe resaltar que los animales también pueden adquirir enfermedades infecciosas por contacto con el hombre, éstas se denominan antropozoonosis. Lo cual hace que la fauna silvestre este en riesgo debido a la invasión de su hábitat por parte de los humanos. La exposición a cadáveres desechados inapropiadamente es una causa común por la que los buitres y carnívoros salvajes suelen adquirir infecciones del mundo civilizado como salmonelosis, brucelosis, ántrax, tuberculosis, rabia, *E. coli* O157:H7, campilobacteriosis, etc. (Kuldeep *et al.*, 2013).

Existen estudios que demuestran que la dinámica huésped-patógeno entre especies silvestres o entre especies silvestres y humanos puede ser gravemente afectada como resultado de la alteración, fragmentación o eliminación del hábitat (Weiss, 2001). No obstante, el alcance de su influencia, la ecología de las enfermedades de la fauna silvestre es poco investigada, por lo que su papel sobre

la aparición de las enfermedades es también relativamente desconocido (Daszak *et al.*, 2001). Además todo esto aumenta el riesgo de la emergencia y reemergencia de enfermedades infecciosas. Las enfermedades infecciosas emergentes se definen como aquellas de nueva aparición en una población dada en los últimos 30 años. Entre estas se encuentran el síndrome pulmonar por Hantavirus, la fiebre hemorrágica de ébola y el síndrome hemolítico urémico D⁺ por *Escherichia coli* O157:H7. Las enfermedades infecciosas reemergentes son las ya conocidas, cuyo impacto había disminuido e incluso se pensaban desaparecidas y que han comenzado a elevar su incidencia o su alcance geográfico en los últimos 30 años (Riverón, 2002). Entre estas están la fiebre amarilla, leptospirosis y cólera (Suárez y Berdasquera, 2000).

Las zoonosis son enfermedades infecciosas transmisibles desde animales vertebrados al ser humano bajo condiciones naturales (Dabanch, 2003). En este sentido, se ha estudiado mucho sobre la participación de los animales domésticos y de compañía en la transmisión de las enfermedades zoonóticas, pero se sabe muy poco del papel que desempeña la fauna silvestre. La mayoría de las enfermedades infecciosas emergentes en humanos son zoonóticas en origen (Brown, 2003). Esto indica que tienen nididad, que es la habilidad de mantener un foco dinámico y permanente de circulación del patógeno en animales en un ambiente geográfico determinado (Cabello y Cabello, 2008).

Gran parte de los cambios que modifican los equilibrios dinámicos de los reservorios animales silvestres de patógenos con potencial zoonótico, son antropogénicos como la contaminación, la globalización y el cambio climático (Cabello y Cabello, 2008). Además, sus modos de transmisión son muy variados, muchos se pueden transmitir directamente de su reservorio silvestre a los humanos como *Francisella tularensis* por contacto de la piel con una liebre o roedor infectado, enfermo o muerto, el virus de la rabia por la mordida (saliva) de un animal enfermo, los Hantavirus se diseminan a través de aerosoles en el polvo de las excretas de los roedores. Así mismo la propagación puede ser de forma indirecta por medio de alimentos y agua contaminados (Kruse *et al.*, 2004) como en el caso de la salmonelosis, leptospirosis, campilobacteriosis, *Escherichia coli*

O157: H7 y *Listeria monocytogenes*, que siguen siendo enfermedades preocupantes para la salud pública. *Campylobacter* spp. causa enfermedad a alrededor de dos millones de personas por año en los Estados Unidos, y *Salmonella* spp. enferma a otros uno punto tres millones (Brown, 2003).

2.3 Tlacuaches (*Didelphis virginiana*)

Los tlacuaches pertenecen a un antiguo y diverso grupo de mamíferos, los marsupiales, cuyos primeros restos fósiles fueron encontrados en rocas que datan del periodo cretácico. Los marsupiales únicamente se encuentran en Australia y América (Armati *et al.*, 2006), sin embargo son habitantes de una amplia gama de ambientes; desde regiones de alta montaña hasta bosques costeros y desiertos. Hay especies que son únicamente arborícolas, otras son arborícolas y terrestres, algunas completamente terrestres y una sola, *Chironectes minimus*, es acuática (Vogelnes, 2014).

En México se distribuyen 8 especies de marsupiales, dentro del orden *Didelphimorphia*, en 7 géneros (*Marmosa*, *Tlacuatzin*, *Caluromys*, *Chironectes*, *Didelphis*, *Metachirus* y *Philander*) (Medina *et al.*, 2012). De los cuales, el género *Didelphis* es uno de los más ampliamente distribuidos con 2 especies: *D. virginiana* y *D. marsupialis* (Cruz *et al.*, 2014).

2.3.1 Clasificación taxonómica (Cuarón *et al.*, 2008)

Reino: *Animalia*

Filo: *Chordata*

Clase: *Mammalia*

Orden: *Didelphimorphia*

Familia: *Didelphidae*

Género: *Didelphis*

Especie: *Didelphis virginiana*

2.3.2 Generalidades

Didelphis virginiana es un marsupial de cuerpo robusto y fuerte, con un rostro largo y puntiagudo. Difiere de *D. marsupialis* por presentar mejillas blancas, usualmente su cola prensil es más corta o igual que la longitud del cuerpo y su porción negra es mayor que la blanca. La coloración de su cuerpo en la parte dorsal es gris o blancuzca (raramente oscura), presenta pelos de guardia con puntas blancas. Toda la parte ventral es blanca, crema o amarillenta, la parte media basal de la cola, las piernas y las patas son negras, sus orejas son desnudas y negras. El peso de *D. virginiana* oscila de 1100 a 2800 g y sus medidas corporales son: longitud total de 645 a 1017 mm, cola vertebral de 255 a 535 mm, pata de 48 a 80 mm y oreja de 45 a 60 milímetros (Zarza y Medellín, 2005). A diferencia de *Didelphis marsupialis*, *D. virginiana* puede presentar una táctica de defensa pasiva llamada tanatosis (Ceballos y Oliva, 2005), que es un estado catatónico en respuesta a una situación de acoso, comportamiento conocido comúnmente como “hacerse el muerto” (Aranda, 2012).

El tlacuache es una especie de hábitos nocturnos, su periodo de mayor actividad es entre las 23:00 y las 02:00 horas (Ceballos y Oliva, 2005), aunque puede ser activo en el día durante el clima frío, solitario y nómada (Cruz-Reyes, 2009) permanece en un sitio entre seis meses y un año. La densidad poblacional promedio es de 0.26 ind/ha en los Estados Unidos y en México se ha registrado de 1 a 23 ind/ha (Ceballos y Oliva, 2005).

2.3.3 Distribución

Esta especie se distribuye desde el sureste de Canadá y parte este de los Estados Unidos hasta el noroeste de Costa Rica. En México se encuentra en casi todo el país con excepción de la península de Baja California y parte del desierto chihuahuense (Zarza y Medellín, 2005; Aranda, 2012).

2.3.4 Hábitat

La documentación de un buen hábitat para *Didelphis virginiana* incluye una combinación de árboles grandes y espesos matorrales, agua abundante y en

muchas ocasiones campos de cultivo. Puede establecer una madriguera casi en cualquier lugar mientras esté seco, abrigado y protegido, como en árboles huecos, troncos y pilas de maleza. Una madriguera de hierba y hojas es usualmente el sitio de anidación. El tlacuache utiliza varias madrigueras dentro de su área de actividad, que abarca de 10 a 15 hectáreas (Aranda, 2012) y no es territorial pero puede defender el espacio ocupado en un tiempo determinado (UN-L, 1992).

2.3.5 Alimentación

Los tlacuaches son omnívoros, su dieta puede incluir desde insectos hasta carroña. Consumen considerables cantidades de materia vegetal, especialmente frutas y granos. En cercanía con la gente visitan pilas de composta, botes de basura, o platos de comida destinados a perros, gatos y otros animales domésticos (Jackson, 1994). En una noche pueden forrajear una distancia de 1.6 a 2.4 Km (Ceballos y Oliva, 2005). Las excretas en general son de forma cilíndrica, de color café oscuro o negro, y los tlacuaches pueden defecar en cualquier sitio (Aranda, 2012).

2.3.6 Tracto gastrointestinal y microbiota

El tracto gastrointestinal del tlacuache comprende, como en todos los mamíferos, la cavidad bucal, el esófago, el estómago, los intestinos delgado y grueso y termina en la cloaca, con sus órganos accesorios (Figura 1).

La ingesta de materia tanto vegetal como animal tiene como consecuencias nutricionales que se requiere una mayor lubricación para proteger el revestimiento del tracto gastrointestinal de traumas físicos durante el paso de residuos de las partes estructurales de las plantas, y que los residuos de plantas no digeridos proveen un sustrato adicional para bacterias y otros microbios residentes del tracto, principalmente en el ciego. En consecuencia, el tracto digestivo de un omnívoro tiene un tamaño total mayor al de un carnívoro, con un intestino delgado más largo, mayor capacidad cecal, y un aumento en la longitud y diámetro del colon. El ciego de *D. virginiana* representa 20-40 % de su longitud corporal, pero es simple en su morfología (Armati *et al.*, 2006).

En la cavidad bucal las glándulas salivales son representadas por grandes glándulas mandibulares que secretan una saliva mucosa, y glándulas sublingual y parótida más pequeñas. La fórmula dentaria que en adultos es (I 5/4, C 1/1, PM 3/3, M 4/4) x 2 = 50 puede utilizarse para determinar la edad del tlacuache como se muestra en el Cuadro 1 (Petrides, 1949; Macedo *et al.*, 2006).

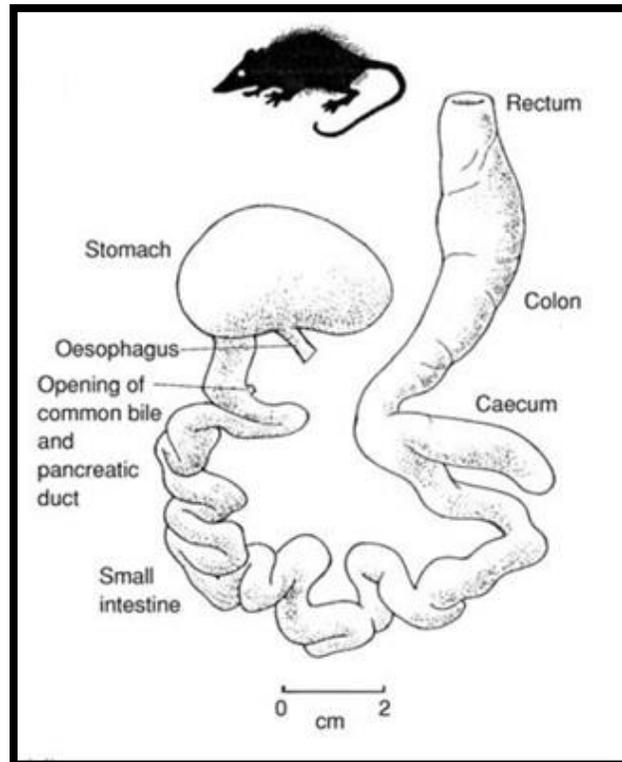


Figura 1. Representación del tracto gastrointestinal de *Didelphis virginiana* (Armati *et al.*, 2006).

Rodríguez *et al.* (1992) examinaron a 20 tlacuaches adultos hembras y machos de entre 2 y 4.5 Kg, sin signos de enfermedad como diarrea, fiebre o cambios en sus hábitos alimenticios, para estudiar su microbiota estomacal, del intestino delgado, del ciego y la bilis. Los ejemplares fueron capturados en su hábitat natural, desparasitados a su llegada con tres dosis de Ivermectina/Praziquantel y luego mantenidos en cautiverio en jaulas individuales por un mes antes del estudio. Obtuvieron que el número de bacterias aisladas fue

menor en el estómago e incrementaba progresivamente del duodeno al íleon, con los números mayores en el ciego. Bacilos Gram negativos fueron los predominantes a lo largo de los intestinos delgado y grueso, mientras que en el estómago predominaron las bacterias Gram positivas.

Cuadro 1. Determinación de la edad en tlacuaches de acuerdo a la fórmula dentaria. I: incisivos; C: caninos; PM: premolares y M: molares.

Edad en meses	Fórmula dentaria I C PM M
Aproximadamente 3	$\frac{5}{4} \frac{1}{1} \frac{2}{2} \frac{0}{0}$
4	$\frac{5}{4} \frac{1}{1} \frac{3}{3} \frac{1}{2}$
De 5 a 8.5	$\frac{5}{4} \frac{1}{1} \frac{3}{3} \frac{2}{3}$
7 a 11	$\frac{5}{4} \frac{1}{1} \frac{3}{3} \frac{3}{4}$
10 en adelante	$\frac{5}{4} \frac{1}{1} \frac{3}{3} \frac{4}{4}$

(Petrides, 1949)

La microbiota que encontraron fue: enterobacterias, detectando que las predominantes fueron *Escherichia coli* (16 animales), *Edwardsiella tarda* (12 animales), *Klebsiella pneumoniae* (10 animales), *Morganella morganii* (9 animales), *Citrobacter freundii* y *Salmonella* spp. (8 animales), *Proteus mirabilis* (7 animales) y *Providencia alcalifaciens* (5 animales). Otros bacilos Gram negativos aislados fueron *Pseudomonas* spp. (10 animales), *Acinetobacter calcoaceticus* (5 animales), *Pasteurella* spp. y *Moraxella* spp. (4 animales), *Aeromonas hydrophila* y *Alcaligenes faecalis* (2 animales). En cuanto a las bacterias Gram positivas los estafilococos coagulasa negativos (*S. xylosus*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. Sciuri*) y los estreptococos viridans fueron los predominantes, encontrados en 17 y 11 animales respectivamente. *Staphylococcus aureus* fue recuperado de 5 animales. Estreptococos β-hemolíticos pertenecientes a los grupos C, D y G fueron

encontrados en 8 tlacuaches. Aislaron enterococos de 15 ejemplares, la mayoría fueron *E. durans*. Los bacilos Gram positivos incluyeron lactobacilos (17 animales) y otras bacterias tipo difteróides (13 animales). Solamente de 3 animales aislaron levaduras. Bacterias anaerobias obligadas pertenecientes al grupo *Bacteroides fragilis* fueron aisladas del intestino grueso de los 20 tlacuaches. La mayoría de la microbiota del ciego incluyó al grupo *B. fragilis*, *B. capillosus*, *B. oralis/veroralis*, *Clostridium perfringes*, *C. sordelii*, *C. clostridiforme*, *C.glycolicum* y *E. coli*.

2.3.7 Comportamiento reproductivo

Los *Didelphis* spp. están catalogados como animales de vida corta (1-4 años en vida libre) y camadas grandes. La reproducción se da en cualquier época con picos de apareamiento en enero-febrero y junio-julio, y dos camadas al año (Rademaker y Cerqueira, 2006) que varían por lo general de una a diez crías. El periodo de gestación es de 13 días, después del parto las crías, en estado fetal, se arrastran hasta el marsupio donde se aferran a un pezón permaneciendo de ese modo por dos meses aproximadamente hasta completar su desarrollo. Después de ese periodo emergen para explorar paseando a menudo sobre el dorso de su madre. (UN-L, 1992; Aranda, 2012), regresando al marsupio para alimentarse de manera más intermitente (Adamski y Demmer, 2000). El destete se da en un periodo de 90 a 108 días cuando miden de 17 a 23 cm, de nariz a cola, y pesan de 280 a 450 g, aproximadamente (NOS, 2015).

2.3.8 Relevancia de la especie

El carácter sinantrópico (que frecuenta el entorno humano) de los tlacuaches, aunado a que también son mantenidos como mascotas exóticas luego de ser rescatados del marsupio de sus madres, que han sido asesinadas por perros o atropelladas (Johnson-Delaney, 2006 y 2014) y el aprovechamiento de su carne para consumo o para su uso empírico en el tratamiento de algunas enfermedades como parte de la medicina tradicional mexicana (Jacobo-Salcedo *et al.*, 2011; Alonso-Castro *et al.*, 2011; Alonso-Castro, 2014), los hace potencialmente importantes como dispersores de enfermedades zoonóticas de

trascendencia para la salud pública, debido a que son portadores naturales o reservorios de una gran diversidad de agentes zoonóticos (Ruiz *et al.*, 2011).

2.3.9 Aislamiento de *Salmonella* spp. en tlacuaches

El tlacuache ha sido mencionado como reservorio de *Salmonella* spp., hay antecedentes que indican que es hospedero de algunas variedades llegando a presentar la enfermedad o manteniéndose como portador asintomático. En América, *Salmonella* spp. en marsupiales ha sido reportada principalmente en Estados Unidos, Brasil y Argentina. En Carolina del Norte, Thigpen *et al.* (1975) examinaron aproximadamente 200 zarigüeyas clínicamente normales, muertas y moribundas para detectar *Salmonella*. Cultivos con resultados positivos se obtuvieron de hisopados rectales en 39 de 56 (70 %) muestras recogidas en el otoño, y en 30 de 50 (60 %) recogidas durante la mitad del invierno de un grupo adicional de animales clínicamente normales, que fueron mantenidos en aislamiento por aproximadamente 3 meses antes de la prueba; 87 de 108 (81 %) enfermos resultaron con cultivos positivos. Los serogrupos B y R de *Salmonella* se aislaron a partir del bazo, hígado, riñones o sangre del corazón, así como del íleon de 57 enfermos. En 23 casos, *S. Typhimurium* o *S. Bern* se aisló en cultivo puro de los órganos viscerales. Estos hallazgos indican septicemia bacteriana. En contraste, las salmonelas de los serogrupos C1, E1, y F se aislaron de heces de zarigüeyas clínicamente normales y enfermas, lo que sugiere un hábitat restringido al tracto intestinal y, probablemente, los nódulos linfáticos mesentéricos.

En este mismo sentido, Runkel *et al.* (1991) obtuvieron cultivos bacteriológicos de linfonodos mesentéricos, conducto biliar, sangre, hígado, bazo y páncreas de 18 tlacuaches (*D. virginiana*). La incidencia general de salmonelosis fuera del tracto intestinal fue de 61 %. Se recuperó *Salmonella* de la vesícula biliar de seis animales (33 %), indicando infección crónica del tracto biliar. De esos seis ejemplares, se observó translocación de *Salmonella* a los nódulos linfáticos regionales en cinco, bacteriemia en tres, y se extendió al hígado o el bazo en cinco. El tracto biliar era estéril en 12 zarigüeyas (67 %). En estos 12 animales, las bacterias se aislaron de los nódulos linfáticos celiacos y mesentéricos superiores

de cinco, la sangre de dos, y el hígado y el bazo de uno. Cultivos bacteriológicos se obtuvieron a partir del tracto intestinal y de sitios extraintestinales en nueve ejemplares. Se encontró al microorganismo en el intestino delgado de dos, los cuales tenían la salmonelosis biliar. Además, *Salmonella* fue aislada de órganos extraintestinales de tres animales con cultivos negativos del intestino. Todos los aislamientos fueron de *S. enterica* subsp. *houtenae*.

En *Didelphis virginiana* se ha encontrado *Salmonella* entérica serovariedad *Oranienburg* en centros de rehabilitación de Ohio (Jijón *et al.*, 2007). En Argentina *S. enteritidis* se ha reportado en *Didelphis albiventris* (Villafañe *et al.*, 2004). En Brasil, *Salmonella enterica* subespecies *diarizonae*, *enterica* y *houtenae* fueron encontradas en los intestinos de *Didelphis aurita*, donde los serotipos más frecuentes de *S. entérica enterica* fueron *Newport*, *Typhimurium* y *Cerro*. En cambio en *D. albiventris* los serotipos fueron *Newport*, *Typhimurium*, *Barelley* y *Thompson* (Casagrande *et al.*, 2011).

En México existen pocos estudios de la excreción de enteropatógenos en marsupiales. Sin embargo, en el estado de Yucatán se ha detectado *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipos *Sandiego*, *Newport*, *Anatum*, y *Minnesota*, y *S. arizonae* serovar O44 en heces de *Didelphis virginiana* en zonas semiurbanas (Ruiz-Piña *et al.*, 2002). No obstante no se tiene información de la excreción de *Salmonella spp.* en el centro de México.

2.4 Género Salmonella

Salmonella spp. es reconocida como uno de los principales patógenos zoonóticos causantes de enfermedades alimentarias a nivel mundial, colonizando animales tanto domésticos como silvestres, así como al humano (González *et al.*, 2014).

2.4.1 Etiología y clasificación

Se puede estimar que un ancestro común del género *Salmonella* existía hace unos 25 a 45 millones de años (Bäumler *et al.*, 1998). De acuerdo al esquema Kauffmann-White se divide en dos especies *S. bongori* y *S. enterica*, que

cuenta con 6 subespecies (Figura 2), y más de 2,600 serotipos (Barrow y Methner, 2013). La caracterización se hace mediante 3 antígenos de superficie: flagelar “H”, somático “O” y capsular o de virulencia “Vi” (PHAC, 2015). Los factores “O”, son polisacáridos específicos que forman parte del lipopolisacárido de la membrana celular, determinan la agrupación o serogrupo, mientras que los factores “H” permiten definir el serotipo de una cepa de *Salmonella* (Lim y Thong, 2009). Algunos serogrupos y los serotipos que los conforman se aprecian en el Cuadro 2.

Las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* son patógenos obligados que habitan en el tracto gastrointestinal y pueden colonizar a casi todos los animales incluido el hombre. No obstante también están muy distribuidos en el ambiente, encontrándose con frecuencia en las aguas residuales humanas y en cualquier material con contaminación fecal (OIE, 2012) debido a que se excretan principalmente por las heces y son capaces de contaminar la vegetación, el agua y el suelo, donde en condiciones de sombra y humedad adecuadas pueden sobrevivir hasta nueve meses.

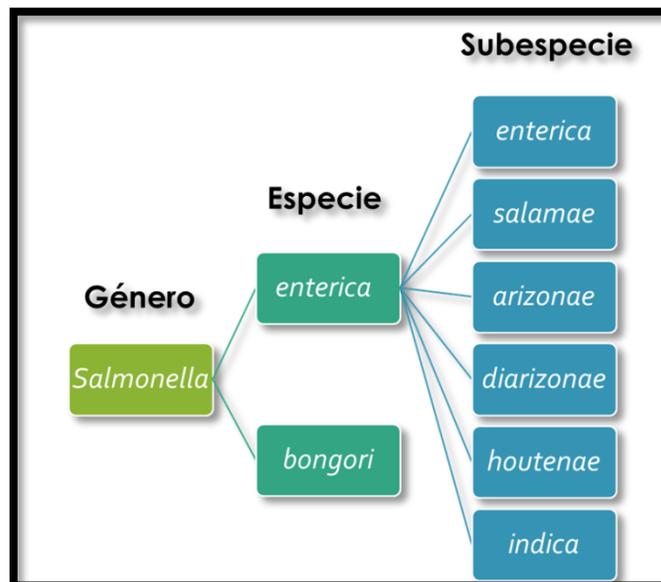


Figura 2. Esquema de especies y subespecies de *Salmonella*, por clasificación Kauffmann-White (Lim y Thong, 2009).

Cuadro 2. Serogrupos y serotipos de las cepas de *Salmonella*.

Serogrupo	Serotipo	Serogrupo	Serotipo	Serogrupo	Serotipo
B	Agona	C2	Altona	E	London
	Brandenburg		Blockley		Senftenberg
	Coeln		Hadar		Tambacounda
	Indiana		Kentucky		Tilburg
	Java		Manhattan		Cerro
	Typhimurium		Muenchen		Friedrichsfelde
	Infantis		Newport		Grumpensis
	Livingstone		Tallahassee		Jangwani
C1	Mikawasima	D	Enteritidis	Otros	Nima
	Ohio		Panama		Paratyphi A
	Rissen		Anatum		Pomona
	Tennessee		Give		Urbana
	Thompson		Goelzau		Veneziana
	Virchow		Lexington		Worthington

(Herrera-León *et al.*, 2007).

2.4.2 Características del género *Salmonella*

Las especies del género *Salmonella* son bacilos gram-negativos, en su mayoría móviles, pues poseen flagelos peritricos, con excepción de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, aerobios o anaerobios facultativos, fermentan la glucosa, maltosa y manitol pero no la lactosa ni la sacarosa (Vila *et al.*, 2009). Además, *Salmonella* spp. no forman esporas, son oxidasa negativos, catalasa positivos, crecen bien en el medio de MacConkey, reducen los nitratos a nitritos, utilizan citrato como única fuente de carbono, producen sulfuro de hidrógeno, son ureasas negativos, no desaminan fenilalanina y son tetrionato reductasas (Linder, 1995).

Respecto sus propiedades, estas bacterias se desarrollan entre 8 y 45 °C, aunque se ha señalado que presentan un crecimiento hasta 5.3 °C (Parra *et al.*, 2002); sin embargo, no sobreviven a temperaturas mayores a 70 °C, ni a elevadas concentraciones de sal. Pero pueden resistir la deshidratación durante un tiempo muy prolongado, tanto en heces como en alimentos. Requiere un pH de 4.1 a 9 (Brands, 2006).

2.4.3 Salmonelosis

En 2011 ocurrieron aproximadamente 1.03 millones de infecciones por *Salmonella* no tifoidea en Estados Unidos, con alrededor de 378 muertes y más de 19,000 personas hospitalizadas. Aunque se estima que la incidencia real de salmonelosis es al menos 29 veces mayor al número de casos registrados, ya que a mayoría de las personas experimenta síntomas moderados y no solicita atención médica (Doyle, 2013). En los países en desarrollo, es difícil evaluar la situación, debido a que se carece de datos de vigilancia epidemiológica, pero se sabe que se presentan brotes epidémicos (Acha y Szyfres, 2001). Majowicz *et al.* (2010) estimaron que 93.8 millones de casos de gastroenteritis debidos a las especies de *Salmonella* ocurren a nivel mundial cada año, con 155,000 muertes debidas a *Salmonellas* no tifoideas.

La salmonelosis puede afectar a todas las especies de animales domésticos, siendo más susceptibles los más jóvenes, gestantes o lactantes. Las infecciones pueden variar desde un estado de portador subclínico a la septicemia fatal aguda. Dichas infecciones se dan fundamentalmente en los meses cálidos del año y tienen una distribución mundial. La manifestación clínica más común es la enfermedad entérica, que a menudo se presenta como diarrea sanguinolenta o profusa acompañada de fiebre, pero hay una gran variedad de signos clínicos que se pueden observar, como septicemia aguda, aborto, artritis, necrosis de las extremidades y enfermedad respiratoria (OIE, 2012).

S. bongori y *S. enterica* subsp. *arizonae* y *diarizonae* son normalmente comensales de hospederos reptiles, pero ocasionalmente pueden infectar a humanos. *Salmonella enterica* serotipos Typhi (cuyo único hospedador conocido

es el hombre) y Paratyphi causan enfermedades severas en humanos, como el síndrome séptico y las fiebres tifoidea y paratifoidea, respectivamente. El resto de los serotipos ocasionan en su mayoría diarrea, fiebre, calambres abdominales, vómito y diarrea (Parra *et al.*, 2002). Los serotipos más frecuentes aislados en México en humanos son: Typhimurium, Enteritidis, Derby, Agona y Anatum. Sin embargo también se han identificado Typhi, Newport, Heidelberg, Infantis, Worthington, Oranienburg, Hadar, Muenchen, Senftenberg, Give, Saintpaul, Panama, Cerro, Montevideo, Meleagridis, Arizona, Sandiego, Thompson, Haviana, Dublin, Paratyphi A y B, entre otros (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000). Los estados en los que se ha reportado el mayor número de casos son: Tabasco, Chiapas, Coahuila, Sinaloa, y Veracruz. Las entidades federativas con menos reportes fueron Durango, Hidalgo, México, San Luís Potosí, y Tlaxcala (Hernández *et al.*, 2011). En Querétaro los casos registrados de Fiebre Tifoidea son 15, de Fiebre Paratifoidea son 7 y de otras Salmonelosis son 103, de acuerdo al Boletín Epidemiológico de la Secretaría de Salud (2017) hasta la semana epidemiológica 15.

2.4.4 Epidemiología

Salmonella spp. es prevalente en animales comestibles tales como aves, porcinos y vacunos, y también en mascotas, incluidos gatos, perros, pájaros y reptiles. Puede atravesar toda la cadena alimentaria, desde los piensos para animales y la producción primaria hasta los hogares o los establecimientos e instituciones de servicios de comidas. Entre las fuentes de infección de salmonelosis para las personas se encuentran los alimentos de origen animal (principalmente huevos, carne, aves y leche), aunque también otros alimentos se han vinculado a la transmisión, incluidas hortalizas así como el agua contaminadas por estiércol (Dhama *et al.*, 2013). También, esta bacteria puede transmitirse entre las personas por vía fecal-oral. Además, se pueden producir casos cuando las personas entran en contacto con animales infectados, incluidas las mascotas. Generalmente, esos animales no presentan signos de la enfermedad (OMS, 2017).

El reservorio de *Salmonellas* no tifoideas son los animales. La distribución entre otras especies animales de los 18 serotipos más frecuentes aislados en humanos en Estados Unidos del 2006 se aprecia en la Figura 3. Estos son Typhimurium, Enteritidis, Newport, Heidelberg, Haviana, Montevideo, Muenchen, Orangienburg, Mississippi, Sainpaul, Braederup, Agona, Infantis, Thompson, Paratyphi B, Stanley, Tennessee y Hadar. *Salmonella* Typhi se excluyó por representar un serotipo con hospedero restringido adaptado a humanos y primates no-humanos (Hoelzer *et al.*, 2011).

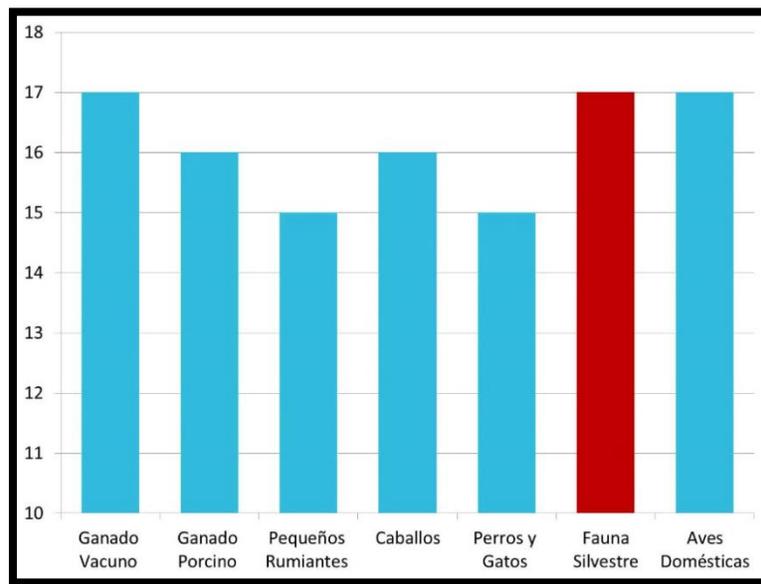


Figura 3. Distribución entre los animales de los serotipos de *Salmonella* más comunes aislados en humanos en Estados Unidos. Modificado de Hoelzer *et al.* (2011).

Entre las diferentes vías de transmisión por las que la fauna silvestre puede estar involucrada en la salmonelosis humana se encuentran: el acercamiento con animales domésticos como vectores de transmisión o reservorios; contacto directo con los seres humanos; a través de la carne de animales salvajes, así como por contaminación ambiental y de los alimentos (Hilbert *et al.*, 2012).

2.4.5 Hospederos

Los serotipos de *Salmonella* pueden ser de hospedador restringido, de hospedador específico o generalistas. A los primeros pertenecen los serotipos Paratyphi A, Gallinarum biovariedades Gallinarum y Pullorum, o Typhi que solo causan enfermedad en una especie de hospedero. En contraste los serotipos del segundo grupo, como *Salmonella* Dublin y *S. Choleraesuis* adaptados al ganado vacuno y porcino respectivamente, están predominantemente asociados a una especie de hospedero pero pueden causar enfermedad a otras especies también. Por último los serotipos generalistas como Typhimurium y Enteritidis comunmente causan enfermedad en una amplia gama de hospederos (Murray *et al.*, 2009; Hoelzer *et al.*, 2011). Los de mayor interés veterinario pertenecen a *S. enterica* subsp. *enterica*.

Salmonella ha sido aislada de un gran número de mamíferos silvestres o de sus heces, incluidos tlacuaches, ardillas, marmotas, mapaches, zorros, visones, pumas, tigres, jabalíes, hipopótamos, rinocerontes, focas y ballenas; resaltando que el patógeno puede causar enfermedad en estos animales, pero los portadores asintomáticos parecen ser comunes y probablemente también representan un considerable riesgo de infección (Holzer *et al.*, 2011).

2.4.6 Factores de virulencia

Durante el proceso infeccioso de *Salmonella* ocurre la adhesión, invasión, replicación, resistencia a los mecanismos de defensa y daño al hospedero. Cerca del 90 % de los genes en las serovariedades *Salmonella* Typhimurium y *S. Typhi* son idénticos y el 10 % de los genes que difieren incluyen los factores de virulencia, que se muestran en la Figura 4, que determinan su potencial patogénico (de Jong *et al.*, 2012).

Las adhesinas de las bacterias gram negativas en general son fimbria, fibrilla, flagelo, lipopolisacárido (LPS) y cápsula. Solamente los serovares Typhi, Paratyphi y Dublin de *Salmonella enterica* presentan cápsula, y todas las salmonelas se consideran móviles a excepción de *S. enterica* serovar Gallinarum. *Salmonella* también expresa una amplia variedad de fimbrias con diferente

especificidad de unión (Figuroa y Verdugo, 2005) como las tipo 1 codificadas por el gen *fim*, o las codificadas por el gen de 90 Kb *pef* del plásmido pSLT, presente en todas las cepas patógenas de la bacteria. Otros genes productores de fimbrias son *lpf* y *agf*, el primero corresponde a la fimbria polar larga que contribuye a la afinidad de la bacteria por las placas de Peyer y la adhesión a las células M, el segundo a la fimbria agregativa que promueve la interacción inicial con el intestino del hospedero y estimula la unión entre las bacterias lo que lleva a mayores probabilidades de supervivencia de las mismas (Parra *et al.*, 2002, Borges *et al.*, 2013). En la mayoría de los aislados de *Salmonella* dos genes son los responsables de codificar los antígenos flagelares. El gen *fliC* codifica los antígenos de fase 1, se ubica en un operón de biosíntesis flagelar, presente en todas las bacterias del género *Salmonella* y tiene un homólogo en *Escherichia coli*. El gen *fljB* codifica los antígenos de fase 2, localizado en una región del genoma que es único para *Salmonella* y está presente en 5 subespecies. Ambos genes se expresan de forma coordinada de uno por vez (McQuiston, *et al.*, 2004). La expresión de estos dos antígenos diferentes es única para *Salmonella* y le confiere la capacidad de variar de fase con respecto a sus antígenos flagelares. Aunque la característica bifásica está limitada a cuatro de las subespecies de *Salmonella enterica* que son *enterica*, *salamae*, *diarizonae* e *indica*, mientras que las subespecies *arizonae* y *houtenae*, así como *Salmonella bongori*, tienen únicamente el gen *fliC* por lo que se consideran monofásicas. Serotipos específicos dentro de las subespecies bifásicas pueden ser monofásicos (McQuiston, *et al.*, 2008). El LPS, la flagelina y el peptidoglucano son patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP) y su reconocimiento por parte de los receptores tipo Toll 4 (TLR4) causa cambios proinflamatorios en la expresión de genes de la célula hospedera (Barrow y Methner, 2013).

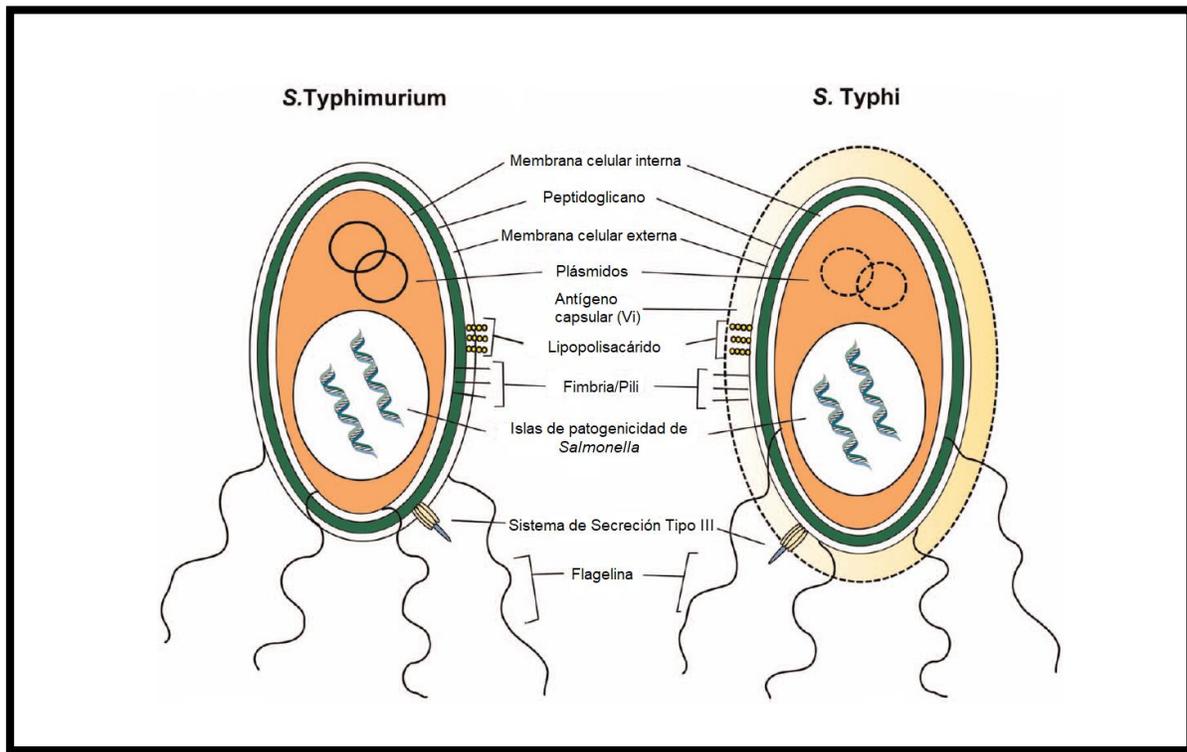


Figura 4. Factores de virulencia de *Salmonella Typhimurium* y *Salmonella Typhi* (de Jong *et al.*, 2012).

Los genomas completos de *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18 (4 809 037 bp), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 (4 857 432 bp) y *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A cepa ATCC 9150 (4 585 229 bp) se han secuenciado, así como de otras cepas, y se ha detectando la presencia de pseudogenes, profagos funcionales, plásmidos, islotes de patogenicidad, islas de patogenicidad y sistemas de secreción. *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 comparten cerca del 89 % de sus genes, sus diferencias incluyen ≈ 480 genes únicos para *S. Typhimurium* and ≈ 600 genes únicos para *S. Typhi* (McClelland *et al.*, 2001; Parkhill *et al.*, 2001).

Los plásmidos y profagos son moléculas de ADN de cadena sencilla o doble que pueden ser intercambiados de manera horizontal entre las bacterias para pasar o recibir genes selectos que pueden mejorar la virulencia o

proporcionar resistencia a antimicrobianos (de Jong *et al.*, 2012). Todos los plásmidos de virulencia comparten una región altamente conservada denominada *spvRABC* que promueve el rápido crecimiento y supervivencia de *Salmonella* spp. Dentro de las células del hospedero y es importante para la infección sistémica (Libby *et al.*, 1997).

Las islas de patogenicidad (SPI por sus siglas en inglés) son grupos de genes involucrados en codificar factores específicos de virulencia, están presentes en el genoma de bacterias patógenas y ausentes en el de cepas no patógenas de la misma especie o especies muy cercanamente relacionadas (Gal-Mor *et al.*, 2014), su porcentaje de G-C difiere del promedio del genoma bacteriano, lo que apoya la idea de adquisición de SPI mediante transferencia lateral de genes, se presentan repeticiones directas en sus extremos, portan genes que codifican factores de movilidad como integrasas, transposasas o secuencias de inserción y se encuentran frecuentemente insertadas en loci de tARN (Figueroa y Verdugo, 2005; Nieto *et al.*, 2016). Las SPI que se conocen son 21 la mayoría están presentes en ambas especies y a través de todas la subespecies (McClelland *et al.*, 2001). SPI-1 y SPI-2 son las más estudiadas y son conservadas y estables en todos los miembros de *Salmonella enterica* (Nieto *et al.*, 2016). No obstante sus genomas tienen 11 SPI en común (de Jong *et al.*, 2012), la SPI-14 es específica de *S. Typhimurium*, así como SPI-7, que codifica para el antígeno Vi, SPI-15, SPI-17 Y SPI-18 están presentes en el genoma de *S. Typhi* pero no en el de la primera (Dougan and Baker, 2014; Gal-Mor *et al.*, 2014).

La SPI-1 se encuentra en el centisoma 63, es un segmento de 35-40 Kb que contiene 31 genes algunos de los cuales codifican el Sistema de Secreción Tipo III (SSTIII) denominados *inv-spa*, otros codifican las proteínas involucradas en la traslocación de las moléculas efectoras dentro del citoplasma de la célula hospedero, y otros más que codifican las proteínas efectoras y sus chaperonas. Ésta isla se encuentra en *S. bongori* y todas las variedades de *S. enterica* (Figueroa y Verdugo, 2005). Los sistemas de secreción tipo III (SSTIII) son un grupo de organelos especializados de las bacterias gram negativas que transfieren las proteínas de la bacteria a través de la membrana celular del hospedero

(Brands, 2006). *Salmonella* spp. tiene dos SSTIII, codificados por dos islas de patogenicidad distintas, SPI-1 y SPI-2. El primero está implicado en la penetración inicial de la bacteria, el segundo es importante para los siguientes estadios de la infección (Parra *et al.*, 2002). Dentro de las proteínas más importantes para el ensamblaje del SSTIII y exportación de proteínas efectoras, se encuentra InvA. Es una proteína de membrana interna involucrada en la formación de un canal, relacionado con el proceso de invasión al epitelio intestinal que es utilizado durante el proceso de infección por *Salmonella* spp. y otros enteropatógenos como *Shigella* spp. (Chacón *et al.*, 2010). El gen *invA* la codifica y es el primero de un operón que contiene también los genes *invB* e *invC* (Figuroa y Verdugo, 2005), además de estar presente en todas las variedades invasoras lo que sugiere su asociación con cuadros virulentos, y ser muy estable por estar codificado en el cromosoma bacteriano (Chacón *et al.*, 2010). El gen *hilA* codifica para el regulador central HilA, el cual es indispensable para la la expresión de los componentes del SSTIII además de participar en la invasión a las células epiteliales e inducir apoptosis en los macrófagos (Borges *et al.*, 2013).

Salmonella spp. invade en su hospedero células que no son normalmente fagocíticas enviándoles señales que inducen un rearrreglo del citoesqueleto. Las proteínas efectoras involucradas en este mecanismo son SipA, SopE, SopE2 y SopB, mientras que la proteína SptP es la responsable de que la superficie celular vuelva a la normalidad. La proteína efectora SipB induce apoptosis de macrófagos acivados y fagocitosis inducida en macrófagos no activados, para que la bacteria sea transportada a hígado y bazo. Las proteínas efectoras pueden ser consideradas como toxinas aunque a diferencia de éstas, carecen de receptores de unión por lo que requieren del Sistema de Secreción Tipo III para acceder a su sitio de acción (Figuroa y Verdugo, 2005).

La SPI-2 también codifica para un SSTIII y se activa cuando la bacteria se encuentra en una vacuola al interior de una fagocítica como los macrófagos o las células dentríticas. Esta isla de patogenicidad se localiza en el centisoma 31, tiene un tamaño de 40 Kb con 32 genes y se divide en dos segmentos el menor (14.5 Kb), está presente en *S. bongori*, y el mayor (25.3 Kb) presente únicamente en *S.*

enterica y tiene importantes genes de virulencia (Figuroa y Verdugo, 2005). Los genes que contiene SPI-2, están envueltos en la fase sistémica de la enfermedad (Parra *et al.*, 2002).

La SPI-3 se ubica en el centisoma 82, con un tamaño de 17 Kb, requerida para la supervivencia intracelular en macrófagos, provee productos esenciales para el crecimiento en condiciones limitadas de Mg²⁺. La SPI-4 codifica un supuesto sistema de secreción tipo I que media la secreción de toxinas y se cree participa en la adaptación de la bacteria al ambiente intracelular en los macrófagos, es de 27 Kb, con 18 genes en el centisoma 92. La SPI-5 de 7.5 Kb, centisoma 20, codifica proteínas efectoras como PipA, involucradas en la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal (Figuroa y Verdugo, 2005).

2.4.7 Patogenia

Un número reducido de serotipos de *Salmonella* más especializados se asocian con infecciones sistémicas (Figura 5) en hospederos inmunocomprometidos, como es el caso de *Salmonella enterica enterica* serotipo Typhi, Sendai y Paratyphi A, B o C que están estrictamente adaptados al humano, que es su reservorio exclusivo (Barrow y Methner, 2013; Gal-Mor *et al.*, 2014). La gran mayoría de los serotipos de *Salmonella* son capaces de producir gastroenteritis en humanos y un gran número de otras especies de animales, infección que permanece localizada en la porción terminal del íleon, colon y linfonodos mesentéricos. La respuesta inflamatoria del hospedero es responsable en gran medida de los signos clínicos característicos que incluyen diarrea, náuseas, vómito, calambres intestinales y fiebre, producidos durante la infección. Estos serotipos son conocidos como no tifoideos. No obstante en un poco más del 5 % de los casos debidos a dichos serotipos, la bacteria causa una enfermedad invasiva, extra-intestinal, que lleva a una bacteremia e infecciones sistémicas focales (Gal-Mor *et al.*, 2014).

La forma de transmisión de *Salmonella* es principalmente por vía oral, aunque las bacterias también pueden penetrar a través de la mucosa de las vías

respiratorias superiores y de la conjuntiva, como experimentalmente lo mostraron Sanchis *et al.* (1995). Una vez ingerida *Salmonella* transita por el sistema digestivo y se une a la mucosa del intestino delgado, pero también puede liberarse hacia la sangre o la circulación linfática. La infección primero se localiza en la mucosa del íleon, ciego y colon, especialmente la región cercana al recto así como en los nódulos linfáticos mesentéricos de los animales afectados. La entrada del microorganismo se asocia más con las microvellosidades de los enterocitos que con las células M, como se pensaba anteriormente (Parra *et al.*, 2002).

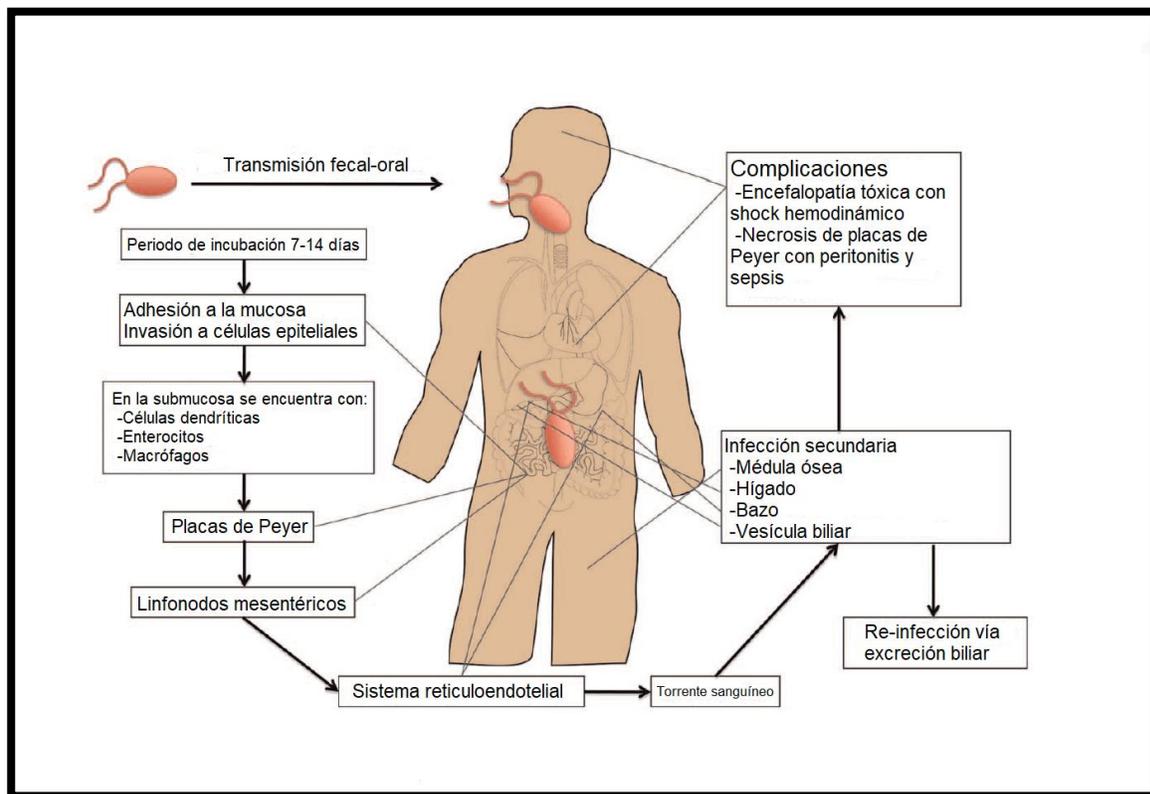


Figura 5. Diseminación de *Salmonella Typhi* durante una infección sistémica (de Jong *et al.*, 2012).

Salmonella invade los enterocitos mediante un mecanismo denominado disparo (*trigger*). Éste consiste en enviar señales a las células epiteliales que inducen rearrreglos del citoesqueleto dando lugar a la formación de ondulamiento

(*ruffling*) en su superficie permitiendo la internación de *Salmonella* en vacuolas, después la superficie celular vuelve a la normalidad. Para todo este proceso se han reconocido proteínas efectoras involucradas pertenecientes a la isla de patogenicidad 1 (Nieto *et al.*, 2016). Una vía alterna de *Salmonella* para diseminarse y producir infección sistémica desde el tracto gastrointestinal es a través de las células fagocíticas que expresan CD-18 como las células dendríticas sin alterar la barrera epitelial. Para ésta vía es importante el papel del segundo SSTIII codificado por la SPI-2, previniendo la formación del fagolisosoma. Una vez dentro de las células tanto fagocíticas como no fagocíticas la bacteria puede sobrevivir y replicarse también con ayuda de la SPI-2. Posteriormente provoca la apoptosis de la célula hospedera para liberarse e invadir otras células circundantes y llegar al tejido linfoide para de ahí diseminarse a órganos como el hígado y el bazo (de Jong *et al.*, 2012).

Los sistemas de secreción tipo III están encargados de inyectar las proteínas necesarias para interferir en el metabolismo y por consiguiente, en la función de las células infectadas. Debido a esta perturbación las células hospederas producen citoquinas que atraen polimorfonucleares, los cuales liberan prostaglandinas con acción en el metabolismo de la adenilato ciclasa, incrementando así los niveles de AMPc y consecuentemente interrumpen la absorción de Na⁺ y el aumento de la secreción de Cl⁻. Esto lleva a una pérdida de líquido intracelular, signo claro de diarrea secretora (Parra *et al.*, 2002).

2.4.8 Diagnóstico de *Salmonella* spp.

De manera tradicional la detección de *Salmonella* consiste en cinco pasos básicos (NOM-114-SSA1-1994):

1. Preenriquecimiento de la muestra en un medio nutritivo no selectivo para restaurar y estabilizar fisiológicamente las células de *Salmonella* dañadas.
2. Enriquecimiento selectivo para incrementar las poblaciones de *Salmonella* e inhibir a otros organismos presentes en la muestra.

3. Selección en medios sólidos que restringen el crecimiento de géneros diferentes a *Salmonella* y permiten el reconocimiento visual de colonias sospechosas.
4. Identificación bioquímica del género de los cultivos de *Salmonella* para eliminar cultivos sospechosos falsos.
5. Serotipificación que es una técnica serológica que permite la identificación específica de un cultivo.

Cuadro 3. Pruebas bioquímicas para identificación del género *Salmonella*.

Prueba	Resultado
Fermentación de glucosa	Positivo
Fermentación de lactosa	Negativo
Fermentación de sacarosa	Negativo
Formación de gas desde la glucosa	Positivo
Producción de ácido sulfhídrico	Positivo
Hidrólisis de la urea	Negativo
Descarboxilación de la lisina	Positivo
Producción de indol	Negativo
Enzima β -galactosidasa	Ausente

El procedimiento consiste en inocular la muestra en medios de pre enriquecimiento, agua peptonada y caldo infusión cerebro corazón los cuales se incuban a 37 °C durante 24 h. A partir de éstos se inoculara 1 ml de muestra en 9 ml de caldo Rappaport y Tetratonato con un periodo de incubación de 24 h a 42 y 35 °C respectivamente. Posteriormente se subcultivan en agar XLT4, SMID, SS, Hektoen, XLD y bismuto sulfito, incubando a 37°C por 24 horas, las colonias

sospechosas de *Salmonella* se identifican con pruebas bioquímicas convencionales (Cuadro 3) y se confirman con antisueros polivalentes y monovalentes para *Salmonella*. La identificación serológica se realiza utilizando el esquema de Kauffman- White (Parra *et al.*, 2002).

La detección de *Salmonella* spp. por métodos de cultivo microbiológico tradicionales se dificulta cuando en número de células bacterianas presentes en la muestra es bajo, además de que son tardados, requieren mucho material. La confirmación por pruebas bioquímicas tiene la desventaja de que no puede diferenciar entre serotipos que comparten características bioquímicas, la excepción es *S. Typhi* con características bioquímicas únicas (González *et al.*, 2014).

Por lo que se han desarrollado varios métodos como los serológicos que incluyen ensayos de aglutinación, de inmunoprecipitación e inmunoenzimáticos como el ELISA o el ensayo de flujo lateral y la técnica de inmunoseparación magnética. No obstante los resultados de éstas técnicas siempre son considerados como presuntos positivos y requieren confirmación por métodos tradicionales (González *et al.*, 2014). También se han desarrollado técnicas moleculares entre ellas la electroforesis de campo pulsado (PFGE), la tipificación multilocus de secuencias (MLST), el análisis multilocus de secuencias repetitivas en tandem (MLVA/VNTR), chip de ADN, secuenciación (EFSA,2010), así como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con sus múltiples variantes. Dichas técnicas son altamente sensitivas, muy específicos y reproducibles además de ofrecer resultados más rápidos que los métodos tradicionales de identificación (Herrera-León *et al.*, 2007). En el Cuadro 4 se muestra una breve comparación de diversas técnicas utilizadas para la identificación de *Salmonella* spp.

Cuadro 4. Comparación de diversas técnicas para identificación de *Salmonella* spp.

Tipo	Prueba	Fundamento	Ventajas/Desventajas
Serológico	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA)	Detección de los antígenos somáticos de superficie y antígenos flagelares por anticuerpos específicos.	Permite distinguir las serovariedades presentes en distintas zonas geográficas.
Serológico	Reacción de Widal	Determina presencia de anticuerpos contra el antígeno O y H de <i>Salmonella</i> Typhi.	Bajo costo y rapidez en resultados. Baja especificidad y sensibilidad.
Serológico	Ensayo de Flujo lateral (LFAs)	Membrana de nitrocelulosa con proteína inmovilizada (Antígeno o anticuerpo), el segundo anticuerpo es conjugado con perlas de látex coloreadas, oro coloidal o carbón en vez de una enzima. La muestra migra por acción capilar. Los resultados positivos son un patrón o línea.	
Serológico	Inmunoseparación Magnética (ISM)	Captura, separa, concentra y purifica, en presencia de un campo magnético, antígenos solubles, ácidos nucleicos o microorganismos viables. Usa perlas de distintos tamaños con material paramagnético que se magnetiza en presencia de un campo magnético externo.	Acorta el tiempo de recuperación de la bacteria a partir de un caldo de pre-enriquecimiento y enriquecimiento selectivo tradicionales, no a partir de muestra pura. Uniones inespecíficas por riqueza de microbiota asociada. Los productos pueden ser secuenciados.
Molecular	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	Multiplicación in Vitro de uno o varios segmentos de ADN, por acción de enzima ADN polimerasa.	Simple, reproducible, rápida y flexible. Puede detectar un bajo número de células al asociarse a etapa previa de enriquecimiento. Selectividad, especificidad y sensibilidad dependiente de oligonucleótidos y tipo de matriz. Requiere personal entrenado, alto costo del sistema.
Molecular	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR)	Uso de fluorómetros/fotómetros para la detección de amplicones fluorescentes.	Elimina la contaminación por arrastre. Detecta la acumulación de productos de PCR tanto específicos como inespecíficos, se puede solucionar con sondas marcadas con fluorocromos para detección específica del

			producto deseado.
Molecular	Pirosecuenciación	Basada en la detección de pirofosfato libre durante la síntesis de ADN por la polimerasa, la luz visible generada es proporcional al número de nucleótidos incorporados.	Ideal para el análisis de la composición de las comunidades microbianas en sistemas complejos.
Molecular	Amplificación Basada en la Secuencia del Ácido Nucleico (NASBA)	Basado en la amplificación mediante una reacción isotérmica (37-42 °C). Detecta moléculas de ARN. Reacción. Ciclos continuos donde transcriptasa reversa media la síntesis de ADNc a partir de una secuencia de ARN, seguido por una transcripción in Vitro por la ARN polimerasa. El producto de ARN se puede detectar por sondas.	No requiere termocicladores.
Molecular	Técnicas de hibridación	Uso de sondas que son genes marcados, por lo general con enzimas, moléculas quimioluminiscentes o radioisótopos. Son secuencias que van de 15 hasta varias miles de pares de bases (pb) que se hibridan con la secuencia complementaria.	Ideal para detección de microorganismos de crecimiento lento. Fácil aplicación aunque sus límites de detección son inferiores a los de PCR.
Molecular	Microensayos	Soportes de cristal, silicona o nylon, en los que se anclan en sitios específicos las sondas de oligonucleótidos conocidos. Las muestras son marcadas con fluorescencia o durante la amplificación en la PCR y luego hibridadas con su secuencia complementaria, detectable por escáner de alta resolución.	Poderosa herramienta diagnóstica para caracterización molecular y tipificación paralela de muchos aislados de Salmonella a la vez.
Molecular	Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)	Permite la separación de fragmentos de ADN de alto peso molecular (10 Kb a 10 Mb). El ADN viaja a través de un gel de agarosa concentrado, bajo la influencia de dos campos eléctricos. Los dos ángulos de los campos eléctricos se encuentran cerca a la perpendicularidad, no son uniformes en la intensidad de campo y cambian de manera alterna (pulsos). Las moléculas de igual tamaño migran con	Útil en brotes, puede discriminar y rastrear exitosamente la fuente de infección por Salmonella diferenciando entre serovariedades. Técnica lenta, laboriosa y no tiene sensibilidad equitativa con diferentes serotipos.

		velocidades diferentes, dependiendo de su posición inicial en el gel.	
Molecular	Serotipificación molecular	Diversas técnicas basadas en la identificación de Salmonella en base a los genes que codifican los antígenos somáticos y falgelares, o la sistemática secuenciación de varios alelos de los genes de flagelina, entre otras.	Reproducible, no requiere tanta experiencia técnica, rápidos resultados. Da resultados parciales (serogrupo) para cepas que expresan antígenos H con, hasta ahora, firma genética no identificada. Da resultados erróneos para algunos serotipos caracterizados por antígenos H complejos cuyas firmas genéticas son alelicamente diversas.

(Liu *et al.*, 2011; Wattiau *et al.*, 2011; González *et al.*, 2014)

III. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades infecciosas para existir en una población requieren de la interacción de múltiples factores propios de la especie hospedera, del agente causal y del hábitat. El equilibrio entre ellos puede ser afectado por aspectos muy variados, como son los cambios en la distribución de los asentamientos humanos derivados del constante incremento en la población y su distribución hacia regiones antes desocupadas. Dichos cambios aumentan el contacto entre personas con animales domésticos y silvestres, lo que puede provocar que el riesgo de transmisión de enfermedades ya conocidas y el surgimiento de nuevas se eleve.

La ciudad de Santiago de Querétaro se encuentra en constante crecimiento. La mancha urbana sigue ampliándose y ya no hay un cambio gradual de área natural a zona rural y posteriormente a zona urbana, sino que se ocupan cada vez más los escasos fragmentos de paisaje silvestre para construcción de viviendas, corredores industriales, desarrollos comerciales, etc. De esta manera se ha ido desplazando a la flora y fauna silvestre nativa. No obstante la información sobre los agentes patógenos presentes en las poblaciones silvestres locales es escasa. La transmisión de agentes patógenos puede darse tanto de fauna silvestre a humanos como de fauna silvestre a animales domésticos y en ambos sentidos. Es importante conocer estas dinámicas para prever problemáticas de salud pública como la transmisión de enfermedades zoonóticas.

El tlacuache o zarigüeya (*Didelphis virginiana*), es una especie silvestre que se adapta muy bien al entorno humano y que es reservorio natural de varios agentes infecciosos, entre ellos *Salmonella* spp. la cual es una bacteria patógena de carácter zoonótico de gran importancia, amplia distribución y múltiples hospederos. Dicho agente es considerada como una de las principales bacterias causales de intoxicaciones alimentarias a nivel mundial. En México hay poca información sobre la prevalencia de infecciones zoonóticas en el ámbito silvestre, pero en Querétaro no hay información sobre el tema, lo cual es de relevancia en salud pública. Este proyecto se enfoca en el estudio de la prevalencia de

Salmonella en zonas urbanas y periurbanas en fauna silvestre nativa para así contribuir al conocimiento de la dinámica del agente patógeno.

IV. HIPÓTESIS

El tlacuache (*Didelphis virginiana*) es reservorio de *Salmonella* spp. y por su carácter sinantrópico puede adquirir y diseminar serotipos de importancia en salud pública en zonas urbanas y periurbanas.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Determinar la prevalencia de *Salmonella* spp. en tlacuaches (*Didelphis virginiana*) en zonas urbanas y periurbanas de la ciudad de Santiago de Querétaro.

5.2 Objetivos particulares:

- 5.2.1** Detectar la presencia de *Salmonella* spp. en los individuos muestreados mediante técnicas microbiológicas y moleculares.
- 5.2.2** Obtener información general sobre el estado de salud de los tlacuaches.
- 5.2.3** Determinar si hay diferencia en la prevalencia de *Salmonella* spp. en zona urbana respecto a la zona periurbana.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Área de estudio

El estudio tuvo lugar en la Zona Metropolitana de Querétaro, ubicada al suroeste del estado de Querétaro. Se conforma por cuatro municipios: Corregidora, Huimilpan, El Marqués y Querétaro (INEGI, 2009-2012). Se encuentra a 1820 m de altitud. Presenta clima seco, semiseco y templado subhúmedo. El rango de temperatura va de 12-20 °C, con un rango de precipitación de 500-700 mm con lluvias en verano, en los meses de junio a septiembre. Predominan la selva baja caducifolia, matorral y pastizal (INEGI, 2010).

Dado el crecimiento de la ciudad la fragmentación de la región es amplia, y la transición de hábitats naturales a áreas urbanas es directa, lo que complicó la determinación franjas que no tuvieran impacto antropogénico. Por ello se seleccionaron zonas que mantienen hábitat natural mediante la obtención de imágenes satelitales utilizando herramientas electrónicas. Las capturas se hicieron en las zonas aledañas al Anillo Vial Fray Junípero Serra (Zibatá) y en el Parque Nacional El Cimatario (PANEC), que se determinaron como áreas periurbanas. Así como el Centro Universitario de la Universidad Autónoma de Querétaro y el Cerro de Las Campanas (CU-CC), que se seleccionaron como representantes de áreas urbanas.

6.2 Modelo de estudio

El tlacuache (*Didelphis virginiana*) sirvió como modelo de estudio por sus hábitos generalistas de alimentación y por su adaptación a entornos humanos. El tamaño de muestra calculado fue de 60 individuos, determinado estadísticamente en base a la prevalencia encontrada por Ruiz-Piña *et al.* (2002) utilizando la fórmula para cálculo del tamaño de muestra para estimar una proporción, $n = (z^2 pq) / e^2$, donde n = tamaño de muestra, z = nivel de confianza, p = variabilidad positiva, q = variabilidad negativa, e = precisión o error.

No obstante por la dificultad de captura y la necesidad de procesar las muestras, se capturaron en Zibatá y CU-CC 20 animales en cada uno, en PANEC por el contrario sólo se tuvieron 5 ejemplares.

6.3 Capturas

Las capturas de los ejemplares se llevaron a cabo durante los meses de agosto a diciembre de 2016, utilizando el permiso de colecta SGPA/DGVS/05871/16 expedido por la Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Se utilizó contención física como lo mencionan Gallina y López-González (2011), usando trampas Tomahawk modelo 109.5 (107 x 31 x 31 cm) (Tomahawk Live Trap Co.), las cuales fueron colocadas cerca de veredas naturales con separación de 100 a 200 m entre ellas, y se fijaron con cadenas a un árbol o arbusto, se hizo el camuflaje de las mismas con ramas y piedras. Se usó un atrayente con base en sardina comercial. Se llevó un registro detallado de la ubicación de las trampas por geo-posicionamiento utilizando un receptor GPS y por descripción del área. Se activaron las trampas al anochecer (18-20 h), se revisaron e inactivaron durante las primeras horas de la mañana (inicio seis-siete h), las horas dependieron de la puesta y salida del sol.

6.4 Manejo inicial

Se procuró determinar lo más certeramente posible mediante observación por el exterior de la jaula, si se trataba de macho o hembra. Posteriormente, se calculó el peso haciendo uso de una báscula electrónica portátil (NOVAL, EL10) en la que se colocó la jaula con el ejemplar en su interior, a la medida registrada se le restó el peso de la jaula vacía obtenido previamente. Posteriormente se llevó a cabo la contención química utilizando Tiletamina Zolazepam (Zoletil® 100) por vía intramuscular (IM). Cada vial de liofilizado para 5 ml de diluyente del producto contenía 250 mg de Tiletamina y 250 mg de Zolazepam ambos como clorhidrato más 990 mg de excipiente c.b.p. La dosis utilizada fue la recomendada para la

especie de 15 mg/kg (West *et al.*, 2007; Morgan *et al.*, 2012). Bajo efecto anestésico, utilizando guantes de piel o carnaza, se extrajo al ejemplar de la jaula sujetando la cabeza por su porción dorsal desde el cuello con una mano mientras se detenía la base de la cola con la otra (Johnson-Delaney, 2014), se colocó en la parte superior externa de la jaula sobre un pañal desechable para adulto y se cubrió con una bolsa de tela de algodón para prevenir la pérdida excesiva de calor corporal derivada del uso del fármaco. A continuación se usaron guantes de nitrilo para la manipulación del paciente (se cambió de par con cada uno). Un paño suave rodeando el rostro del ejemplar se colocó para proteger los ojos y unos tapones adaptados en los oídos para disminuir el impacto de la luz y los ruidos fuertes del ambiente, respectivamente. Las constantes fisiológicas (frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y temperatura) fueron monitoreadas, se confirmó el sexo, se determinó el peso ya sin la jaula y se clasificaron en juveniles y adultos utilizando la fórmula de los maxilares que considera la erupción y el desgaste dentario (Petrides, 1949; Macedo *et al.*, 2006) así como la talla, el peso y en el caso de las hembras el desarrollo del marsupio. Las longitudes total, de la cola, del pie y de la oreja se obtuvieron mediante una cinta métrica. La longitud corporal, considerada de la punta de la nariz a la base de la cola, se determinó a partir de restar la longitud de la cola a la longitud total. Por último se inspeccionó a los animales para detectar heridas, recientes o en proceso de cicatrización, en la piel o en la mucosa oral.

6.5 Toma de muestras

Las muestras recolectadas durante la captura fueron heces frescas, hisopados cloacales y sangre. Las heces frescas se recolectaron colocándolas en tubos de 1.5 o 15 ml libres de DNAsas y RNAsas, en los casos en que el tlacuache defecó durante el manejo. Además se tomaron muestras por duplicado directamente de la cloaca por medio de hisopos estériles que se transportaron en medio Stuart (para identificación de enteropatógenos) (Ruiz-Piña *et al.*, 2002; Nardelli *et al.*, 2011). Las muestras de sangre se obtuvieron en tubos colectores de

3 ml con y sin anticoagulante ácido etilendiaminotetracético (EDTA) en cantidad \leq 1.5 % del peso corporal del ejemplar (Sikes *et al.*, 2011), de las venas: coccígea ventral, safena o cefálica (Johnson-Delaney, 2014), la punción de la vena coccígea ventral permitió extraer sangre de machos y hembras tanto juveniles como adultos, siendo una técnica sencilla con mínimo peligro de lesión al animal (Williams-Newkirk *et al.*, 2013).

6.6 Manejo pre-liberación

Para la identificación de los ejemplares se emplearon métodos de identificación temporal, rasurando de 2.5 por 5 cm en la porción torácica dorsal más aplicación de marcador para ganado en aerosol, y/o permanente, microchip subcutáneo ubicado en la porción dorsal medial entre el cuello y el tórax. Una vez terminado el manejo el ejemplar se regresó a la jaula sobre el pañal desechable y, si la talla del ejemplar lo permitía, dentro de la bolsa de tela con el rostro emergiendo de la misma. Durante la recuperación de la anestesia (30 min-2 h) se procuró reducir el estrés del ejemplar colocando a su disposición agua limpia *ad libitum*, ubicando la jaula bajo la sombra en un área segura y cubriéndola con una funda de manta sin restringir la ventilación. Cuando los animales se recuperaron de la anestesia fueron liberados en el sitio de captura.

6.7 Manejo de hembras con crías

En el caso de las hembras con crías se tuvo en cuenta que las menores a dos meses de nacidas se encuentran en el marsupio donde permanecen aferradas a uno de los pezones de su madre. Las que son mayores pero aún no han sido destetadas a menudo viajan sobre la espalda de su madre (UN-L, 1992), regresando al marsupio para alimentarse de manera más intermitente (Adamski y Demmer, 2000). Con base en lo anterior en los casos de las cuatro hembras capturadas que tenían crías, todas fueron menores de 70 días de edad. Éstas aún estaban en el marsupio donde permanecieron durante el manejo de la madre, que

se procuró fuera muy breve (menor a una hora), de manera que no pasaron más de dos horas sin alimento, basado en la frecuencia de alimentación recomendada para crías pequeñas por Arcangeli (2014). De este modo se aseguró que mantuvieran una alimentación y temperatura corporal adecuadas. Durante este periodo se previno que sufrieran pérdida de calor corporal cubriendo a la madre con una bolsa de tela de algodón. Al momento de la liberación se aseguró no se quedara ninguna cría abandonada.

De esta forma se minimizó el estrés, derivado del manejo, tanto para la madre como para sus crías.

Las muestras de heces y sangre fueron refrigeradas a 4 °C y transportadas al laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Naturales (FCN), en el campus Juriquilla. Los hisopos, de igual manera refrigerados, fueron trasladados a la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ).

6.8 Análisis de laboratorio

6.8.1 Pre enriquecimiento de los hisopos cloacales

Los hisopos cloacales fueron sometidos a pre-enriquecimiento con el método descrito por Ternent *et al.* (2004) con modificaciones, en agua peptonada amortiguada, incubados por 24 h a 35 °C. Posteriormente se realizaron 2 alícuotas de 1 ml para extracción de ADN y 2 de 1.2 ml a las que se les agregaron 0.3 ml de glicerol (20 %) como crioprotector a cada una. Las 4 alícuotas se congelaron para su posterior procesamiento. Se hicieron tanto en el laboratorio de Microbiología molecular de la Facultad de Química (FQ) como en el de Microbiología veterinaria de la Facultad de Ciencias Naturales (FCN) de la UAQ.

6.8.2 Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. a partir de pre enriquecimientos

En el laboratorio de Microbiología molecular de la Facultad de Química de la UAQ se llevó a cabo el aislamiento de *Salmonella* spp., cuatro muestras fueron procesadas en fresco y 41 se hicieron a partir de las alícuotas del pre enriquecimiento almacenadas con glicerol al 20 %. Para éstas se siguió un protocolo de descongelamiento a 50 °C, resucitación en baño maría a 27 °C por una hora seguido de incubación a 37 °C por una hora más descrito por Urdahl *et al.* (2012). A continuación se llevó a cabo el protocolo de aislamiento de *Salmonella* spp. con modificaciones descrito por Kozak *et al.* (2009) inoculando 100 µl del pre-enriquecimiento a 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis R10 (Acumedia, NEDGEN®), incubado a 42 °C por 24 h, y 1000 µl en 10ml de caldo Tetratonato (Acumedia, NEDGEN®) activado con 180 µl de yodo, incubado a 35 °C por 24 h. Al día siguiente se hizo el sembrado de los enriquecimientos en medio sólido XLD adicionado con novobiocina a 10 ppm, incubado a 35 °C por 24 h. Una caja de Petri se utilizó por ejemplar dividida a la mitad para tener los dos enriquecimientos. Posterior a la incubación se hizo el pase de 3 colonias sospechosas a cajas nuevas con el medio sólido con el mismo proceso de incubación. Un tercer pase se hizo de las colonias sospechosas. Las colonias del último crecimiento fueron sometidas a la prueba de la urea, colocándolas en 1 ml de medio con incubación a 37 °C por 24 h. Las negativas a ella (sin cambios de coloración) se inocularon en caldo tripticosa soya y se incubaron a 35 °C por 24 h. Posteriormente se realizaron dos alícuotas de un ml para extracción de ADN y tres de 500 µl con glicerol al 33.33 % cada una. Las cinco alícuotas se almacenaron a -20 °C para su posterior procesamiento.

6.8.3 Extracción de ADN de muestras fecales, preenriquecimientos, cultivos bacterianos y muestras sanguíneas

La extracción de ADN de las muestras fecales y de todas las muestras sanguíneas se llevó a cabo utilizando los kits comerciales QIAamp DNA Stool Mini Kit (50) y DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN) respectivamente. De las colonias

aisladas obtenidas de los hisopos cloacales se realizó la extracción con el kit Quick-gDNA Mini Prep 50 (Zymo Research). Las especificaciones del fabricante con las adaptaciones necesarias fueron efectuadas como se muestra a continuación.

Para las muestras fecales los pasos de centrifugación se hicieron a 14000 rpm a temperatura ambiente. De las heces congeladas se pesaron 220 mg en un tubo de 2 ml que se colocó sobre hielo. Acto seguido se agregaron 1.4 ml de ASL Buffer mezclando por vórtex continuo por dos min aproximadamente hasta homogenizar completamente la muestra. La suspensión se calentó por cinco min a 70 °C aplicando vórtex por 15 s al finalizar. Para formar una pastilla con las partículas de heces se centrifugó por dos min. En un tubo nuevo de 2 ml se pipetearon 1.2 ml del sobrenadante, desechando la pastilla. Una tableta de Inhibit EX se agregó, aplicando vórtex inmediatamente después de forma continua por dos min aproximadamente hasta obtener una mezcla homogénea y se incubó a temperatura ambiente por un min. Para formar una pastilla con los inhibidores unidos a la matriz Inhibitex se centrifugó por ocho min. Todo el sobrenadante de las muestras se pipeteó en un tubo de 1.5 ml nuevo, desechando la pastilla y después se centrifugó por ocho min. En un tubo nuevo de 1.5 ml se pipetearon 15 µl de proteinasa K y se añadieron 200 µl del sobrenadante anterior. A continuación se agregaron 200 µl de AL Buffer y se mezcló por vórtex por 15 s para formar una solución homogénea que se incubó a 70°C por 10 min. Al lisado se le agregaron 200 µl de etanol (96-100%) y se mezcló por vórtex. Cuidadosamente se aplicaron 600 µl del lisado a la columna de centrifugado QIAamp, se centrifugó por 1 min y se colocó la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml, desechando el tubo con el filtrado. A continuación se agregaron 500 µl de buffer AW1 y se centrifugó por 1 min, colocando la columna QIAamp en un nuevo tubo colector de 2 ml. El tubo colector con el filtrado se descartó, se añadieron 500 µl de buffer AW2 en un tubo de 2 ml nuevo y se centrifugó por 3 min, descartando el tubo colector con el filtrado al final. La columna QIAamp se colocó en un nuevo tubo colector de 2 ml centrifugando por 3 min. A un nuevo y etiquetado tubo de 1.5 ml fue transferida la columna y se pipetearon 200 µl de buffer ATE directamente sobre la membrana

QIAamp. A temperatura ambiente se incubó por 1 min, luego se centrifugó por 1 min para la elución del ADN. Finalmente la columna se desechó y el producto se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

Con las muestras sanguíneas las centrifugaciones se hicieron a temperatura ambiente (15-25 °C) y el vórtex por 10 s. Primero se pipetearon 20 µl de proteinasa K en un tubo de 2 ml, se añadieron 100 µl de sangre con anticoagulante y se ajustó el volumen a 220 µl con PBS. Para producir una solución homogénea se agregaron 200 µl de buffer AL (sin etanol añadido), se mezcló a fondo por vórtex y se incubó a 56 °C por 10 min. A la muestra se le añadieron 200 µl de etanol (96-100 %), se mezcló a fondo por vórtex para homogenizar y luego se pipeteó dentro de la columna de centrifugado DNeasy mini colocada en un nuevo tubo colector de 2 ml. Se centrifugó a 8000 rpm por 1 min y se desechó el sobrenadante y el tubo colector. La columna se colocó en un tubo nuevo de 2 ml al que se agregaron 500 µl de buffer AW1 y se centrifugó por 1 min a 8000 rpm. El fluido y el tubo colector se descartaron, la columna se colocó en un nuevo tubo colector de 2 ml y se añadieron 500 µl de buffer AW2. Para secar la membrana de la columna se centrifugó por 3 min a 14000 rpm, luego se desechó el fluido y el tubo colector. La columna se colocó en un tubo limpio de 1.5 ml y se pipetearon 100 µl de buffer AE directamente sobre la membrana DNeasy, se incubó a temperatura ambiente por 1 min. Para la elución se centrifugó por 1 min a 8000 rpm. Para incrementar la concentración final de ADN se repitió la elución con 100 µl más de buffer AE como se indicó anteriormente, reutilizando el tubo de la primera. El producto fue almacenado a -20 °C para ser utilizado posteriormente.

Para la extracción de ADN de las alícuotas de 1 ml de caldo tripticasa soya de los aislamientos positivos las centrifugaciones se hicieron a 11000 rpm por un minuto a excepción de algunos pasos. Primero se centrifugaron las muestras por tres minutos para obtener una pastilla de bacterias, desechando el sobrenadante. Para resuspender se agregaron 500 µl de Genomic Lysis Buffer se aplicó vórtex y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. La mezcla se transfirió a una columna dentro de un tubo colector de 2 ml y se centrifugó

después de lo cual se desechó el tubo con el fluido. La columna se transfirió a un tubo nuevo y se adicionaron 200 μ l de DNA Pre-Wash Buffer, se centrifugó para después desechar el fluido asegurándose de que el tubo quedara seco. Luego se añadieron 500 μ l de g-DNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó. Posteriormente se cambió la columna a un tubo nuevo de 1.5 ml y se agregaron 50 μ l de DNA Elution Buffer directamente al centro de la columna, se incubó por cinco minutos a temperatura ambiente. Para la elución se centrifugó por 30 s después de lo cual se desechó la columna y el producto se almacenó a -20 °C para su posterior procesamiento.

De las alícuotas de 1 ml de pre enriquecimiento se realizó la liberación de ADN por calor de acuerdo a los protocolos descritos por Kongmuang *et al.* (1994) y Soumet *et al.* (1999) con las siguientes modificaciones: las muestras se descongelaron y homogenizaron por vórtex para tomar 200 μ l, éstos se centrifugaron a 14 000 rpm por 10 min para formar una pastilla con el material celular y desechar el sobrenadante. A continuación se hizo un lavado con 400 μ l de PBS con un ciclo de centrifugado como el anterior. Para concluir la pastilla se resuspendió en 50 μ l de PBS y la mezcla se calentó a 100 °C por 10 min, para finalizar se centrifugó a la misma velocidad que antes por 30 s para sedimentar el material celular indeseado. El ADN se refrigeró a 4 °C para su posterior uso en la PCR dentro de un periodo no mayor a 72 h posteriores a su liberación.

6.8.4 Estandarización de PCR en punto final

La estandarización de los oligonucleótidos invA3 se realizó con el kit Phusion Hot Start II con *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* spp. y muestras de ADN extraídas de heces de un donador diagnosticado con Salmonelosis para obtener un control positivo (C+). Primeramente se realizó un gradiente utilizando *S. Typhimurium* para encontrar la temperatura de alineamiento más adecuada para los oligonucleótidos. Como referencia se utilizó la temperatura obtenida a partir del programa en línea Tm Calculator de Thermo Fisher Scientific, que fue de 64.5 °C, siguiendo la recomendación de que la temperatura inicial fuera 6 a 10 °C menor a la calculada.

De esta manera el gradiente se hizo de 55 a 65 °C, las temperaturas intermedias fueron 55.7, 57, 59, 61.4, 63.3 y 64.5 °C. Se obtuvo amplicón por debajo de 300 pb en todas la temperaturas excepto a 65 °C (Figura 6). Se hizo otro gradiente con las muestras An 1 y 2 de heces para determinar si podían ser usadas como C+. Las temperaturas fueron 55, 55.6, 56.9, 58.8, 61, 62.9, 64 y 64.5 °C. De dicho experimento se obtuvieron amplicones mejor definidos a partir de 61 °C y hasta los 64 °C, se tomó la temperatura de 62.9 °C por tener una banda bien definida (Figura 7).

Finalmente se realizó una PCR en punto final con las muestras An 1 y 2, *S. Typhimurium*, así como con ADN extraído de colonias de *Salmonella* spp. identificadas como S 1 y S 10 y con un pool de ADN de heces de tlacuache, con la temperatura de alineación de 62.9 °C (Figura 8).

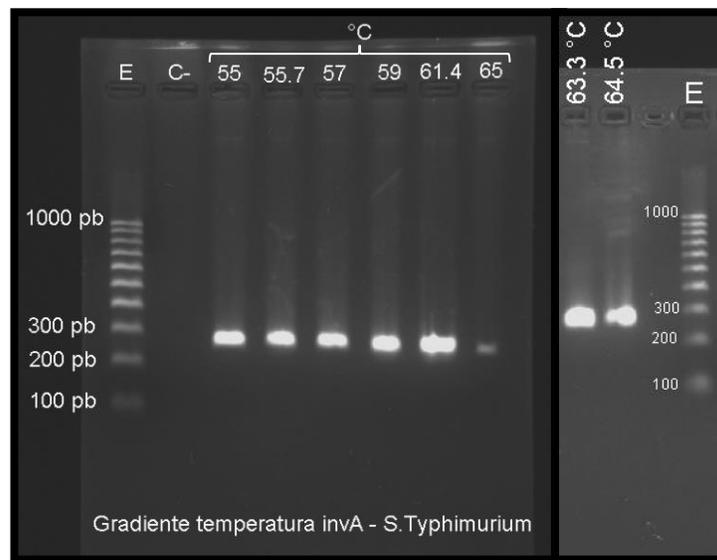


Figura 6. Gradiente de temperatura de 55 a 65 °C con oligonucleótidos invA y ADN de *Salmonella Typhimurium*. E: marcador de peso molecular; C-: control negativo; pb: pares de bases.

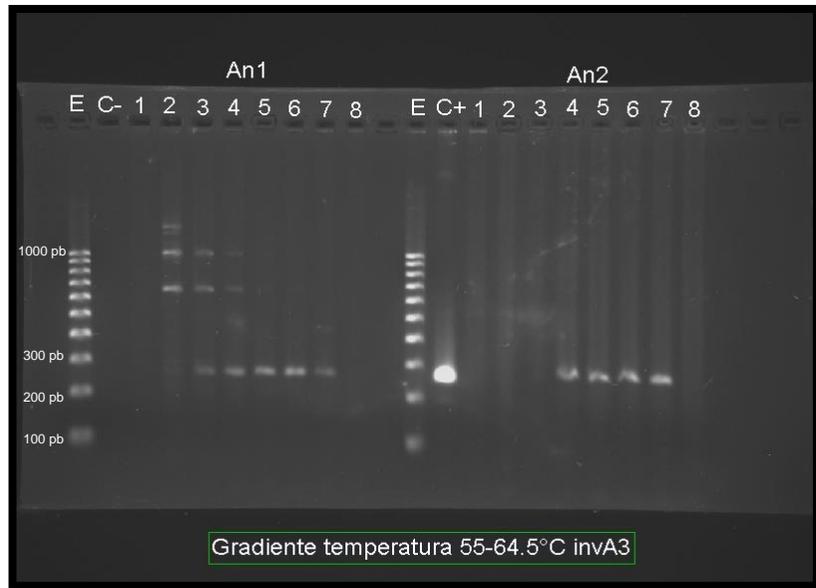


Figura 7. Gradiente de temperatura de 55 a 64.5 °C con oligonucleótidos invA y ADN de heces An 1 y 2. E: marcador de peso molecular; C-: control negativo; C+: S. Typhimurium; 1: 55 °C; 2: 55.6 °C; 3: 56.9 °C; 4: 58.8 °C; 5: 61 °C; 6: 62.9 °C; 7: 64 °C; 8: 64.5 °C; pb: pares de bases.

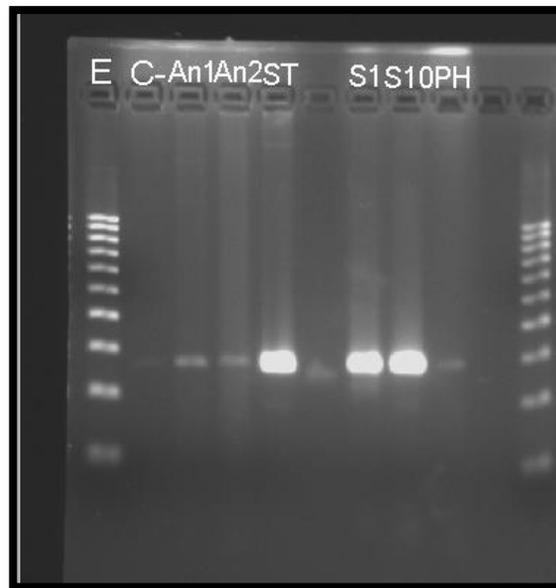


Figura 8. Resultados PCR en punto final con oligonucleótidos invA, controles positivos y pool de ADN de heces de tlacuache. E: marcador de peso molecular; C-: control negativo; An 1 y 2: ADN de heces; ST: S. Typhimurium; S 1 y 10: *Salmonella* spp.; PH: pool de ADN de heces de tlacuache; pb: pares de bases.

6.8.5 Amplificación por PCR en punto final de *Salmonella enterica*

A partir de las colonias aisladas se hizo reacción en cadena de la polimerasa en punto final (PCR por sus siglas en inglés) con amplificación del gen 16S rRNA, con oligonucleótidos “MIN” utilizados por Søborg *et al.* (2013), así como del gen *invA*, con oligonucleótidos tanto de Liu *et al.* (2002) *invA*nest 1 y 2, “*invA*”, como los utilizados por Garrido *et al.* (2013), validados por Cheng *et al.* (2008), (denominados “*invA3*” para diferenciarlos de los anteriores) para detección molecular de *Salmonella* spp, especie a la que pertenecen la mayoría de los serotipos de interés para el estudio por ser los que principalmente afectan a los mamíferos. Para las 22 muestras fecales, 44 sanguíneas y 41 pre enriquecimientos a partir de hisopados cloacales se amplificó mediante PCR el gen *invA* utilizando los oligonucleótidos *invA3* mencionados anteriormente. En el Cuadro 5 se detallan las secuencias de los tres pares de oligonucleótidos que se diluyeron a una concentración de 10 µM para su uso.

Cuadro 5. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para cada gen amplificado.

<i>Gen</i>	<i>Nombre</i>	<i>Secuencia (5'-3')</i>	<i>Referencia</i>
<i>16S rRNA</i>	MIN	Sentido: ACGGTAACAGGAAGMAG Antisentido: TATTAACCACAACACCT	Søborg <i>et al.</i> (2013)
<i>invA</i>	<i>invA</i>	Sentido: AACCAGCAAAGGCGAGCAG Antisentido: GCGCAGGCCATAATCAATAAA	Liu <i>et al.</i> (2002)
<i>invA</i>	<i>invA3</i>	Sentido: AACGTGTTTCCGTGCGTAAT Antisentido: TCCATCAAATTAGCGGAGGC	Cheng <i>et al.</i> (2008); Garrido <i>et al.</i> (2013)

La mezcla de reacción para la PCR se muestra en el Cuadro 6 en volumen de 17 µl del kit Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA) utilizado con los oligonucleótidos MIN e invA. En el Cuadro 7 se muestra la mezcla por reacción en volumen de 12 µl del kit Maxima Hot Start PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, USA) utilizada con el ADN de las colonias aisladas y con el de los pre enriquecimientos con los oligonucleótidos invA3. En el Cuadro 8 se muestra la mezcla por reacción en volumen de 15 µl del kit Phusion Hot Start II (Thermo Scientific, USA) utilizados con los oligonucleótidos invA3 con el ADN de las muestras fecales y sanguíneas. En los Cuadros 9 a 12 se describen los programas de amplificación para cada par de oligonucleótidos llevados a cabo en termociclador C1000 (Bio-Rad Laboratories).

Cuadro 6. Mezcla por reacción de PCRpf con kit Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA). Volumen final 17 µl.

Reactivo	µl
10X Hot Start PCR Buffer	1.7
10 mM dNTPs	0.34
Oligonucleótido sentido	0.68
Oligonucleótido anti sentido	0.68
Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase	0.085
25 mM MgCl ₂	1.36
H ₂ O	10.2
ADN	2

Cuadro 7. Mezcla por reacción de PCRpf con kit Maxima Hot Start PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, USA). Volumen final 12 μ l.

Reactivo	μ l
Maxima Hot Start PCR Master Mix (2X)	6
Oligonucleótido sentido	0.4
Oligonucleótido anti sentido	0.4
BSA 1:10	1.6
H ₂ O	1.6
ADN	2

Cuadro 8. Mezcla por reacción de PCRpf con kit Phusion Hot Start II (Thermo Scientific, USA). Volumen final 15 μ l.

Reactivo	μ l
H ₂ O	4.6
5X Phusion HF Buffer	3
10 mM dNTPs	0.3
MgCl ₂	0.2
invA 3 sentido	0.75
invA 3 anti sentido	0.75
BSA 1:10	2.25
Phusion Hot Start II DNA Polymerase	0.15
ADN 5 ng/ μ l	3

Cuadro 9. Programa de amplificación de PCRpf para gen 16S rRNA, con kit Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA).

Paso	Temp. (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	30 s	
Alineación	57.4	30 s	35
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	5 min	1

Cuadro 10. Programa de amplificación de PCRpf para gen *invA*, con kit Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA).

Paso	Temp. (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	20 s	
Alineación	53	30 s	32
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	2 min	1

Cuadro 11. Programa de amplificación de PCRpf para gen *invA*, con kit Maxima Hot Start PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, USA).

Paso	Temp. (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	4 min	1
Desnaturalización	95	30 s	
Alineación	57	30 s	35
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	5 min	1

Cuadro 12. Programa de amplificación de PCRpf para gen *invA*, con kit Phusion Hot Start II (Thermo Scientific, USA).

Paso	Temp. (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	30 s	1
Desnaturalización	98	10 s	
Alineación	62.9	30 s	32
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	5 min	1

6.8.6 Visualización de DNA y productos de PCR

Los productos de DNA y de PCR se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa. La concentración que se utilizó para la verificación de la integridad del ADN y para los productos de PCR fue de 1.5 o 2 %. Los geles se prepararon pesando los gramos correspondientes de agarosa en polvo (Thermo Fisher Scientific Inc.). Posteriormente se disolvió la agarosa en búfer Tris, Ácido acético y EDTA 1x (TAE: Thermo Fisher Scientific Inc.) mediante calentamiento en microondas. Luego se cargaron 2 µl del marcador de peso molecular O'GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (#SM1153, Thermo Fisher Scientific Inc.) y 2 µl de búfer de carga 6X Orange DNA Loading Dye (#SM1153, Thermo Scientific Inc.) adicionado GelRed Nucleic Acid Stain 10 000 X in Water (41003, Biotium) diluido 1:10 000. A su vez, se cargaron 5 µl de muestra de ADN y 2 µl de búfer de carga con GelRed, como recomienda el fabricante. Los geles de agarosa se corrieron en búfer TAE 1x frío a 60 V/ 400 mA durante 60 minutos y se visualizaron mediante exposición a luz UV en el fotodocumentador Gel Doc XR+ Gel Documentation System (Bio-Rad Laboratories) utilizando el programa Quantity One (Bio-Rad Laboratories).

6.8.7 Secuenciación de productos de PCR obtenidos

Para comprobar que las bandas obtenidas correspondieran a *Salmonella enterica* el producto de la PCR de la muestra de sangre del tlacuache Zi 17 que dio resultado positivo se envió a secuenciar a la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM. El resultado de la secuenciación se analizó mediante el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). La secuencia se transformó a formato FASTA y posteriormente se utilizó el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990) para buscar en la base de datos de GenBank y confirmar que perteneciera al gen esperado. Del 89% de la secuencia comparada hay una similitud del 98% con *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg (Apéndice 10.3).

6.8.8 Procesamiento de muestras sanguíneas

De las muestras de sangre con EDTA se tomó una submuestra que se envió a un laboratorio externo (LABSA S.A. de C.V.) para efectuar el hemograma que sirvió para tener de manera indirecta una referencia del estado de salud de los tlacuaches, y se hicieron frotis. El resto de la muestra se congeló a -20 °C para la posterior extracción de ADN. De las muestras de sangre sin EDTA se obtuvo suero (se centrifugó a 3000 rpm por 20 min), el cual fue congelado a -20 °C.

6.9 Manejo de residuos peligrosos, biológico-infecciosos

Los residuos sólidos no anatómicos fueron colocados en bolsas traslúcidas de calibre 200 y los punzocortantes en recipientes rígidos, ambos de polipropileno color rojo, impermeables, libres de cloro, llenos al 80 % de su capacidad, marcados con el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos, cerrándolos antes de transportarlos al sitio de almacenamiento temporal que fue el laboratorio de Microbiología Veterinaria, donde fueron recolectados y transportados por una empresa especializada y autorizada por la SEMARNAT que se encargó de darles el tratamiento correspondiente (NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

6.10 Determinación de la edad

Para clasificar en juveniles y adultos a los ejemplares capturados se cotejaron las fórmulas dentarias con el cuadro elaborado por Petrides (1949) en combinación con el cuadro comparativo de las clases de edad empleadas por distintos autores mostrado por Gardner y Sunquist (2003) (Cuadro 13). Además se tomó en cuenta la relación entre la longitud corporal y el peso de los ejemplares utilizando los 400 mm y 1300 g como la división entre juveniles y adultos de acuerdo a Hartman (1928) (Gardner y Sunquist, 2003), especialmente de aquellos cuya fórmula no se ajustaba a las esperadas.

Cuadro 13. Erupción dentaria en *Didelphis virginiana* con detalle de reemplazo del tercer premolar desiduo (D) para clasificación, en juveniles y adultos, de los ejemplares capturados. I: incisivo; C: canino; PM: pre molar; M: molar; los números entre paréntesis indican dientes en erupción.

Fórmula total (I,C,PM,M)	Reemplazo del tercer premolar desiduo	Secuencia de erupción de molares				Edad en meses	Clasificación final
	3er PM	1 M	2 M	3 M	4 M		
<u>5120</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	3 aprox.	Juveniles
4120	0	0	0	0	0		
	<u>D3</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>		
	D3	(1)	0	0	0		
	<u>D3</u>	<u>(1)</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>		
	D3	1	0	0	0		
<u>5131</u>	<u>D3</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	4	
4132	D3	1	(2)	0	0		
	<u>D3</u>	<u>1</u>	<u>(2)</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	5-8.5	
<u>5132</u>	D3	1	2	3	0		
4133	<u>D3</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>(3)</u>	<u>0</u>		
	(3)	1	2	3	(4)		
<u>5133</u>	<u>(3)</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>0</u>	7-11	
4134	3	1	2	3	4		
	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>(4)</u>		
<u>5134</u>	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	Más de 10	Adultos
4134	3	1	2	3	4		

Modificado de Petrides, (1949) y Gardner y Sunquist (2003).

6.11 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó del paquete estadístico IBM SPSS Statistics 24. Únicamente se compararon los datos obtenidos de Zibatá y CU-CC. PANEC no se incluyó por tener una n demasiado pequeña ($n=5$). Los valores de peso se normalizaron mediante logaritmo neperiano, los de longitud de la cola se elevaron al cubo, la frecuencia cardiaca al cuadrado, la frecuencia respiratoria, los neutrófilos, los basófilos, los monocitos y los linfocitos mediante logaritmo base 10. De tal forma que los valores normalizados del peso, las longitudes y las frecuencias cardiaca y respiratoria se evaluaron juntos en un modelo lineal general multivariante, los valores normalizados de los hemogramas se evaluaron en otro modelo lineal general multivariante y la temperatura se evaluó por un ANOVA univariado con el fin de probar asociación de dichos parámetros con el sitio de captura, el sexo, la edad, la presencia de lesiones, a ser positivos a *Salmonella* spp. o a alguna interacción entre dichos factores. Para las correlaciones de Pearson se utilizaron los valores normalizados y para las de Spearman se utilizaron los valores sin transformar. Para evaluar la existencia de relación entre la prevalencia de *Salmonella* spp. y el sitio de captura, el sexo, la edad o la presencia de lesiones en los tlacuaches se usó la prueba ji-cuadrado. El análisis de riesgo se realizó mediante tablas de contingencia con el programa Epidat versión 3.1 (Junta de Galicia y OPS/OMS, 2006) calculando la razón de probabilidad, u Odds Ratio (OR), que constituye una medida de efecto alternativa al riesgo relativo, y que permite expresar los resultados de estudios transversales. La evaluación de proporción de sexos se llevó a cabo mediante una prueba binomial para una muestra.

VII. RESULTADOS

7.1 Proporción de sexos

Los porcentajes de hembras y machos en general y para Zibatá y CU-CC se muestran en la Figura 9. En el estudio se capturaron un total de 22 hembras y 18 machos de *Didelphis virginiana*. La proporción de sexos general fue de 1:0.8, es decir 0.8 machos por cada hembra. En Zibatá se obtuvieron 9 hembras y 11 machos con una proporción de 0.82:1. En CU-CC el número de hembras fue 13 y 7 machos con una proporción 1:0.54. No obstante a pesar de que numéricamente hay diferencia en la proporción de sexos en ambas localidades, no se observó diferencia significativa tanto en Zibatá como en CU-CC ($P= 0.824$ y $P= 0.263$, respectivamente con IC=95 %) por lo que las muestras proceden de una población con una proporción de 1:1 en hembras y machos.

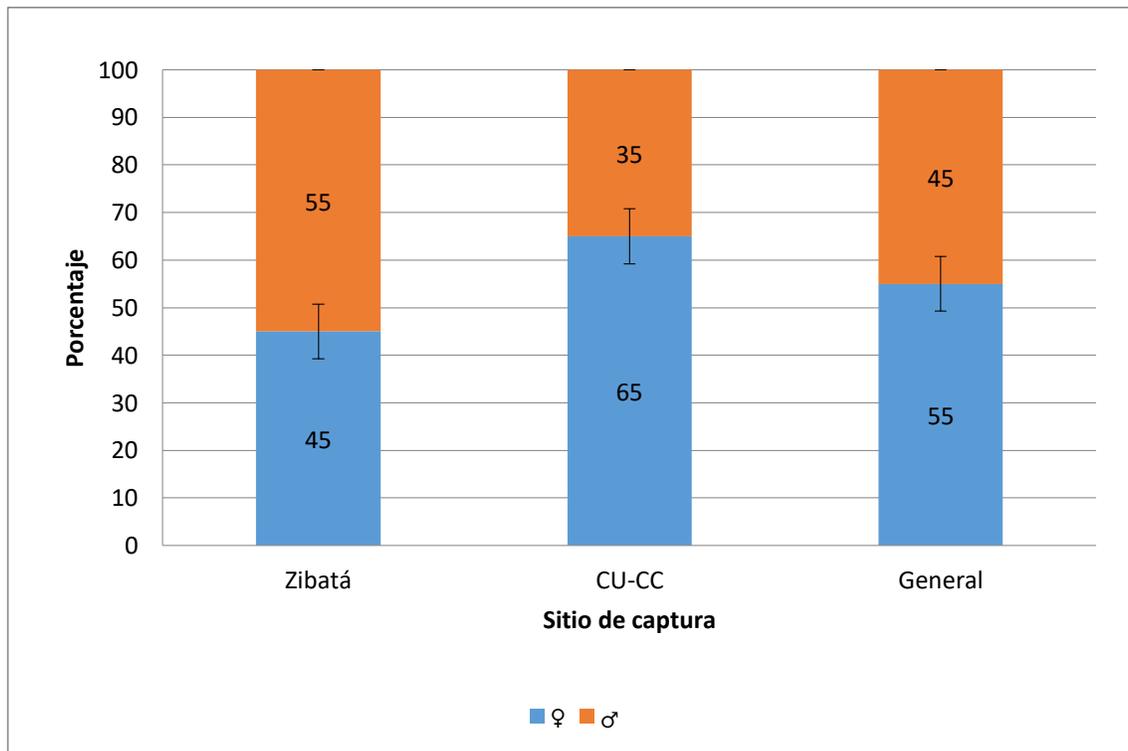


Figura 9. Porcentaje (%) de hembras y machos de tlacuaches (*D. virginiana*) en ambos sitios (General) y para cada sitio de captura (Zibatá, CU-CC). ♀: hembras; ♂: machos.

7.2 Morfometría y constantes fisiológicas

Los valores promedio y desviación estándar de las medidas corporales y del peso de los tlacuaches de acuerdo al sexo y a la edad se describen en el Cuadro 14, por sitio de captura y en general. En el Cuadro 14.1 se muestran los valores de P obtenidos para las medidas corporales y el peso de tlacuaches de acuerdo a categorías de sitio, sexo, edad, lesiones así como las interacciones entre ellas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los sitios de captura, hembras y machos o la presencia de lesiones (IC= 95 %; g.l.= 1; $P>0.05$ para cada uno de los factores). Sin embargo, si hubo diferencias en el peso entre animales con lesiones y sin lesiones ($F=7.8$; g.l.= 1; $P=0.012$). Así mismo hay diferencias significativas en la edad con respecto al peso ($F=16.51$; g.l.= 1; $P= 0.001$) y las longitudes total ($F=14.68$; g.l.= 1; $P= 0.001$), corporal ($F=17.52$; g.l.= 1; $P= 0.001$), de la cola ($F=6.59$; g.l.= 1; $P= 0.019$), del pie ($F=12.51$; g.l.= 1; $P= 0.002$) y de la oreja ($F=7.22$; g.l.= 1; $P= 0.015$), encontrándose valores menores en los animales juveniles.

El peso y la longitud corporal promedio por edad para cada sitio de captura y en ambos sitios (general) se muestran en la Figura 10. El peso está positivamente correlacionado tanto con la longitud total ($R=0.753$; $n=40$; $P=0.000$) como con la corporal ($R=0.794$; $n=40$; $P=0.000$).

Cuadro 14. Media y desviación estándar de medidas corporales y del peso de tlacuaches (*D. virginiana*) para Zibatá, CU-CC y en ambos sitios (General) de acuerdo a categorías de sexo y edad.

Parámetro		n	Peso (g)		Long. Total (mm)		Long. Corporal (mm)		Long. Cola (mm)		Long. Pie (mm)		Long. Oreja (mm)	
			Promedio	DE (±)	Promedio	DE (±)	Promedio	DE (±)	Promedio	DE (±)	Promedio	DE (±)	Promedio	DE (±)
Zibatá	Hembras	9	1339	526	725	107	417	67	308	98	53	7	46	7
	Machos	11	1495	897	766	105	427	65	339	43	56	6	49	8
	Adultos	10	1945	720	814	110	475	39	339	101	59	5	53	7
	Juveniles	10	905	185	680	38	369	32	311	20	50	4	43	4
	General	20	1425	739	747	105	422	65	325	72	54	7	48	7
CU-CC	Hembras	13	1590	859	784	77	443	54	340	32	50	6	46	5
	Machos	7	1693	999	771	137	438	91	334	47	52	8	49	7
	Adultos	11	2270	606	846	78	483	61	363	24	55	6	50	5
	Juveniles	9	839	367	698	46	391	27	307	25	47	3	43	3
	General	20	1626	885	779	99	441	67	338	37	51	7	47	6
General	Hembras	22	1487	737	760	93	432	60	327	67	51	6	46	6
	Machos	18	1572	914	768	115	431	74	337	44	54	7	49	7
	Adultos	21	2115	667	831	93	479	51	352	71	57	6	51	6
	Juveniles	19	874	280	689	42	379	31	309	22	48	4	43	4
	General	40	1526	811	763	102	432	66	332	57	53	7	47	6

Long.: Longitud. DE ±: desviación estándar

Cuadro 14.1 Valores de *P* obtenidos para las medidas corporales y el peso de tlacuaches (*D. virginiana*) de acuerdo a categorías de sitio, sexo, edad, lesiones así como las interacciones entre ellas.

Valor de <i>P</i>						
Sitio	0.956	0.164	0.209	0.786	0.155	0.567
Sexo	0.928	0.633	0.818	0.824	0.443	0.324
Edad	0.001*	0.001*	0.001*	0.019*	0.02*	0.015*
Lesiones	0.012*	0.204	0.063	0.252	0.353	0.223
Sitio*Sexo	0.665	0.764	0.475	0.682	0.701	0.653
Sitio*Edad	0.892	0.381	0.198	0.828	0.306	0.653
Sitio*Lesiones	0.534	0.644	0.944	0.218	1	0.402
Sexo*Edad	0.202	0.967	0.749	0.899	0.927	0.469
Sexo*Lesiones	0.143	0.104	0.407	0.149	0.976	0.435
Sitio*Sexo*Edad	0.601	0.1	0.064	0.28	0.052	0.267

(IC: 95 %; g.l.: 1)

* Valores estadísticamente significativos ($P < 0.05$)

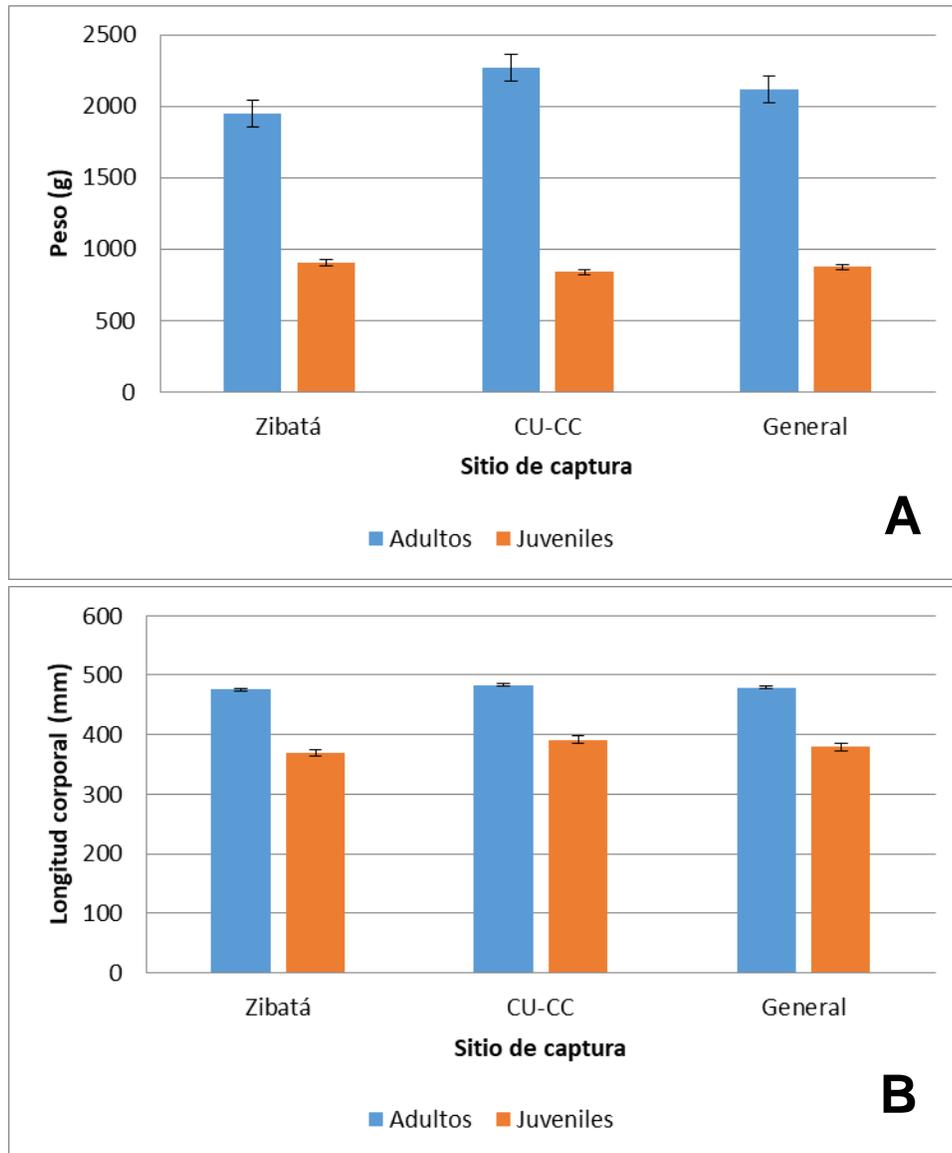


Figura 10. Peso promedio en gramos (A) y Longitud corporal promedio en mm (B) de tlacuaches (*D. virginiana*) para Zibatá, CU-CC y en ambos sitios (General).

En la Figura 11 se observa la relación entre la longitud corporal y el peso de los ejemplares de acuerdo al sexo en los dos sitios de captura, los cuales fueron utilizados para la clasificación de juveniles y adultos en base a los 400 mm

de longitud corporal y los 1300 g de peso, valores que se tomaron como punto de división. El número de hembras y machos adultos y juveniles para Zibatá, CU-CC y en general se detallan en la Figura 12. No se encontró asociación entre la edad de los ejemplares y el sitio de captura ($X^2=0.1$; g.l.= 1; $P=0.75$).

Entre los ejemplares se observaron lesiones generales en la piel que consistieron en laceraciones y abrasiones recientes, en proceso de cicatrización o ya cicatrizadas. No obstante una hembra capturada en Zibatá presentaba amputación de la cola a aproximadamente 5 cm de la base. El número de adultos y juveniles con lesiones se muestra en la Figura 13, obteniendo que hay relación entre estos parámetros ($X^2=10.545$; g.l.= 1; $P=0.001$). Además se observó una correlación negativa moderada entre la edad y la presencia de lesiones (Rho de Spearman=-0.513, $n=40$, $P=0.001$). No obstante la presencia de lesiones no está asociada al sexo de los ejemplares ($X^2=0.08$; g.l.= 1; $P=0.781$). Los análisis de riesgo de presencia de lesiones por sexo, edad y sitio de captura se muestran en los Cuadros 17, 18 y 19, respectivamente.

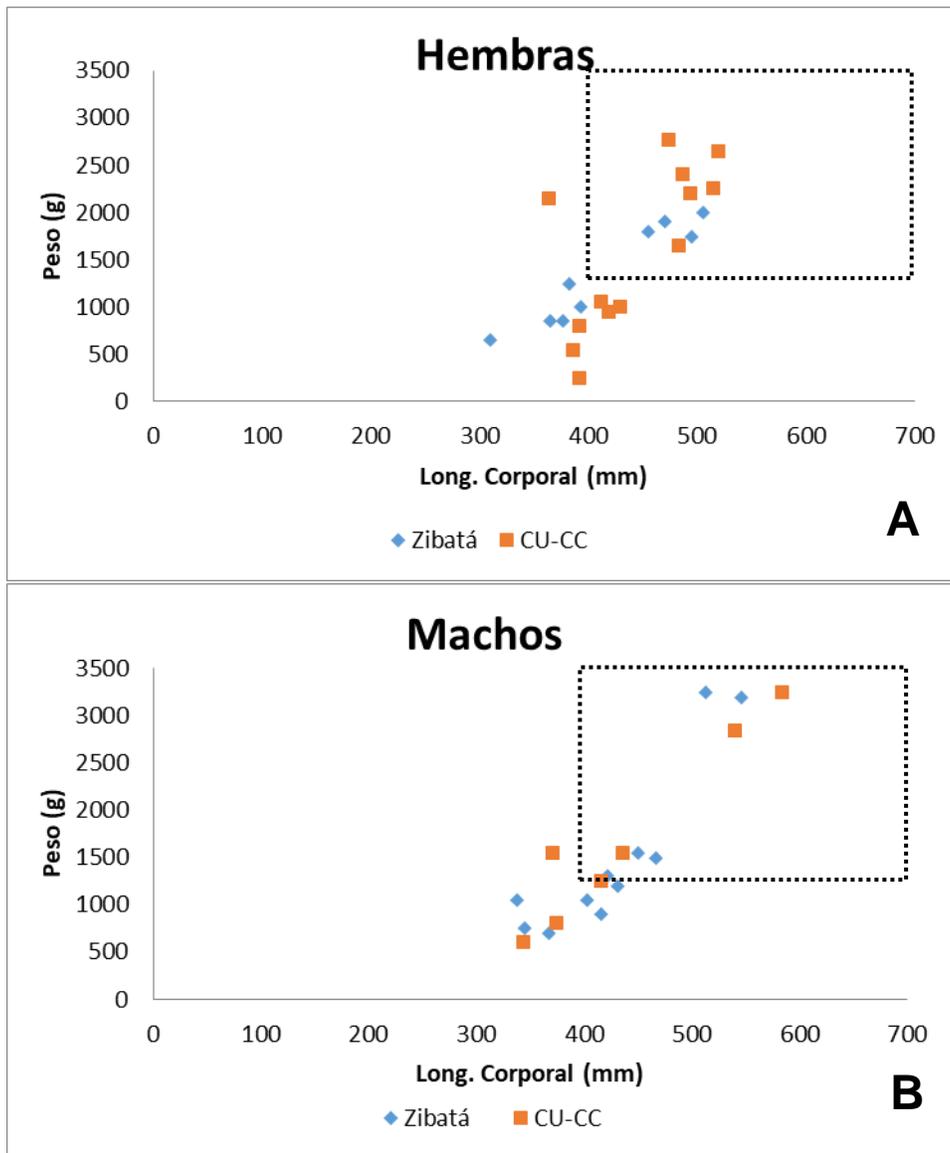


Figura 11. Relación del peso y la longitud (Long.) corporal de tlacuaches (*D. virginiana*) hembras (A) y machos (B) en Zibatá y CU-CC. Los rectángulos punteados indican la división entre adultos y juveniles de acuerdo a Hartman (1928) tomado de Gardner y Sunquist (2003).

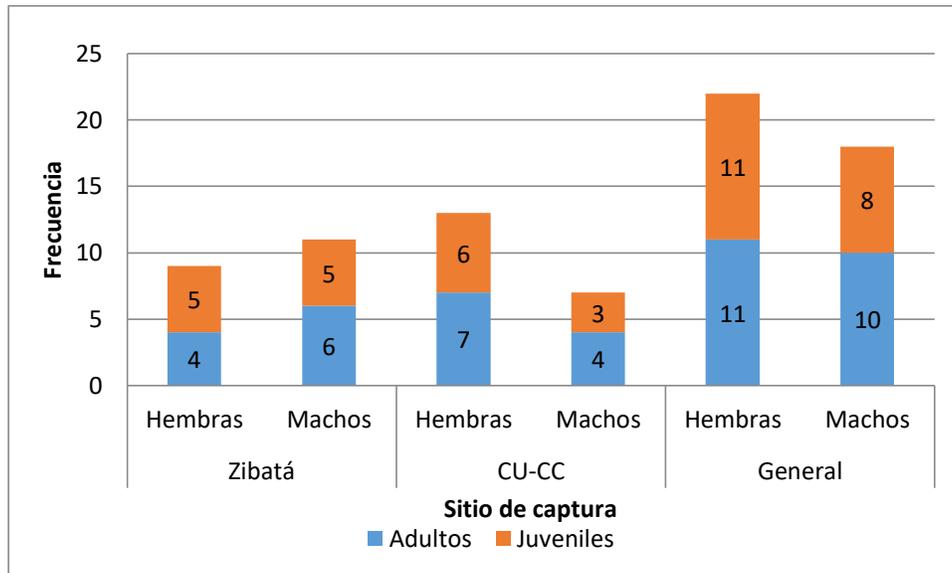


Figura 12. Frecuencias para Zibatá, CU-CC y en ambos sitios (General) de hembras y machos por edad en los tlacuaches (*D. virginiana*).

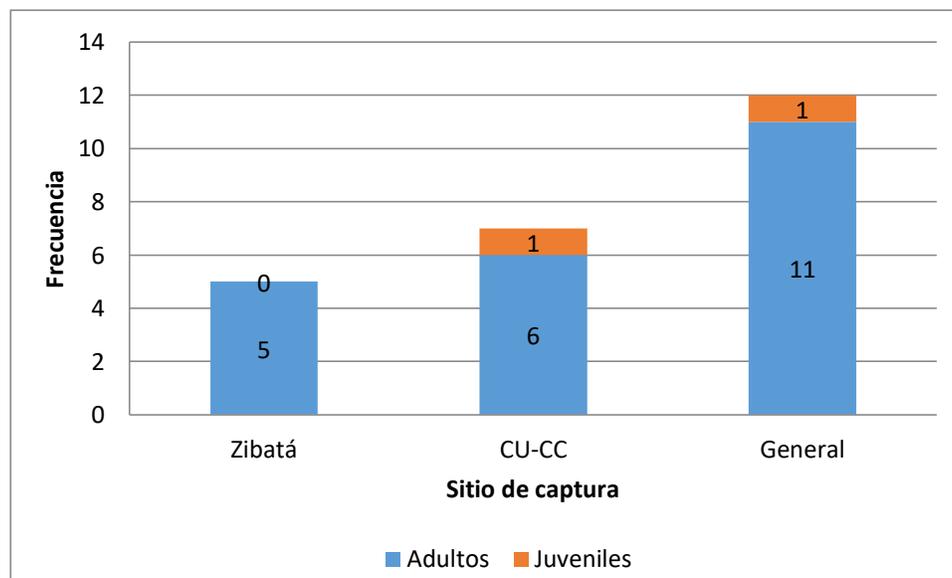


Figura 13. Frecuencia de ejemplares *D. virginiana* adultos y juveniles con lesiones en la piel (laceraciones y abrasiones) para Zibatá, CU-CC y en ambos sitios (General).

Los promedios de temperatura, frecuencia respiratoria y frecuencia cardíaca para cada uno de los dos sitios de captura y en en ambos sitios tanto en hembras como en machos se muestran en el Cuadro 15. Como se puede apreciar no se encontraron diferencias significativas en las constantes fisiológicas entre sexos, adultos y juveniles, el ser positivo a *Salmonella* spp. o el sitio de captura (IC= 95 %; g.l.= 1; $P>0.05$ para cada uno de los factores). No obstante diferencias significativas fueron observadas en la temperatura entre lesionados y no lesionados ($F=7.527$; g.l.= 1; $P=0.014$), siendo menor la temperatura en animales lesionados. También se observaron diferencias en la frecuencia cardíaca entre juveniles y adultos ($F=7.67$; g.l.= 1; $P=0.012$), teniendo un mayor promedio en los tlacuches juveniles, y por la interacción sexo y edad ($F=4.54$; g.l.= 1; $P=0.046$). Donde los promedios de frecuencia cardíaca de mayor a menor fueron obtenidos por hembras juveniles, machos juveniles, machos adultos y por último hembras adultas. Por último se observó una la interacción sitio de captura y edad con la frecuencia respiratoria ($F=5.6$; g.l.= 1; $P=0.029$).

Cuadro 15. Media y desviación estándar (DE \pm) de constantes fisiológicas de tlacuaches (*D. virginiana*) de acuerdo al sexo para Zibatá, CU-CC y en ambos sitios (General). rpm: respiraciones por minuto; lpm: latidos por minuto.

Parámetro		Temperatura (°C)			Frec. Resp. (rpp)			Frec. Card. (lpp)		
		n	Promedio	DE (\pm)	n	Promedio	DE (\pm)	n	Promedio	DE (\pm)
Zibatá	Hembras	9	33.5	1.1	9	78	33	9	206	64
	Machos	10	34.3	1.0	11	48	12	11	227	26
	General	19	33.9	1.1	20	62	27	20	217	47
CU-CC	Hembras	11	34.0	1.0	13	63	15	13	244	28
	Machos	7	33.8	0.4	7	59	17	7	251	33
	General	18	33.9	0.8	20	62	16	20	247	29
General	Hembras	20	33.7	1.0	22	69	24	22	229	49
	Machos	17	34.1	0.8	18	52	15	18	236	30
	General	37	33.9	1.0	40	62	22	40	232	41
Valor de <i>P</i>										
Sitio		0.67			0.663			0.055		
Sexo		0.372			0.133			0.217		
Edad		0.131			0.667			0.012*		
Lesiones		0.014*			0.288			0.805		
Sitio*Sexo		0.743			0.084			0.792		
Sitio*Edad		0.201			0.029*			0.079		
Sitio*Lesiones		0.529			0.737			0.694		
Sexo*Edad		0.244			0.825			0.046*		
Sexo*Lesiones		0.708			0.392			0.218		
Sitio*Sexo*Edad		0.647			0.128			0.128		

(IC: 95 %; g.l.: 1) * Valores estadísticamente significativos ($P < 0.05$)

7.3 Prevalencia de *Salmonella* spp.

De los 40 hisopados cloacales obtenidos se aislaron colonias con la morfología típica de *Salmonella* spp. (rojas con centro negro negativas a la prueba de la urea) de 11. De las 39 muestras de sangre, las 19 de heces, las 36 de pre enriquecimientos, así como de los 11 aislamientos presuntamente positivos se detectó *Salmonella enterica* en 24, 18, 16 y 8 respectivamente, mediante PCR en punto final (Apéndice 10.1). Los ejemplares que se tomaron como positivos fueron aquellos que en por lo menos dos tipos de muestra diferentes tuvieron amplificación del fragmento de ADN deseado en las técnicas moleculares (Apéndice 10.2). Como resultado de la detección molecular se obtuvo que 23 ejemplares fueron positivos a *Salmonella* spp. El número de positivos y la prevalencia en Zibatá, CU-CC y en ambos sitios se muestra en el cuadro 16. En la Figura 14 se aprecia el número de positivos y negativos en hembras y machos de acuerdo a la edad obtenidos en los dos sitios de captura y en ambos sitios.

Cuadro 16. Prevalencia y frecuencias de positivos y negativos a *Salmonella* spp. en tlacuaches (*D. virginiana*) para Zibatá, CU-CC y en ambos sitios (General).

	Zibatá	CU-CC	General
N	20	20	40
Positivos	8	15	23
Prevalencia (%)	40	75	57.5

Al analizar los datos de Zibatá y CU-CC se encontró que hay diferencias significativas en la prevalencia de *Salmonella enterica* entre sitios ($X^2=5.01$; g.l.= 1; $P=0.025$). No obstante es independiente del sexo ($X^2=1.13$; g.l.= 1; $P=0.289$), la edad ($X^2=0.35$; g.l.= 1; $P=0.554$) o la presencia de lesiones ($X^2=0.005$; g.l.= 1; $P=0.944$) de los ejemplares. Los análisis de riesgo se detallan en los Cuadros 17, 18 y 19.

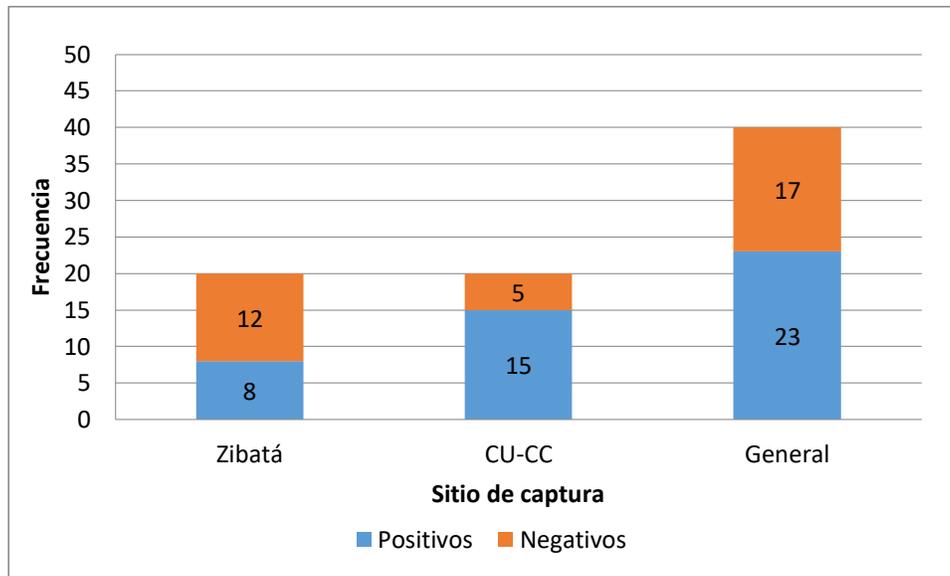


Figura 14. Número de tlacuaches (*D. virginiana*) positivos y negativos para Zibatá, CU-CC y en ambos sitios (General).

Cuadro 17. Relación entre la presencia de *Salmonella* spp. y lesiones en tlacuaches (*D. virginiana*) hembras y machos en general. +: positivos; -: negativos; RP: razón de prevalencias; OR: odds ratio; *P*: valor de *P*.

Factor de riesgo	<i>Salmonella</i> spp.					Lesiones				
	+	-	Total	OR	<i>P</i>	Presentes	Ausentes	Total	OR	<i>P</i>
Hembras	11	11	22	0.5	0.29	7	15	22	1.21	0.78
Machos	12	6	18			5	13	18		
Total	23	17	40			12	28	40		

Cuadro 18. Relación entre la presencia de *Salmonella* spp. y lesiones en tlacuaches (*D. virginiana*) adultos y juveniles en general. +: positivos; -: negativos; RP: razón de prevalencias; OR: odds ratio; *P*: valor de *P*.

Factor de riesgo	<i>Salmonella</i> spp.					Lesiones				
	+	-	Total	OR	<i>P</i>	Presentes	Ausentes	Total	OR	<i>P</i>
Adultos	13	8	21	1.46	0.55	11	10	21	19.8	0.001
Juveniles	10	9	19			1	18	19		
Total	23	17	40			12	28	40		

Cuadro 19. Relación entre la presencia de *Salmonella* spp. y lesiones en tlacuaches (*D. virginiana*) de CU-CC y de Zibatá. +: positivos; -: negativos; RP: razón de prevalencias; OR: odds ratio; *P*: valor de *P*.

Factor de riesgo	<i>Salmonella</i> spp.					Lesiones				
	+	-	Total	OR	<i>P</i>	Presentes	Ausentes	Total	OR	<i>P</i>
CU-CC	15	5	20	4.5	0.03	7	13	20	1.6	0.49
Zibatá	8	12	20			5	15	20		
Total	23	17	40			12	28	40		

En general no hay diferencias significativas en el peso, las medidas corporales, la temperatura, la frecuencia respiratoria, la frecuencia cardiaca (Cuadro 20), ni en los valores obtenidos en las biometrías de los ejemplares positivos a *Salmonella* spp. con respecto a los negativos (Cuadro 21).

Cuadro 20. Media y desviación estándar del peso, las medidas corporales, la temperatura y las constantes fisiológicas de los tlacuaches (*D. virginiana*) positivos y negativos a *Salmonella* spp. en Zibatá, en CU-CC y en ambos sitios (General).

Parámetro	Zibatá				CU-CC				General									
	Positivos		Negativos		Positivos		Negativos		Positivos		Negativos							
	n	Promedio	DE (±)	n	Promedio	DE (±)	n	Promedio	DE (±)	n	Promedio	DE (±)	n	Promedio	DE (±)			
Peso (g)	8	1388	861	12	1450	686	15	1725	784	5	1330	1195	23	1607	808	17	1415	827
Long. Total (mm)	8	756	109	12	741	107	15	777	92	5	786	130	23	770	96	17	754	112
Long. Corporal (mm)	8	418	70	12	425	64	15	437	63	5	453	83	23	431	65	17	433	68
Long. Cola (mm)	8	339	44	12	316	87	15	340	34	5	333	50	23	339	37	17	321	77
Long. Pie (mm)	8	54	7	12	55	7	15	52	6	5	50	9	23	52	6	17	53	7
Long. Oreja (mm)	8	50	8	12	46	7	15	47	5	5	47	8	23	48	6	17	46	7
Temperatura (°C)	7	34	1	12	34	1	14	34	1	4	33	1	21	34	1	16	34	1
Frecuencia Respiratoria (rpm)	8	54	27	12	67	28	15	61	17	5	62	14	23	59	21	17	65	24
Frecuencia Cardíaca (lpm)	8	212	53	12	221	44	15	248	29	5	243	31	23	235	42	17	227	41
Valor de P																		
Parámetro	<i>Salmonella</i> spp.		Sitio* <i>Salmonella</i> spp.		Sexo* <i>Salmonella</i> spp.		Edad* <i>Salmonella</i> spp.		<i>Salmonella</i> spp*Lesiones		Sexo*Edad* <i>Salmonella</i> spp.							
Peso (g)	0.934		0.273		0.839		0.815		0.718		0.337							
Long. Total (mm)	0.404		0.882		0.83		0.817		0.691		0.237							
Long. Corporal (mm)	0.167		0.763		0.66		0.658		0.472		0.098							
Long. Cola (mm)	0.936		0.858		0.91		0.92		0.929		0.742							
Long. Pie (mm)	0.645		0.49		0.772		0.977		0.636		0.331							
Long. Oreja (mm)	0.994		0.551		0.842		0.995		0.694		0.181							
Temperatura (°C)	0.678		0.709		0.267		0.132		0.374		0.143							
Frecuencia Respiratoria (rpm)	0.418		0.917		0.16		0.142		0.318		0.797							
Frecuencia Cardíaca (lpm)	0.649		0.675		0.15		0.196		0.329		0.885							

DE (±): desviación estándar; rpm: respiraciones por minuto; lpm: latidos por minuto. (IC: 95 %; g.l.: 1). * Valores estadísticamente significativos ($P < 0.0$)

Cuadro 21. Media y desviación estándar de los valores obtenidos de los hemogramas de los tlacuaches (*D. virginiana*) positivos y negativos a *Salmonella* spp. en Zibatá, en CU-CC y en ambos sitios (General).

Parámetro	Zibatá				CU-CC				General			
	Positivos		Negativos		Positivos		Negativos		Positivos		Negativos	
	Promedio	DE (±)										
Eritrocitos (x10 ⁶ /mm ³)	5.0	0.5	4.8	0.7	4.7	0.5	4.8	0.2	4.9	0.5	4.8	0.6
Hb (gr/dL)	12.0	1.2	12.0	1.3	11.6	1.3	11.9	0.6	11.8	1.2	12.0	1.1
Hct (%)	40.3	3.2	39.1	5.5	38.4	4.1	38.7	0.9	39.2	3.7	39.0	4.6
VGM (fL)	80.3	5.9	81.7	3.3	81.1	4.4	81.1	3.7	80.8	4.9	81.5	3.3
CMHC (g/dL)	29.8	1.2	31.1	4.4	30.1	1.0	30.7	1.2	30.0	1.1	31.0	3.7
Leucocitos (μl)	9983.8	2201.8	11954.2	4387.9	8742.7	3412.3	8760.0	2602.0	9265.3	2958.1	11014.7	4144.9
Neu. Seg. (μl)	5348.5	1973.7	6337.5	3874.6	4853.5	2945.0	4127.0	1850.0	5061.9	2529.1	5687.4	3500.6
Eosinófilos (μl)	195.3	94.5	231.0	133.6	169.1	92.5	195.0	80.5	180.1	91.6	220.4	119.1
Basófilos (μl)	370.9	390.4	346.0	224.5	235.4	121.8	244.8	130.9	292.4	268.8	316.2	202.9
Monocitos (μl)	155.4	60.8	318.6	289.6	411.9	512.6	333.8	269.9	303.9	405.4	323.1	275.5
Linfocitos (μl)	3914.0	1298.4	4721.4	2283.0	3072.7	1083.5	3859.8	918.1	3426.9	1220.6	4468.0	1989.4

Cuadro 21.1 Valores de *P* obtenidos para los valores obtenidos en las biometrías de los tlacuaches (*D. virginiana*) de acuerdo a categorías de sitio, sexo, edad, lesiones así como las interacciones entre ellas..

Valor de <i>P</i>						
Parámetro	<i>Salmonella</i> spp.	Sitio* <i>Salmonella</i> spp.	Sexo* <i>Salmonella</i> spp.	Edad* <i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp*Lesiones	Sexo*Edad* <i>Salmonella</i> spp.
Eritrocitos (x10 ⁶ /mm ³)	0.814	0.828	0.177	0.679	0.947	0.82
Hb (gr/dL)	0.524	0.979	0.026*	0.473	0.219	0.965
Hct (%)	1	0.914	0.139	0.73	0.49	0.883
VGM (fL)	0.685	0.755	0.921	0.795	0.225	0.879
CMHC (g/dL)	0.538	0.986	0.522	0.736	0.735	0.963
Leucocitos (μl)	0.168	0.354	0.141	0.369	0.81	0.717
Neu. Seg. (μl)	0.469	0.809	0.425	0.85	0.645	0.951
Eosinófilos (μl)	0.425	0.778	0.039*	0.39	0.702	0.44
Basófilos (μl)	0.569	0.906	0.815	0.586	0.888	0.773
Monocitos (μl)	0.657	0.794	0.584	0.993	0.918	0.882
Linfocitos (μl)	0.431	0.731	0.227	0.353	0.904	0.802

(IC: 95 %; g.l.: 1)

* Valores estadísticamente significativos ($P < 0.05$).

7.4 Hemogramas

De los 40 tlacuaches capturados en Zibatá y CU-CC se obtuvieron solamente hemogramas de 36 ejemplares. En el Cuadro 22 se detallan los promedios y desviaciones estándar obtenidos en los hemogramas por hembras y machos de *Didelphis virginiana* en los dos sitios de captura y en ambos sitios. En el Cuadro 22.1 se observan los valores de P obtenidos para los valores de las biometrías de los tlacuaches (*D. virginiana*) de acuerdo a categorías de sitio, sexo, edad, Lesiones así como las interacciones entre ellas. Los promedios de los hemogramas de tlacuaches positivos y negativos a *Salmonella enterica* se detallan en las Figuras 15 y 16. En los valores de los hemogramas de los tlacuaches no se detectaron diferencias entre sexos, edades, los sitios de captura, la presencia de lesiones o el ser positivo a *Salmonella* spp. (IC=95 %; g.l.= 1; $P>0.05$). No obstante los eosinófilos difirieron significativamente solamente por sexo ($F=8.074$; g.l.= 1; $P=0.012$).

Cuadro 22. Media y desviación estándar de valores obtenidos en los hemogramas de tlacuaches (*D. virginiana*) hembras y machos de Zibatá, CU-CC y en ambos sitios (General).

Parámetro	Zibatá						CU-CC						General					
	Hembras			Machos			Hembras			Machos			Hembras			Machos		
	N	X	DE (±)	n	X	DE (±)	n	X	DE (±)	n	X	DE (±)	n	X	DE (±)	n	X	DE (±)
Eritrocitos (x10 ⁶ /mm ³)	9	5	1	11	5	1	10	5	1	6	5	0	19	5	1	17	5	1
Hb (gr/dL)		12	1		12	1		12	1		11	1		12	1		12	1
Hct (%)		39	5		40	5		40	4		36	2		40	4		39	4
VGM (fL)		83	3		80	5		82	4		79	4		82	4		80	4
CMHC (g/dL)		32	5		30	1		30	1		30	1		31	4		30	1
Leucocitos (μl)		11736	4009		10700	3612		9344	3187		7755	2921		10477	3705		9661	3595
Neutrófilos (μl)		6703	3474		5320	3018		4968	2708		4057	2574		5790	3134		4874	2855
Eosinófilos (μl)		265	123		177	103		225	75		98	27		244	100		149	91
Basófilos (μl)		259	174		435	351		257	136		207	91		258	151		354	304
Monocitos (μl)		369	318		159	71		388	337		386	619		379	319		239	368
Linfocitos (μl)		4140	1876		4610	2074		3506	1212		3007	786		3806	1551		4044	1872

X: Promedio

Cuadro 22.1 Media y desviación estándar de valores obtenidos en los hemogramas de tlacuaches (*D. virginiana*) hembras y machos de Zibatá, CU-CC y en ambos sitios (General).

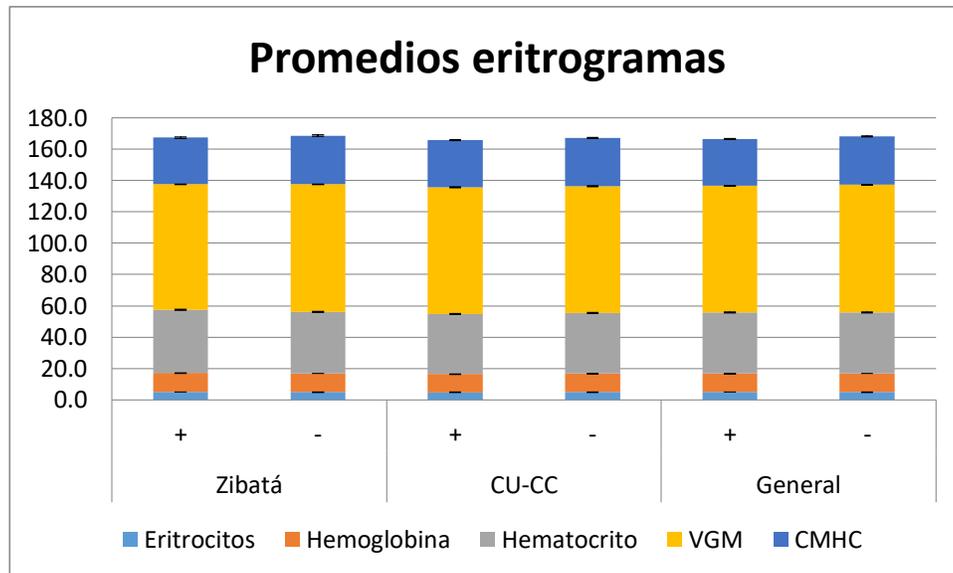
Valor de P										
Parámetro	Sitio	Sexo	Edad	Lesiones	Sitio*Sexo	Sitio*Edad	Sitio*Lesiones	Sexo*Edad	Sexo*Lesiones	Sitio*Sexo*Edad
Eritrocitos (x10 ⁶ /mm ³)	0.525	0.892	0.834	0.642	0.06	0.761	0.989	0.795	0.435	0.945
Hb (gr/dL)	0.754	0.586	0.839	0.785	0.007*	0.838	0.348	0.721	0.278	0.381
Hct (%)	0.593	0.439	0.583	0.71	0.034*	0.821	0.742	0.981	0.555	0.913
VGM (fL)	0.899	0.101	0.471	0.073	0.872	0.803	0.544	0.584	0.469	0.685
CMHC (g/dL)	0.881	0.796	0.388	0.828	0.811	0.942	0.674	0.675	0.742	0.381
Leucocitos (μl)	0.317	0.677	0.172	0.748	0.569	0.392	0.608	0.186	0.045*	0.264
Neutrófilos (μl)	0.507	0.542	0.366	0.464	0.836	0.758	0.637	0.101	0.048*	0.266
Eosinófilos (μl)	0.177	0.012*	0.458	0.264	0.312	0.643	0.555	0.109	0.051	0.66
Basófilos (μl)	0.722	0.397	0.518	0.407	0.434	0.58	0.923	0.791	0.829	0.669
Monocitos (μl)	0.763	0.809	0.421	0.17	0.824	0.9	0.541	0.191	0.271	0.914
Linfocitos (μl)	0.301	0.919	0.23	0.799	0.657	0.655	0.973	0.349	0.59	0.877

(IC: 95 %; g.l.: 1)

* Valores estadísticamente significativos ($P < 0.05$).

|

No obstante la interacción sitio de captura y sexo influye en la hemoglobina ($F=9.757$; g.l.= 1; $P=0.007$) y el hematocrito ($F=5.411$; g.l.= 1; $P=0.034$). Además, la interacción sexo con *Salmonella* influye en la hemoglobina



($F=6.123$; g.l.= 1; $P=0.026$) y los eosinófilos ($F=5.138$; g.l.= 1; $P=0.039$). Así mismo la interacción sexo y lesiones influye en los leucocitos ($F=4.779$; g.l.= 1; $P=0.045$) y los neutrófilos ($F=4.628$; g.l.= 1; $P=0.048$). No se encontró una baja correlación entre la presencia de lesiones con los monocitos (Rho de Spearman=0.386, $n=40$, $P=0.02$) y con los eosinófilos (Rho de Spearman=0.395, $n=40$, $P=0.017$). Pero si se observó una correlación moderada del sexo con los eosinófilos (Rho de Spearman=-0.450, $n=40$, $P=0.006$).

Figura 15. Promedios obtenidos en los eritogramas de tlacuaches (*D. virginiana*) positivos y negativos en cada sitio de captura y en general. VGM: volumen globular medio; CMHC: concentración media de hemoglobina corpuscular; +: positivos; -: negativos. Eritrocitos: $\times 10^6/\text{mm}^3$; hemoglobina: gr/dL; hematocrito: %; VGM: fL; CMHC: g/dL.

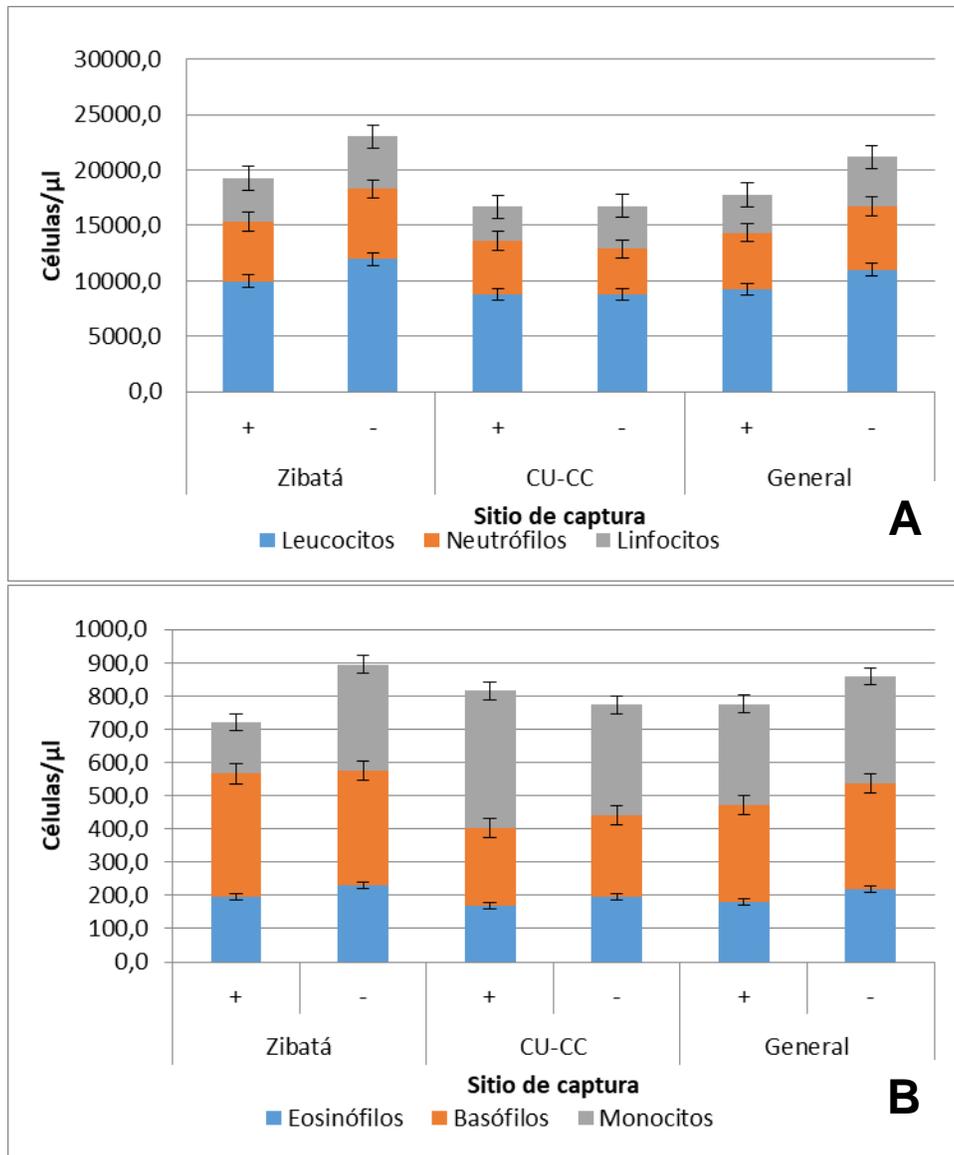


Figura 16. Promedios obtenidos en los leucogramas de tlacuaches (*D. virginiana*) positivos y negativos en cada sitio de captura y en general. **A.** Leucocitos, neutrófilos y linfocitos; **B.** Eosinófilos, basófilos, monocitos; +: positivos; -: negativos.

VIII. DISCUSIÓN

La proporción de sexos encontrada de 1:1 es similar a lo hallado por Cruz-Salazar *et al.* (2014). No obstante, los autores mencionan que a pesar de que dicha proporción en una población puede ser considerada como una condición ideal para el crecimiento de la misma, para especies como *D. virginiana* que son polígamas se esperaría mayor número de machos sobre todo si están en áreas con mayor disponibilidad de recursos y menor competencia. Por ello consideran que la proporción de hembras y machos de 1:1 podría asociarse a un tamaño poblacional bajo. No obstante la dieta suplementada (Sunquist y Eisenberg, 1993) o la condición y edad de la madre (Wright *et al.*, 1995) no influyen en la proporción de sexos en las camadas de *D. virginiana*.

En *D. virginiana* se considera que los machos son más grandes y más pesados que las hembras, distinción que comienza con la madurez sexual y es debido de la demanda energética que representa la crianza de la progenie para las hembras. Además no hay una correlación tan cercana entre el peso y la talla en *D. virginiana* como en otros marsupiales de América y el peso está influenciado por la estación del año siendo mayor en el otoño e inicios del invierno (Gardner y Sunquist, 2003).

Los resultados del peso y longitud total obtenidos de los tlacuaches en este estudio tanto en ambos sitios I y en Zibatá se ajustan a esta afirmación, no obstante en CU-CC únicamente el peso lo hace pero los promedios de las longitudes total y corporal de las hembras son mayores a los de los machos; lo mismo que ocurre en el promedio de la longitud corporal general. Lo anterior puede deberse únicamente a que se capturaron un mayor número de hembras que de machos en CU-CC. Sin embargo, diferencias estadísticamente significativas no fueron encontradas en el peso o la talla entre hembras y machos. Cruz-Salazar *et al.* (2014) registraron para *D. virginiana* un peso y longitud total promedio de 1500 (\pm 340) g y 681 (\pm 67) mm en Los Altos y de 2210 (\pm 250) g y 791.2 (\pm 9.9) mm en la Depresión Central de Chiapas, sin detectar diferencias significativas entre las regiones. Estas regiones son contiguas y poseen variación

de asociaciones vegetales, áreas de cultivo activas o abandonadas y pequeños asentamientos humanos. Además los autores señalaron que la diferencia podría deberse a la mayor disponibilidad en calidad y cantidad de recursos alimenticios y refugio lo cual debería evaluarse en estudios futuros. Y que las actividades antropogénicas tienen un efecto sobre la abundancia y distribución de los recursos, en los sistemas urbanizados los recursos artificiales son típicamente más abundantes y concentrados (Prange *et al.*, 2004).

El promedio del peso de los tlacuaches de CU-CC fue mayor al de los de Zibatá, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Los promedios de peso y longitud total obtenidos en general y en CU-CC fueron mayores que en Los Altos y menores que en la Depresión Central, y el peso fue menor y la longitud total mayor en el caso de Zibatá que el de los tlacuaches de los Altos. Wright *et al.* (2012) encontraron que el peso promedio de tlacuaches que viven dentro de los límites de la ciudad fue 34 % mayor al de aquéllos que viven en áreas rurales, 3.0 (± 0.8) Kg y 2.2 (± 0.6) Kg, respectivamente. Sugiriendo que las áreas urbanas proveen más recursos lo que puede beneficiar a las poblaciones de *D. virginiana*. Finalmente los promedios tanto del peso como de las longitudes e general y en los dos sitios de muestreo se encuentran dentro de los rangos descritos para la especie por Zarza y Medellín (2005).

Gardner y Sunquist (2003) resumieron las diferentes formas en las que se ha utilizado la fórmula dentaria por distintos investigadores para categorizar por edad a los tlacuaches. No obstante en vida libre la fórmula dentaria no siempre está completa o hay variaciones que podrían complicar su uso. Por ello se pueden utilizar la relación que hay entre el peso y la longitud corporal de los ejemplares. Para ello se tomaron como referencia los 400 mm y 1300 g como la división entre juveniles y adultos de acuerdo a Hartman (1928) (Gardner y Sunquist, 2003), especialmente de aquellos cuya fórmula no se ajustaba a las esperadas.

En México los tlacuaches han sido estudiados por su papel en el mantenimiento y la transmisión de *Leptospira interrogans*, *Salmonella enterica*, y rabia (Ruíz-Piña *et al.*, 2002; Arenas, 2016) así como de *Tripanosoma cruzi*,

protozoario causante de la enfermedad de Chagas (Ruíz-Piña y Cruz-Reyes, 2002). *D. virginiana* es una especie que se ve con frecuencia en ambientes peridomésticos urbanos y rurales de los que se beneficia por las características que presenta como su tamaño, sus hábitos nocturnos y su alta capacidad reproductiva (Ruíz-Piña y Cruz-Reyes, 2002; Arenas, 2016). Ruíz-Piña *et al.* (2002) en su estudio tuvieron que todos los tlacuaches infectados con *Salmonella enterica* fueron hembras con embriones en sus marsupios, capturadas durante la estación seca en hábitat peridoméstico. Así mismo observaron mayor densidad de adultos y actividad reproductiva de *D. virginiana* durante la estación seca, y en la lluviosa por el contrario la población fue predominantemente de juveniles (animales susceptibles). Hart *et al.* (1985) también detectó una variación estacional en la frecuencia de la infección por *Salmonella* en un marsupial silvestre, *Setonix brachyurus*, en Australia que se relacionaba con la pobre calidad del alimento disponible en verano respecto al invierno, habiendo más positivos en la primer estación. Además no encontraron evidencias de enfermedad en campo a pesar del elevado número de positivos durante el verano. Kourany *et al.* (1976) también observaron una mayor incidencia de infección por *Salmonella* en mamíferos durante la estación seca que en la lluviosa.

Las capturas del presente estudio abarcaron la parte final de la estación de lluvias, que en Querétaro va de junio a septiembre (INEGI, 2010), es decir el final del verano y casi todo el otoño. Para poder determinar a los ejemplares positivos a *Salmonella* spp. se tomó en cuenta que se tuvieron muestras distintas y no todos los ejemplares tuvieron de todos los tipos de muestras recolectados. Por lo tanto se tomaron como positivos aquellos que tuvieron amplificación del fragmento de ADN con las técnicas moleculares en por lo menos dos tipos de muestra. La decisión se fundamentó en que en base a un solo tipo de muestra las debilidades de la misma podrían afectar la veracidad de los resultados. Por ejemplo *Salmonella* spp. no se excreta de manera constante en las heces o el número de bacterias puede ser limitado, además de que la presencia de inhibidores de la PCR como lo son las sales biliares y la bilirrubina (Chiu and Ou, 1996). Así mismo los hisopados cloacales que tuvieron un proceso de preenriquecimiento para

favorecer el aumento de las poblaciones bacterianas presentes en la muestra, pero no sólo la población del patógeno de interés. En el aislamiento microbiológico se pudo hacer tomado una alícuota con poco contenido bacteriano. En sangre pudiera haberse detectado un fragmento de ADN que correspondiera al hospedero y no a la bacteria. Por todo ello resultados positivos en dos muestras diferentes en las técnicas moleculares son más confiables. Además, el peso y la longitud corporal de los ejemplares fueron junto con la fórmula dentaria una base para clasificar de manera más confiable a los tlacuaches en juveniles y adultos. No obstante en este estudio el número de juveniles fue casi igual al de adultos. De modo que se obtuvo que ni el sexo ni la edad de los individuos se relacionó con ser positivo a *Salmonella* spp. Sin embargo hay que hacer énfasis en que el trampeo fue continuo y no se hizo distinción por época de lluvias o sequía ni por estación del año, lo que sería importante considerar para estudios posteriores, para ver si hay algún cambio en la prevalencia de *Salmonella*. Ya que es importante comparar si la prevalencia de *Salmonella* spp. se modifica de acuerdo a la temporada de lluvias o secas así como a la estación del año en zonas con distinto grado de impacto antrópico.

Por otro lado *Salmonella* spp. ha sido aislada en tlacuaches silvestres extraídos de su hábitat natural con fines de investigación que han sido mantenidos en cautiverio para asegurar que no presentan signos de enfermedad como fiebre, diarrea o cambios en sus hábitos alimenticios como en el caso de Rodríguez *et al.* (1992) así como en ejemplares clínicamente normales, enfermos e incluso moribundos como mencionan Thigpen *et al.* (1975) y Runkel *et al.* (1991). De éstas dos últimas investigaciones se ha recuperado a la bacteria de sangre, signo clínico de bacteremia, así como de la bilis o de vesícula biliar, hallazgo que es relacionado con el estado de portador crónico y que puede ser un riesgo de infección tanto para otros animales como para los técnicos cuando son utilizados con fines de investigación (Rodríguez *et al.*, 1992). Además, al servir como reservorio de varios serotipos de *Salmonella* puede tener un papel importante en la epizootiología de la salmonelosis en la fauna silvestre (Thigpen *et al.*, 1975).

Un reservorio puede mantener a la bacteria en sus intestinos como parte de su microbiota y no sufrir una infección activa (Brands, 2006). No obstante debe tomarse en cuenta que los tlacuaches pueden parecer saludables a pesar de cursar con una enfermedad, o pueden tener signos clínicos de enfermedad que toman tiempo en manifestarse (Johnson-Delaney, 2014). Por lo tanto a pesar de que en el presente estudio no se detectaron signos como diarrea o fiebre, no se puede descartar que alguno de los ejemplares positivos a *Salmonella* spp. estuviera cursando con la enfermedad y no fuera solo un portador asintomático. Más aún debido a que se obtuvieron amplificaciones en las técnicas moleculares a partir de muestras sanguíneas lo que significa que dichos animales presentaban bacteremia.

Las *Salmonellas* no tifoideas producen por lo general una infección auto-limitada al tracto gastrointestinal que provoca inflamación en el mismo. No obstante al sobrepasar las defensas del hospedero la bacteria puede acceder a la circulación linfática y sanguínea diseminándose así a otros órganos, lo que implica una septicemia bacteriana. Cuando se aloja en el hígado y vesícula biliar puede ocurrir una reinfección cuando la bacteria vuelve al intestino delgado vía bilis (Barrow y Methner, 2013). Si los tlacuaches padecían salmonelosis es una interrogante que persiste después de este estudio, pero para responder a ella se requiere de la obtención y análisis de muestras más invasivas que permitan recuperar a la bacteria no solamente de los intestinos y nódulos linfáticos asociados sino también de otros órganos como el hígado, el bazo o los riñones, lo que sería indicativo de septicemia bacteriana (Thigpen *et al.*, 1975; Runkel *et al.*, 1991).

Dado que la invasión de la bacteria al tejido epitelial del intestino desencadena una reacción inflamatoria caracterizada por la infiltración de neutrófilos, principalmente (Barrow and Methner, 2013), la neutrofilia es un signo clínico de infección que se esperaría encontrar en los animales que cursan con Salmonelosis, sin embargo esto no siempre sucede. Del análisis de los valores obtenidos en los hemogramas se desprende que no hay asociación entre ellos y la

presencia de *Salmonella* spp.. Al comparar los valores individuales obtenidos por los tlcuaches en el eritrograma se observó que no se presentó anemia. En cuanto a los valores de los distintos tipos celulares evaluados en el leucograma se tuvo que la mayoría de las anormalidades correspondían a inflamación aguda, seguidas por leucograma de estrés (linfopenia con o sin neutrofilia) y por último debidas a inflamación con cronicidad de días a semanas (monocitosis) (Núñez y Bouda, 2007).

La temperatura corporal en el tlcuache varía diariamente y por estación del año, siendo más elevada en verano. Además fluctúa debido a la actividad, el tamaño corporal, el estado nutricional, la temperatura ambiental y a los métodos de manipulación utilizados por los investigadores (Gardner y Sunquist, 2003). Al comparar las temperaturas individuales de los ejemplares con el rango normal de temperatura cloacal mencionado por Johnson-Delaney (2014) que va de 32.2 a 35 °C, tres hembras juveniles tuvieron temperaturas ligeramente por debajo de lo normal y un macho juvenil, uno adulto y una hembra adulta la tuvieron elevada, ésta última fue la única de los positivos a *Salmonella* spp. en presentar temperatura elevada. En este sentido se usó Zoletil para la contención química de los ejemplares y éste provoca una disminución transitoria en la temperatura corporal. Aunado a esto se debe considerar que la temperatura determinada fue cloacal y es más baja que la temperatura corporal real (Johnson-Delaney, 2006). Por lo tanto no es posible descartar que alguno de los otros ejemplares positivos cursaba con un cuadro febril al momento del muestreo aunque por efecto del fármaco utilizado no se detectó. La fiebre es un signo que se relaciona a una condición patológica. La presencia de heridas sí se asocia con la temperatura corporal. El promedio de temperatura de los ejemplares que presentaron heridas fue menor respecto al de los no heridos. Dicho hallazgo puede deberse a que los animales que presentaron heridas fueron adultos, a excepción de uno que fue juvenil. Debido a esto los ejemplares que no tenían heridas fueron en su mayoría juveniles. Las hembras, las hembras gestantes y los animales jóvenes suelen tener temperaturas basales más elevadas que los machos, las hembras no gestantes y los animales mayores (Radostits *et al.*, 2002).

En cuanto a la mayor prevalencia de *Salmonella* spp. en ejemplares de la zona urbana respecto a la periurbana, resalta el hecho de que en ambas está implicado el mayor contacto entre la fauna nativa, especialmente la mejor adaptada como es caso del tlacuache, los animales domésticos y los humanos. Lo cual es un riesgo de transmisión de agentes patógenos entre ellos (Daszak *et al.*, 2001, Cabello y Cabello, 2008). El aislamiento de *Salmonella* spp. en fauna silvestre se ha dado tanto en zonas conservadas como en la interface a zonas con algún grado de impacto antrópico como las unidades de producción pecuaria, las áreas rurales, periurbanas y urbanas (Kourany *et al.* 1976; Rodríguez *et al.*, 1992; Ruíz-Piña *et al.*, 2002; Bondo *et al.*, 2016). Kourany *et al.* (1976) observaron que la mayoría de los mamíferos que resultaron infectados por *Salmonella* durante su estudio fueron capturados en o cerca de áreas de actividad humana.

Las fuentes ambientales de *Salmonella* spp. incluyen agua, suelo e insectos contaminados con materia fecal. Así como el uso de aguas residuales para el riego de jardines y cultivos (Brands, 2006). La fauna silvestre puede adquirir *Salmonella* al consumir a otros individuos o agua contaminados o por contacto con construcciones agrícolas o pecuarias contaminadas, abono, o por contacto directo con otros animales portadores de la bacteria, con desperdicios humanos o con heces de mascotas. *Salmonella* spp. puede estar en aguas tratadas o no tratadas y sobrevivir en ellas por semanas a meses por lo que la fauna silvestre que viva cerca de cuerpos de agua contaminados tiene más riesgo de infección. Es por eso que *Salmonella* spp. es más prevalente en fauna silvestre que vive cerca de asentamientos humanos (Bondo *et al.*, 2016). En concordancia con lo anterior, los resultados del presente estudio son que los ejemplares que viven en las zonas urbanas tienen mayor probabilidad de infección por *Salmonella* spp. que los de las zonas periurbanas.

Finalmente hay cuestiones que no se pueden responder con los datos obtenidos en este estudio y que sin duda son importantes para el entendimiento de la dinámica de *Salmonella* spp. en la fauna silvestre en las zonas estudiadas y su impacto en la salud pública. Entre dichas cuestiones se encuentra por ejemplo

el determinar los serotipos y la cantidad de microorganismos que se están excretando. Esto puede llevarse a cabo por serotipificación, tipificación de bacteriófagos o por técnicas de tipificación molecular como la electroforesis en gel de campo pulsado (Liu *et al.*, 2011; Wattiau *et al.*, 2011; González *et al.*, 2014). Obtener muestras ambientales para investigar si dichos serotipos son un reflejo de los que se encuentran en las áreas tanto urbanas como periurbanas e incluso en conservadas, y si hay diferencia entre ellas. Además si corresponden con los que son más frecuentemente aislados en los casos humanos en la región. Por último, no se encontraron relaciones entre los resultados de los hemogramas y la presencia de bacteria, lo cual podría indicar que es un reservorio asintomático. Sin embargo, no se pudo determinar si los animales que la presentaron en sangre tenían lesiones por dicha bacteria; por lo que es necesario realizar otros estudios determinar con más certeza si los tlacuaches también están siendo afectados por la bacteria o si es sólo un reservorio asintomático, o si su sistema inmune puede inhibir la diseminación de la bacteria.

IX. CONCLUSIONES

Este estudio confirma la presencia así como la excreción de *Salmonella* spp. en tlacuaches de zonas urbanas y periurbanas de la ciudad de Santiago de Querétaro, con una prevalencia de *Salmonella* spp. general de 57.5 %. Así mismo se halló que la prevalencia es mayor en zona urbana en comparación con la periurbana.

No se encontró evidencia de que los ejemplares estuvieran cursando con enteritis por *Salmonella* spp. al momento de su captura en base a las muestras e información recolectadas durante el estudio.

Los tlacuaches de zona urbana son en promedio más pesados y más grandes que los de zona periurbana, sin embargo no existe diferencia de peso entre sexos.

Los tlacuaches tuvieron alteraciones en los valores de los leucogramas correspondientes a procesos inflamatorios o infecciosos en general, sin que éstos tuvieran relación específicamente con el ser positivos a *Salmonella* spp. o con el sitio donde viven.

X. RECOMENDACIONES

Esto es el inicio del estudio del comportamiento de este agente dentro de la fauna nativa, sin embargo hay que hacer más investigación, ya que surgen más interrogantes que pueden ser estudiadas a detalle más adelante. Es necesario realizar estudios complementarios para poder concluir de manera más certera, si los tlacuaches son sólo un reservorio para el agente, o bien si son portadores asintomáticos o crónicos. Además de determinar los serotipos presentes en los tlacuaches, así como si son un reflejo de los serotipos del ambiente y si difieren entre áreas urbanas, periurbanas e incluso conservadas.

XI. LITERATURA CITADA

- Acha, P.N., y B. Szyfres. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud. Tercera Edición. Volumen I. Bacteriosis y Micosis. Publicación Científica y Técnica No.580. Washington, D.C.
- Adamski, F.M., and J. Demmer. 2000. Immunological protection of the vulnerable marsupial pouch young: two periods of immune transfer during lactation in *Trichosurus vulpecula* (brushtail possum). *Developmental and Comparative Immunology*. 24: 491-502.
- Aguirre, A.A., Ostfeld R.S., and P. Daszak (Eds.). 2012. *New directions in conservation medicine: applied cases of ecological health*. 1st ed. Oxford University Press. New York, USA. 5,6 pp..
- Alonso-Castro, A.J., C. Carranza-Álvarez, J.J. Maldonado-Miranda, M.R. Jacobo-Salcedo, D.A. Quezada-Rivera, H. Lorenzo-Márquez, L.A. Figueroa-Zúñiga, C. Fernández-Galicia, N.A. Ríos-Reyes, M.A. de León-Rubio, V. Rodríguez-Gallegos, and P. Medellín-Milán. 2011. Zootherapeutic practices in Aquismón, San Luis Potosí, México. *Journal of Ethnopharmacology*. 138: 233-237.
- Alonso-Castro, A.J. 2014. Use of medicinal fauna in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 152: 53-70.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. 215(3): 403-410.
- Aránda, S.J.M. 2012. *Manual para el rastreo de mamíferos silvestres de México*. 1^a ed. Editorial Impresora Apolo. D.F., México.
- Arcangeli, J. 2014. Manejo de crías de zarigüeya (*Didelphis virginiana*) en cautiverio – Care for oposum (*Didelphis virginiana*) joeys in captivity. *REDVET*. 15(09): 4, 5 y 8 pp.
- Arenas, P.P.A. 2016. Seroprevalencia de rabia y *Leptospira* en poblaciones de perros de libre rango (*Canis familiaris*) y tlacuaches (*Didelphis* spp.) que habitan dos reservas ecológicas. Tesis de Maestría. Maestría en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. CD.MX., México.
- Armati, P.J., C.R. Dickman, and I.D. Hume (Editors). 2006. *Marsupials*. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 142,143 pp.
- Barrow, P.A. and Methner, U. (editors) 2013. *Salmonella* in domestic animal. 2nd Edition. CAB International. London, UK. 81 pp.
- Bäumler, A.J., R.M. Tsolis, T.A. Ficht, and L.G. Adams. 1998. Evolution of Host Adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun*. 66(10): 4579-4587.

- Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información. 2017. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. México. 34(16): 17 y 18. En línea: <http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/218350/sem16.pdf>. Consultado: 04 de mayo de 2017.
- Bondo K.J., D.L Pearl, N. Janecko, P. Boerlin, R.J. Reid-Smith, J. Parmley, and C.M. Jardine. 2016. Demographic and environmental factors on *Salmonella* occurrence in raccoons (*Procyon lotor*) from swine farms and conservation areas in Southern Ontario. PLoS ONE. 11(9): 2-21.
- Borges, K.A., T.Q. Furian, A. Borsoi, H.L.S. Moraes, C.T.P. Salle, e V.P. Nascimento. 2013. Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. Pesq. Vet. Bras. 33(12): 1416-1422.
- Brands, D.A. 2006. *Salmonella*. Deadly, diseases and epidemics. Chelsea House Publishers. Philadelphia, USA. 18-45 pp.
- Brenner, F.W., R.G. Villar, F.J. Angulo, R. Tauxe, and B. Swaminathan. 2000. *Salmonella* Nomenclature, Guest Commentary. J. Clin. Microbiol. 38(7): 2465-2457.
- Brown, C. 2003. Virchow revisited: emerging zoonoses. ASM News. 69(10): 493-497.
- Cabello, C.C, y F.C. Cabello. 2008. Zoonosis con reservorios silvestres: amenazas a la salud pública y a la economía. Rev Méd Chile. 136: 385-393.
- Casagrande, R.A., L.F.L. Lopes, E.M. Reis, D.P. Rodrigues, and E.R. Matushima. 2011. Isolation of *Salmonella enterica* in opossum (*Didelphis aurita* and *Didelphis albiventris*) of the São Paulo State, Brazil. Ciência Rural. 41(3): 492-6.
- Ceballos, G. y Oliva, G. 2005. Los mamíferos de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad CONABIO. 106-110.
- Chacón, L., K. Barrantes, C. García, R. Achí. 2010. Estandarización de una PCR para la detección del gen *invA* de *Salmonella* spp. en lechuga. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 30(1): 18-23.
- Cheng, C.-M., W. Lin, K.T. Van, L. Phan, N.N. Tran, and D. Farmer. 2008. Rapid detection of *Salmonella* in foods using real-time PCR. Journal of Food Protection. 71(12): 2436-2441.
- Chiu, C.H., and J.T. Ou. 1996. Rapid Identification of *Salmonella* Serovars in Feces by Specific Detection of Virulence Genes, *invA* and *spvC*, by an Enrichment Broth Culture-Multiplex PCR Combination Assay. Journal of Clinical Microbiology. 34(10): 2619-2622.
- Cruz-Reyes, A. 2009. Capítulo en libro: Fauna feral, fauna nociva y zoonosis. En: Lot, A. y Cano-Santana, Z. (Eds.) Biodiversidad del ecosistema del Pedregal de San

Ángel. Sección: Restauración, conservación y manejo. Universidad Nacional Autónoma de México. 453-461.

Cruz-Salazar, B., L. Ruiz-Montoya, D. Navarrete-Gutiérrez, E.E. Espinoza-Medinilla, E. Vázquez-Domínguez, y L.B. Vázquez. 2014. Diversidad genética y abundancia relativa de *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginiana* en Chiapas, México. *Revista mexicana de biodiversidad*. 85(1): 251-61.

Cuarón, A.D., L. Emmons, K. Helgen, F. Reid, D. Lew, B. Patterson, C. Delgado y S. Solari. 2008. *Didelphis virginiana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T40502A10319531. En línea: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T40502A10319531.en>. Consultado:

Dabanch, P. J. 2003. Zoonosis. *Rev Chil Infect*. 20(Supl 1): S47-S51.

Daszak, P., A. Cunningham, and A. Hyatt. 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta tropica*. 78(2): 103-16.

Daszak, P., and A.A. Cunningham. 2002. Emerging Infectious Diseases. A key role for Conservation Medicine. Capítulo en: Aguirre A.A., Ostfeld R.S., Tabor G.M., Pearl M.C. (eds.). *Conservation Medicine. Ecological Health in Practice*. Oxford University Press, New York, USA. 40-61.

de Jong, H.K., C.M. Parry, T. van der Poll, and W.J. Wiersinga. 2012. Host-pathogen interaction in invasive salmonellosis. *PLoS Pathog*. 8(10): 1-9.

Dhama, K., S. Rajagunalan, S. Chakraborty, A.K. Verma, A. Kumar, R. Tiwari, and S. Kapoor. 2013. Food-borne pathogens of animal origin-diagnosis, prevention, control and their zoonotic significance: a review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 16(20): 1076-1085.

Doyle, M.E. 2013. FRI Food Safety Reviews: White paper on human illness caused by *Salmonella* from all food and non-food vectors; update 2013. Food Research Institute, UW–Madison.

Dougan, G., and S. Barker. *Salmonella enterica* Serovar Typhi and the Pathogenesis of Typhoid Fever

EFSA. 2010. Panel on Biological Hazards (BIOhaz); Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. *EFSA Journal*. 8(10): 1826. 48pp. En línea: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2010.1826/epdf>. Consultado: 09 de agosto de 2017.

Figueroa, O.I.M., y R.A. Verdugo. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47(1-2): 25-42.

Gal-Mor, O., E.C. Boyle, and G.A. Grassl. 2014. Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in Microbiology. Microbial Immunology*. 5(391): 1-10.

- Gallina, T.S., y C.A. López-González. (editor). 2011. Manual de técnicas para el estudio de la fauna. Volumen I. Universidad Autónoma de Querétaro-Instituto de ecología, A.C. Querétaro, México. 377 pp. En línea: http://www.uaq.mx/FCN/Investigacion/MANUAL_DE_TECNICAS_PARA_EL_ESTUDIO_DE_LA_FAUNA.pdf. Consultado: 05 de febrero de 2016.
- Gardner, A.L., and M.E. Sunquist. 2003. Capítulo en libro: Opossum: *Didelphis virginiana*. En: Wild mammals of North America: biology, management, and conservation. Feldhamer, G.A., B.C. Thompson, and J.A., Chapman (Eds.). 2nd Ed. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland, USA. 3-29.
- Garrido, A., M.-J. Chapela, B. Román, P. Fajardo, J.M. Vieites, and A.G. Cabado. 2013. In-house validation of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology. 164: 92-98.
- González, P.J., S.N. Pereira, V.Z. Soto, A.E. Hernández, y C.J. Villarreal. 2014. Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. Salud Uninorte. Barranquilla (Col.). 30(1): 73-94.
- Gutiérrez-Cogco, L., E. Montiel-Vázquez, P. Aguilera-Pérez, y M.C. González-Andrade. 2000. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. Salud Pública de México. 42(6): 490-495.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: Nucleic acids symposium series. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
- Hart, R.P., S.D. Bradshaw, and J.B. Iveson. 1985. *Salmonella* infections in a marsupial the Quokka (*Setonoix brachyurus*), in relation to seasonal changes in condition and environmental stress. Applied and Environmental Microbiology. 49(5): 1276-1281
- Hartman, C.G. 1928. The breeding season of the opossum (*Didelphis virginiana*) and the rate of intrauterine and postnatal development. Journal of Morphology. 46: 143-215.
- Hernández, C.C., A.M.G. Aguilera, y E.G. Castro. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. Enf. Inf. Microbiol. 31(4): 137-151.
- Herrera-León, S., R. Ramiro, M. Arroyo, R. Díez, M.A. Usera, and M.A. Echeita. 2007. Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes. Research in Microbiology. 158: 122-127.
- Hilbert, F., F.J.M. Smulders, R. Chopra-Dewasthaly, and P. Paulsen. 2012. *Salmonella* in the wildlife- human interface. Review. Food Research International. 45: 603-608.
- Hoelzer, K., S.A.I. Moreno, and M. Wiedmann. 2011. Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. Veterinary Research. 42: 34.

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2009-2012. Zona Metropolitana 36 Querétaro. En línea: http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/censos/economicos/2009/zona_metro/ZMEUM_CE20093.pdf. Consultado: 02 de febrero de 2016.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2010. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Clave geoestadística 22014, Querétaro Querétaro.
- Jackson, J.J. 1994. Prevention and control of wildlife damage. Extension Wildlife Specialist Warnell School of Forest Resources University of Georgia. Athens, Georgia. 30602.
- Jacobo-Salcedo, M.R., A.J. Alonso-Castro, and A. Zarate-Martinez. 2011. Folk medicinal use of fauna in Mapimi, Durango, México. *Journal of Ethnopharmacology*. 133: 902-906.
- Jijón, S., A. Wetzel, and J. LeJeune. 2007. *Salmonella enterica* isolated from wildlife at two Ohio rehabilitation centers. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 38(3): 409-13.
- Johnson-Delaney, C. A. 2006. Practical marsupial medicine. *Proceedings. Association of Avian Veterinarians. Session #130*. 51-60.
- Johnson-Delaney, C. 2014. Pet Virginia Opossums and Skunks. Review. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 23: 317-326.
- Kongmuang, U., J. Luk, and A. A. Lindberg. 1994. Comparison of three stool-processing methods for detection of *Salmonella* serogroups B, C2, and D by PCR. *Journal of clinical microbiology*. 32(12): 3072-3074.
- Kourany, M., L. Bowdre, and A. Herrer. 1976. Panamanian forest mammals as carriers of *Salmonella*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 25(3): 449-455.
- Kozak, G.K., P. Boerlin, N. Janecko, R.J. Reid-Smith, and C. Jardine. 2009. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(3): 559-566.
- Kruse, H., A.M. Kirkemo, and K. Handeland. 2004. Wildlife as source of zoonotic infection. *Emerging Infectious Diseases*. 10(12): 2067-2072.
- Kuldeep, D., K. Karthik, C. Sandip, T. Ruchi, and K. Sanjay. 2013. Wildlife: a hidden warehouse of zoonosis – a review. Review article. *International Journal of Current Research*. 5(7): 1866-1879.
- Libby, S.J., G. Adams, T.A. Ficht, C. Allen, H.A. Whitford, N.A. Buchmeier, S. Bossie, and D.G. Guiney. 1997. The *spv* genes on the *Salmonella* Dublin virulence plasmid

are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. *Infect. Immun.* 65(5): 1786-1792.

- Lim, B.K., and K.L. Thong. 2009. Application of PCR-based serogrouping of selected *Salmonella* serotypes in Malaysia. *J Infect Dev Ctries.* 3(6): 420-428.
- Linder, E. 1995. *Toxicología de los alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 53-65 pp.
- Liu, F., S. Kariyawasain, B.M. Jayarao, R. Barrangou, P. Gerner-Smidt, E.M. Ribot, S.J. Khabel, and E.G. Dudley. 2011. Subtyping *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates from different sources by using sequence typing based on virulence genes and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs). *Applied and Environmental Microbiology.* 77(13): 4520-4526.
- Liu, T., K. Liljebjelke, E. Bartlett, C. Hofacre, S. Sánchez, and J. Maurer. 2002. Application of nested polymerase chain reaction to detection of *Salmonella* in poultry environment. *Journal of Food Protection.* 65(8): 1227-1232.
- Macedo, J., D. Loretto, M.V. Vieira, e R. Cerqueira. 2006. Classes de desenvolvimento em marsupiais: um método para animais vivos. *Mastozoología Neotropical.* 13(1): 133-136.
- McClelland, M., K. Sanderson, J. Spieth, S.W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston, and R.K. Wilson. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature.* 413(6858): 852-856.
- Majowicz, S.E., J. Musto, E. Scallan, F.J. Angulo, M. Kirk, S.J. O'Brien, T.F. Jones, A. Fazil, and R.M. Hoekstra. 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Food Safety. Clinical Infectious Diseases.* 50: 882-889.
- McQuiston, J.R., R. Parrenas, M. Ortiz-Rivera, L. Gheesling, F. Brenner, and P.I. Fields. 2004. Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fliB*, and *flpA* from *Salmonella*. *Journal of Clinical Microbiology.* 42(5): 1923-1932.
- McQuiston, J.R., S. Herrera-Leon, B.C. Wertheim, J. Doyle, P.I. Fields, R.V. Tauxe, and J.M. Logsdon, Jr. 2008. Molecular Phylogeny of the Salmonellae: Relationships among *Salmonella* Species and Subspecies Determined from Four Housekeeping Genes and Evidence of Lateral Gene Transfer Events. *Journal of Bacteriology.* 190(21): 7060-7067.
- Medina-Romero, M., I. Goyenechea, and J. Castillo-Cerón. 2012. Phylogenetic measures applied to the conservation of Mexican marsupials. *Revista Mexicana de Biodiversidad.* 83(4): 1215-26.
- Medina-Vogel, G. 2010. Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres. *Arch. Med. Vet.* 42: 11-24.

- Morgan, D.R., S. Scobie, and D.G. Arthur. 2012. Evaluation of Zoletil and other injectable anaesthetics for field sedation of brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). *Animal Welfare*. 21(4): 457-462.
- Murray, P.R., K.S. Rosenthal, y M.A, Pfaller. 2009. *Microbiología médica*. Sexta Edición. Elsevier. España.
- Nardelli, M., J.I. Túnez, D. Centrón, y M.H. Cassini. 2011. Técnicas de muestreo no invasivas aplicadas al estudio genético de mamíferos. *Interciencia*. 36(6): 404-411.
- National Opossum Society. 2015. Disponible en línea: <http://www.opossum.org/>. Consultado: 09 de marzo 2016.
- Nieto, P.A., C. Pardo-Roa, F.J. Salazar-Echegarai, H.E. Tobar, I. Coronado, C.A. Riedel, A.M. Kalergis, y S.M. Bueno. 2016. New insights about excisable pathogenicity islands in *Salmonella* and their contribution to virulence. *Microbes and Infection*. Elsevier. 1-8.
- NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. México. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 17 de febrero de 2003.
- NOM-114-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. México. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 22 de septiembre de 1995.
- Núñez O.L., y J. Bouda. 2007. *Patología clínica veterinaria*. Segunda edición. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F., México. 40-61 pp.
- OIE. 2012. *Manual Terrestre*. Salmonelosis. Capítulo 2.9.9. 1-21.
- OMS. 2017. *Salmonella* (no tifoidea). Nota descriptiva. En línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>. Consultado: 14 de octubre de 2017.
- Opossum Society of the United States. Opossum (*Didelphis Virginiana*) Blood Normals. En línea: <http://opossumsocietyus.org/opossum-blood-normals/>. Consultado: 01 de marzo de 2017.
- Parkhill, J., G. Dougan, K.D. James, N.R. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, K.L. Mungall, S.D. Bentley, M.T. Holden, M. Sebaihia, S. Baker, D. Basham, K. Brooks, T. Chillingworth, P. Connor, A. Cronin, P. Davis, R.M. Davies, L. Dowd, N. White, J. Farrar, T. Feltwell, N. Hamlin, A. Haque, T.T. Hien, S. Holroyd, K. Jagels, A. Krogh, T.S. Larsen, S. Leather, S. Moule, P. O'Gaora, C. Parry, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, and B.G. Barrell. 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*. 413(6858): 848–852.

- Parra, M., J. Durango, y S. Máttar. 2002. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. MVZ-Córdoba. 7(2): 187-200.
- Petrides, G.A. 1949. Sex and age determination in the opossum. Journal of Mammalogy. 364-78.
- Prange, S., S.D. Gehrt, and E.P. Wiggers. 2004. Influence of anthropogenic resources on raccoon (*Procyon lotor*) movements and spatial distribution. Journal of Mammalogy. 85(3): 483-490.
- Public Health Agency of Canada. 2015. Salmonella enterica spp. –Pathogen Safety Data Sheets. En línea: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/salmonella-ent-eng.php>. Consultado: 06 de agosto 2015.
- Quinn, P.J., B.K. Markey, M.E. Carter, W.J.C. Donnelly, and F.C. Leonard. 2008. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 1ª ed. Editorial Acribia. 1ª reimpresión. Zaragoza, España.
- Rademaker, V. y Cerqueira, R. 2006. Variation in the latitudinal reproductive patterns of the genus *Didelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae). Austral Ecology. 31: 337-342.
- Radostits O.M., I.G. Mayhew, y D.M. Houston (Editores). 2002. Examen y diagnóstico clínico en veterinaria. Ediciones Harcourt. Madrid, España. p. 108.
- Riverón, C.R.L. 2002. Enfermedades emergentes y reemergentes: un reto al siglo XXI. Rev Cubana Pediatr. 74(1): 7-22.
- Rodríguez, L., R. Calabuig, M. La Eocco, F.G. Moody, y T.A. Miller. 1992. Bacterial flora of the gastrointestinal tract of opossums. Veterinary Microbiology, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. 30: 289-295.
- Ruiz, P.H.A., O.F.J. Escobedo, T.E. Rebollar, y P.M.A. Barrera. 2011. Mamíferos silvestres y sus patógenos zoonóticos. Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán. En línea: <http://www.cicy.mx/sitios/biodiversidad/Biodiversidad/capitulo-V/enfermedades-asociadas-a-la-biodiversidad>. Consultado: 27 de mayo 2015.
- Ruiz-Piña, H.A., y A. Cruz-Reyes. 2002. The opossum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatán, México. Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro. 97(5): 613-620.
- Ruiz-Piña, H.A., M.A. Puc-Franco, J. Flores-Abuxapqui, I. Vado-Solís, and M.F. Cárdenas-Marrufo. 2002. Isolation of *Salmonella enterica* and serologic reactivity to *Leptospira interrogans* in opossums (*Didelphis virginiana*) from Yucatán, México. Brief Communication. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 44(4): 235-237.
- Runkel, N.S., L.F. Rodriguez, F.G. Moody, M.T. LaRocco, and T. Blasdel. 1991. Salmonella infection of the biliary and intestinal tract of wild opossums. Lab. Anim. Sci. 41(1): 54-6.

- Sanchis, R., G. Abadie, and P. Pardon. 1995. Salmonella Abortusovis experimental infection induced by the conjunctival route: clinical, serological and bacteriological study of the dose effect in female lambs. *Vet Res.* 26(2): 73-80.
- Sikes, R.S., W.L. Gannon, and the Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists. 2011. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal fo Mammalogy.* 92(1): 235-253.
- Søborg, D.A., N.B. Hendriksen, M. Kilian, and N. Kroer. 2013. Widespread Occurrence of Bacterial Human Virulence Determinants in Soil and Freshwater Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(18): 5488-5497.
- Soumet, C., G. Ermel, V. Rose, N. Rose, P. Drouin, G. Salvat, and P. Colin. 1999. Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. *Letters in applied microbiology.* 29(1): 1-6.
- Steinmuller, N., L. Demma, J.B. Bender, M. Eidson, and F.J. Angulo. 2006. Outbreaks of enteric disease associated with animal contact: not just a foodborne problem anymore. *Clinical Infectious Diseases.* 43: 1596-1602.
- Suárez, L.C.L., y D.C. Berdasquera. 2000. *Rev Cubana Med Gen Integr.* 16(6): 593-597.
- Sunquist, M.E., and J.F. Eisenberg. 1993. Reproductive strategies of female *Didelphis*. *Bulletin of the Florida Museum of Natural History, Biological Sciences.* 36: 109-140.
- Taylor, L.H., S.M. Latham, and M.E.J. Woolhouse. 2001. Risk factors for human disease emergence. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 356: 983-989.
- Ternent, H.E., Innocent, G.T., Filshie, L.M., Taylor, D.J., Steele, W.B., McEwen, S.A., Reilly, W.J., Gunn, G.J., Reid, S.W.J., and D.J.Mellor. 2004. Frozen storage of *Escherichia coli* O157 in buffered peptone water and its detection on bovine carcasses. *Journal of Food Protection.* 67(1): 40-45.
- Thigpen, J.E., J.A. Moore, B.N. Gupta, and D.B. Feldman. 1975. Opossums as a reservoir for Salmonellae. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 167(7): 590-2.
- Thrusfield, M. 2007. *Veterinary epidemiology.* 3rd. Edition. Blackwell Science. Oxford, UK.
- University of Nebraska-Lincoln. 1992. Virginia opossum (*Didelphis virginiana*). Nebraska wildlife. Nebraska Game and Parks Commission Publications.
- Urdahl, A.M., Solheim, H.T., Vold, L., Hasseltvedt, V., and Y. Wasteson. 2012. Shiga toxin-encoding genes (*stx* genes) in human faecal samples. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica.*

- Uribarren, B.T. (Administrador). 2016. Glosario de microbiología y parasitología. Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional Autónoma de México. En línea: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/glosario.html#letrae>. Consultado: 15 de febrero de 2017.
- Vila, J., M.J. Álvarez-Martínez, J. Buesa, y J. Castrillo. 2009. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 27(7): 406-411.
- Villafañe, I.E.G., F. Miñarro, M. Ribicich, C.A. Rossetti, D. Rossotti, and M. Busch. 2004. Assessment of the risks of rats (*Rattus norvegicus*) and opossums (*Didelphis albiventris*) in different poultry-rearing areas in Argentina. Brazilian Journal of Microbiology. 35(4): 359-63.
- Vogelnest, L. 2014. Capítulo en libro: Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine. Marsupiales. Vol.8. Editorial Elsevier. 755.
- Wattiau, P., C. Boland, and S. Bertrand. 2011. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. Applied and Environmental Microbiology. 77(22): 7877-7885.
- Weiss, R.A. 2001. Animal origins of human infectious disease. The Leeuwenhoek Lecture. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 356: 957-977.
- West, G., D. Heard, and N. Caulkett. 2007. Zoo Animal and Wildlife Immobilization and Anesthesia. 1 ed. Publishing B, editor: Black Publishing. 341-346.
- Williams-Newkirk, A.J., J.S. Salzer, D.S. Carroll, T.R. Gillespie, y G.A. Dasch. 2013. Simple method for locating a suitable venipuncture site on the tail of the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Eur J Wildl Res. 59: 455-457.
- Wright, D.D., J.J. Ryser, and R.A. Kiltie. 1995. First-cohort advantage hypothesis: a new twist on facultative sex ratio adjustment. American Naturalist. 145: 133-145.
- Wright, J.D., M.S. Burt, and V.L. Jackson. 2012. Influences of an urban environment on home range and body mass of Virginia Opossums (*Didelphis virginiana*). Northeastern Naturalist. 19(1): 77-86.
- Zarza, H., y R.A. Medellín. *Didelphis virginiana*. En: Ceballos G, Oliva G. eds. Los mamíferos silvestres de México. 2005. México: CONABIO y FCE. 108-110.

XII. APÉNDICES

12.1 Geles

Como resultado de las técnicas moleculares se tuvieron las amplificaciones que se muestran en las figuras siguientes.

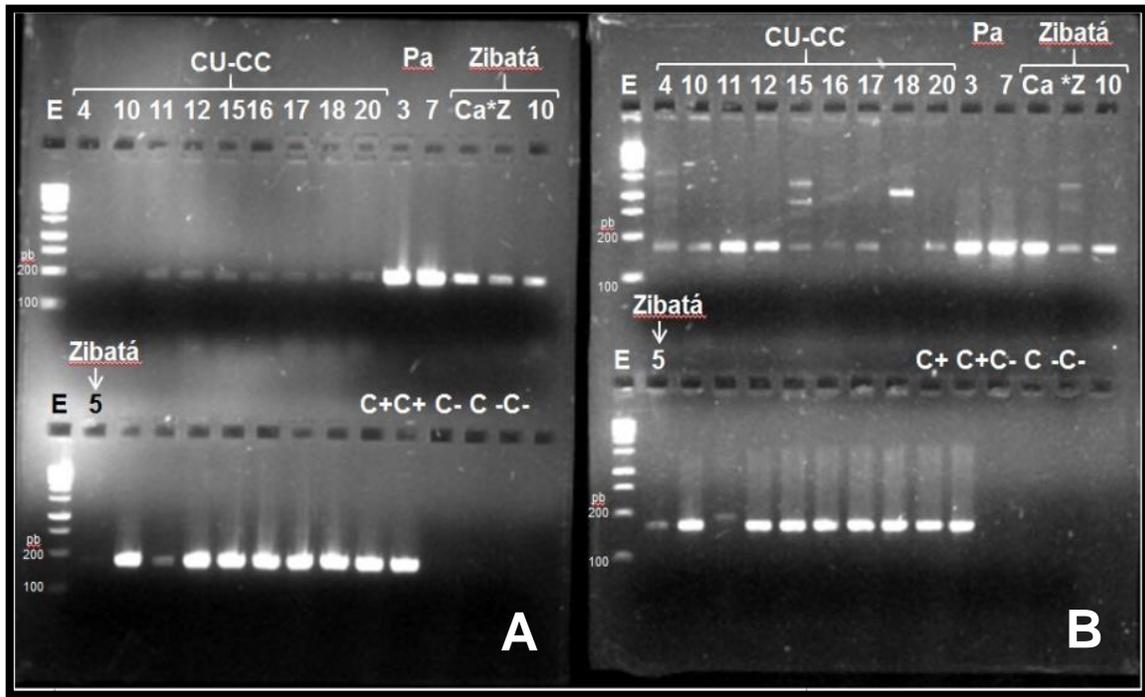


Figura 17. Resultados de la PCR en punto final con oligonucleótidos invA (A) y MIN (B), de los aislamientos presuntamente positivos a partir de hisopados cloacales de Tlacuaches. E: marcador de peso molecular; Pa: PANEC; Ca: cacomixtle; *Z: aislamiento de hisopado salival de zorra gris; C+: control positivo; C-: control negativo.

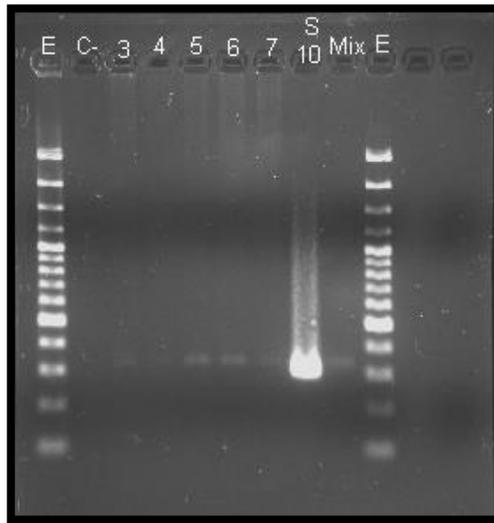


Figura 18. Resultados de la PCR en punto final utilizando oligonucleótidos invA3 en las muestras sanguíneas de PANEC. E: marcador de peso molecular; C-: control negativo; S10: control positivo.

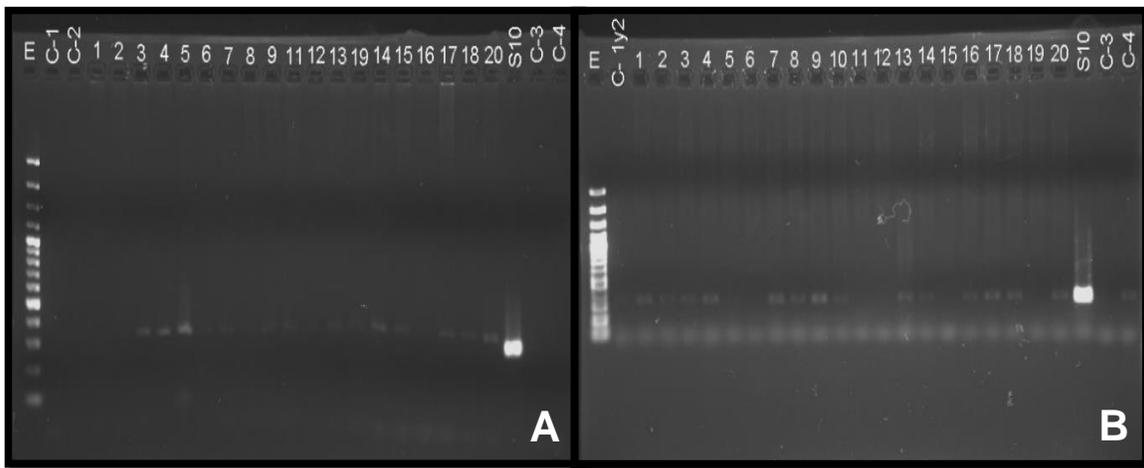


Figura 19. Resultados de la PCR en punto final utilizando oligonucleótidos invA3 de las muestras sanguíneas. **A.** Zibatá, **B.** CU-CC. E: Marcador de peso molecular, C-: Control negativo, S10: Control positivo.



Figura 20. Resultados de la PCR en punto final utilizando oligonucleótidos invA3 en las muestras fecales de los tlacuaches capturados en Zibatá. E: marcador de peso molecular; C-: control negativo; An1: control positivo; Perf.: perforado; ZoG: muestra de heces de zorra gris.

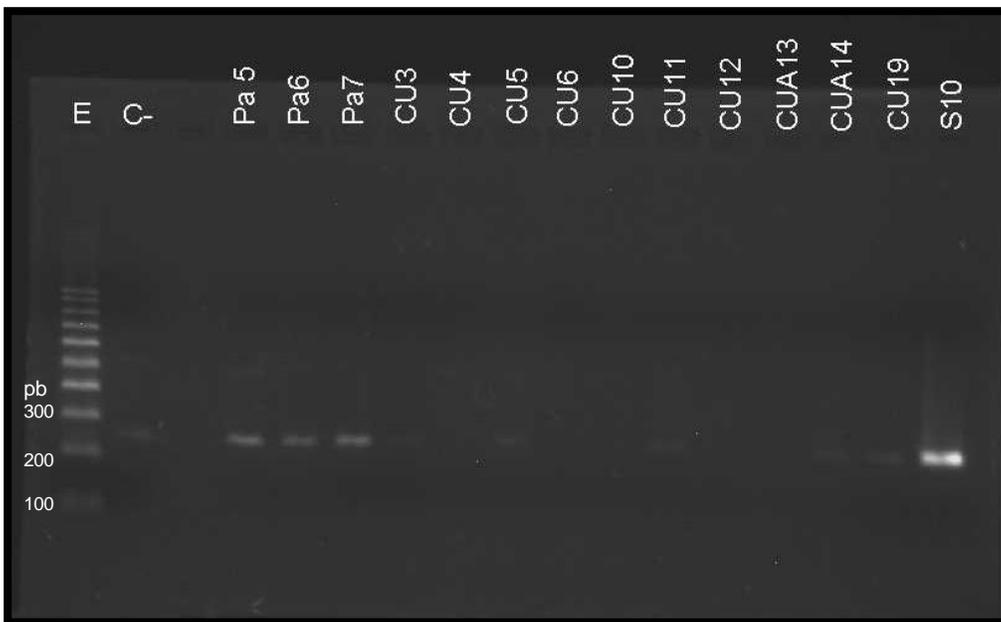


Figura 21. Resultados de la PCR en punto final utilizando oligonucleótidos invA3 en las muestras fecales de los tlacuaches capturados en PANEC y CU-CC. E: marcador de peso molecular; C-: control negativo; S10: control positivo; Perf.: perforado; ZoG: muestra de heces de zorra gris.

12.2 Determinación de positivos

Cuadro 23. Determinación de positivos por comparativo de resultados de la detección molecular en las distintas muestras. ID: identificación del ejemplar; Zi: Zibatá; CU: CU-CC; SM: sin muestra.

ID	Heces	Sangre	Pre enriquecimientos	Aislamientos	Resultado
1Zi	+	-	SM	-	Negativo
2Zi	+	-	SM	-	Negativo
3Zi	SM	+	SM	-	Negativo
4Zi	SM	+	SM	-	Negativo
5Zi	SM	+	+	-	Positivo
6Zi	+	+	-	-	Positivo
7Zi	+	+	-	-	Positivo
8Zi	SM	-	-	-	Negativo
9Zi	+	+	+	-	Positivo
10Zi	SM	SM	-	+	Negativo
11Zi	SM	+	+	-	Positivo
12Zi	SM	-	+	-	Negativo
13Zi	SM	+	-	-	Negativo
14Zi	SM	+	-	-	Negativo
15Zi	SM	+	+	-	Positivo
16Zi	+	-	-	-	Negativo
17Zi	-	+	-	-	Negativo
18Zi	+	+	+	-	Positivo
19Zi	+	+	-	-	Positivo
20Zi	SM	+	-	-	Negativo
1CU	SM	+	+	-	Positivo
2CU	SM	+	+	-	Positivo
3CU	+	+	-	-	Positivo
4CU	+	+	+	+	Positivo
5CU	+	-	-	-	Negativo
6CU	+	-	-	-	Negativo
7CU	SM	+	-	-	Negativo
8CU	SM	+	-	-	Negativo
9CU	SM	+	+	-	Positivo
10CU	+	+	-	-	Positivo
11CU	+	-	+	+	Positivo
12CU	+	-	-	+	Positivo
13CU	+	+	-	-	Positivo
14CU	+	+	-	-	Positivo
15CU	SM	-	+	+	Positivo
16CU	SM	-	+	+	Positivo

17CU	SM	-	+	+	Positivo
18CU	SM	-	-	-	Negativo
19CU	+	-	+	-	Positivo
20CU	SM	-	+	+	Positivo

12.3 Secuenciación

La secuencia obtenida del fragmento de 362 pb fue: CCGCCATGGNGGCCGCGNGAATTCNATTAACGTGTTTCCGTGCGTANTATGAAATTAATTATGGAAGCGCTCGCATTGTGGGCGCCAAGAGAAAAAGATGTCATTAACCTTGTGGAGCATATTCGTGGGGCAATGGCGCGTTATATTTGCCATAANTCGCCAATGGCGGCNAATTACGAGCAGTNATGGTATCTGCTGAAGTTGAGGATGTTATTCGCAAAGGGATCCGTCAGACCTCTGGCAGTACCTTCCTCAGCCTTGACCCGGAAGCCTCCGCTAATTTGATGNAATCACTANTGAATTCGCGGCCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCANCGCGTTGNAATGCATA. En la Figura 22 se aprecian la representación gráfica de los resultados de la búsqueda en la base de datos de GenBank mediante el uso del algoritmo BLAST.

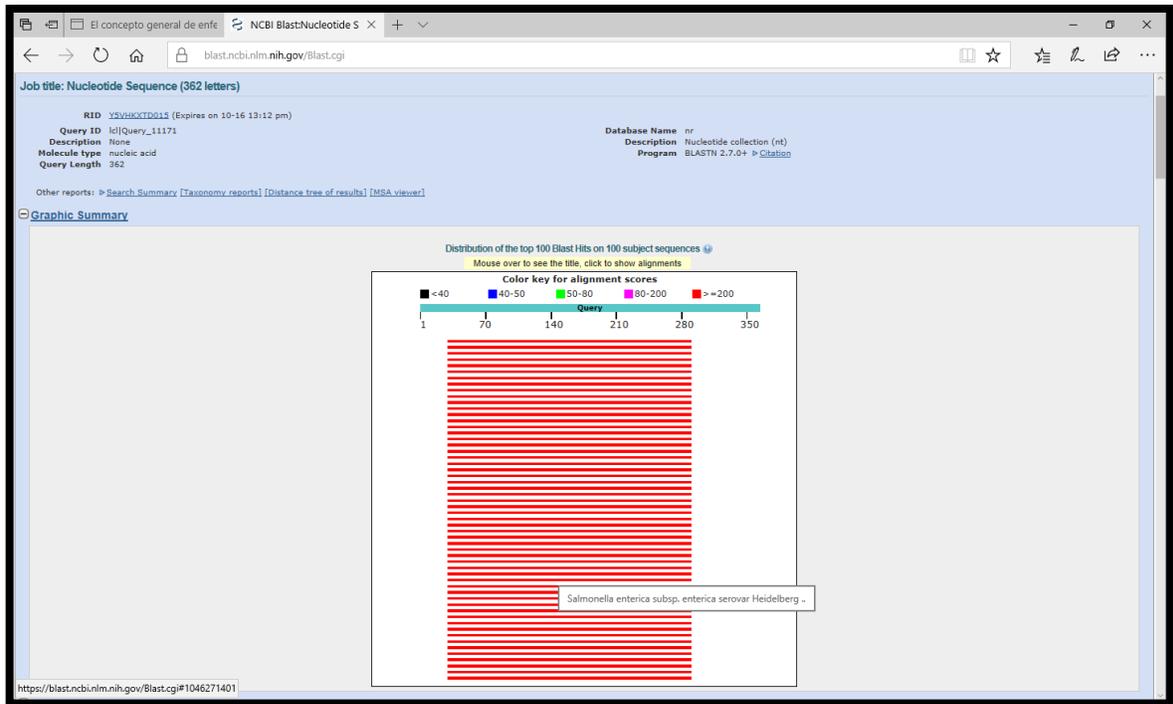


Figura 22. Representación gráfica de los resultados de la búsqueda en la base de datos de GenBank mediante el uso del algoritmo BLAST. Secuencia obtenida a partir del producto de PCR de la muestra sanguínea del tlacuache Zi 17.

12.4 Morfometría y constantes fisiológicas

Cuadro 24. Relación del sexo, edad, constantes fisiológicas, presencia de lesiones y detección de *Salmonella enterica* obtenidos de los tlacuaches (*D. virginiana*) capturados. Zi: Zibatá; CU: CU-CC.

Ejemplar	Sexo	Edad	Temperatura (°C)	Frecuencia respiratoria (rpm)	Frecuencia cardiaca (lpm)	Lesiones	Salmonella enterica
1Zi	Hembra	Adulto	35	52	112	No	Negativo
2Zi	Hembra	Juvenil	32.1	56	236	No	Negativo
3Zi	Hembra	Juvenil	32	96	184	No	Negativo
4Zi	Macho	Juvenil	36.4	40	212	No	Negativo
5Zi	Hembra	Adulto	33.4	48	104	No	Positivo
6Zi	Macho	Juvenil	.	36	212	No	Positivo
7Zi	Macho	Juvenil	33.8	48	228	No	Positivo
8Zi	Hembra	Adulto	32.5	116	208	Sí	Negativo
9Zi	Macho	Adulto	33.1	44	224	Sí	Positivo
10Zi	Macho	Juvenil	34.1	56	272	No	Negativo
11Zi	Macho	Adulto	33.7	28	188	No	Positivo
12Zi	Macho	Adulto	33.4	60	212	Sí	Negativo
13Zi	Macho	Adulto	35.7	68	252	No	Negativo
14Zi	Hembra	Juvenil	34.1	60	280	No	Negativo
15Zi	Macho	Adulto	34	60	200	Sí	Positivo
16Zi	Hembra	Adulto	34.1	40	208	Sí	Negativo
17Zi	Hembra	Juvenil	33.4	116	240	No	Negativo
18Zi	Hembra	Juvenil	34.5	116	280	No	Positivo
19Zi	Macho	Juvenil	34.4	52	262	No	Positivo
20Zi	Macho	Adulto	34.1	40	232	No	Negativo
1CU	Hembra	Adulto	35.6	96	200	No	Positivo
2CU	Macho	Juvenil	34	76	240	No	Positivo
3CU	Hembra	Juvenil	33.1	56	281	No	Positivo
4CU	Macho	Juvenil	34	44	284	No	Positivo
5CU	Hembra	Juvenil	33.4	72	276	No	Negativo
6CU	Hembra	Juvenil	32.1	56	236	Sí	Negativo
7CU	Hembra	Juvenil	.	60	272	No	Negativo
8CU	Macho	Adulto	34	44	204	No	Negativo
9CU	Hembra	Adulto	34.5	64	256	No	Positivo
10CU	Hembra	Juvenil	34.7	44	240	No	Positivo
11CU	Macho	Juvenil	33.8	56	296	No	Positivo
12CU	Hembra	Adulto	34.6	68	248	No	Positivo
13CU	Hembra	Adulto	.	60	240	Sí	Positivo
14CU	Macho	Adulto	33.1	60	264	Sí	Positivo
15CU	Hembra	Adulto	33.1	72	244	Sí	Positivo

16CU	Macho	Adulto	33.5	88	224	Sí	Positivo
17CU	Hembra	Juvenil	34.8	36	268	No	Positivo
18CU	Hembra	Adulto	34.2	80	228	Sí	Negativo
19CU	Hembra	Adulto	33.4	56	188	Sí	Positivo
20CU	Macho	Adulto	34.4	44	244	No	Positivo

Cuadro 25. Relación del peso y longitudes obtenidos de los tlacuaches (D. virginiana) capturados. Zi: Zibatá; CU: CU-CC.

Ejemplar	Peso (g)	Longitud Total (mm)	Longitud Corporal (mm)	Longitud Cola (mm)	Longitud Pie (mm)	Longitud Oreja (mm)
1Zi	1900	845	470	375	60	50
2Zi	850	675	365	310	46	40
3Zi	1000	690	393	297	50	40
4Zi	700	660	367	293	49	41
5Zi	2000	880	505	375	60	58
6Zi	900	706	416	290	55	47
7Zi	1050	728	402	326	56	51
8Zi	1800	820	455	365	62	45
9Zi	1300	784	422	362	51	45
10Zi	1050	652	338	314	52	40
11Zi	1200	764	431	333	56	49
12Zi	3200	947	546	401	65	60
13Zi	1500	822	466	356	63	51
14Zi	850	701	376	325	46	37
15Zi	3250	932	513	419	63	65
16Zi	1750	555	495	60	54	52
17Zi	1250	735	382	353	52	48
18Zi	650	622	309	313	43	41
19Zi	750	635	344	291	46	44
20Zi	1550	792	450	342	57	50
1CU	2150	713	363	350	42	49
2CU	600	630	343	287	45	42
3CU	1050	755	411	344	50	39
4CU	1550	651	371	280	47	46
5CU	550	656	386	270	40	40
6CU	950	740	419	321	45	46
7CU	250	712	392	320	47	42
8CU	3250	990	584	406	63	60
9CU	2650	850	519	331	51	49
10CU	800	723	392	331	49	40
11CU	800	676	374	302	45	45

12CU	2770	830	474	356	56	51
13CU	2400	860	486	374	52	52
14CU	1250	746	415	331	51	43
15CU	2250	901	515	386	59	54
16CU	2850	915	540	375	61	54
17CU	1000	740	429	311	51	47
18CU	1650	830	483	347	53	48
19CU	2200	878	494	384	61	44
20CU	1550	790	436	354	55	50

12.5 Hemogramas

Cuadro 26. Relación de los valores de los eritogramas obtenidos de los tlacuaches (*D. virginiana*) capturados. Zi: Zibatá; CU: CU-CC.

Ejemplar	Eritrocitos x10 ⁶ /mm ³	Hemoglobina gr/dL	Hematocrito %	Volumen Globular Medio fL	Concentración Media de Hemoglobina Cospuscular g/dL
1Zi	4.74	11.6	39.8	84.1	29.1
2Zi	4.98	12.2	40.5	81.3	30.1
3Zi	5.04	12.7	42.1	83.5	30.3
4Zi	5.23	13.5	44.3	84.6	30.4
5Zi	4.55	10.5	38.2	84	27.4
6Zi	5.28	13.4	43.3	81.9	31
7Zi	4.98	12.4	41.9	84.2	29.7
8Zi	4.55	11.8	39.4	86.6	29.9
9Zi	5.57	11.5	38.1	68.4	30.3
10Zi	3.58	8.6	28.5	79.5	30.2
11Zi	5.4	13.7	44	81.5	31
12Zi	5.01	12.2	39.8	79.3	30.8
13Zi	4.65	11.4	37.9	81.6	30.1
14Zi	3.43	13	29	84.8	44.9
15Zi	5.71	12.5	42.5	74.4	29.5
16Zi	5.67	13.1	45.9	80.9	28.6
17Zi	6	13.2	44.8	74.6	29.5
18Zi	4.18	10.7	34.7	83	30.8
19Zi	4.64	11.4	39.5	85.1	28.9
20Zi	4.74	11.1	37.5	79.1	29.6
1CU	5.12	12.3	42.1	82.2	29.1
2CU	4.34	11.6	36.5	84.1	31.9
3CU	5.29	13.4	44.9	84.8	29.8
4CU	4.44	10.4	34	76.7	30.7
5CU	4.5	11.8	39	86.6	30.3
6CU	5.16	12.6	39.5	76.6	31.9
7CU	4.75	12	37.7	79.4	31.7
8CU	4.66	11	37.8	81.1	29.1
9CU	5.48	14.3	45.6	83.3	31.2
10CU
11CU
12CU
13CU
14CU	4.93	11.7	37.2	75.5	31.3
15CU	4.65	10.7	36	77.5	29.7

16CU	4.58	10.3	34.9	76.2	29.6
17CU	4.94	11.6	39.7	80.3	29.2
18CU	4.83	12	39.6	82	30.3
19CU	3.89	10.4	34.9	89.7	29.7
20CU	4.53	10.7	37	81.5	29

Cuadro 27. Relación de los valores de los leucogramas obtenidos de los tlacuaches (*D. virginiana*) capturados. Zi: Zibatá; CU: CU-CC. Todos los valores son expresados como cantidad de células por microlitro de sangre.

Ejemplar	Leucocitos	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Monocitos	Linfocitos
1Zi	21500	14298	516	129	602	5956
2Zi	11210	6861	123	482	572	3172
3Zi	11310	4773	373	113	136	5915
4Zi	16360	11665	180	196	213	4106
5Zi	11790	8548	236	71	212	2723
6Zi	9130	5003	46	292	192	3597
7Zi	9260	4417	130	232	74	4408
8Zi	9080	4286	309	300	808	3378
9Zi	13270	5242	305	1221	226	6277
10Zi	4050	1863	36	446	138	1567
11Zi	8360	2709	150	159	75	5267
12Zi	14820	8773	311	548	252	4935
13Zi	7720	2679	116	116	31	4779
14Zi	11490	7917	230	299	781	2264
15Zi	9170	5768	275	101	174	2852
16Zi	11000	7172	264	143	44	3377
17Zi	11510	3016	207	576	58	7654
18Zi	6730	3452	128	222	108	2820
19Zi	12160	7649	292	669	182	3368
20Zi	13400	2747	107	804	188	9554
1CU	5290	3386	275	111	132	1386
2CU	7300	3635	88	131	139	3307
3CU	14440	11003	231	404	578	2224
4CU	5180	1766	73	326	181	2833
5CU	9050	4932	100	181	244	3593
6CU	7620	2576	267	168	739	3871
7CU	8580	4230	249	463	463	3175
8CU	5730	2166	115	143	69	3237
9CU	8020	3930	168	241	160	3521
10CU
11CU

12CU
13CU
14CU	11030	7412	99	265	1643	1610
15CU	12950	7032	155	207	298	5258
16CU	11760	7138	141	270	223	3987
17CU	5050	1505	192	86	10	3257
18CU	12820	6731	244	269	154	5423
19CU	9620	4358	366	443	1106	3348
20CU	5530	2223	72	105	61	3069