



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ENTEROBACTERIAS EN POBLACIONES SILVESTRES DE  
CARNÍVOROS DE LA RESERVA DE LA BIOSFERA DE JANOS,  
CHIHUAHUA, MÉXICO.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**JONATHAN JOSUÉ LÓPEZ ISLAS**

Asesores:

MVZ Dr. Gerardo Suzán Azpiri

MVZ Dr. Daniel Martínez Gómez

MVZ M. en C. Andrés Mauricio López Pérez

Ciudad Universitaria, D.F. 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Enfermedades infecciosas en vida Silvestres.....	2
Papel de los carnívoros en la ecología de enfermedades.....	5
Salmonelosis.....	6
Patogénesis de <i>Salmonella</i> .....	9
<i>Salmonella</i> y los Carnívoros.....	10
<i>Escherichia coli</i> .....	11
<i>E. coli</i> en carnívoros.....	12
Hipótesis.....	14
Objetivos Generales.....	14
Objetivos Particulares.....	14
MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	20
Composición y estructura de la comunidad de carnívoros en la Reserva de la Biósfera de Janos, Chihuahua.....	20
<i>Salmonella</i> .....	21
<i>E. coli</i> .....	22

Ensayo de infección y sobrevivencia a la gentamicina en cultivo celular de <i>Salmonella</i> .....	23
Ensayo de infección en cultivo celular de <i>E. Coli</i> .....	24
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIONES.....	31
REFERENCIAS.....	32
FIGURAS.....	41
CUADROS.....	47



## RESUMEN

JONATHAN JOSUÉ LÓPEZ ISLAS. Enterobacterias en poblaciones silvestres de Carnívoros de la Reserva de la Biosfera de Janos, Chihuahua (Bajo la dirección del MVZ, Dr Gerardo Suzán Azpiri, MVZ, Dr Daniel Martínez Gómez y MVZ, M. en C. Andrés Mauricio López Pérez)

La incidencia y distribución de las enfermedades emergentes (EID's) se ha incrementado en los últimos años, ocasionando pérdidas económicas y problemas en la salud pública y animal. Se estima que un 54.3% de las EID's son causadas por agentes bacterianos, entre ellos *Salmonella* spp y *E. coli* patógena. Estas han sido reportadas en fauna doméstica y silvestre de diferentes órdenes, incluyendo los carnívoros. En este estudio se evaluó la frecuencia y la presencia de genes de virulencia *Salmonella* spp. y *E. coli* patógenas, en carnívoros de la Reserva de la Biosfera de Janos. Se capturaron 57 carnívoros silvestres en dos muestreos en los años 2013 y 2014, a los cuales se les tomaron hisopados rectales. Las muestras obtenidas fueron analizadas por métodos bacteriológicos convencionales y técnicas moleculares (PCR) para determinar la presencia de los genes ITS 16s, InvA, SopE, CdtB, Stx-1, Stx-2, EscV, bfpB, eae, LT y ST. Los resultados obtenidos muestran que 23 de los 57 individuos (40.35%) fueron positivos a *Salmonella* spp. De estos individuos se logró el aislamiento de tres cepas, las cuales fueron positivas a los genes IT'S-16s, invA, sopE y cdtB. Estas cepas fueron evaluadas en cultivo celular en células Hep2 mostrando sobrevivencia intracelular. Así mismo, de los 55 muestras de heces se recuperaron 1980 cepas de *E. coli*, las cuales fueron evaluadas por medio de la PCR. Se lograron identificar: 30 cepas positivas a escV, de las cuales 8 fueron positivas también a eae; 6 cepas positivas solo a eae; 4 positivas a stx1 y stx2; 19 positivas a stx2 y 2 positivas a stx1. Las 8 cepas positivas a aea y escV fueron evaluadas en cultivo celular con células Hep2, mostrando en todos los casos una adhesión localizada y lesiones sugerentes a la formación de pedestal. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que distintas especies de carnívoros silvestres pueden ser portadoras de variedades atípicas de microorganismos patógenos, lo cual muestra que en los ambientes naturales se pueden presentar ciclos enzoóticos.

## **Enterobacterias en poblaciones silvestres de Carnívoros de la Reserva de la Biosfera de Janos, Chihuahua.**

### **Introducción**

#### Enfermedades Infecciosas en vida silvestre

Las enfermedades infecciosas emergentes (EIDs) y remergentes (REIDs) han sido, en los últimos 20 años, un tema relevante en la salud pública y animal. (Jones et al., 2008). Esto se debe a que se ha habido un aumento en su incidencia en varias partes del mundo, repercutiendo en la economía y la conservación de especies en esas regiones (Daszak y Cunningham 2002; Childs et al. 2007). Algunos ejemplos que pueden citarse son: el virus de Nipah, SARS, la enfermedad de Lyme, el virus de Ebola, Rinderpest, Distemper Canino, Borrelia, Escherichia coli O157:H7, etc (Dobson y Foufopoulos 2001; Daszak y Cunningham 2002; Woolhouse et al. 2005). Estos brotes se presentaron tanto en humanos como animales domésticos y silvestres, afectando los sectores económicos como la producción de alimentos. Además de afectar la salud pública y animal, favoreciendo en algunos casos, la pérdida de la biodiversidad (Jones et al. 2008; Arrivillaga y Caraballo 2009).

Las EIDs son aquellas enfermedades causadas por nuevos patógenos, mientras que las REIDs, son las que han aumentado su incidencia y/o distribución geográfica recientemente, incorporando en varias ocasiones nuevos huéspedes o huéspedes en los cuales no se tenía conocimiento que se hallasen (Childs et al. 2007; Kahn et al. 2012).

Las EIDs y las REIDs son un componente de la dinámica del medio ambiente, la cual se altera por cambios tecnológicos (en los medios de transporte), sociales, económicos, ambientales, geográficos y demográficos (Arrivillaga y Caraballo 2009).

Estudios recientes sugieren que el surgimiento de estas enfermedades está asociado con actividades humanas que perturban los sistemas naturales, como por ejemplo: la fragmentación, reducción y destrucción de hábitats; crecimiento, dispersión y migración de poblaciones humanas; desarrollo agrícola; comercio de especies silvestres; ecoturismo; entre otras actividades antropogénicas (Daszak et al. 2001; Daszak y Cunningham 2002; Jones et al. 2008; Arrivillaga y Caraballo 2009). Muchas de estas actividades propician una mayor tasa de contacto entre humanos, fauna doméstica y la fauna silvestres propiciando así, la transmisión de agentes patógenos (Jones et al., 2008).

Las enfermedades emergentes y reemergentes en poblaciones de animales silvestres, se pueden clasificar en tres tipos: 1) aquellas poblaciones que por susceptibilidad del huésped se ha visto aumentada su incidencia (principalmente poblaciones pediátricas y geriátricas), 2) las que se presentan por cambios medioambientales que favorecen a los patógenos volviéndolos más virulentos y 3) aquellas en que los patógenos invaden huéspedes que se encuentran inmunosuprimidos (Daszak et al. 2001; Dobson y Foufopoulos, 2001; Medina, 2010).

Los primeros reportes de EIDs ocurrieron en los años cuarenta, y a partir de estos, otros han ocurrido hasta nuestros días, tal es el caso del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS por sus siglas en inglés), la enfermedad de Lyme y la Tuberculosis (Childs et al. 2007; Jones et al. 2008).

Para algunos investigadores, el incremento en la incidencia de las EIDs y REIDs puede estar vinculado directamente con la aparición de los sistemas de vigilancia epidemiológicos y no necesariamente con una aparición de sus agentes etiológicos, los cuales pudieron haber estado presentes en el medio ambiente desde hace siglos (Jones et al. 2008; Medina, 2010). Considerando esto, es



importante tener un conocimiento detallado de la epidemiología; la dinámica de las enfermedades infecciosas y sus agentes etiológicos; cómo se lleva la transmisión estas enfermedades en diferentes poblaciones, especialmente en las poblaciones silvestres (Boitani et al. 2012).

De acuerdo a algunos estudios, un 60.3% de las EIDs son causadas por agentes patógenos potencialmente zoonóticos, de los cuales se considera que el 71.8 % provino de individuos silvestres (Jones et al. 2008; Boitani et al. 2012). Las EIDs y REID asociadas con el contacto fauna doméstica-silvestre representan un riesgo considerable para ambos grupos de fauna. Cuando el ganado y la fauna silvestre comparten el mismo hábitat, varios patógenos pueden ser transmitidos entre ellos, colocando en riesgo a las especies silvestres, provocando que estén en peligro o bajo alguna categoría de conservación. (Daszak y Cunningham, 2002).

En este aspecto, los carnívoros pueden tener un papel de importancia en la dinámica de diversas enfermedades (Baker et al. 2008). Debido a que existen especies que se distribuyen ampliamente, recorren grandes extensiones de terreno y pueden ser portadores de una amplia gama de microorganismos, algunos zoonóticos, el que su hábitat se fragmente y sus poblaciones vayan en decremento, tiene implicaciones epidemiológicas (Murray y Kapke, 1999; Lindenfors et al. 2007; Boitani et al. 2012; Farnleitner, 2010).

Actualmente, la Medicina de la Conservación estudia a las EIDs y REIDs con un enfoque distinto, el cual integra distintas disciplinas del área de las ciencias de la salud y la ecología (Arrivillaga y Caraballo, 2009; Tabor, 2002). En este aspecto, la medicina de la conservación representa un esfuerzo por examinar y comprender los procesos de salud, en relación con los procesos ecológicos, bajo los cuales se rige la vida (Tabor 2002; Arrivillaga y Caraballo 2009). Así mismo, esta nueva disciplina, estudia también las múltiples interacciones entre los patógenos y sus hospedadores, así como las interacciones de estos, con el ecosistema y viceversa (Tabor 2002; Arrivillaga y Caraballo 2009). Es decir, describe como los cambios en la estructura del hábitat y uso de la tierra podrían estar relacionados con la emergencia y remergencia de agentes infecciosos, o cómo la biodiversidad se

asocia con la salud del ecosistema y la salud humana (Arrivillaga y Caraballo 2009).

### Papel de los Carnívoros en la ecología de enfermedades.

El orden de los carnívoros que comprenden 271 especies, las cuales se dividen en dos subórdenes, el Feliformia o Feloidea y Caniformia o Canoidea. Dentro del suborden Feloidea están agrupadas 5 familias las cuales son: *Felidae*, *Viverridae*, *Eupleridae*, *Nandiiidae*, *Herpestidae*, y *Hyenidae*, en las cuales están comprendidos 56 géneros ( Nowak, 2005; Russell, 2010; Fowler, 2012). A su vez, dentro del suborden Canoidea se agrupan 9 familias que son: *Canidae*, *Ursidae*, *Otoriidae*, *Odobenidea*, *Phocidae*, *Mustelidae*, *Mephitidae*, *Procyonidae*, y *Ailuridae*, las cuales comprenden 73 géneros distribuidos en prácticamente todo el globo terráqueo, exceptuando Australia, Nueva Guinea, Nueva Zelanda, la Antártica y varias Islas Oceánicas ( Nowak, 2005; Fowler, 2012 ).

En México los carnívoros son el tercer grupo de mamíferos más diversos con 33 especies distribuidas en 6 familias (Huerta 1992;Lamberski 2012). Todas las especies de carnívoros en México se encuentran en algún grado de riesgo (peligro de extinción, amenazada o protección especial), esto debido a la pérdida de hábitat, fragmentación, cacería, entre otras actividades antropogénicas (Pacheco et al. 2000a). Estos son algunos factores que predisponen al aumento en la incidencia de enfermedades, modificando la dinámica y la ecología de enfermedades y el estado de salud de las poblaciones silvestres (Arrivillaga y Caraballo 2009).

Los carnívoros, son los principales depredadores especializados, con adaptaciones diversas desde su estructura anatómica, fisiológica y conductual, lo que les ha permitido sobrevivir y colonizar gran parte del planeta ( Russell, 2010; Estes et al. 2012). Los carnívoros tienen un papel clave en el equilibrio y control de las poblaciones a través de la depredación (Keesing et al. 2006). De esta forma pueden participar en el control de enfermedades evitando que algunos reservorios,

como los roedores aumenten sus poblaciones, en periodos cortos de tiempo (Haydon et al. 2002). Sin embargo, también se ha reportado que los carnívoros pueden tener un papel importante en la transmisión de enfermedades pudiendo actuar como reservorios y/o vectores dispersores de enfermedades infecciosas (Ripple y Beschta, 2004; Baker et al. 2008), como pueden ser tularemia, borreliosis, anaplasmosis, rabia, peste, moquillo, tuberculosis, SARS, enfermedades parasitarias y enfermedades por enterobacterias (Ripple et al., 2014).

En estudios previos se han identificado 52 enfermedades infecciosas en carnívoros de vida silvestre, de las cuales 4% estuvieron asociadas a hongos, 21% a protozoarios, 31% a bacterias y 44% a virus (Murray y Kapke, 1999). Cabe destacar que un número importante de EIDs y REIDs son producidas por bacterias (54.3%), entre las que se incluyen las enterobacterias como *Salmonella* spp y *Escherichia coli* patógenas, ambas presentes en carnívoros (Murray y Kapke 1999; Jones et al. 2008; Christou, 2011).

### ***Salmonelosis***

La salmonelosis es probablemente la zoonosis con una mayor distribución en el mundo (Lee et al., 2011). Los microorganismos del género *Salmonella* son bacilos cortos, Gram negativos aerobios-anaerobios facultativos, con flagelos peritricos y motilidad (exceptuando los serotipos *Gallinarum* y *Pullorum*) (Groisman, 2001). Dentro del género *Salmonella* existen solo dos especies: *Salmonella bongori* y *S. entérica*. Para esta última se reportan 6 subespecies: *entérica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Se han reportado más de 2500 serotipos en el género *Salmonella*, la mayor parte de ellos son considerados patógenos para el humano y los animales, muchos han sido aislados en diversos animales de fauna silvestre, los cuales actúan como reservorios de *Salmonella* spp (Groisman, 2001).

La vía de infección es generalmente fecal-oral y tiene distintas formas clínicas de presentación, como la enterocolitis y la septicemia (Aguirre et al., 2002). En las infecciones crónicas se puede llegar a un estado de portador asintomático con una excreción intermitente de la bacteria en heces (Gyles et al. 2008). Algunos

serotipos de *Salmonella* pueden sobrevivir en el medio ambiente, dicha persistencia es una característica importante en su epidemiología, ya que permite que el organismo contamine cuencas o cuerpos de agua. (Cox et al., 2005; Compton et al., 2008).

Diversos factores de virulencia han sido descritos para organismos del género *Salmonella* entre los que se incluyen: Islas de patogenicidad (SPIs), plásmidos de virulencia, factores de supervivencia intracelular, lipopolisacáridos, fimbrias y flagelos.

Las islas de patogenicidad (SPIs) son regiones en el cromosoma de las bacterias patógenas, que codifican para factores de virulencia. Estas regiones tienen un porcentaje de GC distinto al resto del genoma, además de que se encuentran ausentes en organismos no patógenos. Dentro de las SPIs se han encontrado genes que codifican para integrasas, transposasas o secuencias de inserción, lo que sugiere que se comportan como elementos móviles (Giunnella et al., 1973; Marcus et al, 2000). Algunas islas han sido localizadas en regiones que codifican para ARNt, lo que reafirma la hipótesis de que se trata de elementos genéticos móviles, ya que estas regiones son sitios comúnmente por fagos atemperado (Howard y Groisman 1996; Fàbrega y Vila 2013). Los procesos de arreglo, delección y transferencia de SPIs tienen un fuerte impacto en la microevolución y adaptación de los microorganismos patógenos (Ochoa y Rodríguez 2005; Fàbrega y Vila 2013).

Se han descrito más de 20 SPIs en microorganismos patógenos del género *Salmonella* spp, sin embargo se considera a 5 como las importantes en la patogenicidad de este microorganismo (Ochoa y Rodríguez, 2005; Fàbrega y Vila 2013). La SPI-1, es una de estas cinco y se encuentra presente en todos los microorganismos del género *Salmonella* sp. Codifica para un Sistema de Secreción Tipo III (SSTIII), el cual es requerido para la internalización de la bacteria en células epiteliales. Dentro de esta SPI se encuentran genes que codifican para reguladores transcripcionales y proteínas efectoras y estructurales de el sistema de secreción tipo III (Marcus et al. 2000; Ochoa y Rodríguez 2005;

Fàbrega y Vila 2013). Las proteínas efectoras son translocadas por este sistema hacia el citoplasma de las células huésped, sitio donde inducen los cambios en el citoesqueleto que permiten la entrada de *Salmonella* (Fàbrega y Vila 2013). La SPI-2, presente en microorganismos patógenos de *Salmonella* spp, es requerida para la sobrevivencia dentro del macrófago. Esta SPI contiene también genes para el sistema de secreción tipo III y genes de proteínas efectoras asociadas a la sobrevivencia intracelular (Ochoa y Rodríguez 2005). La SPI-3 igualmente es requerida para la supervivencia intracelular en macrófagos (Ochoa y Rodríguez 2005; Hölzer y Hensel 2012; Fàbrega y Vila 2013). La SPI-4 codifica un para un sistema de secreción tipo I (SSTI) que permite la secreción de toxinas. Se cree que esta SPI participa también en la adaptación de *Salmonella* al ambiente intracelular dentro de los macrófagos (Marcus et al. 2000; Gerlach et al. 2007). La SPI-5 codifica proteínas efectoras involucradas en la reacción inflamatoria en la mucosa intestinal, como SopB, que además de estimular la secreción de cloro, está involucrada en la migración de macrófagos (Marcus et al. 2000; Velge et al. 2012).

Con el fin de lograr una infección exitosa, los microorganismos del género *Salmonella* spp patógena como; *Dublin*, *Pollorum*, *Gallinarum*, *Cholerasuis*, *Abortusovis*, y algunas cepas de *Thyphimurium* y *Enteritidis*, deben colonizar tracto intestinal. Para lograr esto, se ha observado en varios serotipos un gran número de operones fimbriales, ubicados en el cromosoma y plásmidos de virulencia (Marcus et al. 2000). Estos plásmidos le confieren resistencia y adaptabilidad para sobrevivir en células hospederas (Marcus et al. 2000; Gyles et al. 2008).

*Salmonella* es capaz de utilizar diferentes tipos de fimbrias para adherirse a diferentes tipos de células, entre los operones fimbriales que se han logrado reconocer se encuentran *lpf*, *agf*, *fim*, *pef*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, *stf*, and *sth* (Ba y Heffron 1998; Townsend et al. 2001; Weening et al. 2005). Uno de los plásmidos que está involucrado en el ataque al epitelio intestinal contiene el operón *pef*

(Plásmido codificado para fimbria) codifica para una fimbria de membrana, que permite la adhesión al epitelio intestinal (Marcus et al. 2000; Ledebøer et al. 2006).

A través de la serotipificación se ha podido establecer que algunos serotipos de *Salmonella spp*, solo producen un tipo de flagelina (antígeno H), conociéndose como monofásicos. no obstante la mayoría de los serotipos producen dos tipos de antígeno H, denominándose bifásicas (Olsen et al., 2013). Se conoce que la flagelina de *Salmonella* estimula la producción de quimiocinas y citoquinas proinflamatorias, como son: IL-18, IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  y IL-6, en las células epiteliales intestinales (Eom et al. 2013; Olsen et al. 2013).

### **Patogénesis de *Salmonella***

Dado que la transmisión de *Salmonella* es por vía oro-fecal, el microorganismo debe sobrevivir al pH ácido en el estómago, para llegar al intestino sitio donde se lleva a cabo la infección. Para ello *Salmonella spp* cuenta con 2 mecanismos de resistencia a la acidez (Ochoa y Rodríguez 2005; Gyles et al. 2008), no obstante la cantidad de microorganismos que sobreviven es menor en comparación con el que se ingresa (Ochoa y Rodríguez 2005; Velge et al. 2012). En el Intestino delgado, *Salmonella spp* tiene que resistir la acción de las sales biliares, lisozimas, enzimas proteolíticas, así como el movimiento peristáltico que remueve constantemente todo el contenido intestinal (Fedorka-cray et al. 1995; Hölzer y Hensel 2012; Velge et al. 2012). Por otra parte, en el intestino grueso *Salmonella* debe de competir con una abundante y compleja flora intestinal, que representa un obstáculo importante en la colonización de *Salmonella* (Marcus et al., 2000).

La invasión del epitelio intestinal en la salmonelosis comienza con la adhesión, para lo cual, *Salmonella spp* cuenta con factores de virulencia que le permiten adherirse e invadir células, los cuales ya fueron descritos. El principal sitio de infección son las placas de Peyer que contienen células epiteliales especializadas membranosas (células M) en el epitelio del folículo-asociado (FAE) superpuestas a la agregación de células linfoides, sin embargo las células M solo ocupan el 0.01% (aproximadamente) del intestino, por lo que la invasión de enterocitos es de suma importancia (Marcus et al. 2000; Velge et al. 2012). Otra vía de ingreso es a través

de señalizaciones que inducen un arreglo en el citoesqueleto de las células. En esta vía de ingreso actúan las proteínas *SipA*, *SopE*, *SopE2* y *SopB* codificadas en la SPI-1 (Gerlach et al., 2007). La translocación de estas proteínas, se ha visto que estimula la actividad de la fosfolipasa C, que cataliza la escisión del fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP2) de membrana, generando inositol 1,4-5 trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 estimula la liberación de calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) almacenado en el retículo endoplásmico (RE), la cual junto con el fosfoinositol afecta a las proteínas de unión a actina, las cuales son recluidas en el sitio de entrada de la bacteria. El DAG junto con el  $\text{Ca}^{+2}$  activan la proteína quinasa C (PKC), el  $\text{Ca}^{+2}$  junto con PKC sirve para activar enzimas y finalmente los factores de transcripción (Marcus et al. 2000; Hölzer y Hensel 2012; Velge et al. 2012). *SopE* y *SopE2* son responsables de la activación de la familia-Rho GTPeasas *Cdc42* y *Rac1*, que su función es activar un factor de cambio de guanina induciendo la fosforilación de GDP a GTP para el cambio de nucleótido, lo cual genera la señalización para el re-arreglo del citoesqueleto y la formación del ruffling, permitiendo la invasión. *SptP* tiene la función de llevar la ubiquitación de *Cdc42* y *Rac1* para llevar el proceso a la inversa y restaurar la pared celular (Groisman, 2001; Velge et al. 2012). Una vez que *Salmonella* alcanza la lámina propia del intestino, es reconocida por receptores localizados en la superficie de los macrófagos y en la cara interna de las células intestinales, lo que estimula la producción de citocinas que provocan la afluencia masiva de PMN y macrófagos (Fàbrega y Vila 2013). Una vez que es fagocitada e internalizada en SCV's por los macrófagos a través de la señal de gatillo, estos migran lo que facilita la diseminación por sangre presentándose la septicemia. *Salmonella* puede inducir apoptosis de macrófagos a través de *SipB*, la cual se une y activa con la proteasa proapoptótica, caspasa I (ICE) que activa a las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y IL-18 (Velge et al., 2012). Otro mecanismo mediante el cual *Salmonella* produce enteritis es la producción de enterotoxinas, que junto con la enteritis, producen diarreas secretoras (Fàbrega y Vila, 2013).

## ***Salmonella* y los Carnívoros**

En carnívoros silvestres se han reportado alrededor de 50 serotipos de *Salmonella*, los cuales varían notablemente en su virulencia. Entre los carnívoros reportados como portadores de *Salmonella* spp, se encuentran el zorro rojo (*Vulpes vulpes*), mapache (*Procyon lotor*), tejón (*Meles meles*), y Nutria (*Lutra lutra*) (J. Millán et al. 2004; Jardine et al. 2011) . En un estudio realizado por Euden (1990) en 4881 tejones se reportó la presencia de 26 serotipos diferentes de *Salmonella*, en un 7% de las muestras (Williams y Barker 2001). En nutrias de río (*Lutra lutra*) en Portugal, se reportó una incidencia del 7.58%, identificándose a *S. enterica* subesp. *Arizonae* y *S. entérica* subesp *enterica* servar Gallinarum. Estas cepas mostraron resistencia a múltiples fármacos con actividad antimicrobiana como oxitetraciclinas, ampicilina, cefalexina, gentamicina y estreptomycin (Oliveira et al., 2010).

Estudios llevados a cabo en poblaciones de zorra roja (*Vulpes vulpes*) y tejón europeo (*Meles meles*) en vida libre, proponen a estas especies, como posibles reservorios de *Salmonella* sp. En zorra roja (*Vulpes vulpes*) la incidencia de Salmonelosis fue de 6.5%, las cepas aisladas mostraron resistencia a antimicrobianos (Wilson et al. 2003; Handeland et al. 2008). Así mismo en mapaches (*Procyon lotor*), se ha reportado seroprevalencias del 5.7%, 8.7% y 27% en poblaciones distintas (Compton et al. 2008; Jardine et al. 2011; Lee et al. 2011). Para otras poblaciones de carnívoros la prevalencia de *Salmonella* es desconocida (Williams y Barker 2001; Compton et al. 2008).

Las características ecológicas de los carnívoros juegan un papel importante en la ecología de la Salmonelosis (Ripple et al., 2014). Dado que la vía de infección es oro-fecal, la transmisión no requiere del contacto directo entre las especies y puede presentarse por alimento y agua contaminada (Gyles et al. 2008). Es este aspecto la ecología de los carnívoros favorece la formación de ciclos enzoóticos en una comunidad, por su distribución, hábitos sociales, alimenticios y por la perturbación de su hábitat que incrementa su contacto con fauna doméstica y poblaciones humanas, permitiendo la propagación de *Salmonella* spp (Daszak y



Cunningham 2002; Jones et al. 2008; Ripple et al. 2014). Esta interacción entre las poblaciones silvestres, animales domésticos y poblaciones humanas le confiere la capacidad de adquirir resistencia antimicrobiana (atraves de la selección de cepas resistentes por el uso de antibióticos en animales domésticos y en humanos), aumentar su virulencia o infectar nuevos hospedadores; y la aparición de serovariedades en especies que no se había reportado (Monsalve et al. 2009).

### ***Escherichia coli.***

*Escherichia coli* forma parte de la microflora intestinal de diversas especies y generalmente se comporta como organismo apatógeno. En heces de ganado vacuno se han reportado en cantidad de  $10^7$  y  $10^9$  microorganismos por gramo de heces (Lieberman et al., 2010). No obstante existen para esta especie, cepas altamente virulentas las cuales son causa importante de enfermedades gastroentéricas en todo el mundo (Mora et al., 2012). En *E. coli* su virulencia es resultado de la adquisición de elementos genéticos, que codifican para factores de virulencia, como adhesinas, enterotoxinas y sistemas de secreción (Clements, Young, Constantinou, y Gad Frankel, 2012; Katouli, 2010). Se distinguen seis patotipos de acuerdo a los mecanismos de patogenicidad los cuales son: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enteroagregativa (ECEA) y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) (Groisman, 2001). Estos patotipos producen distintas enfermedades, las cuales pueden ser letales en humanos y animales. Algunos de estos patotipos son considerados zoonóticos, recientemente se ha reportado que el ganado bovino es un importante reservorio (Harshman y Riley 1980; Samadder, 2009).

### ***Escherichia coli* en Carnívoros**

Diversos reportes en todo el mundo señalan la presencia de *E. coli* patógenas o genes perteneciente a alguna cepa patógena de *E. coli* en heces de carnívoros de vida silvestre y en cautiverio, como coyotes (*Canis latrans*), mapaches (*Procyon lotor*), pumas (*Puma concolor*), jaguares (*Panthera onca*), zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*), coatí (*Nasua narica*), oso negro (*Ursus americanus*) y

cacomiztle (*Bassariscus astutus*), en muchos de estos estudios no se han reportado prevalencias y en otros encontraron prevalencias del 4.6% a un 28%, además la presencia de *E. coli* patógenas son reportadas en otras especies de vida silvestres como bisontes (*Bison bison*), Venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y muchos roedores (Ripple y Beschta 2004; Murray y Kapke 1999; Souza y Rocha 1999; Kudva y Stasko 2013). Se ha observado que muchas de las cepas de *E. coli* aisladas de vida silvestre presentan cierta resistencia a una gran gama de antibióticos (Souza y Rocha 1999) (Schwab et al. 2011). En muchos de estos estudios se observan cepas típicas y atípicas de ECEP, shigatoxinas para ECEH y toxinas termolábiles de ECET (Schwab et al. 2011; Chandran y Mazumder 2013).

Recientemente se ha sugerido la existencia de un ciclo enzoótico en *E. coli* que incluye carnívoros de vida silvestres, animales domésticos y el hombre (Farnleitner, 2010). Sin embargo aún no se establece con exactitud el papel que podrían tener las poblaciones silvestres de carnívoros en esta dinámica y características genéticas de las cepas posiblemente involucradas, pero se ha logrado observar que existe relación entre las cepas aisladas de humanos, cepas aisladas de ganado vacuno y de poblaciones silvestres de carnívoros (Souza y Rocha 1999).

La contaminación por cepas patógenas de *E. coli* puede estar vinculado: a un afecto presa-depredador; contaminación de agua y de alimento para ya sea por ganado fauna silvestre o por asentamientos humanos, ya que la vía de contagio es oro-fecal y no necesariamente por contacto directo (Gyles et al. 2008).

*E. coli* y *Salmonella* spp pueden infectar una gran gama de huéspedes (Gyles et al. 2008). Esta capacidad es resultado de cambios evolutivos en estos microorganismos (Boto 2010). Se ha observado que estos cambios evolutivos, se deben a la transferencia horizontal de genes (Jackson, Johnson, Clarke, y Arnold, 2011), en la cual se transfieren factores de virulencia que permiten la infección de nuevos hospedadores (Boto 2010). Un ejemplo de este fenómeno es *E. coli* O157 la cual ha mostrado diferencias en la distribución alélica y en la frecuencia de los

genes que codifican para las toxinas Stx (Jackson et al. 2011). Estos cambios evolutivos son una de las causas por lo cual surgen nuevos serotipos patógenos causando una enfermedad emergente (Woolhouse et al., 2005). Estos cambios son parte de una dinámica compleja en la cual los microorganismos buscan adaptarse, y sobrevivir (Aminov, 2011; Falkow, 1998). En la que intervienen las dinámicas de las poblaciones humanas, animales domésticos y fauna silvestre (Falkow, 1998).

Considerando los aspectos ecológico-evolutivos, que permiten la generación de nuevas variantes de microorganismos patógenos, en este trabajo se evaluó la presencia de *Salmonella* spp y *E. coli* en poblaciones silvestres de carnívoros de la Reserva de la Biosfera de Janos. El estudio de las cepas incluyó el análisis de la presencia de genes de virulencia, así como su capacidad para infectar células humanas, con el fin de establecer la capacidad patogénica en estas cepas. El objetivo de estos estudios es establecer la presencia de ciclos evolutivos de bacterias patógenas en los ambientes naturales, los cuales pueden ser afectados por actividades antropogénicas.

## **Hipótesis**

Considerando que los bovinos son portadores asintomáticos de enterobacterias, principalmente *E. coli* y *Salmonella* spp y dado que en la Reserva de la Biosfera de Janos, Chihuahua existe la interacción entre esta especie y los carnívoros silvestres, entonces es muy probable que estos últimos se encuentren infectados por estos microorganismos patógenos.

## **Objetivo General**

Analizar la presencia de *Salmonella* spp y *Escherichia coli* en la comunidad de carnívoros de la Reserva de la Biosfera de Janos, Chihuahua, con el fin de describir aspectos básicos de la ecología de estos agentes en poblaciones de vida libre de esta área.

## Objetivos Particulares

Analizar la composición y estructura de la comunidad de carnívoros en la Reserva de la Biosfera de Janos, Chihuahua.

## Material y Métodos

**Área de estudio.** Este estudio se realizó en la Reserva de la Biósfera de Janos, Chihuahua (en los años 2014 y 2014) ubicada en el Municipio de Janos en el noroeste de Chihuahua, México, limitado al norte por los Estados Unidos de Norteamérica y al este con Sonora, localizada entre los meridianos 108° 56' 49'' y 108° 56' 22'' O y los paralelos 31° 11' 7'' y 30° 11' 27'' N (Figura 1). La Reserva cuenta con una superficie de 5264 km<sup>2</sup> que incluyen en el norte parte de la Sierra Madre Occidental y en el oeste parte del Desierto Chihuahuense, lo que resulta en un rango de altitud de los 1200 a los 2700 msnm. Presenta dos tipos de clima, uno árido templado, con una temperatura media anual de 15.7°C y una precipitación anual de 381 mm (77% de las lluvias entre abril y agosto) y en la región serrana, un clima templado húmedo, con una temperatura media anual de 11.8°C y una precipitación anual de 552 mm (Pacheco et al. 2000b). Los tipos de vegetación predominantes dentro de la Reserva de la Biosfera de Janos, Chihuahua son pastizales, matorrales y bosques (Pacheco et al., 2000b).

**Diseño de muestreo.** Los permisos de colecta fueron otorgados por la Dirección General de Vida Silvestre (DGVS) de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) con número de licencia FAUT-0250. Se realizaron dos muestreos, el primero en otoño 2013 (octubre-noviembre) y el segundo en primavera 2014 (mayo-junio). En cada muestreo se establecieron cinco transectos en tres tipos de hábitats distintos: pastizal, matorral y bosque de encino pino (Cuadro 1; Figura 2). En cada transecto se colocaron 16 sets de trampas espaciados a intervalos de 500-800 metros, resultando en transectos de 10 km de longitud. Cada set de trampas se consistió en una trampa Tomahawk (30"x30"x70" y 60"x20"x28") y cepos con goma (se colocaron de dos medidas, para coyotes y zorras), distanciados a 50 metros entre sí. En cada transecto los sets de

trampas se dejaron activos por 10 días, lo que resulto en un esfuerzo de captura de 160 noches/trampa en cada hábitat y en cada muestreo. Las trampas fueron cebadas con sardinas, pollo, hígado, algunas esencias como vainilla, valeriana, orina de coyote y glándula de lince. Se mantuvieron abiertas durante las 24hrs, y se revisaron dos veces, la primera en la madrugada a las 4:00hrs y la segunda por la tarde a las 14:00hrs (Boitani et al. 2012).

**Captura y contención.** Cada individuo capturado fue sujetado con una cuerda para perros y una vara en forma de “Y” para lograr un mejor manejo. Dependiendo de la especie, la inmovilización química fue con una mezcla de Xilacina y Ketamina (West et al. 2008), según las dosis reportada por especie (0.2 - 4mg/kg de Xilacina y 10-20mg/kg de Ketamina). Los ejemplares capturados fueron identificados por especie y enumerados para su identificación, se les colocó un arete metálico. Durante todo el tiempo que los individuos estuvieron anestesiados, se vigilaron sus constantes fisiológicas.

**Colección de muestras.** A todos los individuos capturados se les tomó una muestra de heces por medio de hisopos, los cuales se colocaron en el medio de transporte Agar Desoxicolato Lactosa modificado, Las muestras fueron identificadas y posteriormente se almacenaron en refrigeración a 4°C, hasta su procesamiento en el laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la Universidad Autónoma de México, unidad Xochimilco (UAM-X). Concluida la toma de muestra y recuperados totalmente, los individuos, éstos fueron liberados en el mismo sitio de su captura.

**Composición y estructura de la comunidad de carnívoros.** Los datos obtenidos de la captura directa de los individuos fueron utilizados para estimar la diversidad a través del índice de Shannon (Krebs 1999), Se realizó una matriz DAFOR y se ponderaron los valores observados de acuerdo a lo reportado por Sage et al, (2010). De esta manera se consideró *especie dominante*, aquellas cuya abundancia relativa estuviera por encima del 50%; *especie abundante*, aquellas con valores del 25 al 50%, *especie frecuente*, con valores del 10 al 25%;

*especie ocasional*, con 1 al 10 y *especie rara*, aquellas con valores menores del 1%.

**Análisis de la presencia de *Salmonella* por métodos bacteriológicos tradicionales.** Las muestras colocadas en los medios de transporte Agar Desoxicolato Lactosa modificado, fueron sembradas en tubos de vidrio con 10 ml de Agua peptonada, los cuales fueron incubados 37°C con agitación por 20 hrs (MRC Modelo DFI). Transcurrido este tiempo, 1 ml del cultivo fue sembrado en 10 ml de Caldo selenito, e incubado a 37°C con agitación por 20 hrs. Posteriormente, el cultivo en caldo selenito fue sembrado en agar Salmonella-Shigella y agar MacConkey, e incubado por 24 hrs a 37°C. Las colonias sugerentes a *Salmonella* spp, obtenidas del medio Mc Conkey se sembraron en cajas con agar Salmonella-Shigella, por un periodo adicional de 24 hrs a 37°C. De esta manera, todas las colonias sugerentes a *Salmonella* spp, observadas en el agar Salmonella-Shigella, fueron identificadas por medio de pruebas bioquímicas (TSI, Urea, Citrato, SIM, MR-VP). Las colonias identificadas como *Salmonella* spp por este medio fueron cultivadas en 10 ml de caldo Infusión Cerebro-Corazón, para su posterior extracción de ADN y confirmación de especie por medio de la PCR (ver más adelante).

**Análisis de la presencia de *E. coli*.** Las muestras de heces colocadas en Agar Desoxicolato Lactosa modificado, fueron sembradas en 10 ml de caldo Universal e incubadas por 20 hrs a 37°C. Concurrido este tiempo el cultivo bacteriano fue diluido 1/100 con caldo Universal. De cada dilución se sembraron 50 µl en medio Levin Eosina-Metionina Azul Agar, y se incubaron a 37°C por 20 hrs. Las colonias de *E. coli* (coloración verde metálico), se seleccionaron en grupos 36 colonias por caja. Estos grupos en 10 ml en caldo Nutritivo y se incubaron a 37°C por 20 hrs. Transcurrido este tiempo, la biomasa de los cultivos fue recuperada por centrifugación a 6000 xg 10 min a temperatura ambiente. De cada biomasa recuperada, se extrajo ADN y se le realizó una PCR (ver detalles adelante). Los grupos de 36 con resultados positivos, fueron divididos hasta lograr el aislamiento de la cepa de *E. coli* portadora de genes de virulencia.

**Extracción de ADN de caldo Selenito, caldo Luria Bertani y caldo nutritivo para determinación de la presencia de *Salmonella* y *E. coli*, por medio de la PCR.** Los cultivos bacterianos de *Salmonella* spp. crecidos en Selenito, y de *E. coli*, crecidos caldo Nutritivo, fueron centrifugados (CLAY ADAMS Brand DYNAC) a 5500 x g por 15 minutos. La pastilla colectada fue transferida a microtubos de 1.5 ml. Para la extracción de ADN se adicionó a cada muestra 600 µl de buffer de extracción (10 mM Tris-HCl pH 8, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0 y 1% de dodecil sulfato de sodio) y 8 µl de proteinasa K (20mg/ml), incubándose todo en un baño seco (WISP-SA Dry Bath Incubator) por 1 hr a 56 °C. Transcurrido este tiempo, los tubos fueron centrifugados (Hermle LaborTechnik GmbH - Z 160 M Microlitre Centrifuge) a 5500 x g durante 5 min, y el sobrenadante fue transferido a un microtubo nuevo. A éste sobrenadante se le agregó 500 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), homogenizándose perfectamente con ayuda de un vortex (IKA MS3 Basic) por 30 segundos. Esta mezcla se centrifugó a 10500 x g por 2 min y el sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo. Al sobrenadante recuperado se le agregó 50 µl de acetato de sodio 3M pH 6, homogenizándolo por inversión. Después se le agregó 10 µl de acrilamida (2% acrilamida, 100 mM TBE pH 8.0), y se homogenizó perfectamente. A esta mezcla, se le adicionó 1 ml de etanol al 100% frío y se incubó en hielo por 5 min para después centrifugar a 17000 xg a 4 °C durante 15 minutos (Thermo Scientific MicroCL 17R). A la pastilla recuperada, se le adicionó 1 ml de etanol al 70% frío, cuidando de no suspenderla. Esta mezcla se centrifugó a 17000 x g a 4 °C durante 15 min. El sobrenadante fue decantado y la pastilla recuperada fue secada durante 30 minutos a 37 °C. Por último la pastilla se suspendió en 50 µl de solución TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8) y almacenadas a -12°C hasta su uso. Todas las extracciones de ADN, fueron evaluadas por medio de electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

**Controles positivos de *Salmonella*, ECEH y ECEP.** Todas las pruebas de PCR contaron con controles positivos, consistentes de ADN recuperado de cepas tipo de *Salmonella* Thyphimurium, ECEH y ECEP pertenecientes al laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la UAM-X. Estas cepas fueron cultivadas en 50 ml

de caldo Luria Bertani (LB), para realizar la extracción de ADN por medio del protocolo antes mencionado.

**PCR para la determinación de la presencia de genes de virulencia.** Se utilizaron once juegos de iniciadores, de los cuales seis (InvA, SopE, CdtB, Eae, LT y ST) fueron diseñados para este trabajo. Los restantes cinco (escV, bfpB, stx-1, stx-2 y 16s-ITS) fueron tomados de Muller, et al. (2006) y Chiu, et al. (2004). Los iniciadores 16s-ITS, invA, cdtB y sopE fueron utilizados para el análisis de *Salmonella* spp. Los iniciadores eae, escV, bfpB, stx1, stx2, ST y LT para el análisis de *E. coli*. Los iniciadores y los tamaños esperados de los fragmentos amplificados se presentan en el siguiente cuadro (Cuadro 2).

Las condiciones de los ciclos de la PCR para cada par de iniciadores fueron:

**16 IT'S:** Desnaturalización inicial de 94°C por 5 min. Seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 57°C por 1 min y 72°C por 1:30 min; por último una extensión final de 72°C por 5 min.

**invA:** Desnaturalización inicial de 94°C por 5 min. Seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min y 72°C por 30 seg; por último una extensión final de 72°C por 5 min.

**sopE:** Desnaturalización inicial de 94°C por 5 min. Seguido de 33 ciclos de 94°C por 1 min 15 seg, 43.5°C por 1 min 30 seg y 72°C por 1 min; por último la extensión final 72° por 7 min.

**cdtB:** Desnaturalización inicial de 94°C por 5 min. Seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 44°C por 1 min y 72°C por 1 min 45 seg; por último la extensión final 72° por 5 min.

**eae:** Desnaturalización inicial de 94°C por 5 min. Seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min y 72°C por 1 min; por último la extensión final 72° por 5 min.

**Multiplex:** Desnaturalización inicial de 94°C por 5 min. Seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min y 72°C por 1 min; por último la extensión final 72° por 5 min.

**LT y ST:** Desnaturalización inicial de 95°C por 5 min. Seguido de 95°C por 1 min, 52°C por 45 seg y de 72°C por 45 seg; por último la extensión final 72° por 5 min.



**Cultivo celular.** Todas las cepas de *Salmonella enterica* y las eae positivas de *E. coli* se evaluaron en cultivo celular con la línea celular Hep-2. Las células fueron crecidas en medio mínimo esencial (MEM) con 10% suero fetal bovino y 1 mM HEPES. Para los ensayos las células fueron contadas en una cámara de Neubauer, empleando azul de tripan.

**Ensayos de sobrevivencia a la gentamicina en *Salmonella*.** En una placa de cultivo celular de 48 pozos se colocaron  $5 \times 10^4$  células/pozo. Estas células fueron infectadas a una MOI 1:100 por una hora. A partir de este tiempo, comenzó el ensayo de protección a la gentamicina (100µg/ml). La sobrevivencia se evaluó en 5 tiempos y cada cepa fue evaluada por duplicado. En cada tiempo un pozo fue fijado con metanol al 70% y teñido para evaluar el estado de la monocapa. Como control positivo se usa la cepa ATCC de *Salmonella Typhimurium*14028.

**Ensayo de Infección/Adhesión en *E. coli*.** En una placa de cultivo de 48 pozos, se colocaron  $2 \times 10^4$  células/pozo. Estas células fueron infectadas con  $1.5 \times 10^5$  UFC de *E. coli*. Cada 50 minutos, durante 5:50 hrs, un pozo fue fijado con metanol al 70%, teñido con Giemsa y evaluado bajo el microscopio con los objetivos 10X, 40X y 100X.

## RESULTADOS

Composición y estructura de la comunidad de carnívoros en la Reserva de la Biósfera de Janos, Chihuahua

En el primer muestreo se capturaron un total de 35 individuos, los cuales correspondieron a: 4 félidos (linces (*Lynx rufus*)), 18 canidos (6 zorras del desierto (*Vulpes macrotis*), 10 coyotes (*Canis latrans*) y 2 zorras grises (*Urocyon cinereoargenteus*)), 1 mustélido (1 tejón (*Taxidea taxus*)), 11 mephitidos (8

zorrillos encapuchado (*Mephitis macroura*) y 3 zorrillos listados (*Mephitis mephitis*) y 2 prociónidos (2 mapaches (*Procyon lotor*)) (Cuadro 3).

En el segundo muestreo se capturan 31 individuos. Entre ellos: 22 Canidos (zorras del desierto 9, coyotes 8 y zorra gris 5), mustelidos 5 (tejonos 5), félidos 1 (lince 1) y prociónidos 3 (Mapaches 3) (Cuadro 3; Figura 3).

En el primer muestreo no hubo especies dominantes. Se observaron especies abundantes las cuales fueron los coyotes y zorrillos listados con 10 y 8 individuos respectivamente, las especies ocasionales fueron la zorra gris con 2 individuos y el mapache y tejón con un individuo ambas especies (Figura 4). Los sitios con mayor diversidad fueron Rancho San Pedro y Rancho ojitos. Todos los índices de diversidad estimados, muestran valores entre 1 y 1.6 (Cuadro 4; Figura 5).

En el segundo muestreo no se hallaron especies dominantes. Se observaron especies frecuentes las cuales fueron las zorras del desierto y los coyotes, con 9 y 8 individuos respectivamente. Las especies ocasionales fueron los mapaches y los lince con 3 y 1 individuos para cada una (Figura 4). Los sitios con mayor diversidad fueron Ejido San Pedro y Rancho Ojitos. Los índices estimados de diversidad, muestran valores entre 0.793 y 1.09. (Cuadro 4; Figura 5)

### *Salmonella*

De las 35 muestras inoculadas en caldo selenito, obtenidas en el primer muestreo, sólo hubo crecimiento en 24. De estos cultivos se logró el aislamiento de dos cepas (8.33%) de *Salmonella* spp, las cuales fueron confirmadas por la PCR 16s-ITs, específica para microorganismos de este género. Las cepas aisladas provinieron de un lince (1.6%) y un zorrillo encapuchado (1.6%), ambos capturados en Rancho ojitos (RO). A estas cepas se les realizó una PCR para InvA, mostrando ambas una amplificación del producto esperado.

Los 22 caldos selenitos negativos restantes, se les extrajo ADN y se les realizó la PCR para 16s-ITs, encontrándose 5 muestras positivas (20.83%). Los cultivos positivos pertenecieron a tres (12.5%) coyotes, un (1.6%) zorrillos listado y una

(1.6%) zorra del desierto (Cuadro 5; Figura 6 y 7). De igual manera que a las cepas aisladas, se realizó una PCR para *InvA*, no obteniéndose un resultado positivo.

La frecuencia de *Salmonella* spp. en el primer muestro fue de  $h_i=0.2916$ . Es decir, que en el 29.16% de la población de carnívoros muestreada estuvo presente *Salmonella* spp. La frecuencia para *Salmonella entérica invA* positivas, fue de  $h_i=0.0833$  o 8.33% (Cuadro 5; Figura 6 y 7).

En el segundo muestreo, los 31 caldos selenitos inoculados mostraron crecimiento. De estos cultivos, se logró el aislamiento de cuatro cepas de *Salmonella* spp (12.90%). Estas cepas fueron recuperadas de dos (6.45%) zorras grises, un coyote (3.22%) y una zorra del desierto (3.22%). Estas cepas recuperadas fueron evaluadas por medio de la PCR para 16s-ITS, encontrándose amplificación para 3 (9.67%), dos provenientes de zorras grises (6.45%) y una de un coyote (3.22%). De igual forma, las cepas fueron evaluadas por medio de la PCR para *InvA*, de las tres cepas evaluadas, solo una (3.22%) muestro un resultado positivo. Esta cepa fue recuperada de una zorra gris (3.22%), capturada en Rancho San Pedro (Tabla 5; Figura 6, 7 y 8).

Los 28 cultivos en caldo Selenito restantes fueron evaluados también por medio de la PCR para 16s-ITS. Con esta prueba 14 cultivos mostraron resultados positivos (45.16%). Los caldos con resultado positivo correspondieron a las muestras provenientes de: siete (22.58%) zorras del desierto, cuatro (12.90%) tejones, tres (9.67%) zorras del desierto (*Urocyon cinereoargenteus*), dos (6.45%) coyotes y un (3.22%) mapache (Tabla 5; Figura 6, 7 y 8). Todas las muestras positivas al segmento 16s-ITS fueron analizadas por medio de la PCR para *InvA*, no encontrándose resultado positivo.

Las 4 cepas de *Salmonella* ssp. recuperadas en este estudio provinieron de sólo dos individuos, un Zorrillo encapuchado y una zorra gris. A estas cepas se les evaluó la presencia de *SopE* y *CdtB* a través de una PCR. Las 4 muestras mostraron un resultado positivo a la presencia de *SopE* y *CdtB*.

## *E. coli*

Se analizaron 24 cultivos del primer muestreo en agar eosina azul de metileno (LEMBA) y 16 (70.83%) del segundo, el resto de los cultivos no mostró crecimiento con la coloración verde metálico, indicadora de *E. coli*.

A través de las pruebas moleculares, se obtuvieron para el primer muestreo, 4 (16.66%) muestras positivas: 2 (8.33%) a *Stx-1*, 1 (4.16%) *Stx-2*, y 1 (4.16%) *escV*. Las cepas *stx-1* positivas, provinieron de un zorrillo y un linco; la cepa *stx-2* positiva de un coyote y la *escV* de un zorrillo, este mismo individuo mostro un resultado positivo para gene *eae* (4.16%). De este primer muestreo, se lograron aislar: 2 cepas de *Stx-1* y 2 cepas de *Stx-2*, 12 cepas de *escV*, de las cuales 1 era positiva también para el gen *eae* (Ver cuadro 6).

Para el primer muestreo, la frecuencia observada de *E. coli* fue de  $h_i=0.7916$  o 79.16%. Las frecuencias observadas para algún gen de virulencia en *E. coli* fue de  $h_i=0.1667$ . Es decir, el 16.67% de la comunidad tuvo en el análisis de heces, por lo menos un resultado positivo para algún gen de virulencia (*Stx-1*, *Stx-2*, *escV*, *eae*) (Ver cuadro 6).

En el segundo muestreo se analizaron 31 muestras. Sólo en 16 (51.61%) de ellas se observó la presencia de *E. coli* en agar eosina azul de metileno. En los análisis moleculares se obtuvieron 4 individuos con resultados positivos: uno (3.22%) a *stx-1* y *stx-2*, correspondiente a un coyote; uno (3.22%) a *stx-2* correspondiente a otro coyote; 2 (6.45%) a *escV* correspondientes a dos zorras del desierto. De este segundo muestreo se logró el aislamiento de 21 cepas positivas a *Stx-2*, de las cuales 4 fueron positivas también al gen *Stx-1*, también 18 cepas positivas a *escV*, de las cuales 7 eran positivas al gen *eae* y 6 cepas positivas solamente al gene *eae*.

La frecuencia de *E. coli* en este segundo muestreo fue de  $h_i=0.5806$  o 58.06%. La frecuencia para algún gen de virulencia en la comunidad fue de:  $h_i= 0.1290$ , es decir el 12.9% de la comunidad presentó en las heces por lo menos un resultado positivo para un gen de virulencia (*Stx-1*, *Stx-2*, *escV*, *eae*) (Ver cuadro 6).

## Ensayo de infección y sobrevivencia a la gentamicina en cultivo celular de *Salmonella*

Sólo dos de las cuatro cepas de *Salmonella* sp, con resultados positivos a la presencia de los genes *InvA*, *SopE* y *cdt-B*, fueron evaluadas en cultivo celular. La denominación de estas cepas fue Meph 18 y 1-B Uro. Los resultados obtenidos en los ensayo sobrevivencia con ambas cepas mostraron un comportamiento característico de sobrevivencia intracelular (ver cuadro Cuadro 8; Figura 10). En esta se observa en los primeros tiempos una cantidad menor de *Salmonella enterica* dentro las células y posteriormente un incremento debido a replicación intracelular del organismo.

Con la cepa Meph 18, a las 6 horas postinfección, se pudo observar el valor más alto de la curva, mientras que con la cepa 1-B Uro se obtuvo a las 3 horas post infección. En los resultados de la cinética también se observó, después de alcanzar el valor más alto, la curva tiene un declive en el número de UFC, lo cual se debió a la pérdida de la monocapa. Este comportamiento de la curva fue observado también con la cepa control de *Salmonella* Typhimurium 14028.

## Ensayo de infección en cultivo celular de *E. coli*

Con el fin de evaluar el patrón de adhesión, 8 cepas *E. coli* *escV* positivas y *eae* positivas, se evaluaron en cultivo celular. Cada 50 minutos las células infectadas fueron fijadas y evaluadas al microscopio. Los resultados de estas evaluaciones mostraron que a las 1:40 horas postinfección, 7 cepas tuvieron un patrón de adherencia localizada (AL) y sola 1 se mostró el mismo patrón a los 50 minutos. También se logró observar daño celular con las 8 cepas, después de 1:40 horas postinfección. En algunas de las cepas, a las 2:30 hrs postinfección, fue posible observar adhesión con una forma de pedestal. En la cepa control se observó la AL a la 1:40 horas y el daño celular después de esta hora. La lesión de pedestal se observó, al igual que las cepas evaluadas a las 2:30 hrs postinfección.

## DISCUSIÓN

En un estudio previo realizado en la Reserva de la Biosfera de Janos (RBJ), se reportaron 16 especies de carnívoros silvestres en la zona (Pacheco et al., 2000). En este estudio se logró un registro de 8 especies de carnívoros silvestres, por captura directa de las 16 reportadas para esta reserva. Aunque en este trabajo se obtuvo un registro del 50% de especies reportadas, para poder obtener el registro de todas las especies de carnívoros presentes y realizar un adecuado análisis de la estructura de la comunidad de carnívoros presentes en la zona, es necesario apoyarse en otros métodos indirectos de captura, como son cámaras trampa, lampareo nocturnos, estaciones de huellas, etc. Pero para fines prácticos de este estudio se realiza la captura directa, para la toma de muestras y el estudio de enfermedades.

En un estudio realizado en la RBJ, por List y Macdonald (1998), para la estructura de las comunidades de carnívoros silvestres en diferentes temporadas, en un periodo de 2.5 años y observaron que la especie más abundante fue la zorra del desierto seguida por los coyotes. En este estudio se observó de igual forma las especies más abundantes en son los coyotes y las zorras del desierto, aunque en este estudio la más abundante fueron los coyotes. Estos resultados pueden explicarse por el hecho de los coyotes pueden ejercer una exclusión competitiva hacia las zorras del desierto. Debido a que usan el mismo espacio y porque tienen muchas presas en común que habitan en zonas de pastizal y mezquital, donde se localizan estas especies (Cypher y Scrivner 1992; Ralls y White 1995;).

Se ha observado que la composición de especies, en la estructura de comunidades, puede variar en periodos determinados de tiempo, debido a diversos cambios climáticos y/o de la disponibilidad de recursos (Mandujano, 2011). Para este estudio, en los diferentes periodos de muestreo (otoño y primavera) del año 2013-2014, a través de un método de estimación visual como la matriz DAFORT, se observó un cambio en la composición de especies entre los dos periodos (otoño y primavera). Mientras que en primer periodo (otoño), la especie reportada considerada frecuente (por la matriz DAFOR) fueron coyotes

y zorrillos listados (*Mephitis mephitis*), con 10 y 8 individuos respectivamente. En el segundo periodo (primavera) se observó que la zorra del desierto pasa de ser una especie ocasional a una especie frecuente, con 9 individuos, mientras que los zorrillos se vuelven una especie rara al no tener registro. Los coyotes permanecen como especies frecuente con 8 individuos. Esto posiblemente se debe a que los coyotes y las zorras del desierto, son especies generalistas lo que les permite una estabilidad en sus poblaciones (Herranz et al 2000), logrando mantener una mayor numero de individuos dentro de su grupo.

En estudios previos se ha descrito al ganado vacuno como un reservorio de *Salmonella* spp (Miranda et al. 2007; Anon, 2008; Canales et al. 2009; Kudva y Stasko 2013). Nuestra área de interés que es una zona ganadera, por lo cual es posible la transmisión de *Salmonella* spp de fauna domestica a fauna silvestre.

En diferentes estudios en carnívoros de diferentes especies como civetas, nutrias, diferentes félidos y canidos se ha reportado la presencia de *Salmonella* spp (Jones y Twigg 1976; Millán et al. 2004; Miller et al. 2010; Oliveira et al. 2010; Jardine et al. 2011)

Estudios previos en carnívoros, muestran frecuencias del 5.7% al 25% (Compton et al. 2008; Jardine et al. 2011; Lee et al. 2011), en número de muestras analizadas dentro de un rango de 55 a 790 . En este estudio el rango encontrado fue de 29.16% a 54.83% con 24 y 31 un muestras analizadas. Estos valores son altos si se considera Las frecuencia con respecto al número total de muestras analizadas.

Estudios previos han propuesto a la zorra roja (*Vulpes vulpes*), al tejón europeo (*Meles meles*) y los coyotes como posibles reservorios de *Salmonella* spp (Gese et al., 1997; Handeland et al., 2008; Wilson et al., 2003). En este estudio las especies con mayor frecuencia de *Salmonella* spp, en los dos periodos, fueron las zorras del desierto, los coyotes y los tejones; con 8, 5 y 4 ejemplares respectivamente. Este resultado podría reforzar la hipótesis de estos carnívoros son reservorios de naturales de *Salmonella* spp.

Se ha observado en estudios que *Salmonella* spp puede tener un aumento en su frecuencia, por factores ambientales que favorecen su diseminación en ciertas épocas del año, principalmente entre los meses de abril a junio (Aurora Echeita et al., 2005; Haley et al. 2009). En este estudio se observó un aumento en la frecuencia de *Salmonella* spp, en el periodo de primavera, dentro de la comunidad de carnívoros, el cual se puede deber a esta estacionalidad. Sin embargo este fenómeno podría ser resultado del incremento en número de hospedadores susceptibles que se reportan como posibles reservorios de *Salmonella* spp. (de las cuales se obtuvo una mayor captura) y pueden transmitir al microorganismo.

Se ha reportado en fauna doméstica, que el movimiento y/o introducción de esta, puede influenciar en el aumento de la frecuencia de *Salmonella* spp. en fauna silvestre, al ser un microorganismo que no requiere el contacto directo para llevar a cabo su ciclo, como se ha reportado para producciones de aves (Camacho-Escobar et al. 2006). Por lo cual nuestro aumento en la frecuencia también puede deberse por un efecto de perturbación de hábitat

En previos estudios, se han realizado infecciones con *Salmonella enterica sub. enterica serovar* Typhimurium en zorras rojas (*Vulpes vulpes*) invitro. Y se comparó con la incidencia observada en zorras rojas de vida libre capturadas y con la presencia en cortes de intestino de zorras rojas que hallaron muertas. De esta forma observaron que las zorras rojas pueden actuar como reservorios de la infección de forma natural (Handeland et al., 2008). En este estudio se observa la presencia *Salmonella enterica* en zorra del desierto (3.22%), zorrillo listado (4.16%) y lince rojo (4.16%). Lo cual nos puede sugerir que no sólo canidos como las zorras pueden ser reservorios de *Salmonella enterica* para lo cual faltaría realizar más estudios

En otros estudios se ha realizado aislamiento y pruebas bioquímicas para la identificación, pruebas moleculares PCRs para la tipificación, además de serotipificación. En los cuales se encuentran prevalencias de 3.6 hasta el 27% como se mencionó anteriormente (Compton et al. 2008; Oliveira et al. 2010; Lee et al. 2011; Jardine et al. 2011; Jardine et al. 2012). En este estudio se utilizaron



aislamientos, pruebas bioquímicas y pruebas moleculares al mismo tiempo para su identificación obteniendo frecuencias de 29.16% y 54.83%. Por lo cual es necesario hacer dos o más pruebas al mismo tiempo para hacerlas complementarias y no excluyentes.

En estudios previos para ver su virulencia de las cepas aisladas se realiza la serotipificación a partir del antígeno somático (O), el antígeno flagelar (H) y el antígeno capsulara (Vi) ( Liebana et al. 2002; Compton et al. 2008; Lee et al. 2011; Jardine et al. 2012 ). En el presente estudio se realiza la identificación de género y genes de virulencia por PCR, asociados a la capacidad de sobrevivencia dentro de la célula. Como es la capacidad de invadir, el sistema de secreción tipo III y el reordenamiento del citoesqueleto. Y para evaluar esta capacidad se realiza un ensayo de infección y sobrevivencia intracelular, en un periodo de 24hrs, recuperando 523 UFC.

La presencia de *E. coli* en diferentes huéspedes es esperada al ser un microorganismo que forma parte de la microflora intestinal (Krause et al. 2005). Por lo cual no es raro encontrar *E. coli* en los carnívoros presentes en la zona, ya que forma parte de su microflora.

Sin embargo se ha visto en diferentes estudio la presencia de patotipos de *E. coli* como ECEP y ECEH, causantes de enfermedad, los cuales se han reportado en ganado vacuno, considerado lo reservorios de estos microorganismos (Ferens y Hovde 2011). En otros estudios se sugiere a los bisontes como posibles reservorios de ECEP (Kudva y Stasko 2013). Debido a que ambas especies interaccionan con los carnívoros silvestres de la Reserva de la Biosfera de Janos, es probable que las cepas encontradas en los carnívoros provengan de los ungulados domésticos y silvestres que se encuentran en la RBJ pudiendo estar circulantes estos microorganismos, entre las diferentes especies y poblaciones presentes en la reserva de la biosfera

Se ha visto en otros estudios que la frecuencia de algún gen de virulencia (reportados para ECEH, ECEP y ECET) puede variar por estacionalidad,

presencia de reservorios y variaciones en la dieta, este cambio se debe principalmente a la composición en la microflora (Gonzales et al., 2013; Miller et al., 2010; Schwab et al., 2011). En este estudio se ve un cambio en las frecuencias entre los periodos de otoño (16.67%) y primavera (12.90%). Tanto la estacionalidad, la presencia de reservorios y el cambio de dieta influenciada por la disponibilidad de recursos alimenticios en cada estación puede explicar por qué el cambio en las frecuencias (Schwab et al., 2011). Se requeriría realizar otros análisis para establecer el origen del cambio.

En estudios previos relacionados a *E. coli* patógenas en carnívoros como: coyotes, mapaches, diferentes variedades de oso, lince, puma, entre otros pequeños carnívoros, se realizó la serotipificación en base a su antígeno O y el antígeno H para poder agruparlos (Souza et al. 1999; Baldy-chudzik et al. 2008; Ferens y Hovde 2011; Xin Wang et al. 2013). Para nuestro estudio se buscaron genes de virulencia asociados a patotipos patógenos de *E. coli*, entre los cuales encontramos *stx1*, *stx2*, *escV* y *eae* en diferentes hospederos como coyotes, zorras del desierto, lince, y zorrillos.

En otros estudios en carnívoros donde se utilizaron técnicas moleculares para identificación de genes, se observó la presencia de genes *stx*, *escV* y *eae* en coyotes y algunas especies pertenecientes al orden feliformia (Souza et al. 1999; Gonzales et al. 2013; Schwab et al. 2011; Miller et al. 2010). En nuestro estudio se observa este arreglo de genes no sólo en este canido, lo tenemos en las tres especies de canidos de la zona, además de encontrar en lince y zorrillos, en los cuales no se había descrito. Lo que puede sugerir a los coyotes como posibles reservorio además de sugerir la posible transmisión de este agente entre carnívoros.

En estudios en osos se logró identificar algunos genes de virulencia relacionados directamente con el serotipo O157:H7, entre ellos genes como, *eae*, *stx*, *spv*, *LEE*, entre otros (Miller et al. 2010). En los aislamientos de las cepas obtenidas de los carnívoros en este estudio, se observó individuos con diferentes cepas, que se diferencian por la variación en sus genes de virulencia. Algunas de estas cepas se

relacionan a ECEP atípicas, al presentar una combinación de genes *escV<sup>+</sup>*, *eae<sup>+</sup>* y *bfpB<sup>-</sup>* como lo ha mencionado Trabulsi et al. (2002). De igual se logró el aislamiento de cepas con genes *stx's*, las cuales se asocian a ECEH (Boerlin et al., 1998). Lo que sugiere procesos de intercambios de cepas entre individuos.

Se ha observado en diversos estudios que las cepas atípicas de ECEP poseen la capacidad de ocasionar la clásica lesión de pedestal provocada normalmente por ECEP típicas (Ruiz et al., 2014). La lesión de pedestal y adherencia localizada (AL) se ha observado en células Hep-2 (Rocha et al. 2011). En este estudio se logró observar estas características además de daño celular, en los ensayos de infección con las cepas aisladas. Por lo cual es muy probable su capacidad patógena *in vivo*. En diversos estudios se ha observado estas lesiones, después de las 4 horas de infección, tanto por cepas atípicas como típicas de ECEP recuperadas de individuos infectados y cepas de laboratorio (Nakazato et al. 2004; Leverton y Kaper 2005; Scaletsky et al. 2010; Scaletsky et al. 2010; Rocha et al. 2011; Culler et al. 2014; Ruiz et al. 2014). En este estudio, en el ensayo de 12 hrs de infección con intervalos de 50 minutos, se puede visualizar el avance y determinar en qué momento se realizaron las lesiones. En una de las cepas, se puede observar que la AL se presentó a los 50 minutos y la lesión de pedestal a la 1:40 hrs. En las 7 cepas restantes cepas la AL empezó a la 1:40 hrs y la lesión de pedestal se visualizó a las 2:30 hrs. De esta forma se logra ver el daño ocasionado de las cepas aisladas de carnívoros y descritas como atípicas por la presencia de estos genes, lo cual concuerda con cepas atípicas encontradas en animales domésticos (Xicohtencatl-Cortes et al., 2007).

Se ha reportado que cepas atípicas de ECEP se relacionan al serotipo O55:H7, estas cepas atípicas se le atribuye la capacidad de evolucionar y dar origen a patotipos de *E. coli* ECEH y serotipos como el O157:H7, considerándose una cepa como ancestro común de varias (Kyle et al., 2012). La presencia de este arreglo de genes, en este estudio, para los patotipos ECEH y ECEP, nos habla de un posible proceso evolutivo de *E. coli*, en el cual se pueden estar ganando o perdiendo genes de virulencia.

Puesto que se conoce que *E. coli* tiene procesos evolutivos, los cuales han dado orígenes a diferentes patotipos además de proporcionarle la capacidad de comportarse como un microorganismo comensal, por lo que es una especie bacteriana muy versátil (Dobrindt et al. 2015). Posiblemente esto puede explicar por qué hay una variación en el arreglo de genes de las cepas aisladas. Este proceso evolutivo puede estar involucrando a la comunidad silvestre de carnívoros de la Reserva de la biosfera de Janos, y la cual puede involucrar otras especies también presentes en la zona.

Uno de los mecanismos por el cual puede llevarse a cabo este proceso adaptativo es la transferencia horizontal de genes, el cual es un mecanismo ya descrito para la ganancia de factores de virulencia de *E. coli* (Cooper et al., 2014; Carvalho y Loreto, 2012; Price et al. 2008). Aunque también puede estarse llevando una pérdida de genes de virulencia para su adaptación, como lo menciona Falkow, S (1998), no necesariamente debe volverse más patógeno un microorganismo para su sobrevivencia, si no debe regular su patogenicidad, involucrando una coevolución en la mayoría de los casos.

## **Conclusión**

En base a los resultados obtenidos:

- 1) Pudimos establecer que las especies con mayor abundancia en diferentes temporadas son los Coyotes y Zorras del desierto;
- 2) Se logró contar con un número alto de capturas. Lo que nos permite obtener datos de 5 familias de las 6 existentes en la zona, siendo el primer estudio de genes de virulencia en carnívoros, en la reserva de la Biosfera de Janos, en Chihuahua, México.
- 3) Las muestras obtenidas son suficientes para analizar la presencia de genes de virulencia para *Salmonella* spp. y *E. coli*. Del cual se confirma la presencia de *Inva*, *SopE*, *CdtB*, *stx-1*, *stx-2*, *EscV* y *eae*. Las cuales se detectan por pruebas moleculares.

- 4) Encontramos valores en la frecuencias para *Salmonella* spp, *Salmonella entérica* sp. y en la frecuencia de genes de virulencia de *E. coli*, en una población de carnívoros que no se tenía registro, y se puede observar como estos valores en las frecuencias se mueven en los periodos de muestreo.
- 5) Se confirma la capacidad de cepas aisladas de *Salmonella* con genes *InvA*, *sopE* y *cdt-B* de internalizarse, replicarse y sobrevivir.
- 6) Se puede observar la capacidad de cepas aisladas de *E. coli* con genes *EscV* y *eae* para infectar células y formar lesiones de pedestal.
- 7) Los diferentes arreglos en los genes presentes, en las cepas de *E. coli*, nos sugiere la posibilidad eventos ecológicos-evolutivos, que se estén llevando acabo, dentro de las poblaciones presentes en la zona, resultado de las interacciones entre las especies tanto silvestres como domésticas.

## Referencias

- Aminov, R. I. (2011). Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology*.
- Arrivillaga, J., y Caraballo, V. (2009). Medicina de la Conservación. *Revista Biomedica*, 20(1), 55–67.
- Aurora Echeita, M., María Aladueña, A., Díez, R., Arroyo, M., Cerdán, F., Gutiérrez, R., Ángel Usera, M. (2005). Distribución de los serotipos y fagotipos de *Salmonella* de origen humano aislados en España en 1997-2001. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 23(3), 127–134.
- B., S. M., V., S. M., y T., M. G. (2009). Silvestres Y Su Impacto En Las Enfermedades Emergentes Y Reemergentes Zoonotic Transmitted By Wild

Animals And Its Impact On Emerging And Re-Emerging Diseases. *Revista MVZ Córdoba*, 14(2), 1762–1773.

- Baker, P. J., Boitani, L., Harris, S., Saunders, G., y White, P. C. L. (2008). Terrestrial carnivores and human food production : impact and management. *Mammal Society, Mammal Review*, 38(2 y 3), 123–166.
- Baldy-chudzik, K., Mackiewicz, P., y Stosik, M. (2008). Phylogenetic background, virulence gene profiles , and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo, 131, 173–184.
- Boerlin, P., Chen, S., Colbourne, J. K., Johnson, R., Grandis, S. de, y Gyles, C. (1998). Evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin plasmids and the locus for enterocyte effacement in Shiga toxin-producing *E. coli*. *Infection and Immunity*, 66(6), 2553–2561.
- Boitani, Luigi; Powell, R. A. (2012). Carnivore Ecology and Conservation. In W. J. Sutherland (Ed.), *Carnivore Ecology and Conservation* (p. 490). New York: Oxford Biology.
- Boto, L. (2010). Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 277(1683), 819–827.
- Camacho-Escobar, M. A., Pérez-Lara, E., Arroyo-, J., Ledezma, y Jiménez-Galicia, E. I. S.-B. M. M. (2006). Guajolotes de traspacio como reservorios de enfermedades de aves domésticas y Silvestres en tres ecosistemas de la costa Mexicana. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 1(6), 117–122.
- Chandran, A., y Mazumder, A. (2013). Prevalence of diarrhea-associated virulence genes and genetic diversity in *Escherichia coli* isolates from fecal material of various animal hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7371–80.
- Childs, J. E., Mackenzie, J. S., y Richt, J. A. (2007). *Wildlife and Emerging Zoonotic Diseases: The Biology, Circumstances, and Consequences of Cross-species Transmission*. Berling: Springer. Retrieved from
- Christou, L. (2011). The global burden of bacterial and viral zoonotic infections. *Clinical Microbiology and Infection*.
- Clements, A., Young, J. C., Constantinou, N., yGad Frankel. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, (April), 71–87.
- Compton, J. a, Baney, J. a, Donaldson, S. C., Houser, B. a, San Julian, G. J., Yahner, R. H., Jayarao, B. M. (2008). Salmonella infections in the common

- raccoon (*Procyon lotor*) in western Pennsylvania. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(9), 3084–6.
- Cooper, K. K., Mandrell, R. E., Louie, J. W., Korlach, J., Clark, T. A., Parker, C. T., Carter, M. Q. (2014). Comparative genomics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145:H28 demonstrates a common evolutionary lineage with *Escherichia coli* O157:H7. *BMC Genomics*, 15, 17.
- Cox, P., Griffith, M., Angles, M., Deere, D., y Ferguson, C. (2005). Concentrations of Pathogens and Indicators in Animal Feces in the Sydney Watershed. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 5929–5934.
- Culler, H. F., Mota, C. M., Abe, C. M., Elias, W. P., Sircili, M. P., y Franzolin, M. R. (2014). Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains form Biofilm on Abiotic Surfaces Regardless of Their Adherence Pattern on Cultured Epithelial Cells. *BioMed Research International*, 2014, 10–15.
- Daszak, P., y Cunningham, A. A. (2002). Emerging Infectious Diseases: A Key Role for Conservation Medicine. In M. C. Aguirre, A. Alonso; Ostfeld, Richard S.; Tabor, Gary M.; House, Carol; Pearl (Ed.), *Conservacion Medicine Ecological Health In Practice* (pp. 40–61). New York: Oxford Biology.
- Daszak, P., Cunningham, A., y Hyatt, A. (2001). Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica*, 78, 103–116. Retrieved from
- De Carvalho, M. O., y Loreto, E. L. S. (2012). Methods for detection of horizontal transfer of transposable elements in complete genomes. *Genetics and Molecular Biology*.
- Dobrindt, U., Hacker, J. H., y Svanborg, C. (2015). Pathogenicity, *E. coli* as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and. In U. Dobrindt, J. H. Hacker, y C. Svanborg (Eds.), *Between pathogenicity and commensalism* (Vol. 358, pp. 3–32). Berlin Heidelberg: Springer.
- Dobson, A., y Foufopoulos, J. (2001). Emerging infectious pathogens of wildlife. *The Royal Society*, 356, 1001–1012. <http://doi.org/10.1098/rstb.2001.0900>
- Eom, J. S., Seok Kim, J., Im Jang, J., Kim, B.-H., Young Yoo, S., Hyeon Choi, J., Keun Park, Y. (2013). Enhancement of host immune responses by oral vaccination to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium harboring both *FliC* and *FliB* flagella. *PloS One*, 8(9), e74850.

- Estes, J. A., Terborgh, J., Brashares, J. S., Power, M. E., Berger, J., Bond, W. J., ... Oksanen, T. (2012). Trophic Downgrading of Planet Earth. *Science*, 301(2011), 301–306.
- Fàbrega, A., y Vila, J. (2013). Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 308–41.
- Falkow, S. (1998). Who speaks for the South? *Emerging Infectious Disease*, 4(3), 495–497.
- Farnleitner, A. (2010). Escherichia coli and enterococci are sensitive and reliable indicators for human, livestock and wildlife faecal pollution in alpine mountainous water resources. *Journal of Applied Microbiology*, 109(5), 1599–1608.
- Fedora-Cray, P. J., Kelley, L. C., Stabel, T. J., Gray, J. T., y Laufer, J. A. (1995). Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of Salmonella typhimurium in swine. *Infection and Immunity*, 63(7), 2658–2664.
- Ferens, W. A., y Hovde, C. arolyn J. (2011). Escherichia coli O157: H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(4), 465–487. Retrieved from
- Gallegos, M., Morales, A., Álvarez, G., Vásquez, J., Morales, L., Martínez, I., y Maldonado, J. (2009). Caracterización de aislados de Escherichia coli o157:H7 en canales de bovinos y porcinos mediante PCR. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 19(2), 139–146.
- Gerlach, R. G., Jäckel, D., Geymeier, N., y Hensel, M. (2007). Salmonella pathogenicity island 4-mediated adhesion is coregulated with invasion genes in Salmonella enterica. *Infection and Immunity*, 75(10), 4697–709.
- Gese, E. M., Schultz, R. D., Johnson, M. R., Williams, E. S., Crabtree, R. L., y Ruff, R. L. (1997). Serological Survey For Disease In Free-Ranging Coyotes (Canis latrans) In Yellowstone National Park, Wyoming. *Journal of Wildlife Diseases*.
- Giunnella, R. A., Formal, S. B., Dammin, G. J., y Collins, H. (1973). Pathogenesis of Salmonellosis Studies of Fluid Secretion, Mucosal Invasion, and Morphological Reaction in the Rabbit Ileum. *The Journal of Clinical Investigation*, 52(February), 441–453.
- Gonzales, L., Sanchez, S., Zambrana, S., Iñiguez, V., Wiklund, G., Svennerholm, A.-M., y Sjöling, A. (2013). Molecular characterization of enterotoxigenic Escherichia coli isolates recovered from children with diarrhea during a 4-year



period (2007 to 2010) in Bolivia. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(4), 1219–25.

Goswami, A. (2010). Introduction to Carnivora. In A. Goswami y A. Friscia (Eds.), *Carnivoran Evolution New Views on Phylogeny, Form, and Function*.

Groisman, E. A. (2001). *Principles of Bacterial Pathogenesis*. (E. A. Groisman, Ed.) (3rd ed.). Orlando, Florida: ACADEMIC PRESS.

Gyles, C. L., Prescott, J. F., Songer, G., y Thoen, C. O. (2008). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. (and C. O. T. Carlton L. Gyles, John F. Prescott, J. Glenn Songer, Ed.) (third edit). Garsington Road, Oxford: Blackwell Publishing Ltd. Retrieved from

Gyles, C., Prescott, J., Songer, G., y Thoen, C. (2008). *Pathogenesis of bacterial infections in animals* (Fourth Edi). Blackwell Publishing Ltd. Retrieved from

Haley, B. J., Cole, D. J., y Lipp, E. K. (2009). Distribution, diversity, and seasonality of waterborne salmonellae in a rural watershed. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), 1248–1255.

Handeland, K., Nesse, L. L., Lillehaug, A., Vikoren, T., Djønne, B., y Bergsjø, B. (2008). Natural and experimental Salmonella Typhimurium infections in foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Microbiology*, 132(1-2), 129–34.

Harshman, L., y Riley, M. (1980). Conservation and variation of nucleotide sequences in Escherichia coli strains isolated from nature. *Journal of Bacteriology*, 144(2), 560–8.

Haydon, D. T., Cleaveland, S., Taylor, L. H., y Laurenson, M. K. (2002). Identifying Reservoirs of Infection : A Conceptual and Practical Challenge. *Emerging Infectious Disease*, 8(12), 1468-1473.

Hölzer, S. U., y Hensel, M. (2012). Divergent roles of Salmonella pathogenicity island 2 and metabolic traits during interaction of S. enterica serovar typhimurium with host cells. *PloS One*, 7(3), e33220.

Huerta, A. H. (1992). Los carnívoros y sus perspectivas de conservación en las áreas protegidas de México. *Acta Zoologica Mexicana*, 23(54), 1–23.

J. Millán, G. Aduriz, B. Moreno, R. A. J. and M. B. (2004). Salmonella isolates from wild birds and mammals in the Basque Country. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 23(3), 905–911.

Jackson, R. W., Johnson, L. J., Clarke, S. R., y Arnold, D. L. (2011). Bacterial pathogen evolution : breaking news. *Trends in Genetics*, 27(1), 32–40.

- Jardine, C. M., Janecko, N., Allan, M., Boerlin, P., Chalmers, G., Kozak, G., Reid-Smith, R. J. (2012). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from raccoons (*Procyon lotor*) in Southern Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 3873–9.
- Jardine, C., Reid-Smith, R. J., Janecko, N., Allan, M., y McEwen, S. a. (2011). Salmonella in raccoons (*Procyon lotor*) in southern Ontario, Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 47(2), 344–51.
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. a, Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., y Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990–3.
- Jones, P. W., y Twigg, G. I. (1976). Salmonellosis in wild mammals. *The Journal of Hygiene*, 77(1), 51–4.
- Kahn, R. E., Morozov, I., Feldmann, H., y Richt, J. a. (2012). 6th International Conference on Emerging Zoonoses. *Zoonoses and Public Health*, 59 Suppl 2, 2–31.
- Katouli, M. (2010). Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. *Iranian Journal of Microbiology*, 2(2), 59–72.
- Keesing, F., Holt, R. D., y Ostfeld, R. S. (2006). Effects of species diversity on disease risk. *Ecology Letters*, 9, 485–498.
- Korth, M., Lara, J., y Moseley, S. (1994). Epithelial cell invasion by bovine septicemic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 62(1), 41–47.
- Krause, G., Zimmermann, S., y Beutin, L. (2005). Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (eae) gene positive *Escherichia coli* types. *Veterinary Microbiology*, 106(1-2), 87–95.
- Kudva, I. T., y Stasko, J. a. (2013). Bison and bovine rectoanal junctions exhibit similar cellular architecture and *Escherichia coli* O157 adherence patterns. *BMC Veterinary Research*, 9(1), 266.
- Kyle, J. L., Cummings, C. A., Parker, C. T., Quiñones, B., Vatta, P., Newton, E., y Huynh, S. (2012). *Escherichia coli* Serotype O55 : H7 Diversity Supports Parallel Acquisition of Bacteriophage at Shiga Toxin Phage Insertion Sites during Evolution of the O157 : H7 Lineage, 1885–1896.
- Lamberski, N. (2012). Updated Vaccination Recommendations for Carnivores. In *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy* (7th ed., pp. 442–450). St. Louis, Missouri: Elsevier Inc.

- Ledeboer, N., y Frye, J. (2006). Salmonella enterica serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. *Infection and Immunity*, 74(6), 3156–3169.
- Lee, K., Iwata, T., Nakadai, a, Kato, T., Hayama, S., Taniguchi, T., y Hayashidani, H. (2011). Prevalence of Salmonella, Yersinia and Campylobacter spp. in feral raccoons (*Procyon lotor*) and masked palm civets (*Paguma larvata*) in Japan. *Zoonoses and Public Health*, 58(6), 424–31.
- Leverton, L. Q., y Kaper, J. B. (2005). Temporal expression of enteropathogenic Escherichia coli virulence genes in an in vitro model of infection. *Infection and Immunity*, 73(2), 1034–43.
- Liebana, E., Garcia-Migura, L., Clouting, C., Clifton-Hadley, F. A., Lindsay, E., Therellfall, E. J., Davies, R. H. (2002). Multiple Genetic Typing of Salmonella enterica Serotype Typhimurium Isolates of Different Phage Types (DT104, U302, DT204b, and DT49) from animals and humans in England, Wales, and Northern Ireland. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12), 4450–4456.
- Lieberman, C. P., Reid-Smith, R. J., Boerlin, P., Weese, J. S., Prescott, J. F., Janecko, N., McEwen, S. A. (2010). Escherichia coli and selected veterinary and zoonotic pathogens isolated from environmental sites in companion animal veterinary hospitals in southern. *Canadian Veterinary Journal*, 51, 963–972.
- Lindenfors, P., Nunn, C. L., Jones, K. E., Cunningham, A. a., Sechrest, W., y Gittleman, J. L. (2007). Parasite species richness in carnivores: effects of host body mass, latitude, geographical range and population density. *Global Ecology and Biogeography*, 16(4), 496–509.
- Macdonald, D. W., y Kays, R. W. (2005). Carnivores of the world: An Introduction. In R. M. Nowak (Ed.), *Carnivores of the world* (6th editio, pp. 1–272). London: The Johns Hopkins University Press.
- Marcus, S., Brumell, J., Pfeifer, C., y Finlay, B. (2000). Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection*. Retrieved from
- Medina-Vogel, G. (2010). Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 24, 11–24.
- Millán J, Aduriz G, Moreno B, Juste RA, B. M. (2004). Salmonella isolates from wild birds and mammals in the Basque Country. *Revue Scientifique et Technique*, 23(3), 905–911.

- Miller, M. a, Byrne, B. a, Jang, S. S., Dodd, E. M., Dorfmeier, E., Harris, M. D., Miller, W. a. (2010). Enteric bacterial pathogen detection in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) is associated with coastal urbanization and freshwater runoff. *Veterinary Research*, 41(1), 1.
- Mora, A., López, C., Dhabi, G., López-Beceiro, A. M., Fidalgo, L. E., Díaz, E. a, Blanco, J. (2012). Seropathotypes, Phylogroups, Stx subtypes, and intimin types of wildlife-carried, shiga toxin-producing escherichia coli strains with the same characteristics as human-pathogenic isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2578–85.
- Murray, D. L., Kapke, C. A., Evermann, J. F., y Fuller, T. K. (1999). Infectious disease and the conservation of free-ranging large carnivores. *Animal Conservation*, 2(4), 241–254.
- Nakazato, G., Gyles, C., Ziebell, K., Keller, R., Trabulsi, L. R., Gomes, T. A. T., Pestana De Castro, A. F. (2004). Attaching and effacing Escherichia coli isolated from dogs in Brazil: Characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic E. coli (EPEC). *Veterinary Microbiology*, 101(4), 269–277.
- Narváez-bravo, C. A., Carruyo-núñez, G., Moreno, M., Rodas-gonzález, A., y Hoet, A. E. (2007). Aislamiento de Escherichia coli 0157:H7 en Muestras de HEces de Ganado Bovino Doble Propósito del Municipio Miranda, Estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica*, XVII, 239–245.
- Ochoa, I. M. F., y Rodríguez, A. V. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de Salmonella sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47. Retrieved from
- Oliveira, M., Pedroso, N. M., Sales-Luís, T., Santos-Reis, M., Tavares, L., y Vilela, C. L. (2010). Antimicrobial-resistant Salmonella isolated from Eurasian otters (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) in Portugal. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(4), 1257–61.
- Olsen, J. E., Hoegh-Andersen, K. H., Casadesús, J., Rosenkranzt, J., Chadfield, M. S., y Thomsen, L. E. (2013). The role of flagella and chemotaxis genes in host pathogen interaction of the host adapted Salmonella enterica serovar Dublin compared to the broad host range serovar S. Typhimurium. *BMC Microbiology*, 13, 67.
- Pacheco, J., Ceballos, G., y List, R. (2000a). Los mamíferos de la región de Janos-Casas Grandes, Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Mastozoología*, 69–83.

- Pacheco, J., Ceballos, G., y List, R. (2000b). Los mamíferos de la región de Janos-Casas Grandes, Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Mastozoología*, 69–83.
- Price, M. N., Dehal, P. S., y Arkin, A. P. (2008). Horizontal gene transfer and the evolution of transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Genome Biology*, 9(1), R4.
- Ripple, W. J., y Beschta, R. L. (2004). Wolves, elk, willows, and trophic cascades in the upper Gallatin Range of Southwestern Montana, USA. *Forest Ecology and Management*, 200(1-3), 161–181.
- Ripple, W. J., Estes, J. A., Beschta, R. L., Wilmers, C. C., Ritchie, E. G., Hebblewhite, M., Smith, D. W. (2014). Status and ecological effects of the world ' s largest carnivores. *Science (New York, N.Y.)*, 343(January), 1–11.
- Rocha, S. P. D., Abe, C. M., Sperandio, V., Bando, S. Y., y Elias, W. P. (2011). Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* that contains functional locus of enterocyte effacement genes can be attaching-and-effacing negative in cultured epithelial cells. *Infection and Immunity*, 79(5), 1833–41.
- Ruiz, R. C., Melo, K. C. M., Rossato, S. S., Barbosa, C. M., Corrêa, L. M., Elias, W. P., y Piazza, R. M. F. (2014). Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* secretes plasmid encoded toxin. *BioMed Research International*, 2014, 896235.
- Samadder, P., Xicohtencatl-Cortes, J., Saldana, Z., Jordan, D., Tarr3, P. I., Kaper, J. B., y Giron, J. A. (2009). The *Escherichia coli* ycbQRST operon encodes fimbriae with laminin-binding and epithelial cell adherence properties in Shiga-toxicogenic *E. coli* O157: H7. *Environmental Microbiology*, 11(7), 1815–1826.
- Scaletsky, I. C. A., Aranda, K. R. S., Souza, T. B., y Silva, N. P. (2010). Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Schwab, C., Cristescu, B., Northrup, J. M., Stenhouse, G. B., y Gänzle, M. (2011). Diet and environment shape fecal bacterial microbiota composition and enteric pathogen load of grizzly bears. *PloS One*, 6(12), e27905–e27905.
- Souza, V., y Rocha, M. (1999). Genetic Structure of Natural Populations of *Escherichia coli* in Wild Hosts on Different Continents. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3373–85.

- Souza, V., Rocha, M., Valera, A., Luis, E., y Eguiarte, L. E. (1999). Genetic Structure of Natural Populations of *Escherichia coli* in Wild Hosts on Different Continents Genetic Structure of Natural Populations of *Escherichia coli* in Wild Hosts on Different Continents. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3373.
- Tabor, G. M. (2002). Defining Conservation Medicine. In A. A. Aguirre, R. S. Ostfeld, G. M. Taibor, C. House, y M. Paerl (Eds.), *Conservacion Medicine Ecological Health In Practice* (pp. 8–16). Oxford Biology.
- Townsend, S. M., Kramer, N. E., Edwards, R., Baker, S., Hamlin, N., Simmonds, M., Bäuml, a J. (2001). *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infection and Immunity*, 69(5), 2894–901.
- Trabulsi, L. R., Keller, R., y Gomes, T. A. T. (2002). Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Disease*, 8(5), 508–513.
- Velden, A. Van Der. (1998). Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infection and Immunity*, 66(6), 2803–2808. Retrieved from
- Velge, P., Wiedemann, a, Rosselin, M., Abed, N., Boumart, Z., Chaussé, a M., Virlogeux-Payant, I. (2012). Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. *MicrobiologyOpen*, 1(3), 243–58.
- Wang, X., Yan, Q., Xia, X., Zhang, Y., Li, D., Wang, C., Hou, R. (2013). Serotypes, virulence factors, and antimicrobial susceptibilities of vaginal and fecal isolates of *Escherichia coli* from giant pandas. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5146–5150.
- Weening, E. H., Barker, J. D., Laarakker, M. C., Humphries, A. D., Tsolis, M., y Ba, A. J. (2005). sth Fimbrial Operons Are Required for Intestinal Persistence in Mice, 73(6), 3358–3366.
- West, G., Heard, D., y Caulkett, N. (2008). *Zoo animal and wildlife immobilization and anesthesia* (1st ed.). oklahoma: Blackwell Publishing Ltd.
- Williams, E., y Barker, I. (2001). *Infectious diseases of wild mammals*. Vasa (Third). Iowa State: Iowa State University Press.
- Wilson, J. S., Hazel, S. M., Williams, N. J., Phiri, a., French, N. P., y Hart, C. a. (2003). Nontyphoidal *Salmonellae* in United Kingdom Badgers: Prevalence and Spatial Distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4312–4315.

Woolhouse, M. E. J., Haydon, D. T., y Antia, R. (2005). Emerging pathogens : the epidemiology and evolution of species jumps. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 20(5), 238–244.

Xicohtencatl-Cortes, J., Monteiro-Neto, V., Ledesma, M. A., Jordan, D. M., Francetic, O., Kaper, J. B., Girón, J. A. (2007). Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Clinical Of Clinical Investgation*, 117(11), 21–24.

Figuras

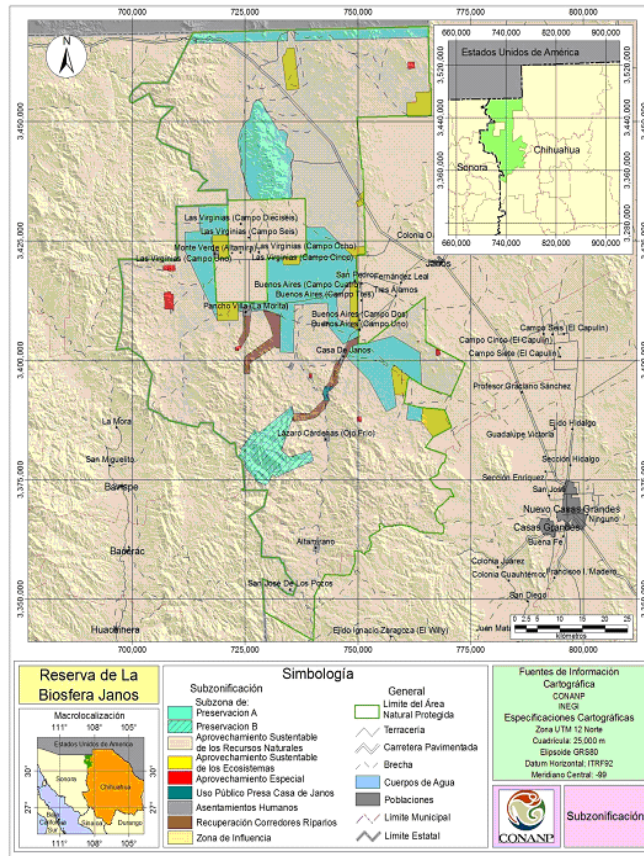
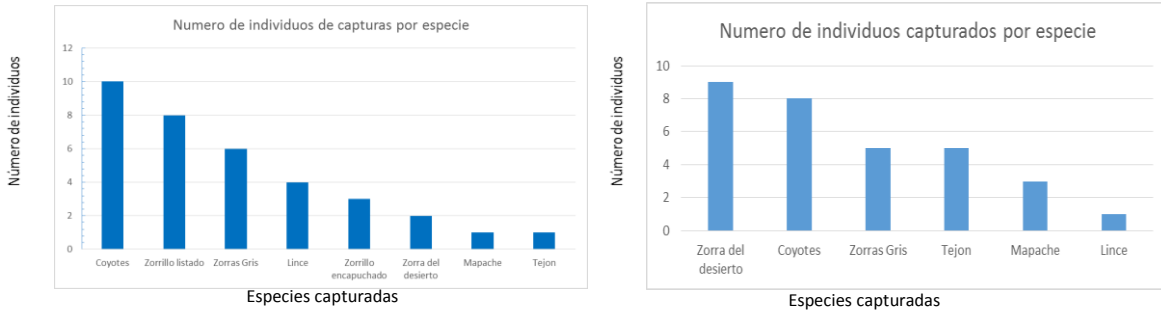


Figura 1. Mapa de la reserva de la Biosfera de Janos Chihuahua, elaborado por la CONANP, donde delimita el área que abarca la reserva.

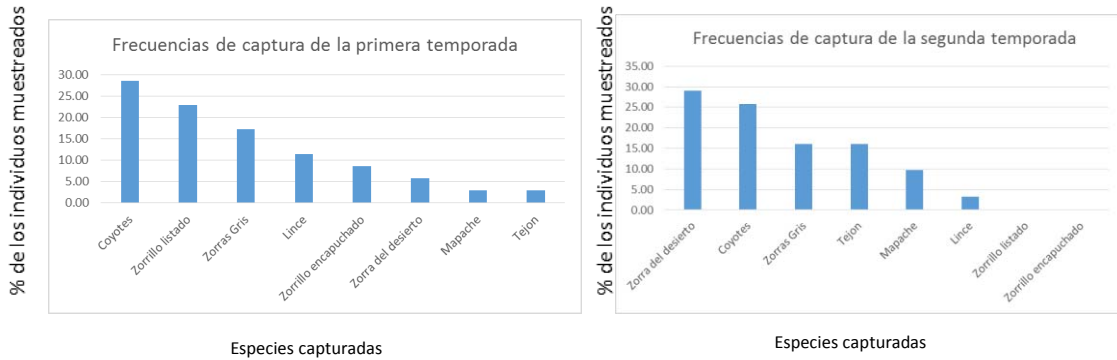


Figura 2. Los Cinco Sitios de Muestreo en la Reserva de la Biosfera de Janos, y las regiones que se toman en cuenta para el estudio

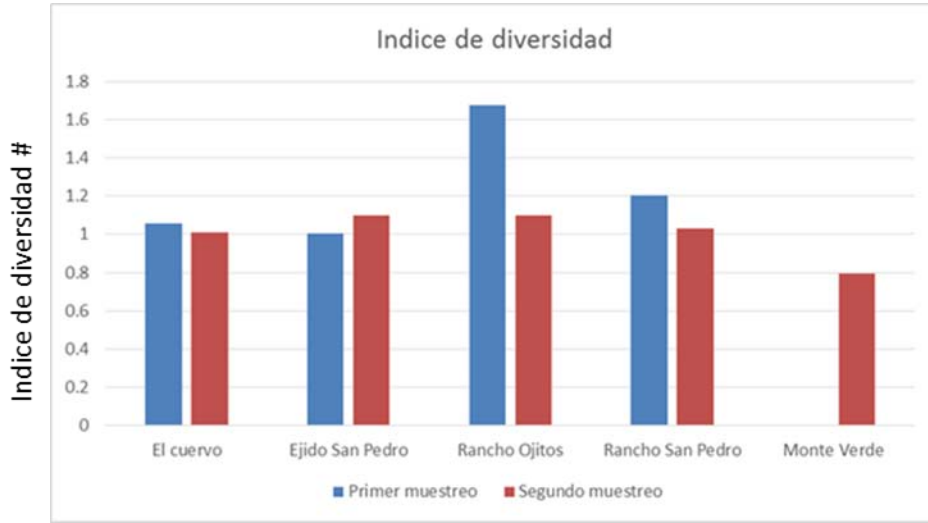




**Figura 3. Total de Individuos capturados en cada temporada. En el total de la reserva de la Biosfera de Janos**



**Figura 4. Frecuencias de capturas obtenidas por temporada, y a partir de la cuales toman en cuenta los porcentajes utilizados para la Matriz DAFOR, en cual podemos observar que nuestra comunidad no cuenta con especies dominantes y abundantes solo encontramos especies frecuentes, observadas y raras**



Sitios de muestreo

Figura 5. Índice de Shannon, establecido para cada sitio de muestreo, en cual podemos observar, que durante la segunda temporada todos los sitios de muestreo, tienen índices similares de diversidad, mientras que el primer muestreo se muestreo podemos observar que el lugar con mayor diversidad es Rancho ojitos

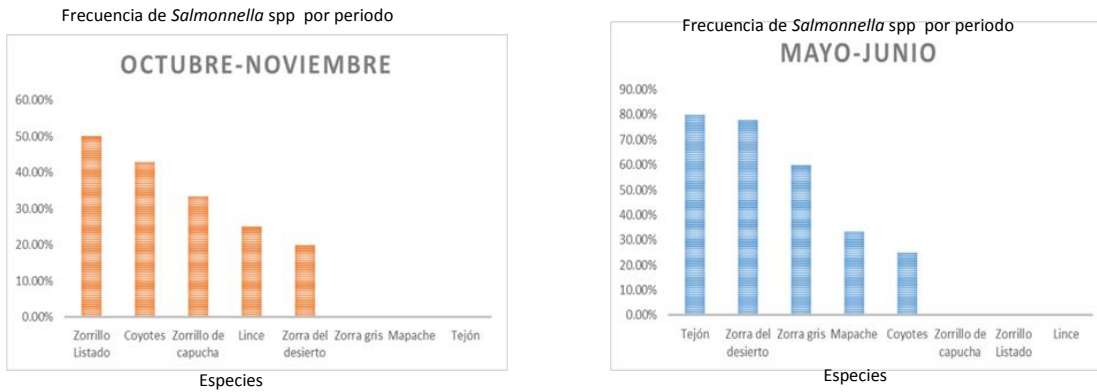


Figura 6. Frecuencia de Salmonella spp en el primer y segundo muestreo por especie, en el cual se puede observar cuales son las especies con mayores porcentajes reportados.



Figura 7. Frecuencia de *Salmonella* spp por sitio de muestreo en cada temporada, en el cual podemos observar que no es un evento aislado de un solo sitio, en todos los sitios de muestreo en ambas temporadas está presente *Salmonella*

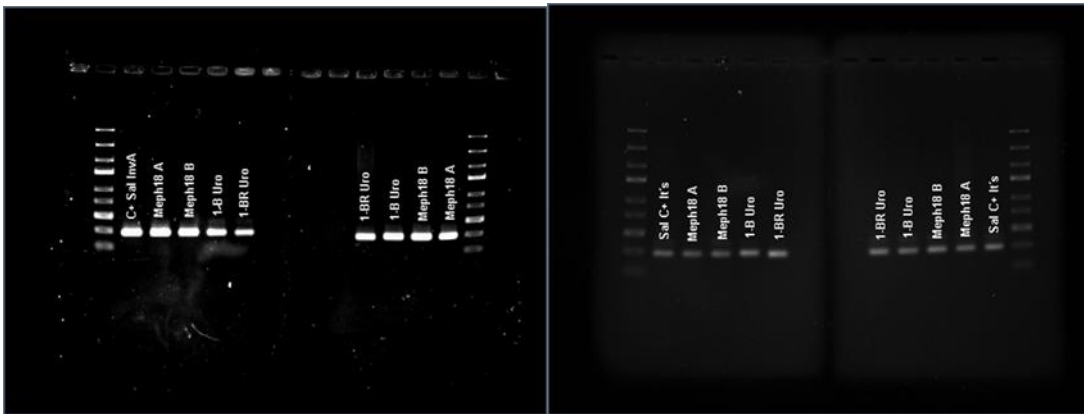


Figura 8 Muestras Aisladas de Carnívoros positivas a 1s-Its e InvA a través de las técnicas moleculares y las cuales se les evaluó en cultivo celular

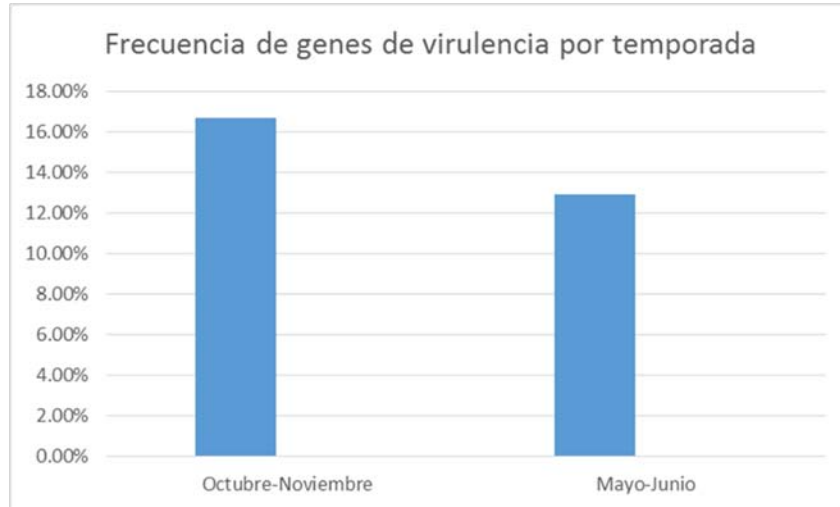


Figura 9 Frecuencia observada de por lo menos algún gen de virulencia para *E. coli* por temporadas, en lo cual podemos ver que estos están presentes en la comunidad de carnívoros de la RBJ

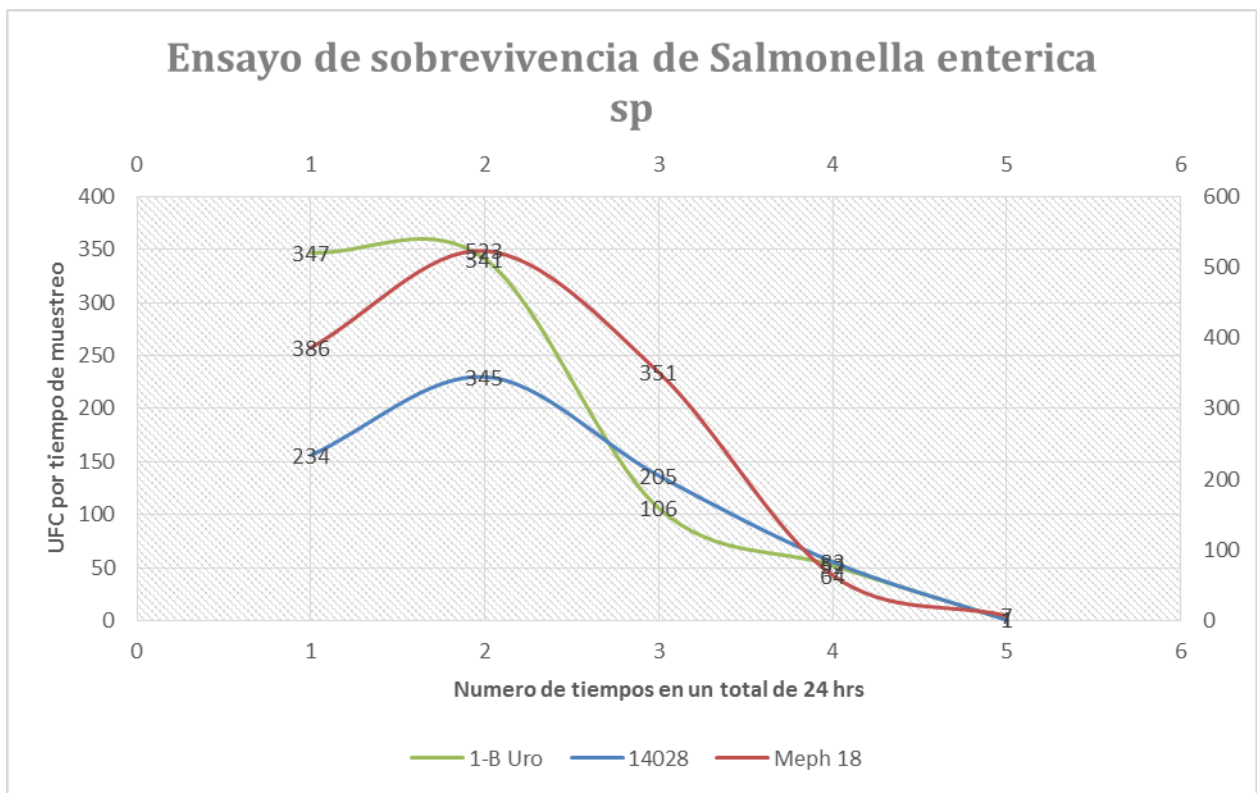


Figura 10. Curva de sobrevivencia intracelular in- vitro durante 24 hrs, en la cual podemos observar cómo se lleva a cabo la replicación, y el número de UFC recuperadas en cada tiempo, lo que no es indicativo de la capacidad de invadir en la célula hospedera

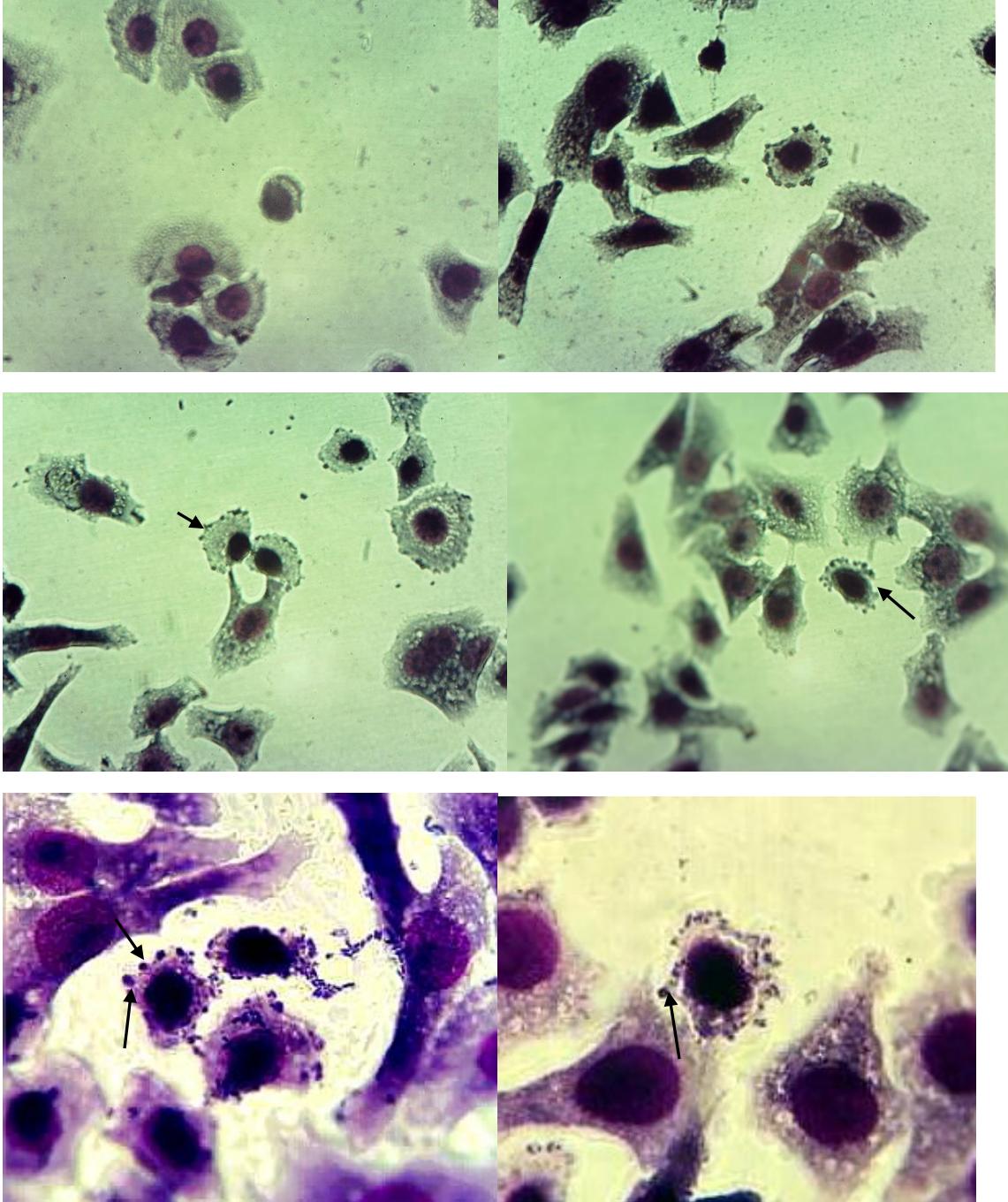


Figura 11. Fotografías a células Hep-2 en el ensayo de infección de *E. coli*. A) Células Hep-2 sin infectar, B) Células Hep-2 infectadas con una típica ECEP (Control) C) Cepa de *E. coli* recuperada de Carnívoros positivas a *EscV* y *eae*, en la cual se observa adherencia localizada en objetivo 40X, D) Cepa de *E. coli* recuperada de Carnívoros positivas a *EscV* y *eae*, en la que se ve lesiones sugerentes a pedestal en objetivo 40X, E) y F) Cepa de *E. coli* recuperada de Carnívoros positivas a *EscV* y *eae*, en la que se ve lesiones sugerentes a pedestal en objetivo y adherencia localizada con objetivo 100X

## Cuadros

<p align="center"><b>Cuadro 1.</b> Se muestran los sitios donde se realizaron los distintos muestreos en este trabajo y los tipos de hábitat encontrados en estos sitios</p>		
Sitio de muestreo	Hábitats	Esfuerzo de muestreo (noches/trampa)
Rancho San Pedro	Bosque de Encino	160
El Cuervo	Pastizal Natural	160
Rancho Ojitos	Matorral Xerófilo	160
Ejido San Pedro	Pastizal Natural	160
Monte Verde	Matorral Xerófilo	160

Nombre	Secuencia (sentido/contrasentido)	amplicon (bp)	Referencia
16 ITS	3'-TGCGGCTGGATCACCTCCTT-5'/ 5'-TATAGCCCCATCGTGTAGTCAGAAC-3'	312	Chiu, et al. 2004
invA	3'-GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGCAA-5'/ 5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3'	280	Este trabajo
sopE	3'-GTGACAAAATAACTTTTATCT-5'/ 5'-GGGAGTGTATTGTATATATTT-3'	700	Este trabajo
cdtB	3'-ATTTCTTTTGCCTGCGC-5'/ 5'-GATCAGAAGCGAGTTGTGG-3'	700	Este trabajo
eae	3'-CGGGGACATTTTAGTCA-5'/ 5'-GATCAGAAGCGAGTTGTGG-3'	600	Este trabajo
escV	3'-GGCTCTCTTCTTCTTTATGGCTG-5'/ 5'-CCTTTTACAACTTCATCGCC-3'	534	Muller, et al. 2006
bfpB	3'-GATAAACTGATACTGGGCAGC-5'/ 5'-AGTGAAGTTCGGGAAGCAC-3'	826	Muller, et al. 2006
Stx1	3'-GGCGTTCTTATGTAATGACTGC-5'/ 5'-ATCCCACGGACTCTTCCATC-3'	250	Muller, et al. 2006
Stx2	3'-CGTTTTGACCATCTTCGTCTG-5'/ 5'-AGCGTAAGGCTTCTGCTGTG-3'	325	Muller, et al. 2006
ST	3'-TAGAGACCGGTATTACAGAAATCTGA-5'/ 5'-TCATCCCGAATTCTGTTATATATGTC-3'	282	Este trabajo
LT	3'-GGGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA-5'/ 5'-ATTACAACAAAGTTCACAGCAGTA-3'	183	Este trabajo

1<sup>er</sup>: Primer temporada, época de otoño

2<sup>da</sup>: Segunda temporada, época de primavera

Localidad	Índice de Shannon	
	Primer muestreo	Segundo muestreo
El cuervo	1.055	1.011
Ejido San Pedro	1.004	1.099
Rancho Ojitos	1.677	1.099
Rancho San Pedro	1.205	1.030
Monte Verde	-----	0.7963
Total	1.823	1.655

Cuadro 5. Frecuencia de *Salmonella* spp y *Salmonella enterica* sp en cada temporada por sitio de muestreo y especies

Especies	Número de casos y Frecuencia de <i>Salmonella</i> spp. por sitio y temporada																			Frecuencia acumulada de <i>Salmonella</i> spp. por especie				Frecuencia de <i>Salmonella enterica</i> sp. por especies				
	Rancho San Pedro				Rancho Ojitos				Ejido San Pedro				EL Cuervo				Monte Verde		1er		2da		1er		2da			
	1er	2da	1er	2da	1er	2da	1er	2da	1er	2da	1er	2da	1er	2da	1er	2da	1er	2da	1er	2da	1er	2da	1er	2da				
<b>Coyotes</b>	-	-	0/3	0%	1/2	50%	0/1	0%	0/3	0%	0/2	0%	2/2	100%	1/1	100%	-	-	1/1	100%	<b>3/7</b>	<b>42.85%</b>	<b>2/8</b>	<b>25%</b>	0/7	0%	0/8	0%
<b>Zorra gris</b>	0/1	0%	3/5	60%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/1	0%	<b>3/5</b>	<b>60%</b>	0/1	0%	0/5	0%
<b>Zorra del desierto</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	1/3	33.33%	<b>1/2</b>	<b>50%*</b>	0/2	0%	1/2	50%	-	-	5/5	100%	<b>1/5</b>	<b>20%</b>	<b>7/9</b>	<b>77.77%</b>	0/5	0%	<b>1/9</b>	<b>11.11%</b>
<b>Zorrillo de capucha</b>	-	-	-	-	1/3	33.33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>1/3</b>	<b>33.33%</b>	-	-	<b>1/3</b>	<b>33.33%</b>	-	-
<b>Zorrillo Listado</b>	-	-	-	-	<b>1/1</b>	<b>100%*</b>	-	-	0/1	0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>1/2</b>	<b>50%</b>	-	-	<b>1/2</b>	<b>50%</b>	-	-
<b>Lince</b>	0/1	0%	-	-	<b>1/2</b>	<b>50%*</b>	-	-	-	-	-	-	0/1	0%	-	-	-	-	-	-	<b>1/4</b>	<b>25%</b>	0/1	0%	<b>1/4</b>	<b>25%</b>	0/1	0%
<b>Mapache</b>	-	-	1/2	50%	0/1	0%	0/1	0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/1	0%	<b>1/3</b>	<b>33.33%</b>	0/1	0%	0/3	0%
<b>Tejón</b>	-	-	-	-	0/1	0%	0/1	0%	-	-	1/1	100%	-	-	2/3	66.66%	-	-	1/1	100%	0/1	0%	<b>4/5</b>	<b>80%</b>	0/1	0%	0/5	%
<b>Número de casos y Frecuencia acumulada por sitio</b>	0/2	0%	<b>4/10</b>	<b>40%</b>	<b>4/10</b>	<b>40%</b>	0/3	0%	<b>1/7</b>	<b>14.28%</b>	<b>2/4</b>	<b>40%</b>	<b>2/5</b>	<b>40%</b>	<b>4/6</b>	<b>66.66%</b>	-	-	<b>7/7</b>	<b>100%</b>	<b>7/24</b>	<b>14.28%</b>	<b>17/31</b>	<b>54.83%</b>	<b>2/24</b>	<b>8.33%</b>	<b>1/31</b>	<b>3.22%</b>



Cuadro 6. Frecuencia de *E. coli* y Frecuencia de por lo menos algún gen de *E. coli* en cada temporada por sitio de muestreo y especies

Especies	Número y frecuencia de <i>E. coli</i> detectados por crecimiento en medio LEMBA																			Crecimiento en medio por especies y temporada				Presencia de algún gen de virulencia (Stx-1, Stx-2, escV, bfpB, eae, LT y ST)				
	Rancho San Pedro				Rancho Ojitos				Ejido San Pedro				EL Cuervo			Monte Verde												
	1er		2da		1er		2da		1er		2da		1er		2da		1er		2da		1er		2da					
<b>Coyotes</b>	-	-	1/3	33.33%	1/2	50%	1/1	100%	0/3	0%	1/2	50%	2/2	100%	1/1	100%	-	-	1/1	100%	3/7	<b>42.86%</b>	5/8	<b>62.50%</b>	1/7	14.19%	2/8	25%
<b>Zorra gris</b>	1/1	100%	2/5	40%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/1	100%	2/5	<b>40%</b>	0/1	0%	0/5	0%
<b>Zorra del desierto</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	3/3	100%	2/2	100%	2/2	100%	2/2	100%	-	-	2/5	40%	5/5	<b>100%</b>	6/9	<b>66.67%</b>	0/5	0%	2/9	<b>22.22%</b>
<b>Zorrillo de capucha</b>	-	-	-	-	2/3	66.67%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/3	<b>66.67%</b>	-	-	1/3	33.33%	-	-
<b>Zorrillo Listado</b>	-	-	-	-	1/1	100%	-	-	0/1	0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/2	<b>50%</b>	-	-	1/2	<b>50%</b>	-	-
<b>Lince</b>	1/1	100%	-	-	2/2	<b>100%</b>	0/1	0%	-	-	-	-	0/1	0%	-	-	-	-	-	-	3/4	<b>75%</b>	0/1	0%	1/4	<b>25%</b>	0/1	0%
<b>Mapache</b>	-	-	0/2	0%	1/1	100%	0/1	0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/1	100%	0/3	<b>0%</b>	0/1	0%	0/3	0%
<b>Tejón</b>	-	-	-	-	1/1	100%	-	-	-	-	1/1	100%	-	-	3/3	100%	-	-	1/1	100%	1/1	100%	5/5	<b>100%</b>	0/1	0%	0/5	0%
<b>Número de casos y Frecuencia acumulada por sitio</b>	2/2	100%	3/10	<b>30%</b>	8/10	<b>80%</b>	1/3	33.33%	3/7	<b>42.86%</b>	4/5	<b>80%</b>	4/5	<b>80%</b>	6/6	<b>100%</b>	-	-	4/7	<b>57.14%</b>	19/24	<b>79.16%</b>	18/31	<b>58.06%</b>	4/24	<b>16.67%</b>	4/31	<b>12.90%</b>

Cuadro 7. Genes de virulencia encontrados por especie y numero de cepas aisladas		
Individuo y lugar de captura	Genes de virulencia encontrados	Numero de cepas aisladas
<i>Canis latrans</i> (El Cuervo)	stx-2	2: stx2+
<i>Mephitis macroura</i> (Rancho ojitos)	escV y eae	11: escV+ 1: escV+, eae+
<i>Lynx rufus</i> (Rancho ojitos)	stx-1	-----
<i>Mephitis macroura</i> (Rancho ojitos)	stx-1	2: stx1+
<i>Vulpes macrotis</i> (Monte verde)	escV-eae	1: escV+ 2: eae+ 7: escV+,eae+
<i>Canis latrans</i> (El cuervo)	Stx-1 y stx-2	4: stx1+,stx2+
35-B <i>Canis latrans</i> (Ejido San Pedro)	Stx-2	16
39-B <i>Vulpes macrotis</i>	escV-eae	4: eae 10: escV

Cuadro 8. Valores de UFC obtenidos en la cinética de infección con las cepas de Salmonella obtenidas de carnívoros silvestres					
Cepa/Tiempo	T1 3HRS	T2 6HRS	T3 8HRS	T4 10HRS	T5 24HRS
14028	234 UFC	345 UFC	205 UFC	83 UFC	1 UFC
Meph 18	386 UFC	523 UFC	351 UFC	64 UFC	7 UFC
1-B Uro	347 UFC	341 UFC	106 UFC	52 UFC	1 UFC