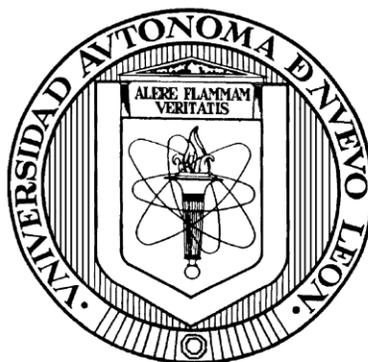


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



Presencia de agentes potencialmente zoonóticos (*Salmonella* spp y *Cryptosporidium* spp) en Pitón bola (*Python regius*) cautivos en Nuevo León

POR

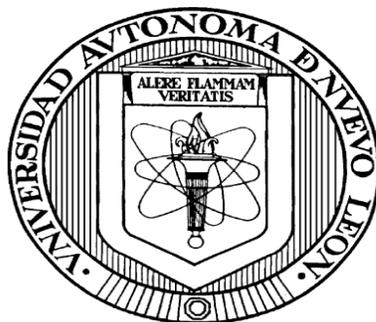
FRANCISCO JAVIER HERNÁNDEZ DE LUNA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIA ANIMAL

Escobedo, N.L., 20 de marzo del 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Presencia de agentes potencialmente zoonóticos (*Salmonella* spp y *Cryptosporidium* spp) en Pitón bola (*Python regius*) cautivos en Nuevo León

Aprobación de Tesis por el comité particular de
FRANCISCO JAVIER HERNÁNDEZ DE LUNA

COMITÉ DE TESIS

Dr. JUAN JOSÉ ZÁRATE RAMOS
Director

Dr. JESÚS JAIME HERNÁNDEZ ESCAREÑO
Codirector

Dra. DIANA ELIZA ZAMORA ÁVILA
Codirector

Dr. UZIEL CASTILLO VELÁZQUEZ
Codirector

Dra. CECILIA RAMÍREZ HERNÁNDEZ
Codirector

Dr. GERARDO MÉNDEZ ZAMORA
Codirector

VIGENCIA DEL PROYECTO: 2 AÑOS

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor el Dr. Juan José Zárate Ramos por el apoyo brindado en este proyecto, a mi comité de tesis, al Dr. Jaime Hernández, al Dr. Uziel Castillo, a la Dra. Cecilia Ramírez, al Dr. Gerardo Méndez, al Dr. Danny Chinchilla y a la Dra. Diana Zamora por los consejos y ayuda brindada en laboratorio como en el proyecto. A mis compañeros de clase Pilar, Jocy y Armando, a mis compañeros de laboratorio Frida, Héctor, Eliud, Lorena, Leo, Leslee. Agradezco al Dr. Alejandro Fuantos por los conocimientos que me ha brindado en la clínica de reptiles e impulsarme a realizar este posgrado. Agradezco a el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para realizar este trabajo. También agradezco a los criaderos de reptiles por permitirme realizar el muestreo de sus ejemplares. Por último, agradezco a mi persistencia y la firmeza para realizar este trabajo cuando se presentaron dudas en el camino y por no perder esa energía que me motivó a llevar a cabo este proyecto.

DEDICATORIA

A mis padres por darme el cariño y apoyo incondicional en todo momento desde que decidí entrar a la carrera hasta concluir este posgrado. A mi pareja Fary por siempre escucharme y apoyarme en los momentos complicados.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1.1. Biología de los ofidios.....	2
2.1.2. Termorregulación.....	2
2.1.3. Tasa metabólica.....	2
2.2. Los Reptiles como Mascotas.....	2
2.2.1. Comercio de Reptiles en México.....	3
2.3. <i>Python regius</i>	5
2.3.1. Morfología de <i>P. regius</i>	5
2.3.2. Taxonomía de <i>P. regius</i>	6
2.3.3. Distribución Mundial.....	7
2.4 Infecciones Bacterianas en Reptiles.....	8
2.4.1 <i>Salmonella</i>	8
2.4.2. Taxonomía de <i>Salmonella</i>	9
2.5. Parásitos en Reptiles.....	10
2.5.1. <i>Cryptosporidium</i>	11
2.5.2. Ciclo Biológico y Morfología.....	11
2.5.3. Taxonomía de <i>Cryptosporidium</i>	12
2.5.4. Diagnóstico de <i>Cryptosporidium</i>	12
2.5.5. <i>Cryptosporidium</i> en Serpientes.....	13
2.5.6. <i>Cryptosporidium</i> en México.....	14
3. Justificación.....	15

4. Hipótesis.....	15
5. Objetivo General.....	15
6. Objetivos Específicos.....	15
7. Materiales y Métodos.....	16
7.1. Selección de Animales.....	16
7.2. Examen Físico.....	16
7.3. Manejo y Contención.....	17
7.3. Metodología Parasitológica.....	17
7.4. Evaluación Microbiológica.....	19
7.4.1. Extracción de ADN.....	19
7.4.2. Cuantificación de ADN.....	19
7.4.3. Amplificación de <i>Salmonella</i> PCR.....	19
7.4.4. Amplificación de <i>Cryptosporidium</i> PCR RT.....	20
7.4.5. Electroforesis.....	20
7.5. Análisis Estadístico.....	20
8. Resultados.....	21
8.1. Evaluación Parasitológica.....	21
8.1.2. Frecuencia de Parásitos.....	22
8.1.3. Comparación entre Técnicas Coproparasitoscópicas.....	23
8.2. Xi Cuadrada de Pearson.....	23
8.3. Tinción Kinyoun.....	24
8.4. Evaluación Microbiológica.....	25
8.4.1. Cuantificación de ADN.....	25
8.4.2. Detección de <i>Salmonella</i> mediante PCR.....	25

8.4.3. Detección de <i>Cryptosporidium</i> PCR RT	27
9. Discusión	31
10. Conclusión	34
11. Perspectivas	35
12. Bibliografía	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes tipos de fases en <i>Python regius</i> (Fotografías tomadas por el MVZ. Francisco J. Hernández).....	6
Figura 2. Distribución de la <i>Python regius</i> en el mundo (IUCN 2012. <i>Python regius</i> . The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2021-2).....	7
Figura 3. Pesaje de <i>P. regius</i>	16
Figura 4. Uso de herramientas herpetológicas para el manejo y contención de ofidios.....	17
Figura 5. Técnicas coproparasitológicas.....	18
Figura 6. Resultados de las técnicas coproparasitológicas.....	21
Figura 7. Resultados de los parásitos encontrados.....	22
Figura 8. Resultados de la tinción Kinyoun.....	24
Figura 9. Amplificación por PCR con primers en muestras de heces de <i>P. regius</i>	25
Figura 10. Amplificación por PCR con primers en muestras de heces de <i>P. regius</i>	26
Figura 11. Amplificación por PCR con primers en muestras de heces de <i>P. regius</i>	26
Figura 12. Curva estándar de PCR en Tiempo Real para <i>Cryptosporidium</i> spp.....	28
Figura 13. Curva estándar de PCR en Tiempo Real para <i>Cryptosporidium</i> spp.....	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía del <i>Python regius</i>	6
Tabla 2. Taxonomía de <i>Salmonella</i>	9
Tabla 3. Taxonomía de <i>Cryptosporidium</i>	12
Tabla 4. Prevalencia y origen de animales positivos a endoparásitos en <i>P. regius</i>	21
Tabla 5. Prevalencia de parásitos en serpientes examinadas.....	22
Tabla 6. Comparación entre diferentes técnicas de diagnóstico de parásitos en <i>P. regius</i>	23
Tabla 7. Xi cuadrada de Pearson.....	23
Tabla 8. Frecuencia (%) de <i>Cryptosporidium</i> spp por microscopia y RT PCR.....	27
Tabla 9. Comparación entre microscopia y RT PCR para la detección de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	27
Tabla 10. Muestras analizadas mediante RT-PCR para la detección de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	27
Tabla 11. Muestras representativas analizadas mediante RT-PCR para la detección de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	29
Tabla 12. Muestras representativas analizadas mediante RT-PCR para la detección de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	30

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

SEMARNAT:	Secretaría de medio ambiente y recursos naturales
<i>P. regius:</i>	Python regius
UICN:	Unión internacional para la conservación de la naturaleza
OMS:	Organización mundial de la salud
FMVZ:	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
UANL:	Universidad Autónoma de Nuevo León
DOF:	Diario oficial de la federación
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
NaCl:	Cloruro de sodio
ZnSO₄:	Sulfato de zinc
RPM:	Revoluciones por minuto
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR RT:	Reacción en cadena de la polimerasa Tiempo Real
µl:	Micro litro
µm:	Micrómetro
nm:	Nanómetro
ng:	Nanógramo
gr:	Gramo

RESUMEN

En la actualidad, las serpientes han tenido un aumento en su demanda como mascotas exóticas en todo el mundo. Se sabe que las serpientes son portadoras de diversos patógenos dentro de los cuales destaca *Salmonella*, una bacteria que en estos animales no llega a causar problemas de salud graves, sin embargo, en humanos si es considerado un problema grave de salud. Del mismo modo, dentro de los parásitos más comunes entre las serpientes, se encuentran los nemátodos y protozoos. En el presente estudio se realizarán exámenes coproparasitológicos, así como microbiológicos para determinar e identificar parásitos y bacterias, que se encuentren presentes en el *Python regius*, quien es por otro lado una de las serpientes más comercializadas en el mundo. El objetivo del presente estudio es determinar la presencia de *Salmonella* y *Cryptosporidium* en esta especie de reptiles.

Palabras Claves: *Salmonella*, *Cryptosporidium*, *Python regius*, Protozooario, Mascota Exótica, Nuevo León

ABSTRACT

Currently, snakes have been in increasing demand as exotic pets worldwide. Snakes are known to carry *Salmonella*, a bacterium that does not cause serious health problems in these animals, but in humans it is a serious health problem. Similarly, among the most common parasites among snakes, are nematodes and protozoon. In the present study, coproparasitological as well as microbiological tests will be carried out to determine and identify parasites and bacteria respectively, in the *Python regius*, which is one of the most commercialized snakes in the world. The objective of the present study is to determine the presence of *Salmonella* and *Cryptosporidium* in this specie of reptiles.

Keywords: *Salmonella*, *Cryptosporidium*, *Python regius*, Protozoan, Exotic-Pet, Nuevo León

INTRODUCCIÓN

Los reptiles se han convertido en mascotas no convencionales cada vez más comunes en todo el mundo y se sabe que albergan diferentes patógenos gastrointestinales. Algunos de estos patógenos tienen potencial zoonótico (Hallinger *et al.*, 2018). Los reptiles desempeñan un papel importante como huéspedes finales o intermedios en los ciclos de vida de una amplia variedad de parásitos (Jacobson, 2007; Zelmer & Platt, 2008; Kusmierek *et al.*, 2019).

Los animales infectados albergan y eliminan bacterias en el medio ambiente que actúan como fuente de infección para otros y humanos susceptibles a través del contacto directo o indirecto, así como ambientes contaminados con sus heces (Gopinath *et al.*, 2012; Rukambile *et al.*, 2019). Varios factores, como el estrés fisiológico y la exposición a ambientes contaminados, pueden agravar la infección e incluso prolongarla. (Cummings *et al.*, 2009; Rukambile *et al.*, 2019).

Salmonella spp. y los *Oxiuridos* se encuentran entre los agentes bacterianos y parasitarios más comunes en los reptiles. Estos organismos se aíslan rutinariamente de tortugas e iguanas sanas, aunque las infecciones graves pueden causar una patología significativa. Los reptiles se consideran especies portadoras de *Salmonella*, un patógeno importante reportada en todo el mundo por su riesgo zoonótico (Dipineto *et al.*, 2012).

En los reptiles las infecciones por *Salmonella* spp. cursan generalmente de manera asintomática, la cual se encuentra en su mucosa gastrointestinal y de la cual se han aislado varios serovares de este patógeno, entre los que se han encontrado serovares patógenos asociados a reptiles y serovares patógenos asociados a humanos (Bjelland *et al.*, 2020). El objetivo de este proyecto será determinar la presencia de *Salmonella* spp y *Cryptosporidium* spp en *Python regius* cautivos en Nuevo León.

ANTECEDENTES

Biología de los ofidios

Termorregulación

Todos los reptiles son poiquilotérmicos (a veces denominados ectotérmicos); es decir, obtienen su temperatura corporal preferida desplazándose entre áreas de calor o de frío, buscando la termorregulación. Este comportamiento les facilita tener una temperatura adecuada y constante para poder realizar sus procesos fisiológicos de manera normal. Cada especie de reptil tiene su propia zona de temperatura corporal óptima para llevar a cabo todas las funciones vitales como lo son la respuesta inmune o la función cardíaca (Girling & Raiti, 2019).

La ectotermia tiene ciertas ventajas, como por ejemplo que no necesitan grandes fuentes de alimento para satisfacer la demanda de energía. Esta necesidad disminuida de energía les permite a los reptiles soportar la hibernación y el ayuno prolongado. Sin embargo, también hay desventajas como la necesidad de la temperatura para tener actividad, ya que a menor temperatura es mayor la inactividad y esto los vuelve vulnerables por la noche (Doneley *et al.*, 2018).

Tasa Metabólica

El metabolismo en los reptiles es lento, representando una quinta parte de lo que es el metabolismo de un mamífero. Esta tasa metabólica suele variar con la temperatura, la dieta, el tamaño y la especie. En el caso de los lagartos de gran tamaño como los monitores suelen tener su tasa metabólica más elevada que la de una boa o pitón (Doneley *et al.*, 2018).

Los reptiles como mascotas

De las casi 3400 especies de serpientes que existen, relativamente pocas son las que se conocen en la naturaleza y algunas son tan escasas que se encuentran en peligro de extinción. Las especies de serpientes que comúnmente son atendidas por un médico veterinario son principalmente de las familias, Boidae, Pythonidae y Colubridae (Divers & Mader, 2005).

En la época reciente, la cantidad de reptiles que son adquiridos como mascotas ha ido en aumento (Copping, 2008; Rinaldi *et al.*, 2012). Sin embargo, el adquirir este tipo de animales ya sean capturados de la naturaleza o criados en cautiverio, representa un riesgo de introducción de enfermedades tanto zoonóticas como no zoonóticas, y a causa de ello la medicina herpetológica ha ido cambiando y evolucionando con el paso de los años (Pasmans *et al.*, 2008; Rinaldi *et al.*, 2012). Existen diversos factores que pueden desencadenar la propagación de agentes patógenos, dentro de los cuales se encuentran, el estrés, el hacinamiento en un espacio inadecuado y la falta de higiene. Todos estos factores en conjunto pueden ocasionar la contaminación y posterior infección de otros animales y el ser humano (Rataj *et al.*, 2011; Dipineto *et al.*, 2012; Rinaldi *et al.*, 2012).

Comercio de reptiles en México

México es un país donde la actividad del comercio de animales exóticos y comercio de vida silvestre es muy común, ya que actúa como consumidor y productor a la vez, pero también en ocasiones actúa como país intermediario en el tránsito de especies de vida silvestre. No obstante, a pesar de todas estas actividades en las que participa México relacionadas a la vida silvestre no todas son actividades legales. El impacto que generan estas actividades ilícitas no solo implica la pérdida de vida silvestre, sino también afectaciones en los ámbitos económicos, sociales y de salud.

Como se mencionó anteriormente México, es un país que se caracteriza por ser consumidor, proveedor e intermediario en el comercio de fauna silvestre, un ejemplo de esto son los productos procesados en México, como lo son las pieles de reptiles exóticos que fueron importados, para posteriormente ser reexportados a mercados europeos, asiáticos o de Norteamérica. El comercio ilegal suele estar influenciado por la demanda de las personas por mascotas exóticas, comidas raras, trofeos y la medicina tradicional. La explotación de la fauna silvestre para satisfacer esta demanda está llevando al borde de la extinción a tigres, elefantes, aves exóticas, reptiles exóticos, rinocerontes y muchas otras especies. Sumado a esto, la aparición de nuevas enfermedades provenientes de la fauna como la gripe aviar, el Síndrome respiratorio agudo severo (SARS), que se puede propagar por el comercio ilegal de fauna silvestre, las cuales son motivo de preocupación para la salud pública (Herrera, 2015).

El ejemplo más reciente de este tipo de enfermedades es el SARS-CoV2 o también llamado COVID-19 el cual se plantea que se originó en un mercado húmedo en Wuhan, China, donde los murciélagos son la causa inicial del brote (Bonilla-Aldana *et al.*, 2020).

En nuestro país los reptiles que más se comercializan son los cocodrilos, las tortugas terrestres como acuáticas, las serpientes, las iguanas y las lagartijas, con los fines de mascotas, alimento, en la medicina tradicional, así como para la elaboración de prendas y accesorios con sus pieles (Semarnat, 2013; Herrera, 2015).

Actualmente las nuevas tecnologías han brindado al hombre tener diversas estrategias de comercializar la fauna silvestre, pero este proceso ha generado presión cada vez más intensa, llevando a especies al borde de la extinción, aunado a eso, las regulaciones mexicanas no han podido combatir este tipo de tráfico (Herrera, 2015).

Python regius

La Pitón bola (*Python regius*) es una de las serpientes más comercializadas en todo el mundo. La mayoría de estas serpientes se producen en granjas de África occidental desde la década de 1990. En el 2009, la especie se catalogó como “preocupación menor” por la unión internacional para conservación de la naturaleza (UICN) (Auliya & Schmitz, 2010; Auliya, 2020). En las últimas décadas ha ido en aumento la exportación de pitón bola de África (Específicamente de Ghana, Togo y Benín), la mayoría con destino a EUA (Robinson *et al.*, 2015; Auliya, 2020).

Morfología de la *Python regius*

La pitón regius es una serpiente de cuerpo pesado y musculosa con el cuello delgado y cabeza estrecha. La coloración normal en estado salvaje es de un color marrón oscuro, con manchas o bandas de color marrón más claro o amarillo. El tipo de patrón varía entre individuos, aunque en cautiverio este tipo de patrones se han modificado hasta obtener decenas de coloraciones y patrones distintos (también llamados “fases” o “morfos”) a través de las distintas generaciones de cría en cautiverio. La vida media de estas serpientes va desde los 20 años hasta los 30 años en cautiverio, pero se han documentado ejemplares de hasta 40 años (Funk, 2006; Rizzo, 2014). Las pitones bolas alcanzan su madurez sexual entre los 12-18 meses en el caso de machos y de los 24-36 meses en las hembras (Murphy *et al.*, 2003; Rizzo, 2014). En la naturaleza el periodo de cría se extiende desde el mes de noviembre hasta el mes de enero (Aubret *et al.*, 2005; Rizzo, 2014). Existen múltiples diferencias anatómicas entre la pitón regius y otros géneros dentro del orden Squamata. Por ejemplo, tienen cinco fosas labiales a cada lado de la boca, las cuales detectan el calor o la radiación infrarroja provenientes de sus presas (Sutherland, 2005; Funk, 2006; Rizzo, 2014).

Otra característica son los ojos que carecen de párpados, pero cuentan con una delgada escama transparente conocida como “gafa”. Más caudalmente cuentan con dos “espolones” uno a cada lado de la cloaca, los cuales se cree que son miembros pélvicos vestigiales (Funk, 2006; Rowland, 2011; Rizzo, 2014).

La pitón bola recién nacida mide entre 25 y 35 cm de longitud. Los adultos suelen alcanzar un tamaño entre 1.1-1.5 m de longitud, las hembras son más grandes que los machos con alrededor de 1.8 m de longitud (Murphy *et al.*, 2003; Rizzo, 2014).



Figura 1. Diferentes tipos de fases en *Python regius* (Fotografías tomadas por el MVZ. Francisco J. Hernández).

Taxonomía de *Python regius*

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Reptilia
Orden	Squamata
Familia	Pythonidae
Género	<i>Python</i>
Especie	<i>regius</i>

Tabla 1. Taxonomía de la *Python regius* (Pitón bola) (The IUCN Red List of Threatened Species, 2010)

Distribución

Esta serpiente es originaria de las sabanas de África del sur y se extiende desde el Sahara hasta el noroeste de Uganda (Barker & Barker 2006; Uetz *et al.*, 2019; Auliya, 2020). La pitón bola prefiere praderas, hábitat de sabana y tierras de labranza, normalmente habitan en madrigueras o termiteros abandonados (Murphy *et al.*, 2003; Rizzo, 2014). Varias pitones pueden compartir una misma madriguera, pero cuando es una hembra que ha colocado huevos lo más común es que se encuentre sola. Esta especie suele tener hábitos de caza durante la noche y durante el día duermen (Rizzo, 2014).

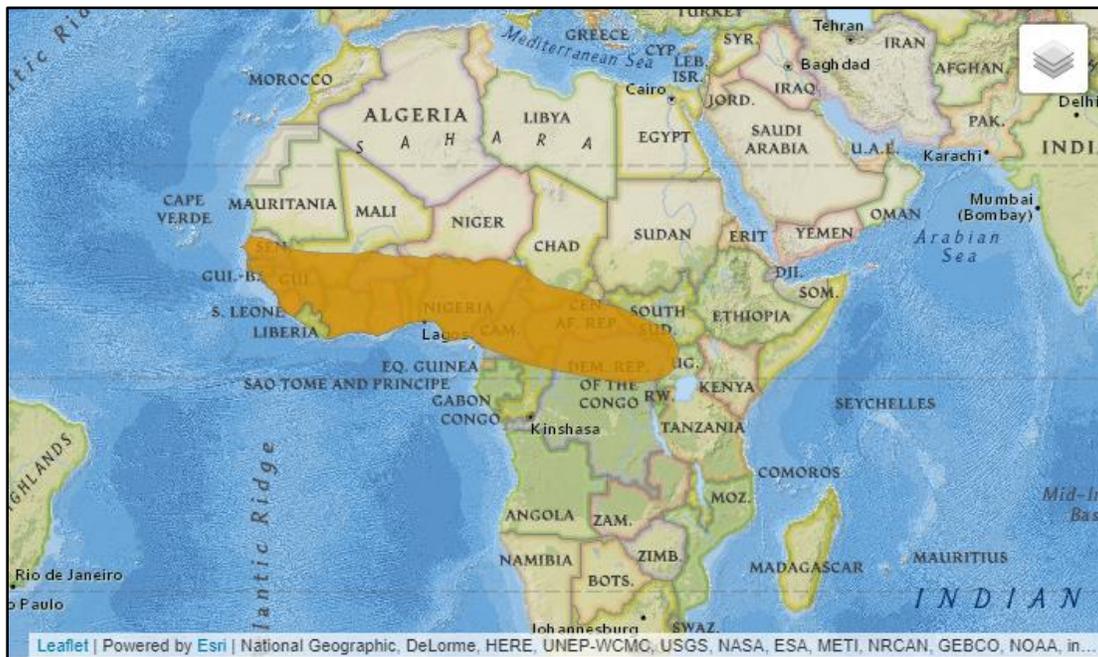


Figura. 2. Distribución de la *Python regius* en el mundo (IUCN 2012. *Python regius*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-2).

Enfermedades bacterianas en reptiles

Se ha demostrado que los reptiles están predispuestos a tener una gran cantidad de bacterias en su microbiota (Grupka *et al.*, 2006; Goupil *et al.*, 2012). El contacto estrecho entre personas y los reptiles se ha vuelto un problema de salud pública ya que estos animales son portadores de agentes zoonóticos como lo son bacterias del género *Mycobacterium*, *Chlamydia* y *Leptospira*. Algunos estudios han reportado la presencia de *Escherichia coli* en reptiles. Asimismo, se ha reportado *Clostridium difficile* en un dragón barbudo (*Pogona vitticeps*), siendo el primer informe de este agente en reptiles, sin embargo, no se comprobó potencial toxigénico en este caso (Lasheras *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2019).

En estudios recientes, se ha reportado que las serpientes tienen una eliminación intermitente de *Salmonella* spp. y que son portadoras de múltiples serotipos de esta bacteria. La presencia de *Salmonella* spp. en serpientes y en otro tipo de reptiles, se le ha relaciona a menudo como un riesgo de infección hacia los humanos. Se estima que en los Estados Unidos ocurren 74,000 casos de Salmonelosis aproximadamente, asociada al contacto con reptiles, lo cual representa el 6% de las infecciones por *Salmonella* en ese país. Por lo cual, las colecciones de reptiles son un riesgo para la salud pública (Mermin *et al.*, 2004; Goupil *et al.*, 2012). Algunas infecciones bacterianas producen cambios en el microbiota comensal a través de la pérdida de bacteria beneficiosas, lo que permite una colonización exitosa de las bacterias patógenas (Arguello *et al.*, 2018; Rukambile, 2019).

Salmonella

Se sabe que la salmonelosis es de las principales enfermedades de importancia en salud publica en todo el mundo. En 2013 se reportaron alrededor de 82,694 casos confirmados de salmonelosis humana en Europa. La gran mayoría de esos reportes en humanos fueron a causa de la ingesta de alimentos contaminados de origen animal. Pero, también se informaron casos de infección a causa del contacto con animales incluidos reptiles domésticos (EFS, 2015; Bertelloni *et al.*, 2016). *Salmonella* es una bacteria gramnegativa perteneciente a la familia enterobacteriaceae que puede sobrevivir durante semanas en ambientes secos y durante meses en ambientes húmedos. Las especies de *Salmonella* se conocen como patógenos zoonóticos que causan enfermedades tanto en humanos como en animales (Boyle *et al.*, 2007; Hossain *et al.*, 2019). El género *Salmonella*, puede dividirse taxonómicamente en 2 especies, *Salmonella entérica* y *S. bongori*.

De acuerdo con las características genéticas y bioquímicas, *S. entérica* puede subdividirse en subespecies como lo son: *entérica, salmae, arizonae, diarizonae, houtenae e indica* (Brenner *et al.*, 2000; Hossain *et al.*, 2019). De los mencionados anteriormente, *S. entérica* subsp. *entérica* se ha asociado con humanos y otros animales de sangre caliente y su transmisión es a través del consumo de alimentos contaminados ya sea de origen vegetal o animal (Bopp *et al.*, 2003; Hossain *et al.*, 2019). Generalmente se le considera un componente normal del microbiota intestinal de los reptiles. Se ha informado de su prevalencia hasta en un 90% en los reptiles, con una amplia gama de serovares identificados. Los reptiles normalmente eliminan *Salmonella* spp. en su excremento de manera intermitente y se ha informado que durante periodos de estrés (Transporte, manejo, enfermedad y hacinamiento) la carga bacteriana que excretan es aún mayor (Bjelland, 2020).

Taxonomía de *Salmonella*

Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacterales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Salmonella</i>

Tabla 2. Taxonomía de *Salmonella*

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), *Salmonella* es una enfermedad asociada a productos alimenticios contaminados a nivel mundial. En EE. UU., aproximadamente 1,35 millones de personas se infectan de esta bacteria y 420 muertes ocurren cada año debido a una infección por *Salmonella* no tifoidea. Se estima que el contacto directo con animales representa el 11% de los casos por enteritis por *Salmonella* (Bjelland, 2020).

Parásitos en reptiles

La mayoría de los reptiles, presentan una alta prevalencia para ser portadores de una gran variedad de parásitos debido a que viven en las condiciones ideales para la proliferación de éstos. Dentro de los factores que pueden influir en una mayor carga parasitaria se encuentran: la mala higiene, el hacinamiento de animales, así como una mala nutrición.

Es en estos casos donde la reinfección con las etapas infecciosas de los parásitos (quistes, ooquistes y huevos) puede provocar un intenso grado de parasitismo y causar la muerte de los huéspedes (Hallinger, 2020). Los reptiles cuentan con su propia fauna parasitaria, algunos parásitos son considerados patógenos y otros no (Slapeta, 2018).

Dentro de los parásitos que frecuentemente son encontrados están los protozoarios que normalmente son patógenos oportunistas secundarios que se clasifican como flagelados como las *Trichomonas*, *Giardia* y *Hexamita* que afectan el tracto gastrointestinal de los reptiles, pero también pueden afectar otros órganos como los riñones en los quelonios. El otro grupo de protozoarios son los ciliados como *Nyctotherus* y algunas especies de *Balantidium*, pero estos son considerados parte del microbiota normal de los reptiles. Por otro lado, también se encuentra el género *Coccidia* el cual es altamente patógeno para los reptiles, dentro de este género se encuentran las especies como *Caryospora*, *Eimeria* e *Isospora* (Machin, 2015). Otro grupo de parásitos son los nemátodos representado por *Rhabditia* el cual cuenta con dos géneros; *Strongyloides* y *Rhabdias*. El primero normalmente ocasiona daños intestinales produciendo enteritis. El segundo parasita los pulmones de las serpientes, llegando a causar neumonía, en los casos severos puede haber complicaciones con infecciones bacterianas secundarias (Slapeta, 2018). Los cestodos y trematodos requieren de un hospedero intermediario para poder completar su ciclo vital, por esta razón es poco frecuente encontrarlos en los reptiles, pero los huevos de cestodos son fáciles de identificar mientras que los trematodos comúnmente son encontrados en animales de vida libre.

Una alta población de este tipo de parásitos puede provocar problemas gastrointestinales como úlceras hemorrágicas y la muerte (Slapeta, 2018).

Cryptosporidium

La criptosporidiosis es considerada una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel global, es una patología de interés en medicina veterinaria, así como de salud pública, debido a esto pertenece a la categoría de enfermedades desatendidas de la organización mundial de la salud (OMS). *Cryptosporidium* es un protozooario reconocido por causar cuadros diarreicos en humanos. Las vías de transmisión de esta enfermedad incluyen la transmisión de persona a persona, la transmisión zoonótica, la transmisión por alimentos y la transmisión por el agua. (Nishikawa, 2020).

Recientemente se han reportado numerosos casos de criptosporidiosis en varios vertebrados, donde se incluyen reptiles, aves, anfibios, peces y mamíferos (incluyendo al humano), que se encuentran infectados y que pueden o no presentar signos clínicos de enfermedad. En humanos que se encuentran inmunodeprimidos se ha detectado la presencia de especies como *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium suis*, *Cryptosporidium muris* y *Cryptosporidium andersoni*. En humanos las 3 especies más comúnmente encontradas son *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis* y *C. meleagridis*; sin embargo, las especies *C. parvum* y *C. hominis* son responsables de más del 90% de los casos de criptosporidiosis. Curiosamente, en otros mamíferos se ha detectado la presencia de *C. parvum* y estos mamíferos se han reportado como huéspedes no humanos, lo que quiere decir que los parásitos se están adaptando para lograr infectar a más huéspedes que anteriormente no afectaban y esto es un grave problema de enfermedad zoonótica (Pumipuntu & Piratae, 2018).

Las especies de *Cryptosporidium* spp se pueden clasificar por el sitio preferido de infección. La gran mayoría se localizan en el tracto gastrointestinal y se dividen en especies gastrotrópicas y enterotrópicas (Plutzer & Karanis, 2009; Bogan, 2019).

Ciclo biológico y Morfología

El ooquiste de *Cryptosporidium* tiene un tamaño pequeño casi esférico de alrededor de 4-6 μm en promedio, pero se han presentado tamaños de 6-12 μm (Pumipuntu & Piratae, 2018). Primeramente, los ooquistes al ser ingeridos, inicia la fase de des enquistamiento donde liberan 4 esporozoítos infectantes, que invaden el borde en cepillo de los enterocitos forman una membrana parasitófora y se convierten en trofozoítos que pueden replicarse, formar un esquizonte y dar lugar a merozoitos.

Estos merozoítos al ser liberados invaden enterocitos sanos y forman una segunda esquizogonia la cuál libera más merozoítos que iniciarán la fase de gametogonia invadiendo células nuevas formando microgametos y macrogametos.

Los microgametos, al liberarse de la célula invaden otra y se encuentran con los macrogametos para llevar a cabo la fertilización donde se forma el cigoto que se transforma en un ooquiste. *Cryptosporidium* tiene 2 tipos de ooquistes; los de pared gruesa que son liberados al medio ambiente y los de pared delgada que no son liberados al medio ambiente, sino que se des-enquistan y vuelven a ser infectantes (Bouzid *et al.*, 2013).

Taxonomía de *Cryptosporidium*

Reino	Protista
Filo	Apicomplexa
Clase	Gregarinomorpha
Orden	Eucoccidioridia
Familia	Cryptosporidiidae
Género	<i>Cryptosporidium</i>

Tabla 3. Taxonomía de *Cryptosporidium*

Diagnóstico de *Cryptosporidium*

Existen numerosas técnicas para detectar *Cryptosporidium* en animales y humanos. Dentro de las cuales se incluyen, la histología, la examinación ultraestructural mediante biopsia, examinación de heces para observar la presencia de ooquistes y la detección de antígenos o ADN de *Cryptosporidium* (Smith, 2008; Mirhashemi *et al.*, 2015). Otros métodos para la detección de *Cryptosporidium* son las técnicas de tinción de inmunofluorescencia directa o indirecta, la detección de antígenos mediante el ensayo inmunoenzimático inmunoabsorbente (ELISA), así como diversas pruebas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Jex *et al.*, 2008; Kaushik *et al.*, 2008; Smith, 2008; Plutzer & Karanis, 2009; Mirhashemi *et al.*, 2015).

***Cryptosporidium* en Serpientes**

En los reptiles, *Cryptosporidium serpentis* y *Cryptosporidium testudines* son especies gastrotrópicas y *Cryptosporidium varanii* (anteriormente llamado *Cryptosporidium saurophilum*) y *Cryptosporidium ducismarci* son especies enterotrópicas (Pavlassek & Ryan, 2008; Jezkova *et al.*, 2016; Bogan, 2019). De las especies mencionadas anteriormente no se ha demostrado que sean zoonóticas (Zahedi *et al.*, 2016; Bogan, 2019).

También se han encontrado otras especies de *Cryptosporidium* en heces de reptiles, como lo son *Cryptosporidium baileyi*, *Cryptosporidium muris* y *Cryptosporidium parvum* (Xiao *et al.*, 2004; Richter *et al.*, 2001; Bogan, 2019). Sin embargo, estas especies no son patógenos en los reptiles y se consideran pseudoparásitos en estos animales (Cranfield *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2004; Pedraza-Díaz *et al.*, 2009; Richter *et al.*, 2011; Bogan, 2019). En cambio, muchos de estos pseudoparásitos si son considerados zoonóticos (Zahedi *et al.*, 2016; Bogan, 2019). La infección por *Cryptosporidium serpentis* en serpientes es caracterizada por una infección que puede ser crónica clínica o subclínica, además de por la presencia de gastritis hipertrófica, acompañada de pérdida de peso y mortalidad (Brownstein *et al.*, 1977, Paiva *et al.*, 2013). Esta enfermedad tiene importancia para los coleccionistas de serpientes porque puede ser letal y afectar a la colección entera. La atención tardía de esta enfermedad casi siempre termina con la eutanasia, lo que significa grandes pérdidas económicas (Carmel & Groves, 1997; Paiva *et al.*, 2013).

***Cryptosporidium* en México**

En México es desconocido el estatus de prevalencia epidemiológica de *Cryptosporidium* spp. En 2006, se dio conocer un estudio donde se detectó *Cryptosporidium* en 41% de 100 lactantes hospitalizados en una institución de salud pública en la ciudad de México (Sánchez-Vega *et al.*, 2006; Quihui-Cota *et al.*, 2017).

Posteriormente en 2013, se informó de la presencia de *C. parvum* en 19 de 38 muestras de agua destinada para su uso doméstico, así como en 12 de 13 comunidades que se incluyeron en el estudio (Olivas-Enríquez *et al.*, 2013; Quihui-Cota *et al.*, 2017). En 2010, se reportó que el 5.1% de 5459 lactantes de entre 1 mes de edad a 5 años presentaban *C. parvum* en Guadalajara, México (Larrosa-Haro *et al.*, 2010; Quihui-Cota *et al.*, 2017).

JUSTIFICACIÓN

Conocer las diferentes especies de patógenos tanto bacterianos como parasitarios que se encuentran presentes en la *Python regius* nos permitirá entender un poco más sobre el riesgo potencial al que están expuestos los propietarios de este tipo de mascotas no convencionales. La creciente demanda de estos reptiles como mascotas no convencionales es un fenómeno observado a nivel mundial, por otro lado, su capacidad para ser portadores de diversos patógenos, algunos de estos con potencial zoonótico es lo que justifica la realización del presente trabajo. Fundamentalmente porque en México no se ha documentado un estudio al respecto.

HIPÓTESIS

Los ofidios (*Python regius*) mantenidos en cautiverio en establecimientos dedicados a venta de reptiles son portadores de agentes patógenos con potencial zoonótico.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *Salmonella* spp y *Cryptosporidium* spp mediante análisis molecular, así como determinar la eficacia de diferentes métodos coproparasitológicos en *Python regius*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1- Determinar la eficacia de diferentes métodos coprológicos para la detección de parásitos en *Python regius*.
- 2- Determinar la presencia de *Salmonella* spp y *Cryptosporidium* spp mediante análisis moleculares.
- 3- Analizar los factores de riesgo asociados a la transmisión zoonótica.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizará en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL, en los laboratorios de microbiología y parasitología, las muestras de los animales serán provenientes de criadero de reptiles para su comercio. Se van a muestrear 110 serpientes (*Python regius*) provenientes de dos criaderos mediante hisopado cloacal entre los meses de junio 2020 y junio 2021, las cuales serán sometidas a un examen clínico (Divers & Stahl, 2019) para descartar los animales enfermos.

Selección de Animales

De las 110 serpientes se registraron los datos de anamnesis como lo son: especie, sexo, edad, temperatura medio ambiental, peso y tipo de alimentación (Fig.3). El criterio de exclusión será el de no utilizar animales que estén en proceso de ecdisis, tratamiento médico, animales con una cloaca pequeña, así como los animales alimentados el mismo día del muestreo.



Figura 3. Pesaje de *P. regius*.

Examen Físico

Parte de la selección de animales, será el examen físico en el cual se revisará la condición corporal, si se encuentra en ecdisis o no, cavidad oral/nasal libre moco y de abscesos caseosos, piel en buen estado, palidez o hiperemia de la mucosa oral. Todo esto de acuerdo con la Ley General de Vida Silvestre DOF 19-01-18.

Manejo y Contención

En cautiverio es muy importante realizar un manejo correcto y adecuado a cada especie de reptil, ya que la mayoría de los accidentes con reptiles se deben a fallas en los procedimientos de contención y restricción o desconocimiento de las técnicas apropiadas para el reptil. Existen herramientas que nos ayudan a realizar de mejor manera y con mayor seguridad el manejo de serpientes, dentro de las cuales se encuentran los ganchos herpetológicos, los tubos de contención, las pinzas herpetológicas entre otras. Es importante utilizar la herramienta adecuada al manejar una serpiente, hay que tener en cuenta que la longitud de el gancho debe ser mayor a dos tercios del largo de la serpiente ya que este es el rango de ataque de las serpientes. El manejo realizado en este estudio fue el de utilizar los ganchos herpetológicos, tomando a la serpiente por la parte ventral en el tercio medio del cuerpo. Cuando la serpiente es pesada se recomienda utilizar dos ganchos para realizar el manejo (Lock, 2008; Rodríguez & Varela, 2014).

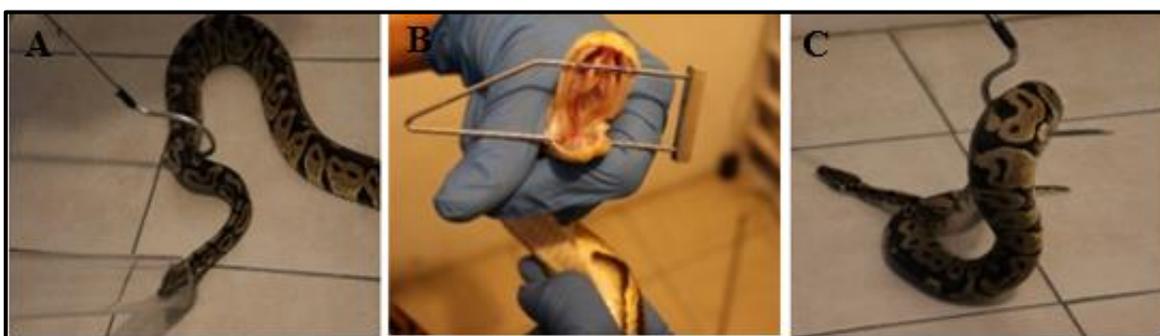


Figura 4. Uso de herramientas herpetológicas para el manejo y contención de ofidios. **A,** Uso de gancho herpetológico y tubo de contención. **B,** Uso de especulas para examinar cavidad oral. **C,** Uso de gancho herpetológico.

Metodología Parasitológica

Para cada muestra de heces de las serpientes se emplearon 3 métodos coprológicos. Primero, se realizó la técnica de copro directo utilizando solución salina fisiológica. Se tomaron 1gr de heces con un hisopo sin algodón y se maceró al contacto con la solución salina en el portaobjetos (Rodríguez-vivas., 2015). Una vez lista la muestra se colocó un cubreobjetos y se observó en el microscopio óptico (Primo Star, Zeiss) a aumentos de 10x, 40x.

En segundo lugar, se realizó la técnica de flotación con solución glucosada o técnica de Sheather (Rodríguez-vivas., 2015), donde se colectaron 5 gr de heces que se maceraron en un mortero con ayuda del pistilo y una vez obtenida una consistencia pastosa se vació la muestra en un tubo de ensayo utilizando un colador y un embudo hasta que se formara una cúpula en la superficie del tubo y se le colocó un cubreobjetos. Se dejó reposar cada muestra por un periodo de 30 minutos y posterior a ello se tomó el cubreobjetos y se colocó en un portaobjetos para su observación en el microscopio óptico. En tercer lugar, se realizó la técnica de flotación con solución sulfato de zinc ($ZnSO_4$) y se realizó el mismo procedimiento de la solución glucosada. Por último, se realizó la tinción de Kinyoun para la detección de *Cryptosporidium* spp., la cual es una técnica de Ziehl-Neelsen modificada, la cual emplea los siguientes 3 reactivos: fucsina básica al 1%, alcohol ácido al 70% y verde brillante al 1%. Inicialmente se tomó una pequeña cantidad de heces con aplicador de madera y se realizó un frotis en el portaobjetos lo más delgado posible, posterior a esto se seca la laminilla con calor utilizando un mechero y una vez seco se le agregó la fucsina básica por un periodo de tiempo de 2 minutos, pasado ese tiempo se le quitó el excedente de fucsina con alcohol ácido para decolorar la muestra y luego se volvió a lavar la laminilla con agua destilada para retirar el exceso de alcohol, por último se agregó verde brillante en la laminilla por un periodo de tiempo de 30 seg – 1 min y se retiró el excedente de tinción con agua destilada. Ya lista la laminilla se procedió a observar la muestra en el microscopio óptico (Primo Star, Zeiss) en aumento de 100x (Xiao & Cama, 2018).

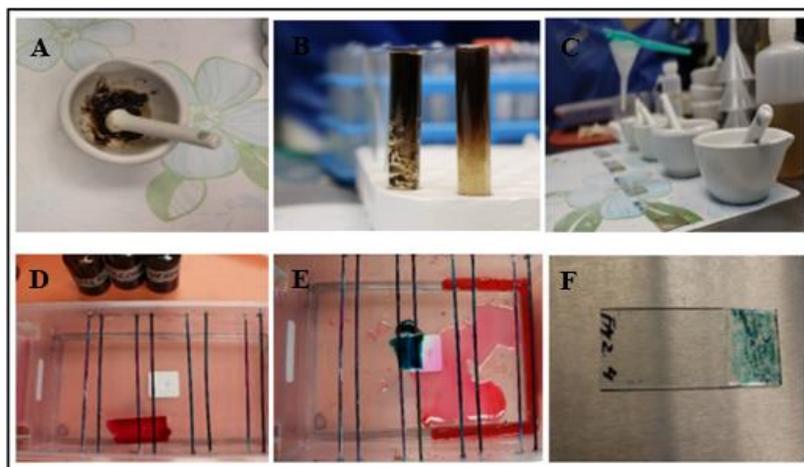


Figura 5. A, Maceración de heces utilizando mortero. B y C, Técnica de flotación (sol. glucosada). D, Tinción Kinyoun (Uso de fucsina). E, Tinción Kinyoun (Uso de verde brillante). F, Laminilla con tinción lista para su observación en microscopio.

Metodología microbiológica

Extracción de ADN

La extracción se llevó a cabo al añadir 500 µl de muestra y 500 µl de buffer de lisis. Posteriormente se incubó a 65°C por el periodo de 1 hora en baño maría, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm x 1 min. Después se le agregaron 500 µl de fenol-cloroformo y se homogenizó la muestra. Después se volvió a centrifugar a 13,000 rpm x 15 min. Se retiraron 350 µl del sobrenadante y se colocó en un tubo eppendorf nuevo. Se agregaron 65 µl de acetato de sodio y 75 µl de NaCl y se agitó suavemente. Se dejaron en congelación x 30 min. Se realizó la centrifugación a 12,000 rpm x 10 min y se recogieron 500 µl del sobrenadante para añadirle 270 µl de isopropanol y dejar lo por 30 min en el congelador. Se centrifugó a 10,000 rpm x 10 min. Posteriormente, se eliminó todo el sobrenadante, se añadieron 500 µl de etanol al 70% y se resuspendió el pellet. Se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm x 5 min y eliminamos el sobrenadante. Colocamos de manera invertida en la incubadora de 37° C x 30 min para que secase. Se resuspendió el pellet en 20 µl de buffer TE (Green & Sambrook, 2012; Ríos-Sanches *et al.*, 2020).

Análisis y Cuantificación de ADN

Para verificar la pureza y cantidad del ADN obtenido de las muestras de heces, se realizó un análisis por espectrofotometría (Epoch Biotek instruments, EE. UU. Software Gen5TM Microplate Reader (Biotek instruments, EE. UU.) a 260 nm y 280 nm. La lectura a 260 nm nos proporcionó la cantidad de ADN y la relación 260/280 nm la pureza del ADN obtenido. Las preparaciones puras de ADN tienen un valor de 260/280 de 1.8, (Wilfinger *et al.*, 1997).

Amplificación de *Salmonella* spp en PCR Punto final

La amplificación por PCR se realizó mediante el uso de los primers 5'-TATAGCCCCATCGTGTAGTCAGAAC-3' y 5'-TGCGGCTGGATCACCTCCTT-3'(312bp). Comenzó con una temperatura de 94°C x 3 min, seguido de 35 ciclos de amplificación que consiste en desnaturalizar el DNA por 30 segundos a 94° C disminuyendo a 61° C por 35 min para la extensión por 35 seg. por 72°C en cada paso (Park, YS *et al.*, 2006).

Amplificación de *Cryptosporidium* spp en PCR Tiempo Real

La amplificación por PCR se realizó mediante el uso de los primers FWD 5' GCT TTA GAC GGT AGG GTA TTG G3' y REV 5' AGA TGT GGT AGC CGT TTC TCA 3'. Se utilizó el equipo Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1.49 Machine Serial No. 050803.

Electroforesis

Los fragmentos amplificados, se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en Tampón TBE (0.09 M Tris, 0:09 M ácido Bórico y 2 MM de EDTA, pH 8.3) (Park, YS *et al.*, 2006). Los geles fueron visualizados mediante el foto-documentador UV-Transilluminator MultiDoc-It Digital Imaging System, Modelo MultiDoc-1.

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos de las frecuencias de positivos y negativos tanto de *Salmonella* spp como *Cryptosporidium* spp fueron expresados en porcentajes, y los resultados obtenidos de las técnicas parasitológicas se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Xi cuadrada en el programa Minitab 17 Statistical Software.

RESULTADOS

Evaluación Parasitológica

Los resultados del presente estudio mostraron la presencia de nemátodos y protozoarios (Fig. 6.) en las serpientes de los dos criaderos que se muestrearon (2/2), sin embargo, hubo diferencias entre ambos criaderos de reptiles.

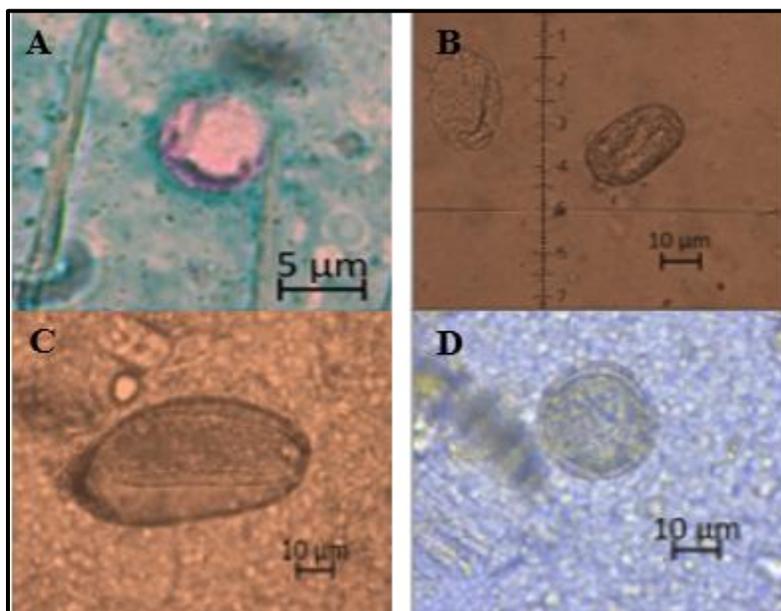


Figura 6. A, Ooquiste de *Cryptosporidium* spp de 6 μm ., tinción Kinyoun, objetivo 100x. B, *Strongyloides* spp., solución glucosada, objetivo 40x. C, Huevo de *Oxyurus* spp. solución ZnSO₄, objetivo 40x. D, *Caryospora* spp. solución ZnSO₄, objetivo 40x.

Tabla 4. Número, frecuencia y origen de animales positivos a endoparásitos en *P. regius*

Especie de serpiente	No. de animales muestreados	Origen (Criadero 1/ Criadero 2)	Total	Positivos a endoparásitos (%)
<i>Python regius</i>	90	1	66	73%
<i>Python regius</i>	20	2	7	35%

Tabla 5. Frecuencia de parásitos en serpientes examinadas

Filo/Clase	Especie de parásito	Frecuencia (%)
Nematelmintos/Nematoda	<i>Strongyloides</i> spp	28.18%
Nematelmintos/Nematoda	<i>Oxyuris</i> spp	26.63%
Apicomplexa/Gregarinomorphea	<i>Cryptosporidium</i> spp	6.3%
Apicomplexa/Coccidia	<i>Eimeria</i> spp	7.27%
Apicomplexa/Coccidia	<i>Caryospora</i> spp	0.9%

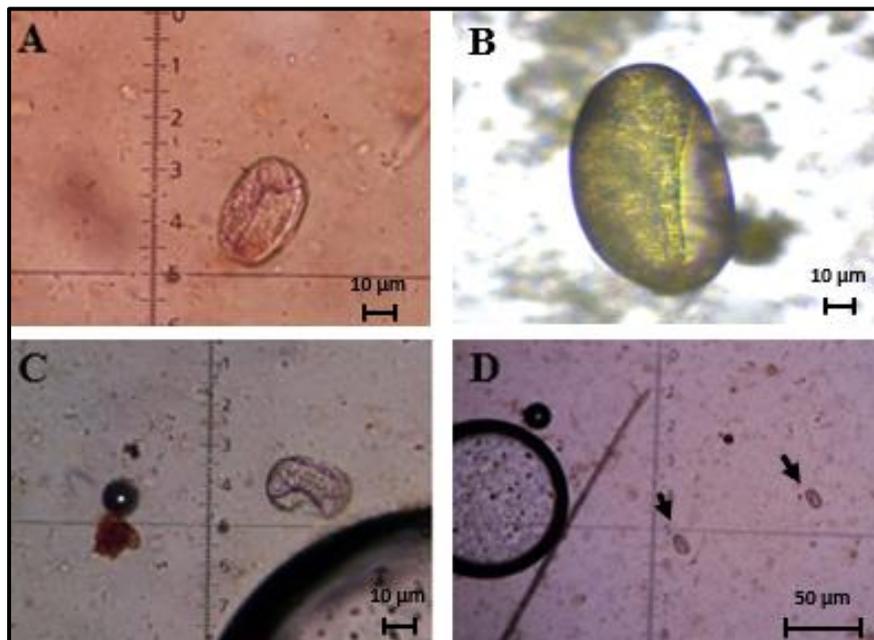


Figura 7. A, *Strongyloides* spp., solución glucosada, objetivo 40x. **B,** Huevo de *Oxyuris* spp. solución ZnSO₄, objetivo 40x. **C,** *Strongyloides* spp., solución glucosada, objetivo 40x. **D,** *Strongyloides* spp., solución glucosada, objetivo 10x.

Tabla 6. Comparación entre diferentes técnicas de diagnóstico de parásitos en *P. regius*

Parásito	Copro directo	Flotación Glucosada	Flotación ZnSO4
<i>Strongyloides spp</i>	10	18	20
<i>Oxyuris spp</i>	8	16	17
<i>Cryptosporidium spp</i>	0	0	0
<i>Eimeria spp</i>	0	11	11
<i>Caryospora spp</i>	0	0	1

Tabla 7. Xi cuadrada de Pearson

Técnicas	Positivos	Negativos	Total
Copro directo	18	92	110
Copro flotación glucosada	44	66	110
Copro flotación ZnSO4	49	61	110
Total	111	219	330

Pearson Chi-Square = 22.562, DF = 2, P-Value = 0.000

Likelihood Ratio Chi-Square = 24.186, DF = 2, P-Value = 0.000

Tablas $\chi^2 = (\alpha, H-1, C-1) = [0.05, (2-1=1) * (3-1=2)] = (0.05, 2) = 5.99$

Si χ^2 Calculada es $> \chi^2$ de Tablas se rechaza Ho.

22.562 $>$ 5.99 Hay efecto de Tratamiento

Conclusión: La técnica de flotación con ZnSO4 es mejor (P<0.05) para la detección de parásitos en *P. regius*.

Tinción Kinyoun

Se analizaron un total de 110 muestras mediante la tinción de Kinyoun (Fig. 8). Se emplearon dos variantes de la técnica, la primera utilizando los colorantes de: fucsina básica, alcohol ácido, y azul de metileno (En ese orden). La segunda variante se emplearon los colorantes de: fucsina básica, alcohol ácido y verde brillante. En 7 de las 110 serpientes (6.3%), se detectaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp mediante esta técnica.

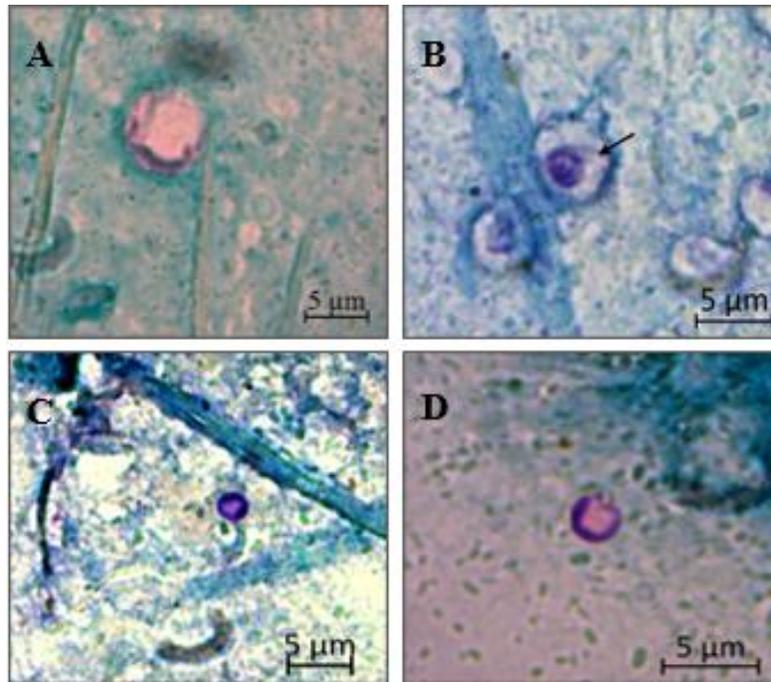


Figura 8. Ooquiste de *Cryptosporidium* spp, objetivo 100x, utilizando verde brillante **A & D**. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp, objetivo 100x, utilizando azul de metileno **B & C**.

Evaluación Microbiológica

Extracción y Cuantificación de ADN

El ADN extraído se analizó mediante electroforesis y espectrofotometría. Una vez cuantificado el ADN y teniendo en cuenta que se requieren de 10-200 ng para una reacción de PCR (Velázquez *et al.*, 2014) se realizaron diluciones del ADN para obtener una concentración de entre 100-150 ng/ μ l y una pureza de 1.8 considerando la proporción de absorbancia de 260-280 nm.

Detección de *Salmonella* spp mediante PCR Punto Final

Las amplificaciones de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% y se visualizaron mediante espectrofotometría.

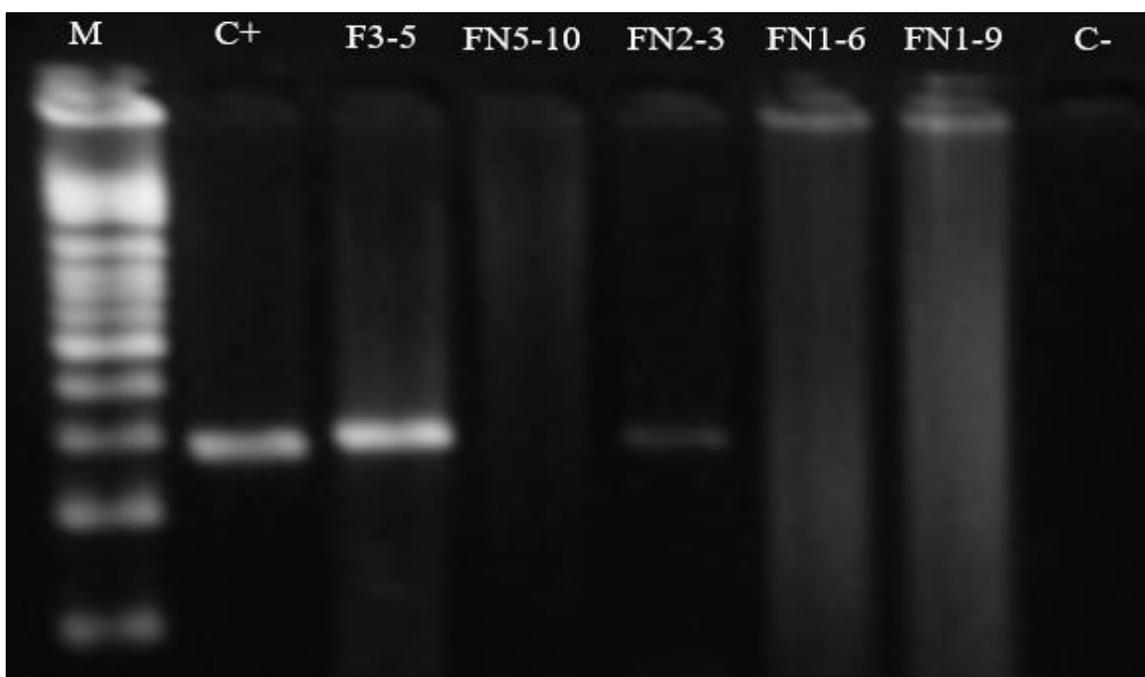


Figura 9. Amplificación por PCR con primers en muestras de heces de *P. regius*. Electroforesis en gel de agarosa de 1.5%. Marcador de peso molecular de 100 pb, C+; control positivo, muestras carril 1-5, C-; control negativo.

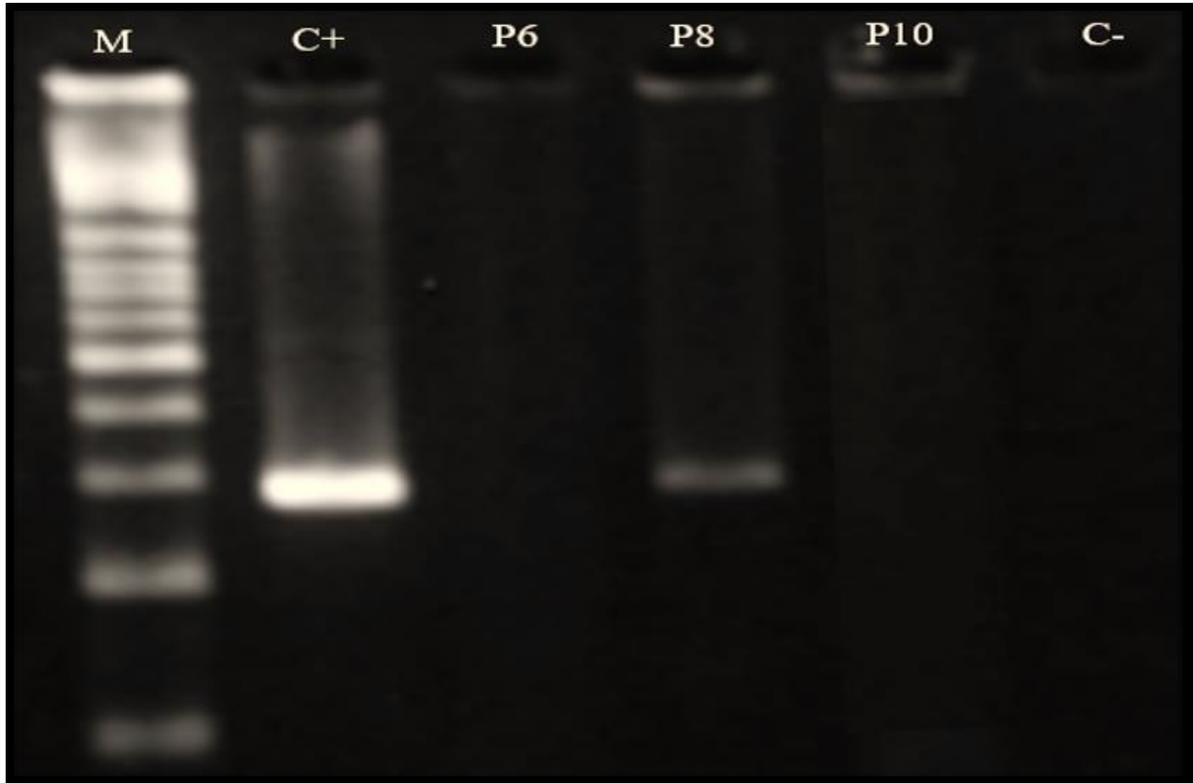


Figura 10. Amplificación por PCR con primers en muestras de heces de *P. regius*. Electroforesis en gel de agarosa de 1.5%. Marcador de peso molecular de 100 pb, C+; control positivo, muestras de pools 6, 8, y 10, C-; control negativo.

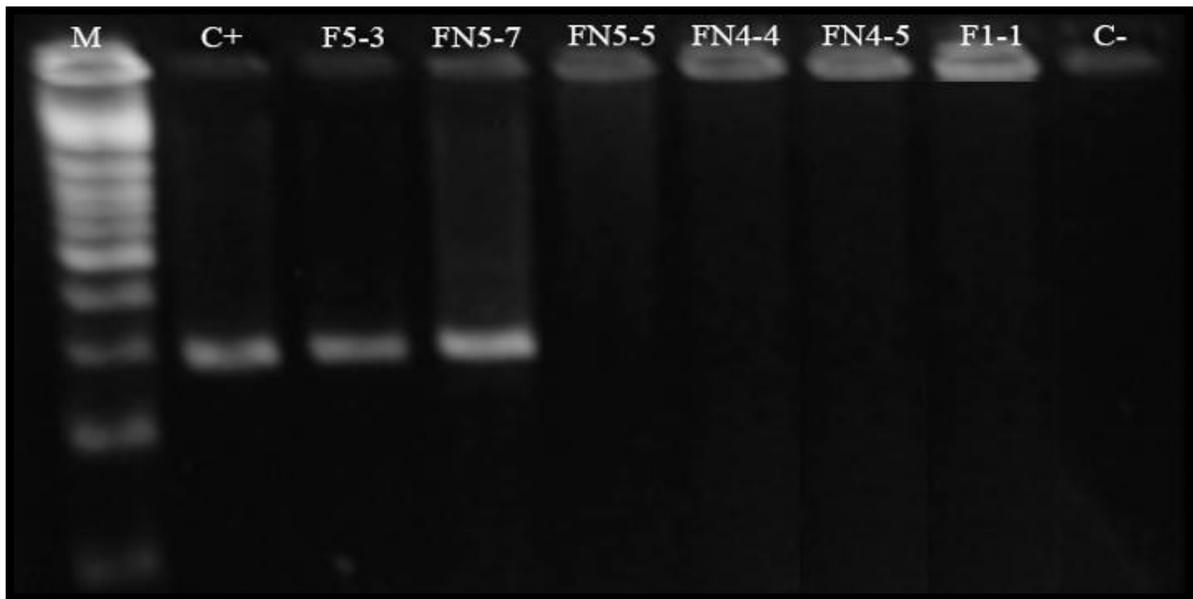


Figura 11. Amplificación por PCR con primers en muestras de heces de *P. regius*. Electroforesis en gel de agarosa de 1.5%. Marcador de peso molecular de 100 pb, C+; control positivo, muestras carril 1-5, C-; control negativo.

Detección de *Cryptosporidium* spp mediante PCR Tiempo Real

La PCR tiempo real mostró un mayor número de animales positivos para *Cryptosporidium* spp. obteniendo un total del 24 positivos (Tabla 8). Existe diferencia entre la PCR en tiempo real y la técnica kinyoun para detectar *Cryptosporidium* spp.

Tabla 8. Frecuencia (%) de *Cryptosporidium* spp por microscopia y RT PCR

Especie	# de muestras	Tinción Kinyoun %	RT PCR %
<i>Python regius</i>	110	7 (6.3%)	24 (21.81%)

Tabla 9. Comparación entre microscopia y RT PCR para la detección de *Cryptosporidium* spp.

Técnicas	Positivos	Negativos
Tinción kinyoun	7	103
RT-PCR	24	86

Tabla 10. Muestras analizadas mediante RT-PCR para la detección de *Cryptosporidium* spp.

Color	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (%)	Calc Conc (%)
	C+ <i>Cryptosporidium</i> spp	Positive Control	11,99	POSITIVO		129622208,565006
	F3 (5)	Unknown		NEG (NTC)		
	FN2 (4)	Unknown		NEG (NTC)		
	F17 (7)	Unknown	30,67	POSITIVO		282,107511025646
	FN 1(10)	Unknown		NEG (NTC)		
	RR	Unknown		NEG (NTC)		
	F2 (2)	Unknown		NEG (NTC)		
	FN1 (3)	Unknown		NEG (NTC)		
	F3 (3)	Unknown		NEG (NTC)		
	FN1 (5)	Unknown		NEG (NTC)		
	FN2 (5)	Unknown		NEG (NTC)		
	F4 (3)	Unknown		NEG (NTC)		
	F5 (3)	Unknown		NEG (NTC)		
	FN1 (6)	Unknown		NEG (NTC)		
	FN1 (4)	Unknown		NEG (NTC)		
	FN2 (2124)	Unknown		NEG (NTC)		
	FN2 (4)	Unknown		NEG (NTC)		
	C- <i>Cryptosporidium</i> spp	NTC		NEG (NTC)		

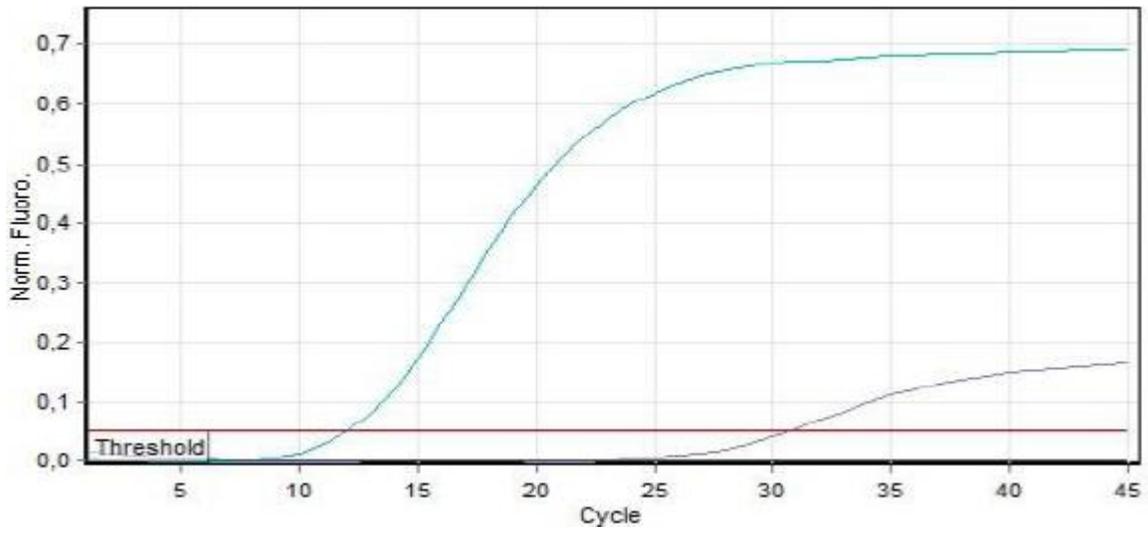


Figura 12. Curva estándar del PCR en Tiempo Real para *Cryptosporidium* spp de la tabla 10.

Tabla 11. Muestras representativas analizadas mediante RT-PCR para la detección de *Cryptosporidium* spp.

Color	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (copies/ul)	Calc Conc (copies/
Red	F8	Unknown		NEG (NTC)		
Yellow	F5	Unknown		NEG (NTC)		
Blue	F4 (5)	Unknown		NEG (NTC)		
Purple	F3 (3)	Unknown		NEG (NTC)		
Pink	F3 (5d)	Unknown	30,86	POSITIVO		247
Light Blue	F4 (3)	Unknown		NEG (NTC)		
Teal	FN1 (10)	Unknown	24,84	POSITIVO		16428
Light Red	FN5 (5d)	Unknown		NEG (NTC)		
Light Green	F3 (8)	Unknown	32,32	POSITIVO		89
Magenta	FN1 (7d)	Unknown		NEG (NTC)		
Black	FN1 (7)	Unknown		NEG (NTC)		
Cyan	RR (4)	Unknown	23,89	POSITIVO		31900
Light Yellow	F2 (7)	Unknown	28,72	POSITIVO		1095
Light Green	F2 (3)	Unknown		NEG (NTC)		
Light Teal	FN5 (1d)	Unknown		NEG (NTC)		
Light Blue	F4 (5d)	Unknown		NEG (NTC)		
Purple	F4 (7)	Unknown		NEG (NTC)		
Pink	FN5 (7)	Unknown	36,81	POSITIVO		4
Light Pink	F4 (8)	Unknown		NEG (NTC)		
Red	F2 (5)	Unknown		NEG (NTC)		
Light Yellow	F3 (5)	Unknown		NEG (NTC)		
Light Green	FN2 (4)	Unknown		NEG (NTC)		
Teal	F8 (3)	Unknown		NEG (NTC)		
Blue	F3 (3)	Unknown		NEG (NTC)		
Dark Blue	FN3 (6)	Unknown	33,30	POSITIVO		45
Purple	F1 (2)	Unknown		NEG (NTC)		
Light Grey	F12 (2)	Unknown		NEG (NTC)		
Grey	FN3 (5)	Unknown	33,55	POSITIVO		38
Dark Grey	F1 (6)	Unknown		NEG (NTC)		
Dark Grey	F2 (7)	Unknown	26,52	POSITIVO		5104
Dark Grey	RR4	Unknown	31,75	POSITIVO		133
Red	FN3 (2)	Unknown		NEG (NTC)		
Yellow	F1 (3)	Unknown	30,97	POSITIVO		227
Blue	F2 (7)	Unknown		NEG (NTC)		
Purple	F2 (3)	Unknown	32,72	POSITIVO		67
Pink	F4 (8)	Unknown		NEG (NTC)		
Light Blue	F3 (1)	Unknown		NEG (NTC)		
Teal	FN5 (1d)	Unknown		NEG (NTC)		

Tabla 12. Muestras representativas analizadas mediante RT-PCR para la detección de *Cryptosporidium* spp.

FN5 (4)	Unknown		NEG (NTC)	
RR2	Unknown		NEG (NTC)	
FN2 (11)	Unknown	29,92	POSITIVO	476
FN1 (4)	Unknown		NEG (NTC)	
FN2 (2)	Unknown	30,72	POSITIVO	272
FN5 (3)	Unknown		NEG (NTC)	
FN1 (10)	Unknown		NEG (NTC)	
FN3 (4)	Unknown	29,92	POSITIVO	475
FN3 (12)	Unknown		NEG (NTC)	
FN1 (8)	Unknown		NEG (NTC)	
FN2 (2)	Unknown		NEG (NTC)	
RR3	Unknown		NEG (NTC)	
FN5 (10)	Unknown		NEG (NTC)	
F2 (8)	Unknown	28,95	POSITIVO	935
FN2	Unknown		NEG (NTC)	
FN3 (1)	Unknown		NEG (NTC)	
FN1 (10)	Unknown	24,18	POSITIVO	26078
FN3 (8)	Unknown	27,01	POSITIVO	3608
FN3 (6)	Unknown	31,59	POSITIVO	148
C+ <i>Cryptosporidium</i> spp	Positive Control	12,83	POSITIVO	71847887
C- <i>Cryptosporidium</i> spp	Negative Control		NEG (NTC)	
F8 (3)	Unknown		NEG (NTC)	

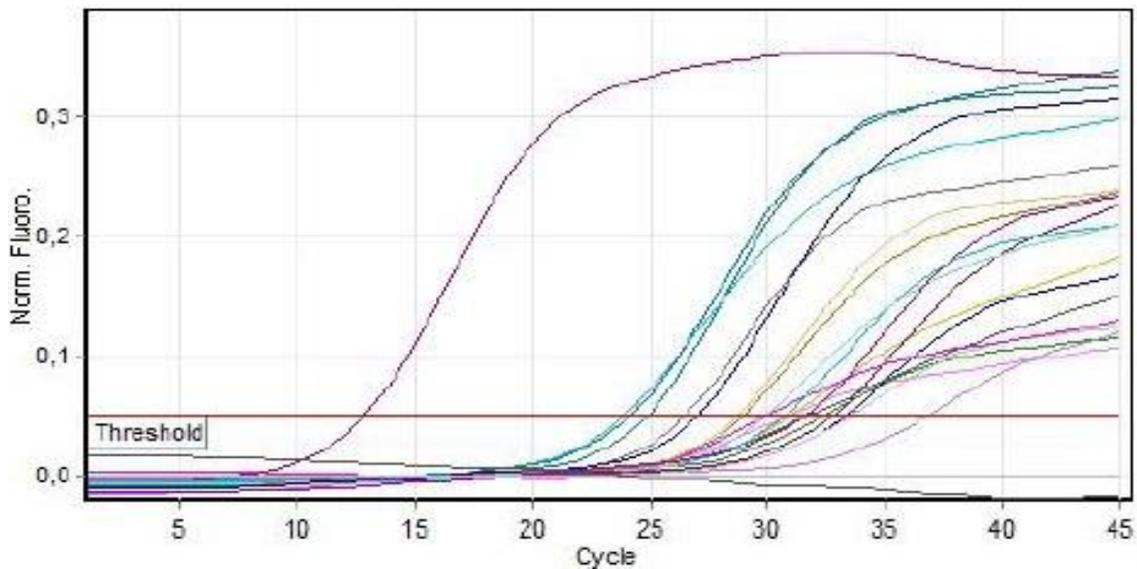


Figura 13. Curva estándar del PCR en Tiempo Real para *Cryptosporidium* spp (Tablas 10.1-10.2).

DISCUSIÓN

Los reptiles en general suelen eliminar agentes parasitarios al medio ambiente en el que se encuentran de manera intermitente y algunos de ellos causan enfermedades en los humanos. Al igual que en estudios previos (Cervone *et al.*, 2016), los resultados obtenidos en este estudio coinciden en que los reptiles mantenidos en cautiverio como mascotas no convencionales son portadores de agentes parasitarios con potencial zoonótico. De acuerdo con Hallinger *et al.*, 2020, *Kalicephalus* spp. fue el parásito (3.3%) con mayor prevalencia en las muestras de heces obtenidas de serpientes, mientras que en nuestro estudio el parásito que más comúnmente se encontró fue, *Strongyloides* spp con un 28.18%. Otros de los parásitos reportados por Hallinger *et al.*, 2020 y que también se hallaron en nuestro estudio fueron *Eimeria* spp (0.4%), *Caryospora* spp (0.2%) *Cryptosporidium* spp (0.2%), los cuales fueron menores a los porcentajes que obtuvimos nosotros. A diferencia del trabajo de Hallinger *et al.*, 2020, donde no encontraron *Oxyuris* spp, en nuestro estudio si se evidenció en un 26.63 % de este parásito. En investigaciones previas (Pasmans *et al.*, 2008) se ha reportado la presencia de parásitos como, *Strongyloides*, *Capillaria*, *Heterakis* y *Ascaroideos*, los cuales representan un grave problema de salud. En nuestro estudio no se encontraron estos géneros parasitarios, una causa de esto puede ser, que son serpientes de criadero, más sin embargo si fue detectada la presencia de *Strongyloides*. Otros estudios (Rom *et al.*, 2018) reportan la presencia de trematodos en los reptiles, pero como estos requieren de un hospedero intermediario y al ser animales de criadero los de nuestro estudio, se reduce la posibilidad de que se cumpla este ciclo. A diferencia de lo reportado por (Hallinger *et al.*, 2020), donde encontraron trematodos como *Plagiorchiidae*.

En trabajos previos (Ayinmode *et al.*, 2010) se menciona la presencia de pentastómidos en reptiles, los cuales tienen un alto potencial zoonótico, sin embargo, en nuestro estudio no fue evidenciado la presencia de este parásito debido a que todos los ejemplares muestreados nacieron en cautiverio y no fueron tomados de la naturaleza. Además de que los reportes existentes evidencian la presencia de este tipo de parásitos mediante la necropsia. Anteriormente, Rinaldi *et al.*, 2012, detectó algunos pseudoparásitos como los son *Hymenolepis nana*, *Trichuris muris* y *Syphacia obvelata*.

De acuerdo con Mustafa *et al.*, 2018, los hallazgos de *Oxyuris* spp deben ser interpretados con cuidado, ya que se pudiera tratar de *Oxyuris* spp proveniente de roedores o de huevos del género *Myocoptes/Myobia*, ácaros comunes en roedores, los cuales son alimento de las serpientes. En el presente estudio, los pseudoparásitos detectados fueron estadios parasitarios provenientes de roedores que sólo transitan por el intestino de las serpientes como lo es *Myocoptes* spp.

En cuanto a las pruebas coprológicas en nuestro estudio, el mejor método de diagnóstico de endoparásitos en serpientes (*Python regius*) fue la técnica por flotación con sulfato de zinc (ZnSO₄) por encima del método de flotación con solución glucosada y el copro directo, lo cual coincide con lo reportado por Wolf *et al.*, 2014.

Por otro lado, los resultados obtenidos de la técnica Kinyoun para la detección de *Cryptosporidium* spp fueron muy similares a los obtenidos por Hallinger *et al.*, 2020 donde obtuvieron un porcentaje de (1.4%) similar al obtenido en nuestro trabajo. A diferencia de lo reportado por Mirhashemi *et al.*, 2015, donde obtuvieron porcentajes considerablemente superiores del 48.4% en la detección de *Cryptosporidium* en ovinos, 38.5% en bovinos y 19.4% en equinos.

En cuanto a la técnica de PCR para detectar *Cryptosporidium* spp en nuestro estudio se obtuvo una prevalencia del 15.45% mientras que en la técnica por microscopia (Kinyoun) se obtuvo un 6.3%, lo cual se asemeja a lo reportado por Altamimi & Zubaidi, 2020, donde obtuvieron resultados del 11% para la técnica molecular de PCR y un 6% para la técnica convencional de microscopia en palomas silvestres (*Columbia livia*).

Salmonella

Además de los agentes parasitarios los reptiles suelen eliminar microorganismos bacterianos que tienen el mismo nivel de importancia debido a su potencial zoonótico como lo es *Salmonella* que en la mayoría de los casos puede afectar a niños, adultos mayores y personas inmunocomprometidas (Drózdź *et al.*, 2021). Varios grupos de investigación han reportado y estudiado la presencia de *Salmonella* spp en diferentes especies de reptiles alrededor del mundo, principalmente en Europa y E.U.A, sin embargo, en México no se cuenta con algún estudio que profundice en el tema.

Por lo que el presente estudio es el primero en relación con la detección de *Salmonella* spp en reptiles mantenidos en cautiverio en México específicamente hablando de la especie *Python regius*. En este estudio se detectó *Salmonella* spp en el 5.45% de los ejemplares incluidos en el presente trabajo, dato que difiere a lo reportado por Ríos *et al.*, 2021 quienes reportaron la presencia de *Salmonella* en un 61.53% en iguana negra de cola espinosa (*Ctenosaura similis*).

Ramos *et al.*, 2019, reportó la presencia de *Salmonella* en un 40% detectado por PCR en serpientes mantenidas en cautiverio y en estado libre. Fagre *et al.*, 2020 también reporto la presencia de *Salmonella* mediante la técnica de qPCR en un 26% del orden squamata y quelonia los cuales eran ejemplares que recibieron en un hospital veterinario. Por otro lado, Pawlak *et al.*, 2020, reportó la presencia de *Salmonella* spp en culebras (*Natrix natrix*) de vida libre en un 22%. En otro estudio (Cota *et al.*, 2021) se informa la identificación de *salmonella* en reptiles mantenidos en cautiverio como mascotas exóticas en un 41% del cual el 50% pertenecían al orden de los ofidios, el 51.2% al orden de los saurios y el 20.9% al orden de los quelonios.

CONCLUSIÓN

El presente estudio demuestra que las serpientes del género *Python regius* mantenidas en cautiverio son portadoras de agentes con potencial zoonótico. El método Coproparasitológico que resultó ser más sensible para la detección de *Cryptosporidium* fue la técnica de concentración por flotación empleando la solución sulfato de Zinc. Mientras que la técnica en general que mostró la mayor sensibilidad para detectar a los patógenos estudiados en el presente trabajo (*Cryptosporidium* y *Salmonella*) fue la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

BIBLIOGRAFÍA

- ▶ Hallinger, M., Taubert A., Hermosilla, C. Mutschmann, F. (2018). Occurrence of health compromising protozoan and helminth infections in tortoises kept as pet animals in Germany. *Parasites Vectors* 11, 352. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2936-z>
- ▶ Kusmierek, N., Pyrka, E. y Popiolek, M. (2019). Diversity of helminths in polish reptiles: a review. *Biologia*. <https://doi.org/10.2175/s11756-019-00330-y>
- ▶ Rukambile, E, Sintchenko, V, Muscatello, G, Kock, R, Alders, R. (2019). Infection, colonization and shedding of *Campylobacter* and *Salmonella* in animals and their contribution to human disease: A review. *Zoonoses Public Health*, 66: 562-578. <https://doi.org/10.1111/zph.12611>
- ▶ Bjelland, A.M., Sandvik, L.M., Skarstein, M.M. et al. (2020). Prevalence of *Salmonella* serovars isolated from reptiles in Norwegian zoos. *Acta Vet Scand* 62, 3. <https://doi.org/10.1186/s13028-020-0502-0>
- ▶ Dipineto, L., Capasso, M., Maurelli, M.P. et al. (2012). Survey of co-infection by *Salmonella* and oxyurids in tortoises. *BMC Vet Res* 8, 69. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-69>
- ▶ Ramos, C. P., Santana, J. A., Morcatti Coura, F., Xavier, R. G. C., Leal, C. A. G., Oliveira Junior, C. A., ... & Silva, R. O. S. (2019). Identification and characterization of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, and *C. difficile* isolates from reptiles in Brazil. *BioMed research international*, 2019.
- ▶ Rodríguez-Vivas, R. I. (2015). Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria. Asociación Mexicana de parasitólogos veterinarios AC.

- Šlapeta, J., Modrý, D. y Johnson, R. (2018). Parasitología de reptiles en salud y enfermedad. En *Reptile Medicine and Surgery in Clinical Practice* (eds B. Doneley, D. Monks, R. Johnson y B. Carmel). doi:10.1002 / 9781118977705.ch31
- Girling, S. J., & Raiti, P. (2019). *BSAVA manual of reptiles* (No. Ed. 3). British small animal veterinary association.
- Auliya M, Hofmann S, Segniagbeto GH, Assou D, Ronfot D, Astrin JJ, Forat S, Ketoh GKK, D’Cruze N (2020). The first genetic assessment of wild and farmed ball pythons (Reptilia, Serpentes, Pythonidae) in southern Togo. *Nature Conservation* 38: 37–59. <https://doi.org/10.3897/natureconservation.38.49478>
- El-Alfy, E. S., & Nishikawa, Y. (2020). *Cryptosporidium* species and cryptosporidiosis in Japan: a literature review and insights into the role played by animals in its transmission. *The Journal of veterinary medical science*, 82(8), 1051–1067. <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0151>
- Paiva, P. R., Grego, K. F., Lima, V. M., Nakamura, A. A., da Silva, D. C., & Meireles, M. V. (2013). Clinical, serological, and parasitological analysis of snakes naturally infected with *Cryptosporidium serpentis*. *Veterinary parasitology*, 198(1-2), 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.08.016>
- Rizzo, J. M. (2014). Captive care and husbandry of ball pythons (*Python regius*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 24(1-2), 48-52.
- Pumipuntu, N. y Piratae, S. (2018). Criptosporidiosis: una enfermedad zoonótica preocupante. *Mundo veterinario*, 11 (5), 681–686. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.681-686>
- Rinaldi, L., Capasso, M., Mihalca, AD, Cirillo, R., Cringoli, G. y Cacciò, S. (2012). Prevalencia e identificación molecular de aislados de *Cryptosporidium* de lagartos y serpientes mascotas en Italia. *Parasite* (París, Francia), 19 (4), 437–440. <https://doi.org/10.1051/parasite/2012194437>

- ▶ Goupil, B. A., Trent, A. M., Bender, J., Olsen, K. E., Morningstar, B. R., & Wünschmann, A. (2012). A longitudinal study of *Salmonella* from snakes used in a public outreach program. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 43(4), 836-841.

- ▶ Doneley, B., Monks, D., Johnson, R., Carmel, B., & Wiley, J. (Eds.). (2018). *Reptile medicine and surgery in clinical practice*. Wiley Blackwell.

- ▶ Hossain, S., De Silva, B. C. J., Dahanayake, P. S., Shin, G. W., & Heo, G. J. (2019). Molecular characterization of virulence, antimicrobial resistance genes, and class one integron gene cassettes in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated from pet turtles in Seoul, Korea. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 28, 209-217.

- ▶ Bertelloni, F., Chemaly, M., Cerri, D., Gall, F. L., & Ebani, V. V. (2016). *Salmonella* infection in healthy pet reptiles: Bacteriological isolation and study of some pathogenic characters. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 63(2), 203-216.

- ▶ Ríos-Sánchez, E., Calleros, E., González-Zamora, A., Rubio, J., Martínez, O. C., Martínez, A., Hernández, S., & Pérez-Morales, R. (2020). Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Acta Universitaria*, 26(4), 56-65. doi: 10.15174/au.2016.1078

- ▶ Park, Y. S., Lee, S. R., & Kim, Y. G. (2006). Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in kimchi by multiplex polymerase chain reaction (mPCR). *Journal of microbiology* (Seoul, Korea), 44(1), 92–97.

- ▶ Wilfinger, WW, Mackey, K. y Chomczynski, P. (1997). Efecto del pH y la fuerza iónica en la evaluación espectrofotométrica de la pureza del ácido nucleico. *Biotécnicas*, 22 (3), 474-481.

- ▶ Bouzid M, Hunter PR, Chalmers MR, Tylera MK. *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(1):115-34.

- Quihui-Cota, L., Morales-Figueroa, GG, Javalera-Duarte, A., Ponce-Martínez, JA, Valbuena-Gregorio, E., y López-Mata, MA (2017). Prevalencia y factores de riesgo asociados para infecciones por *Giardia* y *Cryptosporidium* en niños del noroeste de México: un estudio transversal. *Salud pública de BMC*, 17 (1), 852. <https://doi.org/10.1186/s12889-017-4822-6>
- Almazán Herrera, G. C. (2015). Estrategias para la regulación del Comercio Internacional de Fauna Silvestre en México.
- Rodríguez, C., & Varela, N. (2014). Guía para el Manejo y Cuidado de Ofidios Colombianos en Cautiverio. In *Memorias de la Conferencia Interna en Medicina y Aprovechamiento de Fauna Silvestre, Exótica y no Convencional* (Vol. 10, No. 1, pp. 31-61).
- Divers & Stahl, (2019). *Mader's Reptile and Amphibian Medicine & Surgery*. 3 Ed Elsevier
- Divers, S. J., & Mader, D. R. (Eds.). (2005). *Reptile Medicine and Surgery-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Xiao, L., & Cama, V. A. (2018). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. In *Foodborne parasites* (pp. 73-117). Springer, Cham.
- Plutzer J, Karanis P. 2009. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Vet Parasitol*, 165(3– 4):187–199.
- Bogan, J. E. (2019). Gastric Cryptosporidiosis in Snakes, a Review. *Journal of Herpetological Medicine and surgery* 29 (3-4), 71-86. <https://doi.org/10.58818/19-05-201.1>
- Wolf, D., Vrhovec, M. G., Failing, K., Rossier, C., Hermosilla, C., & Pantchev, N. (2014). Diagnosis of gastrointestinal parasites in reptiles: comparison of two coprological methods. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56(1), 1-13.

- Mustafa, S., Rafailov, R., Kanchev, K., Koureas, C., & Manioti, M. I. (2018). Study on internal parasites in snakes grown in domestic conditions. effect of *Staphylococcus aureus* infection on the dynamics of creatinine and urea concentrations in the blood plasma of rabbits, 55.
- Cervone, M., Fichi, G., Lami, A., Lanza, A., Damiani, G. M., & Perrucci, S. (2016). Internal and external parasitic infections of pet reptiles in Italy. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 26(3-4), 122-130.
- Mirhashemi, M. E., Zintl, A., Grant, T., Lucy, F. E., Mulcahy, G., & De Waal, T. (2015). Comparison of diagnostic techniques for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in animal samples. *Experimental parasitology*, 151, 14-20.
- Ayinmode, A. B., Adedokun, A. O., Aina, A., & Taiwo, V. (2010). The zoonotic implications of pentastomiasis in the royal python (*Python regius*). *Ghana medical journal*, 44(3).
- Rom, B., Kornas, S., & Basiaga, M. (2018). Endoparasites of pet reptiles based on coproscopic methods. *Annals of parasitology*, 64(2).
- Velázquez, L. P. A., MdCA, M., & Romero, A. C. (2014). Extracción y purificación de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 1.
- Machin, R. A. (2015). Common gastrointestinal parasites in reptiles. *In Practice*, 37(9), 469-475.
- Fagre, AC, Pabilonia, KL, Johnston, MS, Morley, PS y Burgess, BA (2020). Comparación de los métodos de detección de la diseminación de *Salmonella enterica* entre pacientes reptiles en un hospital universitario veterinario. *Revista de investigación de diagnóstico veterinario*, 32 (1), 118-123.
- Ramos, C. P., Santana, J. A., Morcatti Coura, F., Xavier, R. G. C., Leal, C. A. G., Oliveira Junior, C. A., ... & Silva, R. O. S. (2019). Identification and characterization of *Escherichia coli*, *Salmonella*, 1-9.

- ▶ Ríos, R., Flores, B., Mora - Sánchez, B., Torres, D., Sheleby - Elías, J., Jirón, W. y Balcázar, JL (2021). Aislamiento de *Salmonella* spp. de carne de iguana negra de cola espinosa (*Ctenosaura similis*) comercializada en mercados de la ciudad de León, Nicaragua. *Medicina y ciencia veterinaria*.

- ▶ Pawlak, A., Morka, K., Bury, S., Antoniewicz, Z., Wzorek, A., Cieniuch, G., ... y Bugla-Płoskońska, G. (2020). Microbiota cloacal gramnegativa en culebra de vida libre *Natrix natrix* de Polonia. *Microbiología actual*, 77, 2166-2171.

- ▶ Cota, JB, Carvalho, AC, Dias, I., Reisinho, A., Bernardo, F. y Oliveira, M. (2021). *Salmonella* spp. en reptiles de mascotas en Portugal: prevalencia y eficacia antimicrobiana del gluconato de clorhexidina. *Antibióticos*, 10 (3), 324.

- ▶ Drózdź, M., Małaszczuk, M., Paluch, E. y Pawlak, A. (2021). Potencial zoonótico y prevalencia de serovares de *Salmonella* aisladas de mascotas. *Ecología y epidemiología de infecciones*, 11 (1), 1975530.

- ▶ Altamimi, MK y Al-Zubaidi, MT (2020). *Cryptosporidium* spp.: Detección molecular y convencional en palomas salvajes (*Columba livia*) en la provincia de Babilonia, Irak. *Plant Archives*, 20 (2), 1544-1548.

- ▶ Bonilla-Aldana, D. K., Villamil-Gómez, W. E., Rabaan, A. A., & Rodríguez-Morales, A. J. (2020). Una nueva zoonosis viral de preocupación global: COVID-19, enfermedad por coronavirus 2019. *Iatreia*, 33(2), 107-110.