



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HUEVOS DE
Ancylostoma Y *Viannaia* EN ZARIGÜEYAS *Didelphis
virginiana* DE UNA LOCALIDAD RURAL DE
YUCATÁN, MÉXICO.**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES**

POR:

**Licenciado en Biología
Rosendo Arturo de Jesús Aragón Pech**

**Directores:
Dr. Hugo A. Ruiz Piña
Dr. Roger I. Rodríguez Vivas**



Mérida, Yuc., México, octubre de 2019

POSGRADO INSTITUCIONAL
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y MANEJO
DE RECURSOS NATURALES TROPICALES



UADY
UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE YUCATÁN

**COORDINACIÓN GENERAL
DEL SISTEMA DE POSGRADO,
INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN**

POSGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

**ALUMNO: LICENCIADO EN BIOLOGÍA
ROSENDO ARTURO DE JESÚS ARAGÓN PECH**

SÍNODO DEL EXAMEN DE TESIS DE GRADO

**M. EN C. JAVIER ESCOBEDO ORTEGÓN
CIR-HIDEYO NOGUCHI**

**DR. SERGIO GUILLÉN HERNÁNDEZ
CCBA-UADY**

**DR. ANTONIO ORTEGA PACHECO
CCBA-UADY**

**DR. JOSÉ ALBERTO ROSADO AGUILAR
CCBA-UADY**

**DR. ISRAEL CHAN PÉREZ
CIR-HIDEYO NOGUCHI**

MÉRIDA, YUCATÁN, OCTUBRE DEL 2019

DECLARATORIA DE ORIGINALIDAD

“El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente”.

DEDICATORIAS

A mis padres Arturo Aragón y Filomena Pech que siempre me han brindado su apoyo incondicional en las buenas y en las peores etapas de mi vida, gracias por estar siempre ahí.

A mis hermanos Demetrio y Joel por darme su apoyo, cariño y compañía, espero ser para ustedes un ejemplo a seguir.

A mi segunda familia, mis suegros Adolfo Campos y Caridad Loeza, a mi cuñada Diana Campos, que fueron testigos de las largas noches de desvelo por la realización de este trabajo, gracias por su apoyo.

Con mucho cariño, le dedico este trabajo y todos mis logros a mi amada esposa Jessica Quintana Loeza, que ha estado conmigo en mis triunfos y fracasos, gracias por motivarme, apoyarme y aconsejarme, por aguantar mis cambios de humor y enseñarme a ser mejor persona todos los días.

Por último, a mis dos compañeros caninos “Canelo y Mayla” quienes me han brindado su cariño incondicionalmente.



AGRADECIMIENTOS

A mis asesores el Dr. Hugo A. Ruiz Piña y Dr. Roger I. Rodríguez Vivas, por brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo de investigación en sus respectivos laboratorios. También, les agradezco su tiempo por las revisiones de la tesis y por su amistad.

Al comité tutorial conformado por el Dr. Antonio Ortega Pacheo, Dr. Sergio Guillen Hernandez y el M.C. Javier Escobedo Ortégón, gracias por sus valiosos comentarios y observaciones durante las evaluaciones.

Agradecimiento especial M.C. Javier Escobedo Ortégón, por compartir sus conocimientos en Biología Molecular y las largas horas dedicadas en el trabajo de laboratorio.

Al Dr. Enrique A. Reyes Novelo, por compartirme sus conocimientos, motivación y sabios consejos, que permitieron fortalecer este trabajo.

Al Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Nouguchi” (CIR-Hideyo Nouguchi), por permitirme el uso de sus instalaciones y equipos dentro del Laboratorio de Zoonosis y Otras Enfermedades Transmitidas por Vector (LZOO)

A todos mis compañeros del LZOO del CIR “Hideyo Nouguchi”, que me apoyaron durante las salidas de campo (Alan Cuxim, Lissie Uicab, Jesús Aguiñaga, Antonio Granados).

Al Laboratorio de parasitología Animal (LPA) del CCBA-UADY, en especial a la Q.F.B Iris Trinidad Martínez por su paciencia y asistencia en el LPA.

A la Q.B.A Sandra Luz Villegas por su apoyo en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Diagnóstico – FMVZ- UADY.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca de estudio otorgada durante la maestría.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue identificar mediante la amplificación por PCR de las secuencias ITS-1 e ITS-2 huevos del género *Ancylostoma* y *Viannaia* en heces de *Didelphis virginiana* capturadas en una localidad rural de Yucatán, México. El muestreo se realizó durante la temporada húmeda (junio a octubre 2018) y seca (noviembre 2018 a marzo 2019). El diagnóstico coprológico se realizó mediante la técnica de enriquecimiento por flotación, la amplificación por PCR mediante dos pares de oligonucleótidos (RTGHF1/RTGHR1) y (VianITS1-F/VianITS1-R) los cuales amplifican la secuencia ITS-1-ITS-2 del género *Ancylostoma* e ITS-1 de *Viannaia* respectivamente. Un total de 112 individuos *D. virginiana* fueron examinados mediante análisis coprológico, de ellos trece muestras fecales con > 2000 HPG fueron amplificadas mediante PCR. Los resultados mostraron una prevalencia del 82 % con huevos de *Viannaia* sp. De las muestras amplificadas por PCR, 8 fueron positivas a *Viannaia* sp. y cero a *Ancylostoma* sp. De los animales sacrificados todos fueron negativos a adultos de *Ancylostoma* sp., mientras que nueve positivos a *Viannaia* sp. Este es el primer estudio en identificar y confirmar mediante análisis molecular por PCR la presencia de huevos que corresponden a *Viannaia* sp. en heces de *D. virginiana*, en una localidad rural de Yucatán, México.

Palabras clave: *Didelphis virginiana*, *Viannaia* sp., *Ancylostoma*, Yucatán, México

SUMMARY

The aim of the study was to seek and identify by PCR amplification of the ITS-1-ITS-2 sequences of eggs of the genus *Ancylostoma* and *Viannaia* isolated from stool of *Didelphis virginiana* captured in a locality of Yucatan, Mexico. The sampling was carried out during the rainy season (June to October 2018) and dry season (November to March 2019). The coprological diagnosis was made by enrichment technique through flotation. PCR amplification was performance by two pairs of oligonucleotides (RTGHF1/RTGHR1) and (VianITS1-F/VianITS1-R) which amplify the ITS-1-ITS-2 sequence of the genera *Ancylostoma* and ITS-1 of *Viannaia*. A total of 112 *D. virginiana* were examined through coprological analysis, 13 stool samples with > 2000 EPG were amplified by PCR. The results showed a frequency of 82 % with *Viannaia* sp. eggs. Of the amplified PCR samples, 8 were positive to *Viannaia* sp. and zero for *Ancylostoma* sp. All animals slaughtered were negative to adults *Ancylostoma* sp. while nine positives to *Viannaia* sp. This is the first study to confirm by molecular analysis PCR the presence of eggs corresponding to *Viannaia* sp. at *D. virginiana* feces in a locality in Yucatan, Mexico.

Key words: *Didelphis virginiana*, *Viannaia* sp., *Ancylostoma*, Mexico

ÍNDICE GENERAL

DECLARATORIA DE ORIGINALIDAD.....	I
DEDICATORIAS	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN	IV
SUMMARY	V
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Distribución geográfica de <i>Didelphis virginiana</i>	3
2.2. Taxonomía de <i>Didelphis virginiana</i>	4
2.3. Ecología y biología de <i>Didelphis virginiana</i>	5
2.4. Papel de la zarigüeya en salud pública y su importancia sinantrópica en Yucatán	6
2.5. Características generales de los nematodos parásitos.....	7
2.5.1. Identificación y diagnóstico de nematodos parásitos	10
2.6. Nematodos parásitos de <i>Didelphis virginiana</i> en México	11
2.7. Generalidades del género <i>Ancylostoma</i> y <i>Viannaia</i>	14
III. HIPÓTESIS.....	17
IV. OBJETIVOS.....	17
V. REFERENCIAS	18
VI. ARTÍCULO.....	24
VII. CONCLUSIONES	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución potencial de la zarigüeya *didelphis virginiana* en México 3

Figura 2. Morfología típica de un nematodo hembra y macho 9

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Nematodos parásitos de la zarigüeya <i>Didelphis virginiana</i> en México.	12
--	----

I. INTRODUCCIÓN

Las zarigüeyas del género *Didelphis*, están ampliamente distribuidas en México, encontrándose de manera simpátrica las especies *Didelphis virginiana* y *D. marsupialis* (Gardner, 2005; Ceballos y Arroyo, 2012; Ramírez *et al.*, 2014). La especie *D. virginiana* es considerado una especie sinantrópica en localidades rurales del estado de Yucatán, dado que encuentran con mayor frecuencia en el peridomicilio, ocupando basureros, bodegas, gallineros, montículos de piedra, y otros materiales que utilizan como refugios temporales (Ruíz *et al.*, 2013a). Dada su naturaleza omnívora, los patios de las viviendas yucatecas o “solar” fungen como ecotopos para *D. virginiana*, ya que las familias cuentan con árboles frutales, hortalizas y animales de traspatio, los cuales brindan las condiciones necesarias para su supervivencia (Ruiz y Cruz, 2002, Ruiz *et al.* 2013b).

En México, las zarigüeyas del género *Didelphis* tienen una gran importancia en el área de la salud pública, ya que son mamíferos que participan como hospederos definitivos, intermediarios, paraténicos y reservorios de muchos agentes patógenos de importancia zoonótica (Cruz, 2009).

En cuanto a sus nematodos parásitos, en México, se tiene información de varias familias parasitando a las zarigüeyas del género *Didelphis*, como lo son: Angionstrongylidae, Ascaridae, Heterakoidea, Toxocaridae, Kathlaniidae, Gnathostomidae, Gonglyonematidae, Physaloptera, Spirocecidiae, Trichuridae, Capillaridae y Viannaiidae (Monet *et al.*, 2005; Acosta *et al.*, 2015).

La mayoría de los trabajos realizados en México con helmintos parasitando zarigüeyas de género *Didelphis*, han sido realizados mediante la recolecta de nematodos adultos en el intestino u organos de estos marsupiales, el único trabajo en México que reporta huevos de parásitos gastrointestinales en heces de *D. virginiana*, se realizó por Aragón *et al.* (2018), mediante técnica de flotación, donde reportaron la presencia de huevos de *Ancylostoma* sp., *Trichuris* sp., *Capillaria* sp., *Toxocara* sp., *Turgida* sp., *Cruzia* sp., y *Ascaris* sp, también, reporta que la prevalencia más alta fue de *Ancylostoma* sp. con 84 %.

La información en cuanto a la infección con nematodos de la familia Ancylostomatidae, en zarigüeyas, es escasa. En algunos países de Latinoamérica, se reporta la presencia de *Ancylostoma* sp. en varias especies del género *Didelphis*, identificados mediante examen directo y diversas técnicas de flotación, sin embargo, ninguno de estos trabajos reporta la presencia de nematodos adultos de *Ancylostoma* sp. (Rueda *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2017; Muñoz *et al.*, 2017; Teodoro *et al.*, 2019).

En un estudio realizado en Brasil, por Teodoro *et al.* (2019), reportan la presencia de huevos de Ancylostomatidae en heces de *Didelphis albiventris*, no obstante, al hacer la necropsia no encontraron parásitos adultos de *Ancylostoma*, solo nematodos del género *Viannaia* sp. en los mismos individuos antes identificados como *Ancylostoma* sp.

El género *Viannaia* (Strongylida: Viannaiidae) se encuentra ampliamente reportado en zarigüeyas de la familia Didelphidae en varios países de América (Pinto & Gomes, 1980; Guerrero, 1985; Ellis *et al.*, 1999; Silva & Costa, 1999; Monet *et al.*, 2005; Tantaleán *et al.*, 2010; Scheibel *et al.*, 2014; Acosta *et al.*, 2015; Chero *et al.*, 2017; Simões *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2018; Teodoro *et al.*, 2019).

El nematodo *Viannaia* sp., en vivo presenta una coloración rojiza, aparente dilatación cefálica, son de cuerpo pequeño y se localizan en la mucosa intestinal de marsupiales americanos, otras de las características distintivas es la carencia de capsula bucal y dientes esofágicos, los cuales son distintivos del género *Ancylostoma*, aunque por ser del orden Strongylida, ambos presentan una bolsa copulatoria con características diferentes (Anderson *et al.*, 2009).

En cuanto a su impacto en la salud de las zarigüeyas, con infección por *Viannaia* sp., no se tiene registro de causarle algún daño severo. En lo que respecta a *Ancylostoma* sp., se sabe que puede ser mortal en fauna silvestre, causándoles diarrea, anemia, crecimiento retardado, daño en tejido y algunos casos la muerte (Seguel y Gottdenker., 2017).

Considerando la alta prevalencia de *Ancylostoma* sp. en *D. virginiana* en el estado de Yucatán, aunado a la similitud que existe entre los huevos de *Viannaia* sp. y *Ancylostoma* sp., así como la dificultad que existe para llegar a nivel especie usando únicamente la observación directa de huevos de parásitos. El presente trabajo tiene como objetivo identificar mediante la amplificación por PCR de las secuencias ITS-1 e ITS-2 huevos del género *Ancylostoma* y *Viannaia* en heces de *Didelphis virginiana* capturadas en una localidad rural de Yucatán, México.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Distribución geográfica de *Didelphis virginiana*

Entre los géneros de la familia Didelphidae, se encuentra el género *Didelphis* compuesto por dos especies simpátricas en Centroamérica, *Didelphis virginiana* y *Didelphis marsupialis* (Gardner, 2005; Ceballos y Arroyo, 2012; Ramírez *et al.*, 2014).

La distribución geográfica de la zarigüeya *D. virginiana*, abarca una gran diversidad de hábitats, desde los tropicales hasta los templados, ocupando las dos regiones biogeográficas de América, la Neártica en el sur de Canadá y la Neotropical al norte de Costa Rica, en sitios con elevaciones que van desde el nivel del mar hasta por encima de los 3000 msnm, en las montañas de México y Sudamérica (Ceballos y Oliva, 2005; Gardner, 2005).

En México, se encuentra prácticamente en la mayoría de los estados, con excepción de las zonas áridas que colindan con E.U.A (Figura 1) (Gardner, 2005; Ceballos *et al.*, 2006). El único estudio de distribución de *D. virginiana* que se tiene en la Península de Yucatán es el realizado por (Jones *et al.*, 1974) el cual reporta la presencia de *D. virginiana*, con mayor ocurrencia en la parte norte del estado de Yucatán.

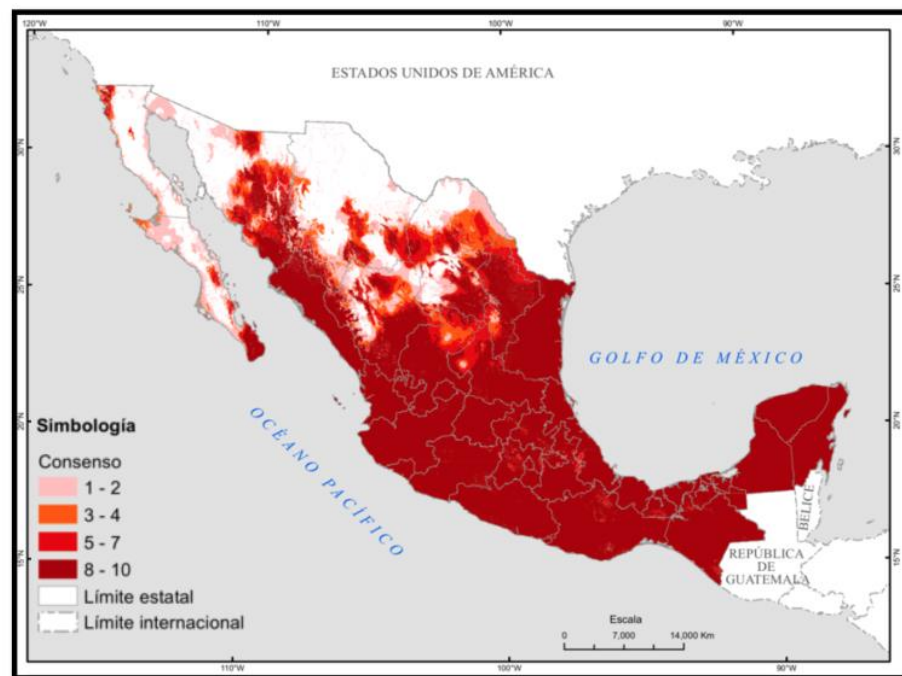


Figura 1. Distribución potencial de la zarigüeya *Didelphis virginiana* en México. Fuente: (Ceballos *et al.*, 2006)

2.2. Taxonomía de *Didelphis virginiana*

La zarigüeya *Didelphis virginiana* pertenece al orden Didelphimorphia, en él se integran la mayoría de los marsupiales americanos por una sola familia Didelphidae, en México está conformado por siete géneros y ocho especies (Ramírez *et al.*, 2014). Estos marsupiales son los únicos que han experimentado una gran radiación adaptativa desde su aparición en el Cretácico superior (Gardner, 2005; Rueda *et al.*, 2013).

Por otra parte, *D. virginiana* es uno de los marsupiales más recientes en cuanto a su especiación con su ancestro *Didelphis marsupialis*, con aproximadamente 75, 000 años (Gardner, 1973). Para la identificación de zarigüeyas del género *Didelphis* en zonas simpátricas, como es el caso de *D. virginiana* y *D. marsupialis* en Centro América, Gardner (1973) estableció ciertos caracteres fenotípicos para el diagnóstico de cada especie, que incluyen la morfología cromosómica, la morfología de los huesos del cráneo, aspectos conductuales y patrón de coloración del pelaje. En cuanto a la identificación en campo, los patrones de coloración del pelaje y la morfología craneal son algunos de los caracteres frecuentemente usados para la identificación de zarigüeyas.

Actualmente, la identificación de *Didelphis virginiana* y *D. marsupialis* en México, se puede llevar a cabo mediante la aplicación de herramientas de biología molecular, por medio de enzimas de restricción (RFLP's) en complemento con la taxonomía clásica (Arcangeli y Cervantes, 2009).

La zarigüeya *Didelphis virginiana*, se caracteriza por tener individuos de cuerpo robusto, relativamente pesados, con una longitud total (del hocico a la punta de la cola) que puede ir de 645 a 1017 mm, la longitud de la cola va de 225 a 535 mm, longitud de pata de 48 a 88 mm, así como un peso en promedio de los machos adultos de 2.8kg y las hembras adultas 1.9 kg, la coloración del pelaje, varía dependiendo de la región en que se encuentre (Gardner, 1973; McManus, 1974).

De acuerdo con Reynolds (1952), en *D. virginiana* existe dimorfismo sexual muy marcado con respecto a la edad (juvenil, subadulto, adulto). En las hembras juveniles el pelaje del marsupio es abundante y los pezones son imperceptibles, en los machos la longitud de los testículos es igual o menor a 15 mm, en los ejemplares subadultos, las hembras tienen el marsupio con pelo abundante y una coloración blanquizca, con pezones pequeños, en los machos la longitud de los testículos es de 20mm, presencia de mancha amarilla verduzca en cuello y pecho.

En comparación con la edad adulta, las hembras presentan una coloración del marsupio amarillento-naranja y los pezones son prominentes, en los ejemplares machos la longitud de los

testículos es mayor a 20 mm, y presentan una mancha amarilla verdusca en cuello y pecho (Hunsaker, 1977).

2.3. Ecología y biología de *Didelphis virginiana*

Las zarigüeyas son animales nocturnos de hábitos semi-arborícolas, su actividad durante el día es baja, ya que permanecen en refugios o madrigueras que son abandonadas por otras especies, o cualquier refugio que encuentren durante su trayecto, como huecos de árboles, montículos de piedra, lugares abandonados, bodegas, el dosel de los árboles de gran altura, entre otros. Cada madriguera o refugio, es ocupado generalmente por una sola familia o por una hembra y sus crías (Hunsaker, 1977; Krause y Krause, 2006).

Un mecanismo de defensa que las zarigüeyas presentan es la tanatosis, que se refiere a la capacidad de fingir estar muertos en situaciones de estrés o ataques de sus depredadores, por el cual dejan su cuerpo en reposo y al estar fuera peligro huyen del lugar para sobrevivir (Pasteur, 1982).

Las zarigüeyas son de naturaleza omnívora, aunque se ha reportado que son más carnívoros e insectívoros que herbívoros o frugívoros; en su dieta incluyen: frutas, aves de corral, pequeños mamíferos, insectos, cangrejos dulceacuícolas, caracoles, serpientes, anfibios, huevos de aves, desperdicios orgánicos y desechos del hombre (McManus, 1974, Krause y Krause, 2006). Así mismo, diversos estudios han demostrado que *D. virginiana*, tiene una respuesta significativa con respecto a la atracción alimenticia de heces de otros animales “coprofagia” los cuales pueden ser una importante fuente estacional de alimento durante el verano (Gipson *et al.*, 2003; Livingston *et al.*, 2005).

El periodo de apareamiento de *D. virginiana*, ocurre a partir de enero o febrero hasta los meses de junio-julio. El período de gestación, es relativamente corto, se da a los trece días después de la concepción (día cero), los embriones que nacieron migran y se adhieren a las tetas que se encuentran ubicadas dentro el marsupio para comenzar la fase de lactación y crecimiento, lo cual dura aproximadamente 60 días, a los 100 días desde la concepción de las crías, se da el destete de aproximadamente 5 a 11 crías (Reynolds, 1952; McManus, 1970; Harder *et al.*, 1993).

La madurez sexual de las hembras, es alcanzada a los seis meses de edad, en comparación con los machos que se da a los ocho meses y medio. Al año, las zarigüeyas presentan dos camadas, en raras ocasiones se dan hasta tres, esto explica que *D. virginiana*, sea una especie de gran

abundancia. El promedio de vida en estado silvestre se estima de uno a cuatro años (McManus, 1974; Hunsaker, 1977).

Dada su capacidad de habitar una gran variedad de hábitats, cortos períodos de reproducción y alimentación omnívora, hace de la zarigüeya un marsupial de importancia tanto biológica como biomédica para el ser humano, ya que se encuentra en estrecha relación con éste, por tal motivo son nombrados como animales sinantrópicos, ya que habitan refugios temporales artificiales creados por el hombre (viviendas, basureros, granjas, entre otros) (Ruíz *et al.*, 2013a).

2.4. Papel de la zarigüeya en salud pública y su importancia sinantrópica en Yucatán

Los animales silvestres son considerados la fuente principal de emergencia y reemergencia de agentes zoonóticos en el ecosistema, ya que cumplen un papel importante como hospederos y reservorios, mediante la dispersión y mantenimiento de agentes con potencial zoonótico, como lo son virus, bacterias, helmintos y protozoarios, de manera directa (heces, orina, aerosoles) o a través sus ectoparásitos (pulgas, garrapatas) (Acha y Szyfres, 2003; Monsalve *et al.*, 2009; Reyes *et al.*, 2011; Ruíz *et al.*, 2013).

En cuanto a los marsupiales americanos, se tiene un gran cúmulo de información acerca de los patógenos que portan y que transmiten, desde enfermedades virales, bacterianas, Rickettsiales, clamidias, protozoarias, micóticas, ectoparásitos y helmintos parásitos (Potkay, 1977). Los marsupiales del género *Didelphis* en México, tienen una gran importancia en el área de la salud pública, ya que son mamíferos que participan como hospederos definitivos, intermediarios, paraténicos y reservorios de muchos agentes patógenos de importancia zoonótica (Cruz, 2009).

En el estado de Yucatán, las zarigüeyas han estado involucradas en la participación de enfermedades emergentes y reemergentes de importancia zoonótica. Es denominado reservorio de *Trypanosoma cruzi* (causante de la Enfermedad de Chagas), portador de *Rickettsia felis*, *Salmonella enterica*, *Leptospira interrogans* y *Toxoplasma gondii* (Ruíz y Cruz, 2002; Ruíz *et al.*, 2002; Peniche *et al.*, 2016; Torres *et al.*, 2016).

En cuanto a sus parásitos gastrointestinales, se tiene registro de la presencia de huevos de nemátodos parásitos como *Ancylostoma* sp., *Trichuris* sp., *Capillaria* sp., *Toxocara* sp., *Turgida* sp., *Cruzia* sp., y *Ascaris* sp., en heces de zarigüeyas *D. virginiana* capturadas en seis localidades del estado de Yucatán (Aragón *et al.*, 2018).

La mayoría de los estudios antes mencionados, han sido realizados en áreas rurales del estado de Yucatán, ya que dichas zonas se encuentran alejadas de la capital del estado, la mayoría de las viviendas cuentan con pequeños agroecosistemas que le proporcionan a las familias, alimentación, techo, y subsistencia económica, estos agroecosistemas son nombrados como “solar” o “traspatio” (Jiménez *et al.*, 1999). Los solares o traspacios funcionan como ecotopos artificiales para la zarigüeya sinantrópica *D. virginiana* en las localidades rurales de Yucatán, ya que le proporcionan las condiciones necesarias para su alimentación, reproducción, desarrollo, y lo más importante, refugios temporales, dichos refugios, como se había mencionado con anterioridad, pueden ser: troncos de árboles, montículos de piedras, agujeros en la tierra, espacios como bodegas, corrales, perreras, entre otros (Ruíz *et al.*, 2013a).

De la misma manera, las condiciones microclimáticas de los solares, engloban las condiciones abióticas necesarias de humedad y temperatura, que podrían estar influyendo en el caso de los nematodos, a la supervivencia y eclosión de huevos y larvas de parásitos, quedando latentes en el ecosistema (Bowman y Georgi, 2014; Weinstein y Lafferty, 2015).

2.5. Características generales de los nematodos parásitos

El Phylum Nematoda se caracteriza por presentar diversas formas de vida parásita, siendo los nematodos de las plantas los más estudiados debido al impacto que causa en la agronomía, afectando cultivos de importancia económica como las leguminosas, granos, yuca, coco, caña de azúcar, papa, hortalizas, entre otros (Sasser y Freckman, 1987; Agrios, 2005).

Se estima que aproximadamente 16,000-17, 000 especies de nematodos han sido descritas y que al menos existen 40, 000 especies. Así mismo, se estima que el 33% de todos los géneros de nematodos descritos, se encuentran como parásitos de vertebrados (Anderson, 2000).

Los nemátodos parásitos son gusanos alargados, cilíndricos, no segmentados y adelgazados en sus extremos, sus dimensiones varían de tamaño con relación a su hospedero, existiendo especies con dimensiones de menos de 1 mm (*Caenorhabditis*), hasta especies que pueden alcanzar los ocho metros de largo como *Placentonema gigantisima* (Roberts *et al.*, 2009).

Los nemátodos comparten características diagnósticas entre ellos, como son la cutícula, que generalmente es lisa, pero también puede presentar espinas, cerdas, papilas y estriaciones, entre otros. Así mismo, presentan cavidad bucal, faringe, recto, cloaca, vagina y poro excretor (Figura 2). En el proceso de ontogenia, el crecimiento y desarrollo de los nematodos, es por medio de ecdisis.

Aunque el desarrollo pudiera variar dependiendo de la familia, el género e incluso la especie (Anderson, 2000; Roberts *et al.*, 2009).

La primera fase es el huevo, que pudiera o no estar larvado al salir del hospedero, posteriormente se presentan cuatro fases larvarias, acompañados por una muda, siendo el estadio tres (L₃), la fase infectiva para la mayoría de las especies (Roberts *et al.*, 2009; Bowman y Georgi, 2014). En esta fase de vida del parásito, la larva cuenta con una vaina la cual la hace más resistente y de larga vida, y es la etapa infecciosa en muchos Strongyloides y Trichostrongyloides, así como las etapas de vida libre de los parásitos Rhabditida y Ancylostomatidae, los cuales son morfológicamente similares entre sí (Anderson, 2000). En especies como *Trichinella spiralis*, la fase infectante se da en el primer estadio (Anderson, 2000).

La mayoría de los nemátodos son dioicos y muestran dimorfismo sexual definido. Los machos generalmente son más pequeños que las hembras, en su extremo posterior presentan estructuras como papilas, bursas y alas, así mismo son curvados y ornamentados. Su aparato reproductor consta de uno a dos testículos, y poseen además un par de espículas esclerotizadas acelulares de tamaño igual o desigual entre sí y son de utilidad para la identificación de las especies (Roberts *et al.*, 2009).

Las vías de infección en los nemátodos varían de acuerdo con la especie que parasitan y al tipo de ciclo de vida que presenten; entre estos pueden ser: ingesta de huevos – embrionados o no-, hospederos intermediarios, penetración de los estadios larvarios al hospedero final o asistida por vectores como en el caso de algunos nemátodos de importancia en salud pública (Cheng, 1986).

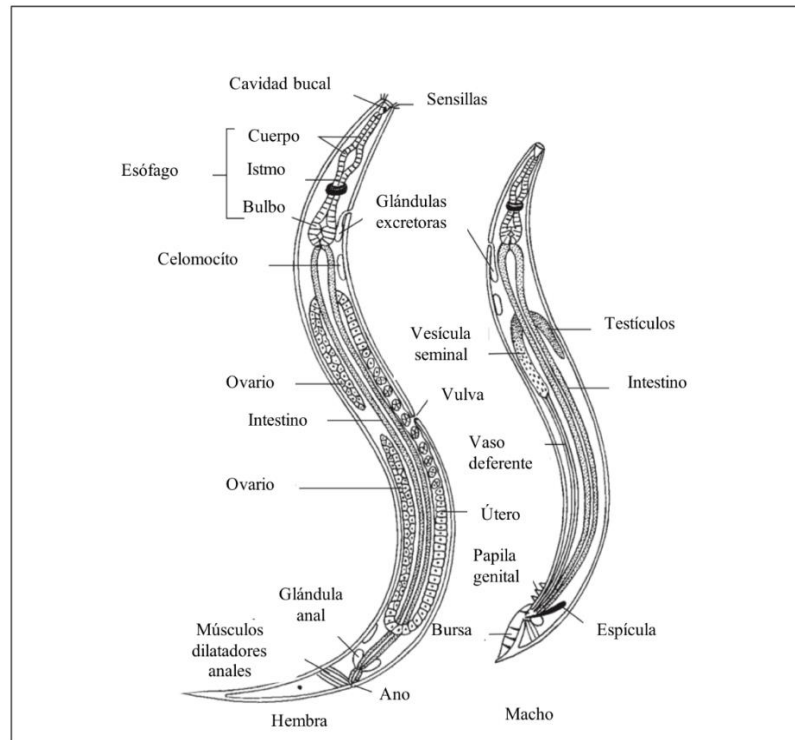


Figura 2. Morfología típica de un nematodo hembra y macho. Tomado y modificado de: (Roberts *et al.*, 2009)

Las hembras, por su parte, poseen dos ovarios, aunque algunas especies pueden tener más de dos, esta característica es distintiva para su clasificación en monodelfas o didelfas. Los huevos, resultados de la fecundación de las hembras varían en tamaño, forma y estructura de acuerdo con la especie. Entre las características de cubierta de los huevos, puede ser lisa o rugosa, operculado en uno o dos polos, y el contenido puede estar diferenciado (fértil, larvado, blastómeros) dependiendo del estado de desarrollo (Roberts *et al.*, 2009).

En ciertas familias de nematodos, para completar su desarrollo ontogénico hasta la forma adulta, pueden requerir de hospederos intermediarios, en su mayoría invertebrados en las etapas primeras, a este ciclo de vida donde requieren de otro hospedero, se le denomina ciclo heteroxeno o indirecto, englobando a las familias Metastrongiloidea, Seuratoidea, Ascaridoidea, Subuloroidea, Spirurida y Dioctophymatoidea (Anderson, 2000; Roberts *et al.*, 2009).

En cuanto a los nematodos de ciclo de vida directo o monoxeno, se encuentran los órdenes Rhabditida, Strongylida (excepto Metastrongyloidea), Cosmocercoidea y Heterakoidea, los cuales no requieren de hospederos intermediarios para infectar a su hospedero definitivo (Anderson, 2000; Roberts *et al.*, 2009).

2.5.1. Identificación y diagnóstico de nematodos parásitos

La identificación de los nematodos parásitos consiste en determinar a qué grupo taxonómico pertenece una especie, mientras el diagnóstico establece la causa y naturaleza de un caso de la enfermedad, ambos son procesos deductivos. En cuanto al diagnóstico del parasitismo requiere que únicamente se identifique al parásito en particular en alguna fase de su ciclo de vida en el hospedero (huevos, larva, adulto) (Bowman y Georgi, 2014).

En cuanto a la identificación de parásitos comunes de gatos domésticos, perros, ganado, ovejas, cabras, caballos y cerdos es relativamente un tema simple, ya que se tiene un cúmulo de información entre atlas, libros y artículos especializados. No obstante, cuando el tema de interés es ampliado hacia animales exóticos, en cautiverio, mamíferos silvestres y aves, no basta con solo revisar un atlas o un libro en parasitología ya que los hábitos alimenticios de cada especie de fauna silvestre pudieran estar asociado a cierto grupo taxonómico de parásito (Bowman y Georgi, 2014).

En lo que respecta al diagnóstico de infección por helmintos, el uso de serología y métodos moleculares son herramientas de diagnóstico que ayudan a dar validez al diagnóstico, sin embargo, la examinación fecal para la observación de la presencia de huevos o larvas de nematodos parásitos sigue siendo la técnica de rutina más común empleado (Taylor *et al.*, 2016).

Entre los métodos de diagnóstico que existen se encuentran: examinación de heces (frotis directo, flotación, flotación directa), recuperación de larvas (Baermann, cultivo e identificación de la fase infectiva L3), recuperación de nematodos del tracto digestivo, recuperación de nematodos del pulmón, recuperación de trematodos y cestodos, métodos basados en ADN (reacción en cadena de la polimerasa PCR, PCR en tiempo real, piro secuenciación, entre otros) (Taylor *et al.*, 2016).

La morfología de los nematodos es realmente rica en caracteres que pueden ser potencialmente útiles, sin embargo, aún falta un instrumento ideal para su estudio y observación: la microscopía de luz no proporciona una resolución suficiente y requiere años de experiencia que ayude a discernir ciertos caracteres que no se ven a simple vista, mientras que la microscopía electrónica (particularmente la de transmisión) es demasiado costosa en cuanto a tiempo y equipamiento para un uso eficaz de forma rutinaria. (Lee, 2002).

En contraste, las modernas herramientas moleculares pueden proporcionar de manera rápida y económica una gran cantidad de caracteres, utilizando métodos estandarizados y aplicables en casi cualquier taxón (Lee, 2002).

2.6. Nematodos parásitos de *Didelphis virginiana* en México

México reúne todas las características físicas y biológicas para ser uno de los países más diversos, entre estas destaca la de poseer una topografía compleja y la convergencia de dos grandes regiones biogeográficas; la neártica y la neotropical, con lo que se espera que la cantidad de parásitos intestinales se vea favorecida (Lamothe *et al.* 1997).

En nuestro país, se han registrado 336 especies de helmintos en mamíferos, de estos 53 son tremátodos, 46 céstodos, 11 acantocéfalos, 225 nemátodos y 1 hirudineo, estos fueron recolectados en 136 taxa de mamíferos silvestres, los cuales, 123 fueron identificados a nivel de especie y 12 son taxones indeterminados. Los registros helmintológicos provienen de 241 localidades de todos los estados de la República con excepción de Aguascalientes (Pérez-Ponce de León *et al.*, 2010; García *et al.*, 2012).

Una de las familias con mayor número de registros helmintológicos en nuestro país es Didelphidae, en él se incluye las especies simpátricas en la Península de Yucatán, *Didelphis virginiana* y *D. marsupialis*, parasitadas por 30 y 16 taxa de helmintos respectivamente (García *et al.*, 2012).

Los estudios parasitológicos realizados en México con la zarigüeya *Didelphis virginiana*, se han llevado a cabo desde 1958 a la fecha (Monet *et al.*, 2005). Con base a los estudios realizados por los siguientes autores (Lamothe *et al.* 1981; Lamothe, 1997; Cañeda, 1997; Almeyda *et al.*, 2000; Monet *et al.*, 2005; Acosta *et al.*, 2015; Aragón *et al.*, 2018), se proporciona la siguiente lista de nemátodos parásitos de *D. virginiana* reportados para México (Cuadro 1).

Los estados que registran mayor número de especies descritas de nemátodos parásitos para *Didelphis virginiana* en México son Veracruz, Guerrero y Colima. Los registros del estado de Yucatán han sido esporádicos, ya que solo se tiene 3 especies registradas en su fase adulta (*Trichuris didelphis*, *Cruzia tentaculata* y *Turgida turgida*), con el estudio de Aragón *et al.*, (2018) se incrementó a 9 la taxa de registros en Yucatán, con base en los huevos de los gusanos encontrados en las heces.

Cuadro 1. Nematodos parásitos de la zarigüeya *Didelphis virginiana* en México.

Nematodo parásito Familia / especie	Localización	Estado	Referencia
Ancylostomatidae <i>Ancylostoma</i> sp.*	Heces	Yucatán	Aragón <i>et al.</i> (2018)
Angionstrongylidae <i>Didelphostrongylus hayesi</i>	Pulmón	Guerrero Oaxaca Distrito Federal Guanajuato Hidalgo Morelos	Monet <i>et al.</i> (2005), Acosta <i>et al.</i> (2015)
Ascaridae <i>Ascaris</i> sp.*	Heces	Yucatán	Aragón <i>et al.</i> (2018)
Heterakoidea <i>Aspidodera raillieti</i>	Intestino	Tabasco Veracruz	Acosta <i>et al.</i> (2015)
Toxocaridae <i>Toxocara</i> sp.*	Heces	Yucatán	Aragón <i>et al.</i> (2018)
Kathlaniidae <i>Cruzia</i> sp.* <i>Cruzia americana</i>	Heces, intestino Ciego	Yucatán Guerrero Colima Guerrero Oaxaca Veracruz	Aragón <i>et al.</i> (2018), Monet <i>et al.</i> (2005) Monet <i>et al.</i> (2005)
<i>Cruzia tentaculata</i>	Ciego, recto	Chiapas Colima Jalisco Veracruz Yucatán Campeche Guanajuato Hidalgo Morelos Oaxaca Puebla Tabasco	Monet <i>et al.</i> (2005), Lamothe <i>et al.</i> (1981), Cañeda (1997), Acosta <i>et al.</i> (2015)
Gnathostomatidae <i>Gnathostoma</i> sp.	Estómago	Tabasco	Lamothe (1997)
<i>Gnathostoma procyonis</i>	Estómago	Morelos	Lamothe (1997)

<i>Gnathostoma turgidum</i>	Estómago	Guerrero Oaxaca Chiapas Colima, Veracruz	Monet <i>et al.</i> (2005), Lamothe <i>et al.</i> (1998), Almeyda <i>et al.</i> (2000), Acosta <i>et al.</i> (2015)
Gonglyonematidae <i>Gonglyonema</i> sp.	Estómago	Chiapas	Acosta <i>et al.</i> (2015)
<i>Gonglyonema mexicanum</i>	Esófago	Veracruz	Cañeda (1997)
Physaloptera <i>Turgida</i> sp.*	Heces	Yucatán	Aragón <i>et al.</i> , (2018)
<i>Turgida turgida</i>	Ciego, estómago	Colima Edo. de México Guerrero Jalisco Michoacán Nayarit Oaxaca Veracruz Yucatán Campeche Guanajuato Hidalgo Puebla Tabasco	Monet <i>et al.</i> (2005), Lamothe <i>et al.</i> (1981), Cañeda (1997), Acosta <i>et al.</i> (2015)
Spirocecidae <i>Didelphonema longispiculata</i>	Estómago	Guerrero	Monet <i>et al.</i> (2005)
Trichuridae <i>Trichuris</i> sp. *	Heces, ciego	Yucatán Guerrero	Aragón <i>et al.</i> , (2018), Monet <i>et al.</i> (2005).
<i>Trichuris didelphis</i>	Pulmón, recto, ciego	Veracruz Campeche Colima Hidalgo Morelos Yucatán	Cañeda (1997), Acosta <i>et al.</i> (2015)
Capillaridae <i>Capillaria</i> sp.*	Heces	Yucatán	Aragón <i>et al.</i> , (2018)
Viannaiidae <i>Viannaia</i> sp.	Intestino	Guerrero Veracruz	Monet <i>et al.</i> (2005), Cañeda (1997),
<i>Viannaia didelphis</i>	Intestino	Colima	Monet <i>et al.</i> (2005)

<i>Viannaia viannai</i>	Intestino	Guerrero Campeche Chiapas Colima Oaxaca Puebla Tabasco Veracruz	Monet <i>et al.</i> (2005)
-------------------------	-----------	--	----------------------------

<i>Travassostrongylus</i> sp.	Intestino	Chiapas	Acosta <i>et al.</i> (2015)
-------------------------------	-----------	---------	-----------------------------

* Los géneros reportados corresponden a huevos del parásito encontrado en las heces.

2.7. Generalidades del género *Ancylostoma* y *Viannaia*

Los Ancylostomatidae o “Hookworms” (inglés) pertenecen al orden Strongylida, son pequeños nematodos bursados, con presencia de cápsula bucal bien desarrollada, los cuales se encuentran en la mucosa intestinal de sus hospederos mamíferos, alimentándose principalmente de sangre, causándoles cuadros clínicos de diarrea, anemia, crecimiento retardado, daño en tejidos y algunas veces la muerte del hospedero (Anderson, 2000; Anderson *et al.* 2009; Bowman y Georgi, 2014).

Los Hookworms son ampliamente distribuidos en áreas subtropicales y tropicales, parasitando una amplia diversidad de organismos, entre los que se encuentran los siguientes ordenes: Carnivora, Artiodactyla, Primates, Rodentia, Perissodactyla, Proboscidea, Pholidota, Afrosoricidae, Scandentia y Xenarthra (Bowman y Georgi, 2014, Seguel y Gottdenker, 2017).

Entre sus hospederos naturales, se encuentran principalmente los canidos y félidos, los cuales mantienen especies de importancia en salud pública, como lo son: *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense* y *Uncinaria stenocephala*, causantes de larva migrans cutánea en el ser humano (Bowman *et al.*, 2010).

En marsupiales americanos del género *Didelphis*, la información acerca de la infección con Ancylostomatida, es escasa y limitada a nivel taxonómico. Entre estos estudios se encuentran los siguientes: en Colombia se reportó la presencia de huevos e individuos adultos de *Ancylostoma* sp. en heces y en el intestino delgado de *Didelphis marsupialis*, los cuales fueron identificados por medio de examen directo, flotación y técnica de Sheater (Rueda *et al.*, 2014; Muñoz *et al.*, 2017). En el estado de Alagoas, Brasil, Silva *et al.* (2017) también identificaron en heces de *Didelphis albiventris*, mediante la técnica coprológica de Willis-Molay la presencia de huevos de *Ancylostoma* sp.

Los trabajos mencionados anteriormente, fueron realizados mediante técnicas coprológicas y necropsias sin descripción de los huevos o ejemplares encontrados.

En lo que respecta a México, se reportó una prevalencia del 84.5 % de *Ancylostoma* sp. en 84 muestras de heces procedentes de *Didelphis virginiana* en seis localidades rurales del estado de Yucatán, el diagnóstico se realizó mediante la técnica de flotación con solución saturada de glucosa, por lo cual, solo se reporta la presencia de huevos del parásito en heces (Aragón *et al.*, 2018).

La ancylostomiasis es la infección causada por la presencia y acción de larvas y adultos de diversas especies del género *Ancylostoma*, localizado en el intestino delgado y otros tejidos de animales domésticos, silvestres y humanos, por tal motivo es considerada como una zoonosis (Acha y Szyfres, 2003). En el humano, puede causar larva migrans cutánea (LMC) por infección percutánea de la larva infectante (L₃) de *Ancylostoma caninum*, *A. braziliense* o *Uncinaria stenocephala* o enteritis eosinofílica por la ingesta de larvas (L₃) de *A. caninum*, mediante agua o alimentos contaminados (Gómez *et al.*, 2013).

En esquemas de clasificación basados en la cápsula bucal, los Ancylostomatidae algunas veces son agrupados con los Strongyloidea, ya que ambas superfamilias cuentan con cápsulas bucales globulosas. Sin embargo, la similitud en cuanto sus ciclos de vida, bursa copulatoria, tropismo hacía el intestino delgado y la presencia de un ovoyector tipo Trichostrongyloidea, hacen de los Ancylostomatida más cercanos a los Trichostrongyloidea que a Strongyloidea (Anderson *et al.* 2009).

En cuanto a las características morfológicas de huevos de *Ancylostoma* sp. son ovalados de aproximadamente 55-75 µm de largo por 35-45 µm de ancho, cubierta fina y transparente, tiene 6-8 células al salir con las heces. Mientras que los adultos, se caracterizan por medir entre 9- 11 mm, siendo las hembras un poco más largas (12-15mm), así también, presentan una larga cámara bucal, esófago estrecho y musculoso en forma de botella. Por ser parásitos hematófagos, poseen 3 pares de dientes en la porción marginal y un par en la porción ventrolateral (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Bowman y Georgi, 2014).

El estudio más reciente en cuanto a la familia Ancylostomatidae y Trichostrongylidae en zarigüeyas del género *Didelphis*, reportan la presencia de ambas familias en heces de *Didelphis albiventris* y *D. aurita* en áreas urbanas y selváticas de São Paulo, Brasil, sin embargo, al realizar la necropsia de 17 *D. albiventris*, no encontraron ningún individuo en su estadio adulto de la familia

Ancylostomatidae, aunque, si encontraron individuos del género *Viannaia* los cuales pertenecen al suborden (Trichostrongylina) (Teodoro *et al.*, 2019).

En cuanto a las especies de *Viannaia*, según la última descripción de Guerrero (1985), actualmente se tiene un total de 18 especies: *V. viannaia* Travassos 1914, *V. hamata* Travassos 1914, *V. conspicua* Travassos 1914, *V. pusilla* Travassos 1914, *V. skrjabini* Lent y Freitas 1937, *V. philanderi* (Wolfgang 1951), *V. monodelphis* Durette-Desset 1968, *V. metachirops* Durette-Desset 1974, *V. cayanensis* (Diaw 1974), *V. didelphis* (Travassos 1914); *V. bisbali* Guerrero 1985, *V. reigi* Guerrero 1985, *V. tenorai* Guerrero 1985, *V. minuspicula* Guerrero 1985, *V. guayamensis* Guerrero 1985, *V. venezuelensis* Guerrero 1985, *V. gabaldoni* Guerrero 1985 y *V. barusi* Guerrero 1985.

Los nematodos del género *Viannaia* son de cuerpo pequeño y filiforme, se localizan en la mucosa del intestino y en vivo tienen una coloración rojiza, aunque cuando son fijados en alcohol toman un color blanco, se contraen y toman una forma enrollada o en espiral (de 2 a 4 vueltas sobre si mismo), lo que dificulta su procesamiento. El género *Viannaia* se caracteriza por tener un sinlofe con tres aretes ventrales orientados hacia la izquierda con una formula bursal 2-1-2 (Durette, 1983).

Las hembras son monodelfas y presentan útero lineal – lo cual es una característica diagnóstica, propuesta por Desset y Chabaud, 1981- huevos dispuestos en tándem los cuales miden entre 45- 55 µm de largo por 25 a 35 µm de ancho. Los machos carecen de gubernáculo. Poseen una bolsa copulatriz simétrica con tres lobulos; en cada lóbulo un par de radios ventrales, carecen de capsula bucal y dientes esofágicos (Desset y Chabaud, 1981; Anderson, 2009).

En lo que respecta al ciclo de vida de *Viannaia*, no se sabe en cuanto al género, no obstante, el patrón básico de los trichostrongiloideos es de ciclo de vida directo, los huevos son liberados en el ambiente con las heces del hospedero; la larva emerge del huevo y muda hasta la fase infectiva de tercer estadio. La infección puede llevarse a cabo en dos maneras dependiendo del hospedero: en el patrón más primitivo, la larva de tercer estadio penetra la piel de su hospedero, mientras que en el patrón más evolucionado, la larva infectante es ingerida (Durette, 1985).

La presencia de *Viannaia* en zarigüeyas del género *Didelphis* en México, es reportado por primera vez en Veracruz por Cañeda (1997) posteriormente, se reporta en los estados de Colima, Guerrero, Campeche, Chiapas, Oaxaca, Puebla, Tabasco y Veracruz (Monet *et al.*, 2005; Acosta *et al.*, 2015).

III. HIPÓTESIS

Las zarigüeyas *Didelphis virginiana* capturadas en dos temporadas climáticas en las viviendas de la localidad de Komchén, Yucatán, México, tendrán la presencia de huevos del género *Ancylostoma* y *Viannaia* identificados mediante la amplificación por PCR convencional.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar por PCR convencional la presencia de huevos de nematodos del género *Ancylostoma* y *Viannaia* en heces de la zarigüeya *Didelphis virginiana* capturadas en dos temporadas climáticas en la localidad de Komchén, Yucatán, México.

Objetivos específicos

- Identificar a nivel de género los huevos de nematodos de *Ancylostoma* y *Viannaia* mediante la amplificación por PCR convencional de la secuencia ITS-1 e ITS-2 en el ADN de las heces de zarigüeyas *Didelphis virginiana* capturadas en las viviendas de localidad de Komchén, Yucatán, México.
- Estimar la prevalencia de huevos de *Ancylostoma* o *Viannaia* en heces de zarigüeyas *Didelphis virginiana* capturadas en las viviendas de la localidad de Komchén, Yucatán, México.
- Determinar diferencias en la prevalencia de infección de huevos de *Ancylostoma* o *Viannaia* en relación con los parámetros poblacionales (sexo y edad) y la temporada climática de las zarigüeyas *Didelphis virginiana* capturadas en las viviendas de la localidad de Komchén, Yucatán, México.

V. REFERENCIAS

Acha, N.P. y Szyfres, B. 2003. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals: Parasitoses, 3rd Ed. Pan American Health Org. 395 pp.

Acosta, V.K., López, Z. C, García, P.L. y Mata, L.R. 2015. Helminths of three species of opossums (Mammalia, Didelphidae) from Mexico. Zookeys, 511,131-152.

Agrios, G. N. 2005. Fitopatología. 2^o ed. Ed. Limusa, México. 838 pp.

Almeyda, A. R., Bargues, M. D. y Mas, C.S. 2000. ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the americas. Journal of Parasitology, 86, 537-544.

Anderson, R. C. 2000. Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission, Wallingford, UK, CABI Publishing.

Anderson, R. C., Chabaud, A. G. y Willmont, S. 2009. Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. CAB International. Inglaterra. 449 pp.

Aragón, P.R., Ruiz, P., Rodríguez, V.R., Cuxim, K.A. y Reyes, N.E. 2018. Prevalence, abundance and intensity of eggs and oocysts of gastrointestinal parasites in the opossum *Didelphis virginiana* Kerr, 1792 in Yucatan, Mexico. Helminthologia, 55(2), 119-126.

Arcangeli, J. y Cervantes, F. A. 2009. Identificación molecular de dos especies de tlacuache: *Didelphis virginiana* y *D. marsupialis*, utilizando enzimas de restricción. En: Cervantes, F. A., Hortelani, M. Y. y Vargas, C. J. (eds.) 60 años de la Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología, UNAM, Aportaciones al Conocimiento y Conservación de los Mamíferos Mexicanos. Primera edición ed. México, D.F: Instituto de Biología, UNAM.

Bowman, D. D. y Georgi, J. R. 2014. Georgis' parasitology for veterinarians, St. Louis, Missouri, ELSEVIER.

Bowman, D. D., Montgomey, S. P., Zajac, A. M., Eberhard, M. L. y Kazacos, K. R. 2010. Hookworms of dogs and cats as agents of cutaneous larva migrans. Trends in Parasitology, 26 (4): 162-167.

Cañeda, G. I. C. 1997. Parásitos intestinales de tres especies de marsupiales de la estación "Los Tuxtlas" y algunas zonas cercanas, Veracruz, México. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, Tesis para obtener el grado de Licenciada en Biología. .

Ceballos, G. y Arrollo, C. J. 2012. Lista actualizada de los mamíferos de México 2012. Revista Mexicana de Mastozoología Nueva época, 2, 27-80.

Ceballos, G. y Oliva, G. 2005. Los mamíferos silvestres de México, México, D.F., Fondo de Cultura Económica, CONABIO.

Ceballos, G., Blanco, S., González, C. y Martínez, E. 2006. '*Didelphis virginiana* (Tlacuache). Distribución potencial'. Extraído del proyecto DS006 'Modelado de la distribución de las especies de mamíferos de México para aun análisis GAP'. Con tamaño de pixel: 0.01 grados decimales. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Financiado por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México.

Cheng, T. C. 1986. General parasitology. Academic Press, New York. 2° Ed.

Cruz, R. A. 2009. Fauna feral, fauna nociva y zoonosis. Biodiversidad del ecosistema del Pedregal de San Angel. Sección: restauración, conservación y manejo., 453-461.

Cordero del Campillo, M., Rojo, F.A., Martínez, A.R., Sánchez, M.C., Hernández-Rodríguez, S., Navarrete-López, I., Diez-Baños, P., Quiroz-Romero, H., Carvalho-Varela, M. 1999. Parasitología Veterinaria. Editorial Mcgraw-hill- interamericana de España. Madrid, España. p 642-646.

Durette, D. M. 1983. Keys to the genera of the superfamily Trichostrongyloidea. No 10. 1-68pp. En: Anderson, R. C y Chabaud, A. G. (eds). CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, England.

Durette, D. M. y Chabaud, A. G. 1985. Trichostrongyloid nematodes and their vertebrates hosts: reconstruction of the phylogeny of a parasitic group. Advances in Parasitology. 24: 239-306.

García, P. L., Falcón, O. J. y Gúzman, T. C. 2012. Helminth parasite of wild Mexican mammals: list of species, host and geographical distribution. Zootaxa 3290: 1-92.

Gardner, A. L. 1973. The Systematics of the Genus *Didelphis* (Marsupialia: Didelphidae) in North and Middle America, Texas Tech Press.

Gardner, A. L. 2005. Order Didelphimorphia. En: Wilson, D. E. Y Reeder, D. M. (eds.) Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.

Gipson, P. S., Livingston, T. R, Zuercher, G. L. y Howard, M. E. 2003. Responses of opossums and raccoons to bobcat and coyote feces. *Western North American Naturalist*, 63, 538-540.

Gómez, A. P., Proy, H., Eljure, N., Dieguez, C. A. y Rocher, C. C. 2013. Larva migrans cutánea relacionada con *Ancylostomas*. *Dermatol Rev Mex*, 57, 454-460.

Harder, J. D., Stonerook, M. J. y Pondy, J. 1993. Gestation and placentation in two new world opossums: *Didelphis virginiana* and *Monodelphis domestica*. *Journal of Experimental Zoology*, 266, 463-479.

Hunsaker, D. 1977. The biology of Marsupials, New York: Academic.

Jiménez, O. J., Ruenes, M. D. y Montañez, P. 1999. Agrodiversidad de los solares de la Península de Yucatán. *Red de gestión de recursos naturales*, 14, 30-40.

Krause, W. J. y Krause, W. A. 2006. The opossum: it's amazing story, Columbia, Missouri, Department of Pathology and Anatomical Sciences, School of Medicine, University of Missouri.

Lamothe, A. R. 1981. Hospederos definitivos e intermediaries de *Paragonimus mexicanus*, Miyazaki e Ishii, 1968, en México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México* ,52: 39-44.

Lamothe, A. R., Akahane, H., Osorio, D. y García, L. 1998. Hallazgo de *Gnathostoma turgidum* en *Didelphis virginiana* de Temascal, Oaxaca, México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México* 69: 225–229.

Lamothe, A., Pérez, P., y García, P. L. 1997. Helmintos parásitos intestinales de Animales Silvestres. *Historia natural de los Tuxtlas*, pp. 1-7.

Lee, D. L. 2002. The Biology of Nematodes. Inglaterra y New York, Taylor & Francis. 1284 pp.

Liebano, H. E. 2011. Ecología de larvas de nematodos gastrointestinales de bovinos, ovinos y caprinos. En: Quiroz, R. H, Figueroa, C. J., Ibarra, V. F., y López, A. M. (eds). Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. UNAM, México, D.F. p. 254–272

Livingston, T. R., Gipson, P. S., Ballard, W. B., Sánchez, D. M. y Krausman, P. R. 2005. Scat removal: a source of bias in feces-related studies. *Wildlife Society Bulletin*, 33, 172-178.

McManus, J. J. 1970. Behavior of Captive Opossums, *Didelphis marsupialis virginiana*. *The American Midland Naturalist*, 84, 144-169.

McManus, J. J. 1974. *Didelphis virginiana*. *Mammalian Species*, 1-6.

Monet, M. A., Osorio, S. D. y García, P. L. 2005. Helminths of the Virginia opossum *Didelphis virginiana* (Mammalia: Didelphidae) in Mexico. *Journal of Parasitology*, 91, 213-219.

Monsalve, B. S., Mattar, V. S. y González, T. M. 2009. Zoonosis transmitidas por animales silvestres y su impacto en las enfermedades emergentes y reemergentes. *Revista MVZ Córdoba*, 14, 1762-1773.

Muñoz, R.L., Pérez, B. J., Ramírez, M. A. y Gómez, M. X. 2017. Identificación de parásitos gastrointestinales en zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*) por medio de la técnica de Sheather. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 30: (Supl). pp. 152.

Pasteur, G. 1982. A classificatory review of mimicry systems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13: 169-199.

Peniche, L.G., Ruiz, P. H, Reyes, N.E, Dzul, R.K. y Zavala, C.J. 2016. Infection by *Rickettsia felis* in Opossums (*Didelphis* sp.) from Yucatan, Mexico. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*, 58.

Pérez-Ponce de León, G., García, P. L. y Mendoza, B. G. 2010. Helmintos parásitos de vertebrados silvestres. En: Molina, F. F. y Van, D. T. (eds). *Diversidad biológica de Sonora*. UNAM, México, pp. 268-283.

Potkay, S. 1977. Diseases of marsupials. En: Hunsaker, D. (ed.) *The biology of the marsupials*. First ed. United States of America: Academic Press, INC.

Ramírez, P. J., Gonzalez, R. N., Gardner, A. L. y Arroyo, C.J. 2014. List of recent land mammals from Mexico. Texas, Special Publications Museum of Texas Tech University.

Reyes, N.E., Ruíz, P. H., Escobedo, O.J., Rodríguez, V.I., Bolio, G.M., Polanco, R.A. y Manrique, S.P. 2011. Current status and perspectives for the study of emergent, reemergent and neglected zoonotic diseases in the Yucatan peninsula, Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14, 35-54.

Reynolds, H.C. 1952. Studies on reproduction in the opossum (*Didelphis virginiana*). University Californy Publication. *Zoology*. 52: 223-284.

Roberts, L. S., Schmidt, G. D. y Janovy, J. 2009. Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' foundations of parasitology, Boston: McGraw-Hill Higher Education, 8th edition.

Rueda, M. C., Ramírez, G. F. y Osorio, J. H. 2013. Aproximación a la biología de la zarigüeya común (*Didelphis marsupialis*). *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 17, 141-153.

Rueda, M. C., Ramírez, G. F. y Osorio, J. H. 2014. Identificación de helmintos en zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*) en el suroccidente colombiano. *Revista Biosalud*, 13 (1): 37-44.

Ruiz-Piña, H. A., Puc-Franco, M. A., Flores-Abuxapqui, J., Vado-Solís, I. y Cárdenas-Marrufo, M. F. 2002. Isolation of *Salmonella enterica* and serologic reactivity to *Leptospira interrogans* in opossums (*Didelphis virginiana*) from Yucatán, México. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 44, 235-237.

Ruiz, P. H. A. y Cruz, R. A. 2002. The opossum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilche, Yucatan, Mexico. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 613-620.

Ruiz, P. H., Reyes, N. E., Escobedo, O. F. y Barrera, L. M. 2013a. Mamíferos sinantrópicos y la transmisión de enfermedades zoonóticas en el área rural de Yucatán. En: Pacheco, C. J., Lugo, P. J., Tzuc, C. L. y Ruiz, P. H. (eds.) *Estudio multidisciplinarios de las enfermedades zoonóticas y ETVs en Yucatán*. Primera ed. Yucatán, México: Universidad Autónoma de Yucatán.

Ruiz, P.H., Pacheco, C.I, y Lugo, P. I. 2013b. El “Zorro” de Yucatán y su relación con la población humana. En: Pacheco, C. J., Lugo, P. J., Tzuc, C. L. y Ruiz, P. H. (eds.) *Estudio multidisciplinarios de las enfermedades zoonóticas y ETVs en Yucatán*. Primera ed. Yucatán, México: Universidad Autónoma de Yucatán.

Sasser, J. N. y Freckman, D. W. 1987. A world prospective on nematology: the role of the society, pp. 7-14. En: Veech, J. A. y Dickson, D. W. Vistas on Nematology. Society of Nematologists, Hyattsville, MD.

Seguel, M. y Gottdenker, N. 2017. The diversity and impact of hookworm infections in wildlife. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 6, 177-194.

Silva, M. D., Lima, S. S., Borges, G. C., y Porto, N. J. 2017. Ocorrência de parasitas gastrointestinais zoonóticos em uma população de *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) de uma área urbana no nordeste do Brasil-(translation to English) Occurrence of zoonotic gastrointestinal parasites in a population of *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) from an urban área in the northeast of Brazil. REDVET Revista Electronica Veterinaria, 18, 1-12.

Taylor, M. A., Coop, R. L. y Wall, R. L. 2016. Veterinary Parasitology. 4° Ed. UK. Wiley Blackwell. 1035 pp.

Torres, C.M., Noh, P.H., Puerto, H.R., Reyes, H.B., Panti, M.A., Hernández, B.S., Yeh, G., González, H.L., Zavala, C.J. y Puerto, F. I. 2016. First molecular evidence of *Toxoplasma gondii* in opossums (*Didelphis virginiana*) from Yucatan, Mexico. Open Veterinary Journal, 6, 57-61.

Weinstein, S. B. y Lafferty, K. D. 2015. How do humans affect wildlife nematodes? Trends in Parasitology, 31, 222-227.

VI. ARTÍCULO

En formato de la revista JOURNAL OF HELMINTHOLOGY

Identificación molecular de huevos de *Ancylostoma* sp. Y *Viannaia* sp. en zarigüeyas *Didelphis virginiana* de una localidad rural de Yucatán, México

Rosendo Arturo de Jesús Aragón Pech^{1*}, Hugo Antonio Ruiz Piña¹, Roger Iván Rodríguez Vivas²,
Francisco Javier Escobedo Ortegón¹

¹Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Universidad Autónoma de Yucatán,
Avenida Itzáes, No. 490 x Calle 59, Col. Centro, Mérida, Yucatán, México.

²Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Km 15.5
Carretera Mérida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán, México.

Encabezado: Identificación molecular de *Ancylostoma* y *Viannaia* en *Didelphis virginiana*

*Autor de correspondencia: rosendoaragonp@gmail.com

Identificación molecular de huevos de *Ancylostoma* y *Viannaia* en zarigüeyas *Didelphis virginiana* de una localidad rural de Yucatán, México

R.A. Aragón-Pech^{1*}, H.A. Ruiz-Piña¹, R.I. Rodríguez-Vivas² y F.J. Escobedo-Ortegón¹

¹Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Universidad Autónoma de Yucatán, Avenida Itzáes, No. 490 x Calle 59, Col. Centro, Mérida, Yucatán, México y ²Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Km 15.5 Carretera Mérida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán, México.

Resumen

El objetivo del estudio fue identificar mediante la amplificación por PCR de las secuencias ITS-1 e ITS-2 huevos del género *Ancylostoma* y *Viannaia* en heces de *Didelphis virginiana* capturadas en una localidad rural de Yucatán, México. El muestreo se realizó durante la temporada húmeda (junio a octubre 2018) y seca (noviembre 2018 a marzo 2019). El diagnóstico coprológico se realizó mediante la técnica de enriquecimiento por flotación, la amplificación por PCR mediante dos pares de oligonucleótidos (RTGHF1/RTGHR1) y (VianITS1-F/VianITS1-R) los cuales amplifican la secuencia ITS-1-ITS-2 del género *Ancylostoma* e ITS-1 de *Viannaia* respectivamente. Un total de 112 individuos *D. virginiana* fueron examinados mediante análisis coprológico, de estos trece muestras fecales con > 2000 HPG fueron amplificadas mediante PCR. Los resultados mostraron una prevalencia del 82 % con huevos de *Viannaia* sp. De las muestras amplificadas por PCR, 8 fueron positivas a *Viannaia* sp. y cero a *Ancylostoma* sp. De los animales sacrificados todos fueron negativos a adultos de *Ancylostoma* sp., mientras que nueve positivos a *Viannaia* sp. Este es el primer estudio en identificar y confirmar mediante análisis molecular por PCR la presencia de huevos que corresponden a *Viannaia* sp. en heces de *D. virginiana*, en una localidad rural de Yucatán, México.

Palabras clave: *Didelphis virginiana*, *Viannaia* sp., *Ancylostoma*, México

Introducción

Las zarigüeyas del género *Didelphis*, están ampliamente distribuidas en México, encontrándose de manera simpátrica las especies *Didelphis virginiana* y *D. marsupialis* (Gardner, 2005; Ceballos y Arroyo, 2012; Ramírez *et al.*, 2014). La especie *D. virginiana* es considerado una especie sinantrópica en localidades rurales del estado de Yucatán, dado que encuentran con mayor frecuencia en el peridomicilio, ocupando basureros, bodegas, gallineros, montículos de piedra, y otros materiales que utilizan como refugios temporales (Ruíz *et al.*, 2013a). Dada su naturaleza omnívora, los patios de las viviendas yucatecas o “solar” fungen como ecotopos para *D. virginiana*, ya que las familias cuentan con árboles frutales, hortalizas y animales de traspatio, los cuales brindan las condiciones necesarias para su supervivencia (Ruiz y Cruz, 2002, Ruiz *et al.* 2013b).

En México, las zarigüeyas del género *Didelphis* tienen una gran importancia en el área de la salud pública, ya que son mamíferos que participan como hospederos definitivos, intermediarios, paraténicos y reservorios de muchos agentes patógenos de importancia zoonótica (Cruz, 2009).

En cuanto a sus nematodos parásitos, en México, se tiene información de varias familias parasitando a las zarigüeyas del género *Didelphis*, como lo son: Angionstrongylidae, Ascaridae, Heterakoidea, Toxocaridae, Kathlaniidae, Gnathostomidae, Gonglyonematidae, Physaloptera, Spirocecidiae, Trichuridae, Capillaridae y Viannaiidae (Monet *et al.*, 2005; Acosta *et al.*, 2015).

La mayoría de los trabajos realizados en México con helmintos parasitando zarigüeyas *Didelphis*, han sido realizados mediante la colecta de nematodos adultos en el intestino u organos de estos marsupiales, el único trabajo en México que reporta huevos de parásitos gastrointestinales en heces de *D. virginiana*, se realizó por Aragón *et al.* (2018), mediante técnica de flotación, donde reportaron la presencia de huevos de *Ancylostoma* sp., *Trichuris* sp., *Capillaria* sp., *Toxocara* sp., *Turgida* sp., *Cruzia* sp., y *Ascaris* sp, también, reporta que la prevalencia más alta fue de *Ancylostoma* sp. con 84 %.

La información en cuanto a la infección con nematodos de la familia Ancylostomatidae, en zarigüeyas, es escasa. En algunos países de Latinoamérica, se reporta la presencia de *Ancylostoma* sp. en varias especies del género *Didelphis*, identificados mediante examen directo y diversas técnicas de flotación, sin embargo, ninguno de estos trabajos reporta la presencia de nematodos adultos de *Ancylostoma* sp. (Rueda *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2017; Muñoz *et al.*, 2017; Teodoro *et al.*, 2019).

En un estudio realizado en Brasil, por Teodoro *et al.* (2019), reportan la presencia de huevos de Ancylostomatidae en heces de *Didelphis albiventris*, no obstante, al hacer la necropsia no encontraron parásitos adultos de *Ancylostoma*, solo nematodos del género *Viannaia* sp. en los mismos individuos antes identificados como *Ancylostoma* sp.

El género *Viannaia* (Strongylida: Viannaiidae) se encuentra ampliamente reportado en zarigüeyas de la familia Didelphidae en varios países de América (Pinto & Gomes, 1980; Guerrero, 1985; Ellis *et al.*, 1999; Silva & Costa, 1999; Monet *et al.*, 2005; Tantaleán *et al.*, 2010; Scheibel *et al.*, 2014; Acosta *et al.*, 2015; Chero *et al.*, 2017; Simões *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2018; Teodoro *et al.*, 2019).

El nematodo *Viannaia* sp., en vivo presenta una coloración rojiza, aparente dilatación cefálica, son de cuerpo pequeño y se localizan en la mucosa intestinal de marsupiales americanos, otras de las características distintivas es la carencia de capsula bucal y dientes esofágicos, los cuales son distintivos del género *Ancylostoma*, aunque por ser del orden Strongylida, ambos presentan una bolsa copulatoria con características diferentes (Anderson *et al.*, 2009).

En cuanto a su impacto en la salud de las zarigüeyas, con infección por *Viannaia* sp., no se tiene registro de causarle algún daño severo. En lo que respecta a *Ancylostoma* sp., se sabe que puede ser mortal en fauna silvestre, causándoles diarrea, anemia, crecimiento retardado, daño en tejido y algunos casos la muerte (Seguel y Gottdenker., 2017).

Considerando la alta prevalencia de *Ancylostoma* sp. en *D. virginiana* en el estado de Yucatán, aunado a la similitud que existe entre los huevos de *Viannaia* sp. y *Ancylostoma* sp., así como la dificultad que existe para llegar a especie mediante la observación directa de huevos de parásitos. El presente trabajo tiene como objetivo identificar mediante la amplificación por PCR de las secuencias ITS-1 e ITS-2 huevos del género *Ancylostoma* y *Viannaia* en heces de *Didelphis virginiana* capturadas en una localidad rural de Yucatán, México.

Materiales y métodos

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en la comunidad de Komchén (21°06'11" N y 89°39'41" W), en un área rural localizada al norte del estado de Yucatán, México. La localidad cuenta con una población de 4,259 habitantes (INEGI, 2010). El clima es de tipo Aw0 (i) gw'', semiseco muy cálido y cálido subhúmedo con lluvias en verano y poca oscilación térmica. La temperatura media anual es de 26°C (rango 16-36° C) con una precipitación anual de 700 mm con mayor ocurrencia de lluvias en verano, la vegetación está conformada por selva caducifolia y el suelo predominante es de tipo Leptosol (Orellana, 2010).

Captura de zarigüeyas

Las zarigüeyas fueron capturadas en dos períodos climáticos; de junio a octubre del 2018 (período húmedo) y de noviembre 2018 a marzo del 2019 (período seco), en 100 casas seleccionadas a conveniencia y previa autorización de las familias. Cada mes se colocaron 100 trampas Tomahawk (66 x 23 x 23 cm; Tomahawk Live Trap Co.), una por cada casa seleccionada, las trampas fueron cebadas con piña y colocadas al atardecer en el patio o "solar" de cada vivienda, de igual manera, fueron retiradas a la mañana siguiente. Los animales capturados fueron transportados al laboratorio de zoonosis y otras enfermedades transmitidas por vectores, para la toma de datos somáticos y la obtención de muestras biológicas. La transportación se realizó mediante las condiciones que minimicen el estrés y malestar de los animales, considerando las recomendaciones para el manejo de fauna silvestre con fines de investigación (NOM-062-ZOO-1999; Sikes, 2016).

Colecta de heces y análisis coproparasitológicos

Las zarigüeyas presentan tanatosis, este comportamiento se caracteriza por defecar y orinar durante su manejo en el laboratorio (Krause & Krause, 2006). Las muestras de heces fueron obtenidas conforme a lo descrito por Rodríguez & Cob (2005), aproximadamente de dos a tres gramos de heces directamente de la jaula o tomada del recto de cada animal, y posteriormente fueron colocadas en bolsas tipo Ziploc (12.5 x 8 cm) y almacenadas en condiciones de refrigeración (4° C) hasta su análisis. El examen coproparasitológico se realizó mediante la técnica de enriquecimiento por flotación con solución saturada de glucosa (SSG) descrita por Rodríguez & Cob

(2005). El conteo de huevos por gramo de heces se realizó mediante la técnica de McMaster modificada descrita por Rodríguez & Cob (2005), donde se usó 1 g de heces y 14 ml de SSG.

Examinación de las zarigüeyas

En el laboratorio se tomaron los datos somáticos de las zarigüeyas tales como el sexo y la edad. El sexo se identificó por observación de los genitales, y la edad mediante su fórmula dental de juveniles cuando presentan 5/4, 1/1, 3/3, 3/4 y adultos 5/4, 1/1, 3/3, 4/4 (Haro *et al.*, 2018).

A las zarigüeyas con mayor excreción de huevos por gramo de heces (HPG) de Viannaiidae se les realizó la eutanasia mediante las indicaciones de la NOM-033-SAG/ZOO-2014.

Para ello, las zarigüeyas fueron sedadas por administración intramuscular en la región glútea con hidrocloreto de ketamina (30 mg/kg) asociado con xilacina (2 mg/kg), posteriormente se le aplicó una sobredosis vía intracardiaca de 5 ml de pentobarbital sódico. En la necropsia se colectó los órganos del sistema digestivo de los animales, los cuales fueron colocados en cajas de Petri con solución salina, se revisó principalmente el intestino delgado. Los nematodos recuperados del intestino delgado fueron fijados con alcohol etílico al 70 % para su identificación y otros con EtOH 100% para estudios moleculares. Los nematodos se aclararon con lactofenol y se realizaron montajes temporales para la toma de medidas y fotografías.

Métodos moleculares

Para confirmar los resultados observados en el microscopio, se seleccionaron las muestras de heces de *D. virginiana* con mayor excreción de HPG y se extrajo el ADN. Las muestras seleccionadas, fueron sujetas a diagnóstico molecular por PCR para complementar el diagnóstico realizado por microscopía óptica.

Extracción de ADN de nematodos adultos

Nematodos adultos de *Ancylostoma caninum* fueron aislados del intestino delgado de perros sacrificados en la sala de necropsia de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán, México, y su ADN fue usado como control positivo en la PCR. En cuanto a *Viannaiidae* se usó como control positivo los nematodos adultos aislados de *D. virginiana*.

La extracción de ADN de *A. caninum* aislados del perro, así como, los nematodos de Viannaiidae colectados del intestino delgado de *D. virginiana*, se realizó mediante el DNeasy Blood

& Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de ADN fueron almacenadas a – 20° C hasta su análisis.

Extracción ADN en heces de zarigüeyas

Se seleccionaron trece muestras de heces de *D. virginiana* con la mayor eliminación de huevos (> 2000 HPG) de nematodos con el fin de asegurar una mayor cantidad de ADN del parásito. Trescientos microgramos de heces de cada animal fue colocado en un tubo de 1.5 ml y almacenados en un ultracongelador (-80 °C) (Kaltis international, Taiwan), posterior a 24 horas se extrajo el ADN mediante el QIAamp DNA Mini Stool Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Amplificación del fragmento ITS-1 e ITS-2 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el género Ancylostoma

La amplificación del fragmento ITS-1 e ITS-2 del género *Ancylostoma*, fue realizado mediante los oligonucleótidos; Forward RTGHF1 (5'-CGTGCTAGTCTTCAGGACTTTG-3') y Reverse RTGHR1 (5'-CGTTGTCATACTAGCCACTGC-3'), los cuales amplifican a 679 pares de bases (pb) región conservada de *A. tubaeforme*, 680 pb región de *A. caninum* y *A. duodenale*, por último, 690 pb región de *A. ceylanicum* (Traub *et al.*, 2004). La mezcla de PCR fue realizado en un volumen final de 20 µl conteniendo 1.25µl (12.5 pmol) de cada oligonucleótido, 1 µl de MgCl₂, 1µl de Dimethyl Sulfoxide (CH₃)₂SO, 0.50µl de Triton X-100 (Bio-Rad), 10µl de Go Taq® Polimerasa (Promega Corporation, Madison, USA) y 5 µl de ADN. Las condiciones de la PCR fueron a 94° C por 2 min, 64° C por 1 min 72° C por 2 min seguido de 50 ciclos de 94° C por 30 s, 64° C por 30 s, 72° C por 30 s y 1 ciclo de 72° C por 7 min. Los amplicones fueron visualizados en un gel de agarosa (1.5%) con buffer TBE 1x a 100 V por 45 min. Control positivo ADN *Ancylostoma caninum*, control negativo mezcla de PCR.

Amplificación del fragmento ITS-1 mediante PCR para el género Viannaia

Para la amplificación del fragmento ITS-1 para el género *Viannaia* se diseñaron oligonucleótidos. Las secuencias de nucleótidos para el gen ITS-1 de *Viannaia viannai* (número de acceso GenBank JX877687), *V. minispicula* (número acceso GenBank JX877696), *V. hamata* (número acceso GenBank JX877695), *V. didelphis* (número acceso GenBank JX877689, JX877688) se obtuvieron del GenBank. Las secuencias fueron alineadas mediante Clustal W con el programa Unipro UGENE (Okonechnikov *et al.*, 2012). Los oligonucleotidos F: VianITS1-F (5'-

ATGTCATGAGTCGTTCTTGAGT-3') y R: VianITS1-R (5'-CGGCGCTATGCGTTCAAAAT-3') son diseñados para amplificar la región ITS-1 de *Viannaia viannai* a 391 pares de bases (pb), *V. minispicula* a 386 pb, *V. hamata* a 391 pb y *V. didelphis* a 392 pb. La mezcla de PCR fue realizada en una concentración final de 20 µl conteniendo 1µl de cada oligonucleótido 10pmol, 10 µl de GoTaq® (Promega Corporation, Madison, USA), 3 µl de H₂O y 5 µl de ADN. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95° C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95° C por 40 s, 58° C por 1 min, 72° C por 1 min, seguido de 1 ciclo de 72° C por 5 min. Los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% con buffer TBE 1x a 100 V por 45 min. Control positivo se úso ADN de *Viannaia* sp. y control negativo mezcla de reacción.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se calculó la prevalencia de los animales infectados. Los análisis estadísticos fueron calculados con intervalos de confianza del 95% (Bush *et al.*, 1997; Rózsa *et al.*, 2000), y fueron estimados con Quantitative Parasitology 3.0 (Reiczigel *et al.*, 2019). Para identificar los factores asociados a la infección, se realizó una prueba de X² (análisis univariado) mediante tablas 2x2, como variables independientes se usó el sexo (macho y hembra), la edad (juvenil y adulto) y temporada climática (húmeda y secas) los análisis estadísticos se realizaron en el programa EpiInfo™ (Dean *et al.*, 2011).

Resultados

Un total de 112 zarigüeyas *Didelphis virginiana* fueron examinadas mediante examen coproparasitológico, de estos; 57 fueron machos y 55 hembras (81 adultos y 31 juveniles), en la temporada húmeda se capturaron 65 animales, mientras en secas 47.

De las 12 zarigüeyas sacrificadas durante los diez meses de estudio (8 en la temporada húmeda y 4 en secas), en nueve zarigüeyas se encontraron adheridos en la parte anterior de la mucosa intestinal nematodos adultos que carecieron de diente esofágico, ausencia de labios y de estructura tipo mandíbula.

Los nematodos se caracterizaron por tener el cuerpo pequeño y filiformes, localizados en la mucosa del intestino y en vivo presentaron una coloración rojiza, aunque, una vez fijados con alcohol, se contrajeron y se enrollaron entre sí, los machos (de 2 a 4 vueltas) y las hembras (de 2 a 8 vueltas) (fig. 1A). Los machos presentaron una bolsa copulatoria en el extremo distal con una

fórmula bursal 2-1-2 (fig. 1B). Tanto los machos como las hembras presentaron una dilatación cefálica con una capsula bucal poco prominente (fig. 1C), las hembras, presentaron útero en forma lineal y huevos dispuestos en tándem de forma elíptica (fig. 1D). Para llegar a género se uso la guía de Guerrero (1985).

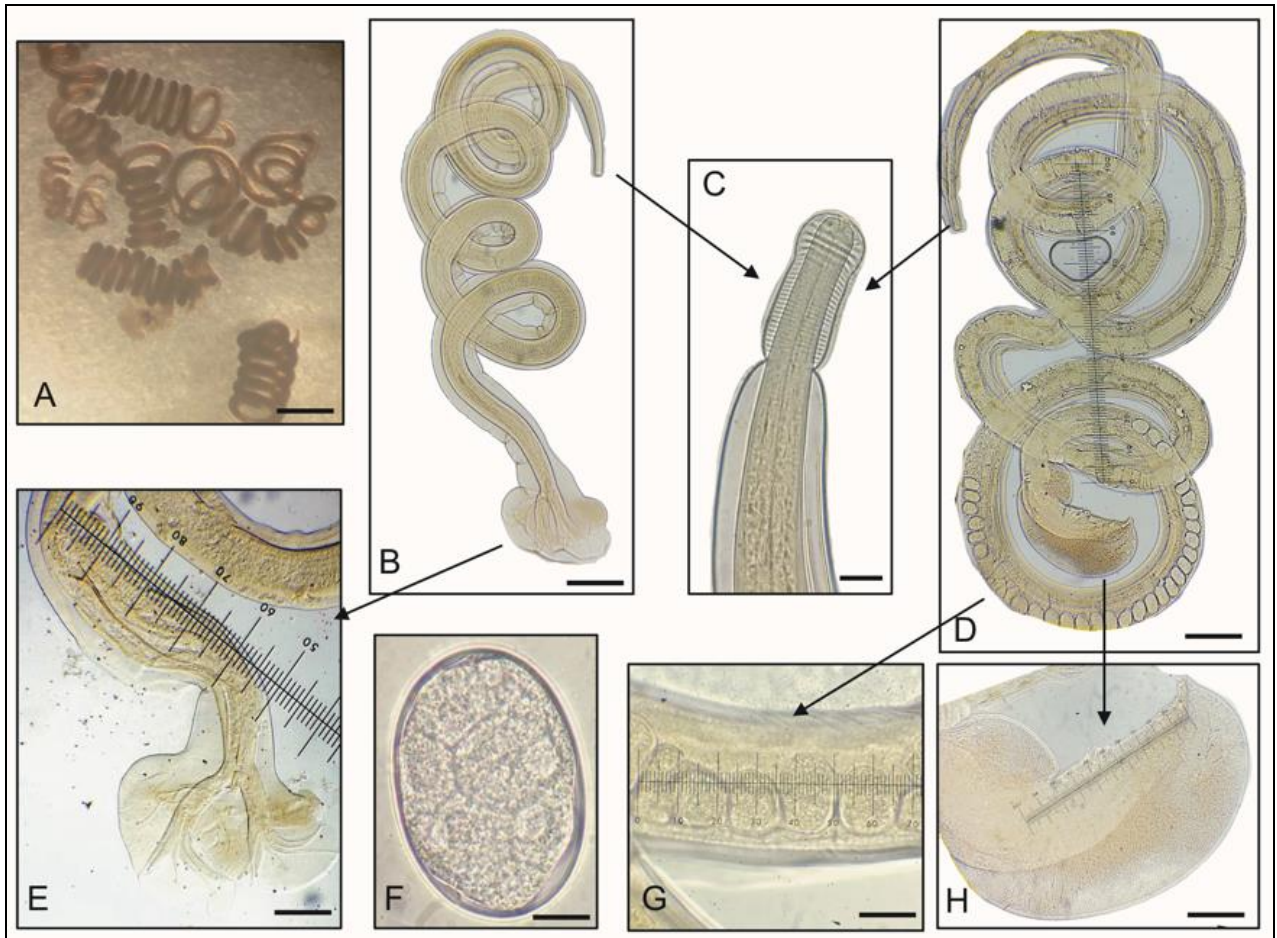


Fig. 3. Nematodo *Viannaia* sp. (A) nematodos vivos observados desde el estereoscopio. (B) *Viannaia* sp. macho, presencia de bolsa copulatriz en la parte distal 10x. (C) dilatación cefálica en ambos sexos 40x. (D) *Viannaia* sp. hembra, útero de forma lineal y huevos dispuestos en tándem 40x. (E) bolsa copulatriz del macho, presencia de espículas filiformes 40x. (F) huevos de *Viannaia* sp. (45-55 μ m por 25-35 μ m) observados en las heces de *D. virginiana* 40x. (G) huevos de la hembra dispuestos en tándem 40x. (H) útero en forma lineal de la hembra a 40x.

En cuanto a la identificación molecular por PCR las 13 muestras de ADN de heces de *D. virginiana* resultaron negativas a la amplificación de los fragmentos del gen ITS-1-ITS-2 del género *Ancylostoma* (fig. 2). Ocho de trece muestras de ADN de heces de *D. virginiana* resultaron positivos a la amplificación del fragmento ITS-1 del género *Viannaia* (fig. 3). Sin embargo, no se pudo observar las diferencias de pares de bases entre especies de *Viannaia* en el gel de agarosa, por lo

tanto, se decidió como género *Viannaia*. Las muestras restantes que resultaron negativas pudiesen deberse a que quizá exista otra u otras especies del orden Strongylida, que no pertenece a *Ancylostoma* ni a *Viannaia*. Para asegurar la fidelidad de los oligonucleótidos, se colocó ADN de *Ancylostoma caninum* y *Lagochilascaris minor* en la PCR, los cuales resultaron negativos (fig. 3).

Con base en estos resultados se pudo diagnosticar que los nematodos eliminados en muestras de fecales de *D. virginiana* el 61.50 % fueron del género *Viannaia* (Cuadro 1).

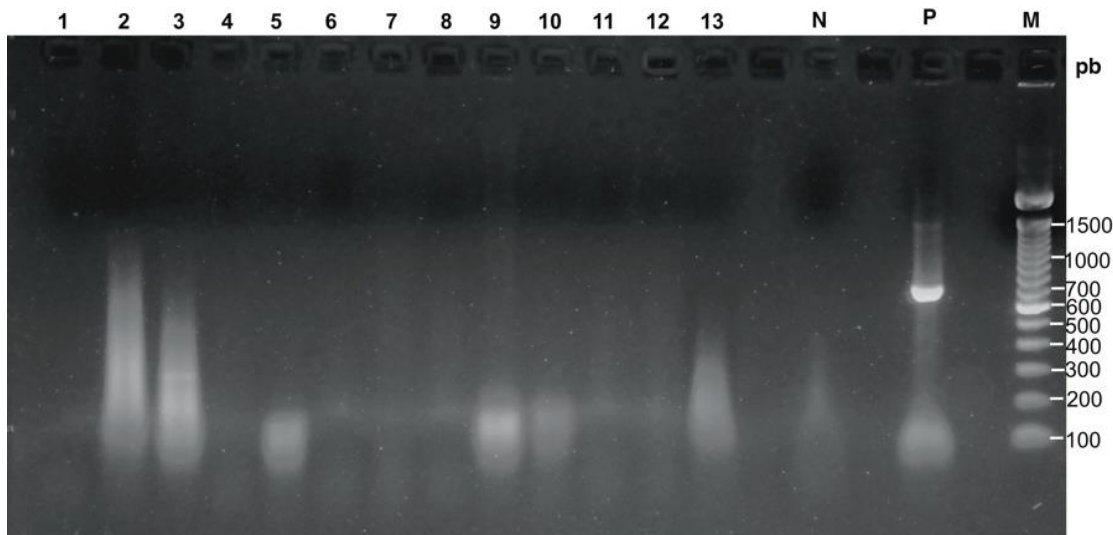


Fig. 4. Amplificación de la PCR del fragmento ITS-1- ITS-2 del género *Ancylostoma*. Carriles: 1-13, ADN de heces de *D. virginiana* > 2000 HPG; N, control negativo mezcla de reacción; P, control positivo ADN de *Ancylostoma caninum*; M, marcador de pares de bases (Invitrogen™ TrackIt™ 100 bp DNA Ladder).

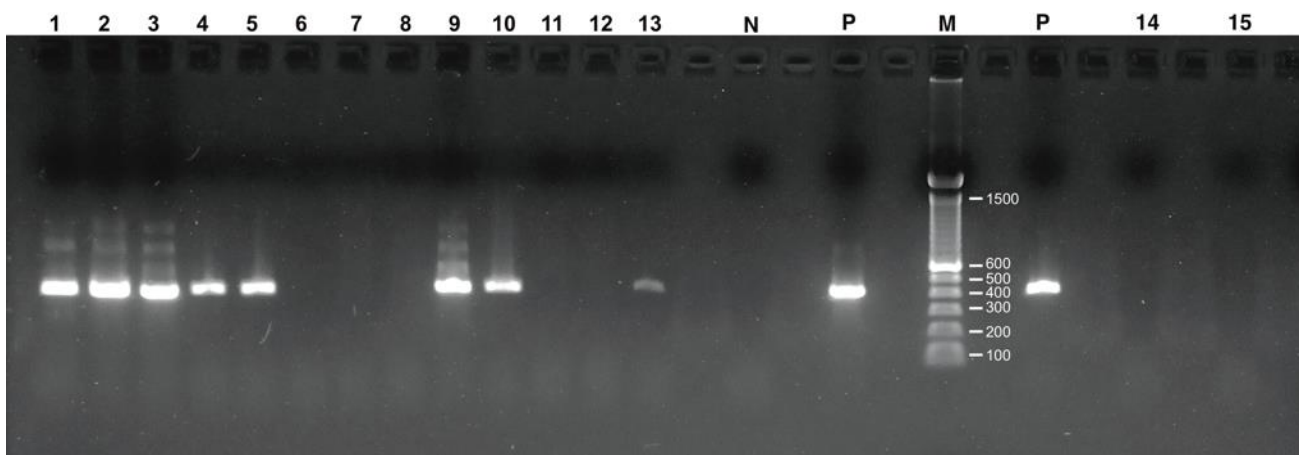


Fig. 5. Amplificación de la PCR del fragmento ITS-1 del género *Viannaia*. Carriles: 1-13, ADN heces de *D. virginiana* > 2000 HPG; N, control negativo mezcla de reacción; P, control positivo ADN de *Viannaia* sp.; M, marcador de pares

de bases (Invitrogen™ TrackIt™ 100 bp DNA Ladder). 14, ADN control *Lagochilascaris minor*; 15, ADN control *Ancylostoma caninum*.

Asimismo, se identificaron en las muestras fecales nematodos de *Cruzia* sp. (63%), *Turgida* sp. (32 %) y *Trichuris* sp. (18 %). En el análisis de factores asociados a la infección de *D. virginiana* con *Viannaia* sp. La prueba de X^2 no mostró factores asociados significativamente: sexo ($X^2=0.1862$, $df=1$, $P > 0.05$), edad ($X^2=2.2452$, $df=1$, $P > 0.05$) y temporada del año ($X^2=0.1616$, $df=1$, $P > 0.05$).

Cuadro 1. Resultados de la intensidad promedio (HPG) y la relación entre la prevalencia de infección con huevos de *Viannaia* sp. y los parámetros poblacionales de 112 *Didelphis virginiana* (sexo y edad) y temporada climática de captura (húmeda y seca).

Variables	Número de animales	Animales infectados	Prevalencia % (I.C. 95%)
Sexo			
Machos	57	49	86 (74.2-93.7)
Hembras	55	40	72.7 (59-83.9)*
Edad			
Juvenil	31	28	90.3 (74.2-98)
Adulto	81	61	75.3 (64.5-84.2)*
Temporada			
Húmeda	65	53	81.5 (70-90.1)
Seca	47	36	76.7 (62-87.7)*

*Análisis de X^2 o prueba exacta de Fisher's. $P > 0.05$.

Discusión

En un estudio realizado recientemente en el estado de Yucatán, México se reportó que el 84.5 % de muestras fecales de *D. virginiana* se encontraban parasitados por nematodos del género *Ancylostoma* y para confirmar este hecho se sugirió realizar estudios moleculares (Aragón *et al.*, 2018). En el presente estudio, aunque fue realizado en otra comunidad rural del estado de Yucatán, se encontró que los huevos de los nematodos con estructura morfológica similares al género *Ancylostoma* pertenecen molecularmente al género *Viannaia*. Dado que el objetivo del estudio fue

enfocado al diagnóstico y no taxonómico, se adoptó una posición conservadora, asignando a los nematodos encontrados al género *Viannaia* sp. hasta realizar un análisis taxonómico más profundo.

La diferenciación entre huevos de las familias de nematodos Trichostrongylidae y Ancylostomatidae, es difícil en la práctica, por tal motivo las técnicas moleculares son herramientas más sensibles que pueden ayudar a un mejor diagnóstico entre estas los géneros o especies de estas dos familias de nematodos (Yong et al., 2007).

No existe reportes del efecto que produce el nematodo *Viannaia* sp. sobre la salud en las zarigüeyas; sin embargo, junto con otros géneros de nematodos encontrados en este estudio (*Cruzia* sp., *Turgida* sp., y *Trichuris*) pueden causar lesiones en el tracto digestivo de los animales (Nettles et al., 1975; Nichelason et al., 2008).

La presencia de *Viannaia* sp. en el intestino delgado de *D. virginiana*, corresponde a lo reportado en zarigüeyas del género *Didelphis* en diversos países de América, tales como EUA, Venezuela, Perú, Brasil, Panamá, Costa Rica y Guayana Francesa (Pinto & Gomes, 1980; Guerrero, 1985; Ellis et al., 1999; Silva & Costa, 1999; Tantaleán et al., 2010; Scheibel et al., 2014; Chero et al., 2017; Simões et al., 2017; Costa et al., 2018; Teodoro et al., 2019).

La alta prevalencia 82 % de *Viannaia* sp. en *D. virginiana*, pudiera estar relacionado con su ciclo de vida directo, dado que es un animal omnívoro, lo cual aumenta la posibilidad de infección mediante ingesta de huevos embrionados o larvas infectantes (L₃) de *Viannaia* sp. dispersos en el ecosistema (Anderson, 2009).

La alta prevalencia de *Viannaia* sp. encontrada en el presente estudio es superior a la reportada por Teodoro et al. (2019) en Brasil quienes encontraron una prevalencia de 7 % y 100 % de Trichostrongylidae al estudiar 56 *D. albiventris* y 2 *D. aurita*, respectivamente. De igual manera, estos autores reportan la presencia de parásitos adultos de *Viannaia* sp., en el duodeno de cuatro *D. albiventris*.

En México la presencia de especies del género *Viannaia* ha sido reportado en los estados de Colima, Guerrero, Campeche, Chiapas, Oaxaca, Puebla, Tabasco y Veracruz, encontrando las especies *Viannaia* sp., *V. viannaia* y *V. didelphis* (Monet et al., 2005, Acosta et al., 2015).

En diversos estudios se ha reportado a los marsupiales del género *Didelphis* estar parasitados con nematodos del género *Ancylostoma*, estos estudios se han basado en la observación de huevos

en las heces (Rueda *et al.*, 2014; Muñoz *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017; Aragón *et al.*, 2018; Teodoro *et al.*, 2019). A pesar de estos reportes, la identificación de huevos de las familias Viannaiidae y Ancylostomatidae son difíciles y para poder confirmar los géneros presentes en las heces se recomienda actualmente pruebas moleculares que son altamente específicas (Traub *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2016).

En el presente estudio no fue posible identificar factores asociados a las infecciones de *D. virginiana* con *Viannaia* sp.; sin embargo, en estudios previos se ha identificado que las épocas de mayor humedad y animales juveniles tienen mayor probabilidad de estar infectado con nematodos (Ruiz & Cruz, 2002; Aragón *et al.*, 2018).

La presencia de *Viannaia* sp. en el intestino y heces de zarigüeyas *Didelphis virginiana* en Yucatán, México, representa un nuevo registro de localidad para México, ampliando así su distribución geográfica.

El no haber encontrado adultos de *Ancylostoma* sp. y tampoco confirmar su presencia mediante PCR, nos da la pauta para mejorar el método diagnóstico a través de la observación directa en combinación con las técnicas de biología molecular, lo cual nos ayudaría a descartar posibles falsos positivos.

Este es el primer estudio en identificar y confirmar mediante análisis molecular por PCR la presencia del 61 % (8/13) de huevos que corresponden a *Viannaia* sp. en heces de zarigüeyas *D. virginiana* en una localidad rural de Yucatán, México. En futuros estudios se sugiere estudiar mayor número de zarigüeyas y diferentes localidades, así como usar las técnicas de secuenciación para llegar a especies, con el fin de entender la ecología del parásito y la relación con sus hospederos.

Agradecimientos

Al Dr. Manuel E. Bolio González de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UADY, por su apoyo para la colecta de *Ancylostoma caninum* en perros.

A todas las personas de la localidad de Komchén, Yucatán, México que nos apoyaron en la realización del trabajo de campo.

Financiamiento

R. A. A. es financiado con una beca para obtener el grado de Maestría en Ciencias por el CONACYT.

Conflicto de interés

Ninguna

Estándares éticos

Este estudio se llevó a cabo con el permiso de las autoridades encargadas de la fauna silvestre en México (SEMARNAT, SGPA/DGVS/ 004927/18) siguiendo los lineamientos del Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Yucatán (CB-CCBA-M-2018-001).

Referencias

Acosta, V., López, Z., García, P. & Mata, L. (2015) Helminths of three species of opossums (Mammalia, Didelphidae) from Mexico. *Zookeys* **511**, 131-152.

Anderson, R. C. (2000) *Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission*. 2nd Edn. Farnham Royal: CAB International.

Anderson, R., Chabaud, A. & Willmont, S. (2009) *Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. Archival Volume*. Wallingford: CABI Publishing.

Aragón, P.R., Ruiz, P., Rodríguez, V.R., Cuxim, K.A. & Reyes, N.E. (2018) Prevalence, abundance and intensity of eggs and oocysts of gastrointestinal parasites in the opossum *Didelphis virginiana* Kerr, 1792 in Yucatan, Mexico. *Helminthologia* **55** (2), 119-126.

Bowman, D. D. & Georgi, J. R. (2014) *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. 10th Edn. Missouri, ELSEVIER.

Bowman, D. D., Montgomey, S. P., Zajac, A. M., Eberhard, M. L. & Kazacos, K. R. (2010) Hookworms of dogs and cats as agents of cutaneous larva migrans. *Trends in Parasitology* **26** (4), 162-167.

Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, M.J. & Shostak, A.W. (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of parasitology* **83**(4), 575-583.

Cañeda, G. I. C. (1997) Parásitos intestinales de tres especies de marsupiales de la estación "Los Tuxtlas" y algunas zonas cercanas, Veracruz, México (Bachelor Thesis) Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

- Chero, J., Sáez, G., Mendoza, C., Iannacone, J. & Cruces, C.** (2017) Helminths of the common opossum *Didelphis marsupialis* (Didelphimorphia: Didelphidae), with a checklist of helminths parasitizing marsupials from Peru. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **88**, 560-571. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmb.2017.07.004>
- Costa-Neto, S., Cardoso, T., Boullosa, R., Maldonado, A. & Gentile, R.** (2018) Metacommunity structure of the helminths of the black-eared opossum *Didelphis aurita* in peri-urban, sylvatic and rural environments in south-eastern Brazil. *Journal of Helminthology*, 1-12. <https://doi.org/10.1017/S0022149X18000780>
- Dean, A. G, Arner, T. G, Sunki, G.G, Friedman, R., Lantinga, M., Sangam, S., Zubieta, J. C, Sullivan, K. M, Brendel, K.A., Gao, Z., Fontaine, N., Shu, M., Fuller, G., Smith, D. C, Nitschke, D. A., & Fagan, R. F.** (2011) *Epi Info™, a database and statistics program for public health professionals*. CDC, Atlanta, USA.
- Ellis, R. D., Pung, O. J. & Richardson, D. J.** (1999) Site selection by intestinal helminths of the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*). *Journal of Parasitology* **85**(1), 1-5.
- Gipson, P. S., Livingston, T. R, Zuercher, G. L. & Howard, M. E.** (2003) Responses of opossums and raccoons to bobcat and coyote feces. *Western North American Naturalist* **63**, 538-540.
- Guerrero, R.** (1985) Nematoda: Trichostrongyloidea parásitos de mamíferos silvestres de Venezuela. II. Revisión del género *Viannaia* Travassos, 1914. *Memoria de la Sociedad de Ciencias Naturales La Salle* **45**(124), 9-47.
- Haro, A., Ruiz, P., Canche, P., Medina, S. & Mercado, J.** (2018) Physiological basal parameters of free-ranging opossum (*Didelphis virginiana*) in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **49**(2): 480-483
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía)** (2010) Censo de Población y Vivienda 2010. Disponible en la página www.inegi.org.mx (Accedido Mayo 2019).
- Krause, W. J. & Krause, W. A.** (2006) *The opossum: it's amazing story*, Columbia, Missouri, Department of Pathology and Anatomical Sciences, School of Medicine, University of Missouri.
- Monet, M. A., Osorio, S. D. & García, P. L.** (2005) Helminths of the Virginia opossum *Didelphis virginiana* (Mammalia: Didelphidae) in Mexico. *Journal of Parasitology* **91**, 213-219.

- Muñoz, R.L., Pérez, B. J., Ramírez, M. A. & Gómez, M. X.** (2017) Identificación de parásitos gastrointestinales en zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*) por medio de la técnica de Sheather. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* **30**: (Supl). pp. 152.
- Nettles, V. F., Prestwood, A. K., & Davidson, W. R.** (1975) Severe parasitism in an opossum. *Journal of Wildlife Diseases* **11**, 419-420.
- Nichelason, A. E., Rejmanek, D., Dabritz, H.A., Melli, A. C., Miller, M., & Conrad, P. A.** (2008) Evaluation of *Cruzia americana*, *Turgida turgida*, and *Didelphostrongylus hayesi* infection in the Virginia Opossum (*Didelphis virginiana*) and California coast. *Journal of Parasitology* **94**(5), 1166-1168.
- NOM033-SAG/ZOO-2014 DOF.** (2015) Norma Oficial Mexicana [NOM-033-SAG/ZOO-2014]. Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. Disponible: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5405210&fecha=26/08/2015 Consultado: Mayo de 2019.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M. & the UGENE team.** (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* **28**(8), 1166-1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Oliveira, A., Davida, E., Oliveira, S., Katagiri, S., Coradi, S. & Guimarães, S.** (2016) Molecular identification of *Ancylostoma* species from dogs and an assessment of zoonotic risk in low-income households, São Paulo State, Brazil. *Journal of Helminthology* **91**(1), 14-19. <https://doi.org/10.1017/S0022149X15001145>
- Orellana, L.R., Espadas, M.C. & Nava, M.F.** (2010) Climas. In Durán, R. & Méndez, M. (Eds) *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán*. Mérida, Yucatán, México, CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA.
- Pinto, R. M. & Gomes, D. C.** (1980) Contribuição ao conhecimento da fauna helmintológica da região Amazônica. Nematódeos. *Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro* **21**, 65-74.
- Reiczigel, J., Marozzi, M., Fábian, I. & Rózsa, L.** (2019) Biostatistics for parasitologists – a primer to quantitative parasitology. *Trends in Parasitology* **35**(4), 277-281. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.003>

- Rodríguez, V.R & Cob, G.L.** (2005) Técnicas diagnósticas en parasitología veterinaria, 2nd Edn. 306 pp. Yucatán, México, Universidad Autónoma de Yucatán.
- Rózsa, L., Reiczigel, J. & Majoros, G.** (2000) Quantifying Parasites in samples of hosts. *Journal of Parasitology* **86**(2), 228 – 232. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0228:QPISOH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0228:QPISOH]2.0.CO;2)
- Rueda, M. C., Ramírez, G. F. & Osorio, J. H.** (2014) Identificación de helmintos en zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*) en el suroccidente colombiano. *Revista Biosalud* **13** (1), 37-44.
- Ruiz, P. H. A. & Cruz, R. A.** (2002) The opossum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilche, Yucatan, Mexico. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **97**, 613-620.
- Ruiz, P. H., Reyes, N. E., Escobedo, O. F. & Barrera, L. M.** (2013a) Mamíferos sinantrópicos y la transmisión de enfermedades zoonóticas en el área rural de Yucatán. pp. 184-194 in Pacheco, C. J., Lugo, P. J., Tzuc, C. L. & Ruiz, P. H. (Eds) *Estudio multidisciplinarios de las enfermedades zoonóticas y ETVs en Yucatán*. Yucatán, México, Universidad Autónoma de Yucatán.
- Ruiz, P.H., Pacheco, C.I, & Lugo, P. I.** (2013b) El “Zorro” de Yucatán y su relación con la población humana. pp. 215-232 in Pacheco, C. J., Lugo, P. J., Tzuc, C. L. & Ruiz, P. H. (Eds) *Estudio multidisciplinarios de las enfermedades zoonóticas y ETVs en Yucatán*. Yucatán, México, Universidad Autónoma de Yucatán.
- Scheibel, P., Catzefflis, F., & Jiménez, A.** (2014) The relationships of marsupial-dwelling Viannaiidae and description of *Travassostrongylus scheibelorum* sp. n. (Trichostrongylina: Heligmosomoidea) from mouse opossums (Didelphidae) from French Guiana. *Folia Parasitologica* **61**(3), 242-254.
- Seguel, M. & Gottdenker, N.** (2017) The diversity and impact of hookworm infections in wildlife. *International Journal for Parasitology; Parasites and Wildlife* **6**, 177-194.
- Sikes, R.S., & the animal care and use committee of American Society of Mammalogists.** (2016) Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy* **92**, 235-253.
- Silva, M. D., Lima, S. S., Borges, G. C., & Porto, N. J.** (2017) Ocorrência de parasitas gastrointestinais zoonóticos em uma população de *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) de uma área

urbana no nordeste do Brasil (translation to English) Occurrence of zoonotic gastrointestinal parasites in a population of *Didelphis albiventris* (Lund, 1841) from an urban área in the northeast of Brazil. *REDVET Revista Electronica Veterinaria* **18**, 1-12. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090917/091723.pdf>

Silva, M. G. Q. & Costa, G. (1999) Helminths of white-bellied opossum from Brazil. *Journal of Wildlife Diseases* **35**(2), 371-374.

Simões, R., Silva, J., Costa-Neto, S., dos Santos, M., Faro, M. & Maldonado, A. (2017) Survey of helminths in small mammals along the aqueduct of the São Francisco river in the caatinga biome. *Oecologia Australis* **21**(1), 88-92. <https://doi.org/10.4257/oeco.2017.2101.10>

Tantaleán, M., Díaz, M., Sánchez, N. & Portocarrero, H. (2011) Endoparásitos De Micromamíferos del Noroeste de Perú. 1: Helmintos De Marsupiales. *Revista Peruana De Biología* **17** (2), 207 -13. <https://doi.org/10.15381/rpb.v17i2.29>.

Teodoro, A., Cutolo, A., Motoie, G., Mejra-Strejevitch, C., Pereira-Chioccola, V., Mendes, T. & Allegretti, S. (2019) Gastrointestinal, skin and blood parasites in *Didelphis* spp. from urban and sylvatic areas in São Paulo state, Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* **16**,100286. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100286>

Traub, R.J., Robertson, I.D., Irwin, P., Mencke, N. & Thompson, R.C.A. (2004) Application of a species-specific PCR-RFLP to identify *Ancylostoma* eggs directly from canine faeces. *Veterinary Parasitology* **123**: 245-255.

Yong, T. S., Lee, J. H., Sim, S., Lee, J., Min, D. Y., Chai, J. Y., Eom, K., Sohn, W.M., Lee, S. H., & Rim, H. J. (2007) Differential diagnosis of *Trichostrongylus* and hookworm eggs via PCR using ITS-1 sequence. *Korean Journal of Parasitology* **45**: 69-74

VII. CONCLUSIONES GENERALES

Se identificó el género *Viannaia* en el intestino delgado de *Didelphis virginiana* capturadas en Komchén, Yucatán, México.

Se identificó por medio de la técnica molecular PCR la presencia *Viannaia* sp. en heces de la zarigüeya *Didelphis virginiana*.

En el presente estudio no fue posible identificar factores asociados a las infecciones de *D. virginiana* con *Viannaia* sp.

Se reporta por primera vez en el estado de Yucatán la presencia de *Viannaia* sp. en heces de *Didelphis virginiana*, ampliando así su distribución geográfica en México.

Este es el primer estudio en identificar y confirmar mediante análisis molecular por PCR la presencia del 61 % (8/13) de huevos que corresponden a *Viannaia* sp. en heces de zarigüeyas *D. virginiana* en una localidad rural de Yucatán, México.