



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN  
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**“DETERMINACIÓN DE BACTERIAS AEROBIAS Y LEVADURAS  
DEL TRACTO RESPIRATORIO Y EL ÁREA GENITAL  
DEL DELFÍN TONINA (*Tursiops truncatus*) EN  
INSTALACIONES CERRADAS Y ABIERTAS”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

**ROSALIA ÁVALOS TÉLLEZ**

TUTOR:

DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES

COMITÉ TUTORAL:

DR. FERNANDO GUAL SILL

DR. FRANCISCO GALINDO MALDONADO

MEXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **DEDICATORIA**

A mis papás:

Rosa María Téllez García, por siempre tener confianza en mí y en lo que hago, por su apoyo incondicional que sin él no habría llegado hasta aquí.

Humberto Ávalos Serrano, por creer en mí.

A mis hermanos:

Gerardo, Hassan y André.

A Alejandro O. T. H., por recorrer esta parte del camino a mi lado, por ayudarme, comprenderme, darme su amor y apoyo siempre.

A mis niños:

Katy, Vinka y Lothar, por existir y estar en mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

A CONACyT, por otorgarme una beca para realizar mis estudios.

A los Drs. de los parques marinos:  
GRUPO VIA DELPHI (María Concepción López Romahn, Raúl Torres Salcedo, Juan José Bolaños Guerra),  
CONVIMAR (Alejandro Hernández Alarcón, José Luís Solórzano Velasco),  
SIX FLAGS (Aurora Ramos Garduño) y  
DELFINITI DE MEXICO (Marcela Bárbara)  
Por todo el apoyo recibido en la toma de muestras.

A mi tutor:  
Dr. Francisco Suárez Güemes, por apoyarme y darme la oportunidad de trabajar en lo que a mi me gusta.

A mi comité tutorial:  
Dr. Fernando Gual Sill y Dr. Francisco Galindo Maldonado, por sus aportaciones a mi tesis.

Al jurado de mi tesis:  
Dr. Rigoberto Hernández Castro y Dr. Carlos Vázquez Peláez, por sus aportaciones a mi tesis.

A mis compañeros de laboratorio de brucelosis y tuberculosis por ayudarme y soportarme en mis momentos de estrés:  
Rigo, Lucy, Yuliet, Víctor, Irasema, Uziel, Elihú, Alma, José Ángel, Bety y Elena.

A los que me ayudaron en el proceso de la tesis, que forman parte del departamento de Inmunología y Microbiología de la FMVZ; UNAM:  
MVZ. Raúl Segura Candelas  
Pablo Vera Galina

# CONTENIDO

	Página
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>1.1 DELFIN TONINA (<i>Tursiops truncatus</i>)</b>	
1.1.1 Clasificación taxonómica	3
1.1.2 Distribución geográfica	4
1.1.3 Situación legal en México	4
1.1.4 Anatomía y fisiología del aparato respiratorio	6
1.1.5 Anatomía y fisiología del tracto genital	7
1.1.6 Enfermedades infecciosas	11
1.1.6.1 Enfermedades bacterianas	11
1.1.6.2 Enfermedades virales	14
1.1.6.3 Enfermedades micótica	15
1.1.6.4 Enfermedades parasitarias	17
<b>1.2 MICROBIOTA NORMAL</b>	
1.2.1 Definición	18
1.2.2 Composición y función	19
1.2.3 Interacción con el sistema inmunológico	20
1.2.4 Relación con estrés y enfermedad	21
1.2.5 Importancia en mamíferos marinos	22
<b>1.3 JUSTIFICACIÓN</b>	<b>23</b>
<b>1.4 HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
<b>1.5 OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
1.5.1 Objetivo General	24
1.5.2 Objetivos específicos	24
<b>II. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
<b>2.1 INSTALACIONES</b>	<b>24</b>
<b>2.2 DELFINES</b>	<b>25</b>
2.2.1 Muestreo del área genital	26
2.2.2 Muestreo del tracto respiratorio	26
<b>2.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO</b>	<b>27</b>
<b>2.4 ACTIVIDADES Y MUESTREOS COMPLEMENTARIOS</b>	<b>28</b>

<b>2.5</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>30</b>
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>RESULTADOS ESTADÍSTICOS</b>	<b>37</b>
<b>3.3</b>	<b>RESULTADOS DE LOS MUESTREOS COMPLEMENTARIOS</b>	<b>44</b>
	<i>3.3.1 Citologías</i>	44
	<i>3.3.2 Hemogramas</i>	46
	<i>3.3.3 Análisis del agua</i>	48
<b>IV.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>60</b>
<b>VI.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>61</b>
<b>VII.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>68</b>

## Lista de Cuadros y Figuras

<b>Cuadros</b>	<b>Página</b>
1. Distribución del total de las muestras con respecto al tipo de instalación, los cuatro muestreos y área muestreada. _____	<b>31</b>
2. Distribución del número de aislamientos por tipo de muestra y por tipo de instalación. _____	<b>32</b>
3. Especies bacterianas y de levaduras aisladas del tracto respiratorio por cada por tipo de instalación y en cada uno de los 4 muestreos realizados (I, Verano, II, Otoño, III, Invierno, IV, Primavera)._____	<b>33</b>
4. Especies bacterianas y de levaduras aisladas del área genital por cada por tipo de instalación y en cada uno de los 4 muestreos realizados (I, Verano, II, Otoño, III, Invierno, IV, Primavera). _____	<b>35</b>
5. Total de especies aisladas del tracto respiratorio y el área genital en cada tipo de instalación. _____	<b>37</b>
6. Proporción de aislamiento por tipo de instalación en los 8 parques marinos. _____	<b>38</b>
7. Distribución de los porcentajes de aislamiento de las 19 especies bacterianas y una de levadura. _____	<b>39</b>
8. Resultados de las citologías del tracto respiratorio, mucosa prepucial y vaginal durante los 4 muestreos, la presencia de células inflamatorias, bacterias, parásitos, levaduras y miceliados. _____	<b>45</b>
9. Delfines que presentaron un proceso inflamatorio local en las citologías del tracto respiratorio, su relación con las bacterias y levaduras aisladas, presencia o ausencia de otros microorganismos y alteraciones en el hemograma. _____	<b>47</b>
10. Aislamientos realizados de las muestras de agua de las instalaciones que presentaron crecimiento de bacterias, durante los 4 muestreos. _____	<b>48</b>

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Esquema del aparato respiratorio en el delfín <i>T. truncatus</i> . _____	7
2. Área genital externa de la hembra <i>T. truncatus</i> . _____	9
3. Aparato reproductor de la hembra del delfín <i>T. truncatus</i> . _____	9
4. Aparato reproductor del macho del delfín <i>T. truncatus</i> . _____	10
5. Toma de muestra de sangre. _____	28
6. Distribución de las proporciones estadísticas del aislamiento de las 20 especies bacterianas y una de levadura con respecto al tipo de instalación. _____	40
7. Distribución de las proporciones del aislamiento de las 19 especies bacterianas y una de levadura con respecto al área muestreada (respiratorio y área genital). _____	41
8. Distribución de las proporciones estadísticas del aislamiento de las 19 especies bacterianas y una de levadura en las muestras del tracto respiratorio en cada tipo de instalación (abierta y cerrada). _____	42
9. Distribución del porcentaje de aislamiento de las 20 especies bacterianas y de levaduras en las muestras del área genital en cada tipo de instalación (abierta y cerrada). _____	43
10. Tinción Diff Quick, 100x. (A) Tracto respiratorio. Células inflamatorias, detritus celular y bacterias. (B) Mucosa vaginal. Célula basal (C) Tracto respiratorio. <i>Kyaroikeus cetarius</i> . (D) Tracto respiratorio. Pseudomicelio. _____	46

## **RESUMEN**

La información sobre la microbiota normal es importante cuando se intenta rehabilitar animales varados o en cautiverio, debido a que permite un mayor entendimiento del papel de los microorganismos en los delfines con desordenes reproductivos y respiratorios, permitiendo así un manejo adecuado de estos delfines en cautiverio. En México, existen dos tipos de instalaciones que contienen a los delfines en cautiverio, la instalación abierta la cual mantiene a los mamíferos marinos en su hábitat natural permitiendo el intercambio de agua del exterior, con lo cual se diferencia de las instalaciones cerradas por que la calidad de agua es regulada por sistemas de filtración. El conocimiento de la microbiota normal en ambos tipos de instalación permitirá un mayor entendimiento de los microorganismos relacionados con estos delfines y las instalaciones que los contienen, permitiendo así un adecuado manejo de estos cetáceos en cautiverio. El objetivo de este trabajo fue determinar las bacterias aerobias y levaduras presentes en el tracto respiratorio y el área genital del delfín tonina (*T. truncatus*) clínicamente sanos, mantenidos en instalaciones cerradas y abiertas en diferente época del año. Se obtuvieron en total de los cuatro muestreos en diferente época del año 212 muestras bacteriológicas del tracto respiratorio y el área genital de 29 delfines *T. truncatus*, 18 de ellos mantenidos en instalaciones abiertas localizadas en el estado de Quintana Roo, los otros 11 delfines mantenidos en instalaciones cerradas localizados dentro del Distrito Federal y en Ixtapa, Guerrero. Por medio del sistema API 20, se realizó la identificación de 170 bacterias y 19 levaduras del tracto respiratorio y 189 bacterias y una levadura del área genital. Los resultados muestran que existe evidencia estadística para afirmar que hay una mayor diversidad de especies bacterianas y de levaduras tanto en el tracto respiratorio como en el área genital de los delfines que se encuentran en instalaciones abiertas en comparación con los que se encuentran en instalaciones cerradas. La presencia en el aislamiento varía entre cada especie bacteriana y de levaduras, así como su presentación en el tracto respiratorio y en el área genital. Entre los aislamientos que se realizaron en cada uno de los 4 muestreos no hubo diferencia estadística entre ellos. El crecimiento microbiano ocurrió sin la presencia de un proceso inflamatorio (87%), esto sugiere que los microorganismos aislados en este trabajo son parte de la microbiota normal permanente o transitoria.

**Palabras clave:** *Tursiops truncatus*, microbiota normal, bacterias y levaduras.

## **ABSTRACT**

There is a dearth of information regarding microbiological aspects of bottlenose dolphins and other cetacean species in the refereed literature. Most of this information describes pathogenic bacteria associated with stranded dolphins and there are a few reports describing normal microbiota in cetaceans. Knowledge of normal microbiota is important in rehabilitation cases of stranded dolphins and in dolphins held in captivity. In Mexico two types of marine parks exist, opened and closed facilities, the former uses water for the natural environment while the last ones assure water quality by filtration. This information enhances the understanding of the bacterial role in respiratory and reproductive disorders, and the relationship of these microorganisms with humans. The aim of this study was to determine the bacteria and yeast associated with the respiratory tract and genital area of clinically healthy bottlenose dolphins, housed in closed and opened facilities, at different times of the year. Twenty nine clinically healthy bottlenose dolphins from eight different facilities in Mexico were sampled. A total of 212 samples were cultured to determine the species of the aerobic and microaerophilic bacteria and yeast. One hundred and seventy bacterial isolates and 19 yeast isolates were obtained from the respiratory tract; 189 bacterial isolates and one yeast isolates were obtained from the genital area. These isolates were identified by microbiological and biochemical methods, using the API 20 system. Our results showed a greater diversity of bacterial species in opened facilities when compared with closed facilities ( $p < 0.05$ ). Additionally, a higher number of bacterial and yeast isolates were obtained from opened facilities ( $p < 0.05$ ). Results showed the presence of several microorganisms that can be considered as part of the normal microbiota of healthy animals because most of them were isolated in absence of any apparent clinical disease or any evident inflammatory process (87%). These microorganisms can become opportunistic pathogens when dolphins are immunosuppressed. This knowledge may contribute in the understanding of the role of the bacteria in stranded dolphins, as well as some of their reproductive and respiratory disorders.

**Key words:** *Tursiops truncatus*, blow-hole, aerobic bacterial, respiratory tract, genital area.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 DELFÍN TONINA (*Tursiops truncatus*)

#### 1.1.1 Clasificación taxonómica

El delfín tonina (*Tursiops truncatus*) está clasificado dentro del grupo de los cetáceos, el cual incluye a las ballenas, delfines y marsopas, con aproximadamente 80 especies. Este grupo está dividido en dos grandes subgrupos, Mysticeti y Odontoceti, el primer grupo está conformado por las ballenas, las cuales presentan barbas en lugar de dientes, entre otras diversas características; en el suborden de los odontocetos, se encuentran clasificados las marsopas y delfines, donde forman parte los tursiones o toninas, se caracterizan por presentar dentición homogénea y un sólo orificio respiratorio denominado espiráculo el cual se encuentra en posición craneal (Folkens *et al.*, 2002). Este suborden está dividido a su vez en 10 familias, 40 géneros y al menos 70 especies; donde se encuentra la familia *Delphinidae*, la cual está conformada por 17 géneros y 32 especies, y a la que pertenece el *T. truncatus* (Folkens *et al.*, 2002). En México, el orden Cetácea, se encuentra representado con 37 especies (cerca del 50% del total mundial), los cuales el 78% son odontocetos y el 22% son misticetos (SEMARNAT, 2001).

Clasificación taxonómica del delfín *T. truncatus*:

Reino:	Animal
Filo:	Cordados
Subfilo:	Vertebrados
Clase:	Mamíferos
Orden:	Cetácea
Suborden:	Odontoceti
Familia:	<i>Delphinidae</i>
Género:	<i>Tursiops</i>
Especie:	<i>truncatus</i>
Nombre común:	Tonina, tursiones, delfín nariz de botella, delfín mular y bufeo.
Nombre científico:	<i>Tursiops truncatus</i> , del latín turbio que significa cara y truncare “cortada” (Fernández, 1991).

### **1.1.2 Distribución geográfica**

El delfín *T. truncatus* tiene una amplia distribución en aguas templadas y tropicales de todo el mundo, con un intervalo de temperatura de 10 a 32°C (Folkens *et al.*, 2002). Se distribuye en el Océano Pacífico desde Japón, Australia, Chile, sur de los Estados Unidos, Islas de Hawai, México y Sudamérica. En el Océano Atlántico habitan desde el norte de Escocia y Noruega. En el Océano Indico hasta el sur de África. En el Golfo de México, el Caribe y el mar mediterráneo. Presenta una subespecie llamada *gilli*, la cual habita en el Océano Pacífico (Gorostieta, 2003).

### **1.1.3 Situación legal en México**

Los delfines *T. truncatus* participan en exhibiciones en acuarios, zoológicos y parques marinos alrededor del mundo desde 1938 en Florida, EU, cuando por primera vez se mantuvo exitosamente un tonina en cautiverio. En México, se han exhibido a partir del año 1972 (Fernández, 1991). La preocupación por la conservación de éstos y otros cetáceos en México se puede ver reflejada en la Ley General de Vida Silvestre y en las normas oficiales mexicanas (NOM):

**Ley General de Vida Silvestre.** En el Título VI Conservación de la vida silvestre, capítulo I. Especies y poblaciones en riesgo y prioritarias para la conservación. En el Artículo 60 Bis, se menciona que queda prohibido el aprovechamiento extractivo, ya sea de subsistencia o comercial, de cualquier ejemplar de mamífero marino, incluyendo al delfín *T. truncatus* como parte de la fauna silvestre en nuestro país, pero se pueden expedir permisos especiales ya sea para su investigación científica u otros propósitos educativos. En el año 2006 fue anexado en esta ley en el Artículo 55 bis del Título V Disposiciones comunes para la conservación y el aprovechamiento sustentable de la vida silvestre, en el capítulo X Legal procedencia, donde mencionan que queda prohibida la importación, exportación y reexportación de ejemplares de cualquier especie de mamífero marino y primate, así como de sus partes y derivados, con excepción de aquéllos destinados a la investigación científica, previa autorización de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales SEMARNAT, la cual es el conducto del Ejecutivo Federal por la cual se ejerce la aplicación de este reglamento (Fernández, 1991; semarnat.gob.mx, 2006).

**NOM-059-ECOL-2001.** Protección ambiental de especies nativas de México de flora y fauna silvestres, categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio en la lista de especies en riesgo. Incluye al delfín *T. truncatus* en la clasificación de protección especial, en la categoría Pr, que se refiere a aquellas especies o poblaciones que podrían llegar a encontrarse amenazadas por factores que inciden negativamente en su viabilidad, por lo que se determina la necesidad de propiciar su recuperación y conservación de esta especie o de las poblaciones de especies asociadas. Su distribución la menciona como: no endémica, con lo cual se refiere a aquella cuyo ámbito de distribución natural no se encuentra circunscrito únicamente al territorio nacional y las zonas donde la nación ejerce su soberanía y jurisdicción (<http://semades.jalisco.gob.mx/site/nom059ecol2001.htm>).

**NOM-135-SEMARNAT-2004.** Para tener una mejor regulación de la captura con fines de investigación fue necesario que el gobierno mexicano realizara esta norma, la cual especifica la captura, transporte, exhibición, manejo y manutención de mamíferos marinos en cautiverio, principalmente en delfines (SEMARNAT, 2000).

**NOM-ECOL-136-2002.** Especifica las regulaciones existentes para los mamíferos marinos en cautiverio (SEMARNAT, 2000).

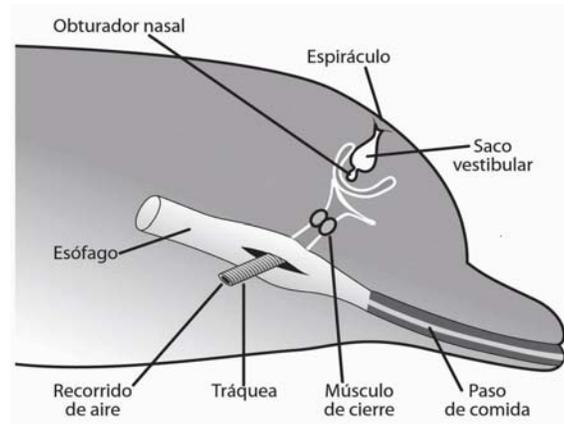
**NOM-EM-PESC-2001.** Establece los lineamientos para la captura incidental de organismos juveniles de atún y delfines (SEMARNAT, 2000). NOM 012-PESC-1993. Establece las medidas para la protección del pez totoaba (*Cynoscion macdonaldi*) y la vaquita marina (*Phocoena sinus*) en aguas de jurisdicción Federal del Golfo de California, donde especifica la veda total e indefinida de estas especies y otras, como el delfín (*T. truncatus*), el delfín común (*Delphinus delphis*), la ballena piloto (*Giobicephala macrorhynchus*), la ballena de esperma (*Physeter catodon*), la ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*), la ballena azul (*Balaenoptera musculus*), la ballena gris (*Eschrichtius robustus*), la ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) y el lobo marino (*Zalophus californianus*).

#### ***1.1.4 Anatomía y fisiología del aparato respiratorio***

En los delfines se pueden observar diversas adaptaciones anatómicas y fisiológicas que les han permitido sobrevivir en el medio acuático donde habitan, teniendo la habilidad de alcanzar un periodo de apnea de aproximadamente 10 minutos y alcanzar 150 m de profundidad en sólo algunos minutos, salir a la superficie a gran velocidad y volverse a sumergir sin sufrir trastorno alguno, esto es debido a que presentan una bradicardia en las inmersiones profundas, la cual le permite que el flujo sanguíneo se distribuya únicamente a órganos vitales, además de la redistribución del volumen sanguíneo a través de los sistemas porta los cuales funcionan como reservorios de sangre, asimismo se puede observar una alta cantidad de mioglobina en los músculos, favoreciendo el trabajo muscular durante la inmersión con reducida reoxigenación, a la alta capacidad de los músculos para soportar elevadas concentraciones de ácido láctico, presente durante la inmersión por oxigenación anaerobia; en el tracto respiratorio se puede observar la presencia de unos anillos traqueales completos que impiden que la traquea se colapse (Gorostieta, 2003). Otras adaptaciones de los delfines en el aparato respiratorio es el orificio respiratorio localizado en una posición alta en la cabeza llamada respiráculo o espiráculo, por medio del cual respiran, teniendo la capacidad de abrirlo y cerrarlo voluntariamente, está formado por una membrana fibrosa y está constituido por un tubo que es un sistema intrincado de sacos ciegos, los cuales están involucrados con la comunicación y con la ecolocación, se continua con la laringe la cual presenta unos poderosos músculos que se abren y cierran para permitir la entrada de agua a los pulmones, los cuales se extienden del espiráculo hasta la tráquea, la laringe atraviesa verticalmente al esófago, debido a que este se bifurca. Por medio de este espiráculo, los cetáceos expulsan los gases contenidos en el interior de sus pulmones, los cuales, al pasar a un medio más frío, se condensan formando el característico chorro o surtidor, que resulta especialmente visible en los grandes cetáceos (Gorostieta, 2003) (Fig. 1).

Los cartílagos epiglóticos y aritenoides son elongados, forman un tubo proyectado anterior y superiormente desde el paso de la faringe. La tráquea es corta, fuerte y con anillos completos, los pulmones son elongados, no lobulados, situados dorsalmente en el tórax, tienen una pleura más elástica y gruesa, el parénquima pulmonar está reforzado con válvulas mioelásticas, esfínteres musculares y anillos cartilaginosos cubiertos con una doble capa alveolar permitiendo un eficiente

intercambio de aire y dando una mayor resistencia para contrarrestar y soportar la presión (Gorostieta, 2003).



**Figura 1.** Esquema del aparato respiratorio en el delfín (*T. truncatus*) (Fernández, 1991; Gorostieta, 2003).

En los bronquios se ve desde una estructura fibrosa hasta ramificaciones de calibre relativamente pequeño a lo largo del árbol bronquial, en los bronquiolos se encuentran una válvulas mioelásticas las cuales se abren y se cierran para capturar oxígeno, la estructura especialmente elástica del pulmón y la extensa ramificación capilar arteriovenosa en torno a los alvéolos hacen que casi el 90% del oxígeno inspirado llegue a oxigenar la sangre (Gorostieta, 2003).

### 1.1.5 Anatomía y fisiología del tracto genital

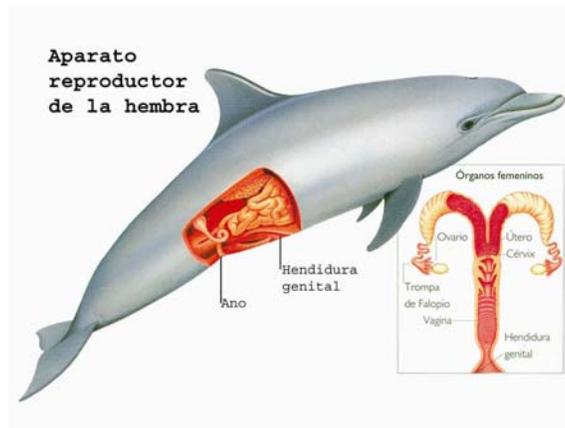
La única diferencia visible entre ambos sexos es la distancia que hay entre el ano y el pliegue genital, en la hembra el ano y el pliegue genital parecen estar unidos, en el macho hay una mayor distancia entre estas dos estructuras (Fernández, 1991). De igual forma, las hembras son reconocibles exteriormente por la presencia de dos aberturas longitudinales a ambos lados de la abertura genital, las cuales llevan dentro los pezones y las glándulas mamarias (Fernández, 1991). Los órganos reproductivos externos de la hembra consiste en una vulva en forma de hendidura, con los labios mayor y menor; presenta un clítoris el cual se proyecta posteriormente dentro de la hendidura genital con un cuerpo cavernoso, los músculos que se localizan ahí son el isquiocavernoso, esfínter vaginal y retractor del clítoris (Fig. 2).

Existe un orificio vaginal, donde encontramos a la vagina, la cual se expande en su diámetro de 3 a 4 veces el tamaño del orificio. La superficie de la pared vaginal tiene surcos longitudinales y pliegues circulares, siendo estos más prominentes en la parte anterior y los surcos más prominentes en la parte posterior (Gódinez, 1992). Existe un pseudocervix que es un gran pliegue de 2 a 3 cm en la parte anterior de la vagina, su abertura es aplanada y posee una cavidad o descanso espermatecal, formado por la pared posterior del pseudocervix y la cara anterior del cervix verdadero, aquí se puede mantener de 6 a 10 ml de semen en una hembra adulta. Todas estas características ayudan para prevenir el lavado de semen en la vagina por agua de mar después de la cópula (Gódinez, 1992). El útero es bicornio con cuerpo corto y cuernos uterinos largos que pasan cranealmente por aproximadamente la mitad de su longitud antes de voltearse lateralmente al cuerpo del útero (Gódinez, 1992; Sentié *et al.*, 2001).

Los ovarios son esféricos y elongados en su forma y lisos en su superficie, los ovarios inmaduros tienen una forma plana y elongada con ranuras en su superficie, cuando los ovarios maduran tienen forma de racimo de uvas; se localizan inmediatamente posterior y lateralmente a los riñones, fijados por un amplio ligamento. Cada ovario es cubierto parcialmente por un infundíbulo grande y bien desarrollado, que se contiene con el corto y robusto tubo uterino (Gódinez, 1992). El oviducto es fino y largo, el útero es bicorne, con el cuerno izquierdo más desarrollado que el derecho, debido a que en la mayoría de los casos, es el único funcional (Gódinez, 1992) (Fig. 3). La madurez sexual en hembras *T. truncatus* en vida libre, fue estimada cerca de los 10 años de edad, en dos casos en delfines en cautiverio fue estimada del sexto al séptimo año de edad, por lo que se ha observado que el rango varía entre los 7 a los 10 años (Robeck *et al.*, 2001). El ciclo estral ha sido denominado como poliestrico estacional y se menciona que la mayor actividad del ciclo estral ocurre durante la primavera, pero también se ha observado que puede ocurrir en cualquier mes del año y varias veces durante ese mismo año, el ciclo estral puede durar de 21 a 42 días (Robeck *et al.*, 2001). Los periodos de anestro pueden ocurrir sin estar asociados a lactación o gestación, existe un reporte de un *T. truncatus aduncus* con un periodo de anestro de 27 meses, el cual ese fenómeno no ha sido explicado (Robeck *et al.*, 2001). La gestación ha sido estimada a los 12 meses y la lactación puede llegar a los 2 años y sobrepasando este tiempo en animales en vida libre. De tal forma el intervalo entre partos puede alcanzar de los 3 a los 4 años (Robeck *et al.*, 2001).



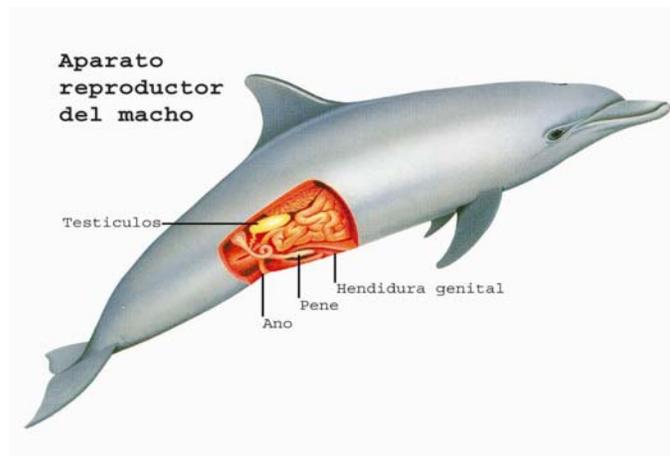
**Figura 2.** Área genital externa de la hembra *T. truncatus*.



**Figura 3.** Aparato reproductor de la hembra del delfín (*T. truncatus*) (Carwardine *et al.*, 1999).

El tracto genital del macho tiene diferencias importantes con la mayoría de los mamíferos terrestres, los testículos se encuentran fijos en la pared dorsal de la cavidad abdominal lateral y caudalmente a los riñones, son de forma cilíndrica y elongados, están envueltos por la túnica vaginal y la túnica albugínea, que también cubre al epidídimo (Gódinez, 1992; Sentiel *et al.*, 2001). Su volumen varía con la edad y la actividad sexual. Existen numerosos y pequeños canales dando origen al conducto eferente que se introduce en el epidídimo, el cual posee una cabeza, cuerpo y cola; distalmente la cola crece para convertirse en el conducto deferente. La glándula accesoria que poseen es la prostática que rodea el canal urogenital y está protegida por una capa gruesa de músculo (Gódinez, 1992).

El pene es fibroelástico, contiene una gran cantidad de tejido fibroso duro, se encuentra constituido por 3 capas, la capa exterior formada por una piel dura y gruesa; la capa media formada por un tejido conjuntivo y la capa interna que contiene fibras elásticas (Gódinez, 1992; Sentiel *et al.*, 2001). De la región pélvica el pene corre anteriormente, con su parte distal proyectándose dentro del saco peneal. La piel que recubre el saco peneal se refleja hacia delante para cubrir el primer tercio anterior del pene, esta parte distal es llamada como terminal; cuando el pene está erecto, el recubrimiento invaginado del saco peneal es estirado hacía afuera para cubrir el tercio medio del pene (Gódinez, 1992). El pene relajado forma una curvatura en forma se “S”, que es mantenida por sus músculos retractores, que se originan en la parte rectal anterior y se insertan en la porción ventral del pene, sobresale al exterior en estado de erección durante el acto sexual o después de la muerte comunicándose con el exterior por una abertura. En el caso del macho los pliegues anales y genitales están separados (Gódinez, 1992) (Figura 4).



**Figura 4.** Aparato reproductor del macho del delfín (*T. truncatus*) (Carwardine *et al.*, 1999).

### ***1.1.6 Enfermedades infecciosas***

En los últimos años, se ha reconocido que las enfermedades bacterianas, la infección por morvilivirus y las fitotoxinas, son la causa mayor de mortalidad en poblaciones de mamíferos marinos silvestres (Dunn *et al.*, 2001). Así también, otras bacterias patógenas han infectado nuevos o previamente no reconocidos hospederos, como por ejemplo, las enfermedades ocasionadas por especies de *Mycobacterium*, las

cuales presentan una alta morbilidad y mortalidad en poblaciones de mamíferos marinos en cautiverio y en vida libre. De igual forma otra enfermedad conocida como brucelosis, la cual se pensaba que sólo infectaba mamíferos terrestres, ha sido documentada en mamíferos marinos en diversas partes del mundo (Higgins, 2000; Dunn *et al.*, 2001; Bourg *et al.*, 2007). Diversos factores hacen difícil cuantificar el papel de las enfermedades bacterianas en la morbilidad y mortalidad de los mamíferos marinos en vida silvestre.

#### **1.1.6.1 Enfermedades bacterianas**

##### **Enfermedades respiratorias**

Se ha observado que los cetáceos tienen una alta susceptibilidad a las enfermedades respiratorias de origen bacteriano, mencionando a la neumonía como la principal causa de muerte (Dunn *et al.*, 2001). Una significativa proporción de cetáceos diagnosticados con problemas en el tracto respiratorio han presentado abscesos pulmonares, en los cuales frecuentemente han aislado a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, y menos frecuente a bacterias Gram negativas. Sin embargo, también se ha visto que tanto en mamíferos marinos de vida libre como en cautiverio, las enfermedades bacterianas son con frecuencia secuelas de un fuerte parasitismo (Dunn *et al.*, 2001). Existen reportes de microorganismos causantes de neumonía como *Aerobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*; los signos que se presentan pueden presentarse son: depresión, halitosis y disnea (Higgins, 2000; Medway, 1973; Medway, 1980).

##### **Pasteurelosis**

Enfermedad relacionada con los rumiantes y conejos, sin embargo se ha presentado en delfines como una bronconeumonía hemorrágica (Medway, 1973), la mayoría de las veces se presenta como una septicemia aguda o subaguda, frecuentemente ocurre la muerte sin la presencia de signos clínicos o a pocas horas de presentar anorexia u otros signos de comportamiento como letargia y decremento en el nado (Dunn *et al.*, 2001). Otros autores han mencionado a *Pasteurella multocida* como causante de enteritis, ocasionando la muerte del animal, debido a la presencia de bacteremia y hemorragia intestinal. *Mannheimia haemolytica* se ha reportado como causante de traqueitis hemorrágica (Dunn *et al.*, 2001).

## **Erisipela**

*Erysipelothrix rhusopathiae*, bacilo pleomórfico Gram positivo, agente causal de la enfermedad erisipela en cerdos y pavos, la cual se ha observado también en cetáceos en cautiverio por la ingestión de pescado contaminado con este microorganismo. Se tiene dos presentaciones de esta enfermedad; la primera es la septicémica, la cual frecuentemente culmina con la muerte del animal, debido a que es súbita y no presenta signos específicos; la segunda es la forma dermatológica, caracterizada por placas en la piel en forma de rombos grisáceos en el tronco dorsal, en el hocico y sobre el melón, además de presentar anorexia, debilidad y excremento de color negro. El microorganismo puede ser aislado de los linfonodos, pulmón e hígado. En la forma septicémica podemos observar a la necropsia, ascitis, petequias intestinales multifocales, esquimososis, hemorragias, esplenomegalia y lesiones en piel (Medway, 1973; Higgins, 2000).

Existen bacterinas, las cuales han tenido excelentes resultados en el control de la enfermedad. La inmunización de los delfines con bacterinas activas e inactivas es frecuentemente utilizada sin reacciones adversas, excepto en dos casos, donde se utilizaron bacterinas activas y causaron la muerte de los animales (Allen *et al.*, 1971).

## **Brucelosis**

Esta enfermedad es ocasionada por distintas especies de *Brucella*, la cual es una bacteria bacilo Gram negativa, usualmente asociada a rumiantes, cerdos y roedores. A mitad de los años noventa, fue aislada de cadáveres de diversos mamíferos marinos como focas, delfines, marsopas y ballenas (Bourge *et al.*, 2007). Ha sido encontrada en una gran variedad de tejidos y se ha observado que ocasiona aborto y meningoencefalitis, estas cepas aisladas son genéticamente distintas de las cepas de animales terrestres, por lo que se han propuesto dos nuevas especies, *Brucella pinnipediae* y *Brucella cetaceae* (Bourge *et al.*, 2007). La evidencia serológica a la exposición a *Brucella* spp., ha sido documentada en varios cetáceos, incluyendo al *T. truncatus*, en el cual se ha aislado de un aborto en cautiverio, en lesiones cutáneas, neumonía, en los ganglios linfáticos e hígado, ocasionando en éstos órganos una inflamación granulomatosa multifocal (Dunn *et al.*, 2001; Higgins, 2000; Foster *et al.*, 2002).

## **Vibriosis**

Los vibrios son bacterias Gram negativas que existen en altas densidades en el agua y en organismos marinos como los corales, peces, moluscos, hierba del mar, esponjas, camarón y zooplancton, en ambientes como estuarios, costas, sedimentos y en la acuicultura (Thompson *et al.*, 2004). En los delfines *T. truncatus* se han descrito tanto en individuos sanos como enfermos, en Hawai se han aislado rutinariamente de heces, espiráculo y faringe a *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae* (sin antígeno O) y vibrios no clasificados (Schroeder *et al.*, 1985; Beck y Rice, 2003). En otras especies de delfines, los vibrios se han asociado a hepatitis necrótica, bronconeumonía focal aguda, y dermatitis activa en aletas, tejido subcutáneo y la punta del rostro, *V. alginolyticus* causa estomatitis necrótica y *V. parahaemolyticus* se aisló de un pulmón, la posible vía de entrada por la cual los vibrios invaden el sistema vascular es a través de la mucosa intestinal, el pulmón y las heridas orales (Schroeder *et al.*, 1985; Tangredi y Medway, 1980), estas mismas especies suelen asilarse comúnmente como contaminantes de heridas, ocasionando la muerte del animal debido a septicemia (Dunn *et al.*, 2001). Algunos investigadores señalan que las personas que mantienen un contacto estrecho con mamíferos marinos deben estar concientes del riesgo del potencial zoonótico de estos microorganismos (Schroeder *et al.*, 1985; Tangredi y Medway, 1980).

## **Nocardiosis**

Las nocardias son bacterias filamentosas gram positivas, que se encuentran generalmente en el ambiente, estiércol, agua y tierra, por lo que son fácilmente inhaladas o aspiradas (Dunn *et al.*, 2001). En los cetáceos existen reportes de nocardias patógenas para estos animales, las cuales son: *N. asteroides* y *N. brasiliensis*. Las formas de la enfermedad encontradas con mayor frecuencia son la pulmonar o extrapulmonar, las cuales han sido descritas en nueve especies de cetáceos, las cuales ocasionaron también lesiones cutáneas. *N. asteroides*, ha sido asociada también con necrosis y linfadenitis piogranulomatosa, pleuritis, encefalitis y mastitis. *N. paraguayensis*, es el agente causal de micetoma, donde se pueden observar lesiones ulcerativas en la cavidad oral (Fowler, 1993).

### **1.1.6.2 Enfermedades virales**

#### **Morbilivirus**

A lo largo de la década pasada, el morbillivirus ha emergido como el patógeno de mayor importancia en los cetáceos en vida libre, existen reportes acerca de su evidencia serológica en numerosos cetáceos del Atlántico, lo cual se sugiere que puede tener un alto impacto en estas especies. El delfín *T. truncatus* es una de las especies afectadas por este virus, se ha observado que desarrollan una neumonía severa con múltiples focos de atelectasia y consolidación de los pulmones, así como edematización de los ganglios linfáticos, en la mayoría de los animales afectados se ha presentado una meningoencefalitis no supurativa (Fowler, 1993).

#### **Papilomavirus**

De la familia Papovaviridae, el género *Papillomavirus* ha sido implicado en la aparición de papilomas genitales, papilomas cutáneos y papilomas gástricos de varios cetáceos, las lesiones consisten en ser áreas delimitadas con hiperplasia epitelial, distribuidas al azar. Las lesiones en la mucosa son generalmente de superficie irregular y con variantes en el color. El tamaño es variable, desde unos pocos milímetros hasta los 20 cm. No se conoce la forma de transmisión (Kennedy, 2001).

#### **Poxvirus**

Este virus ha sido identificado morfológicamente en lesiones de piel de numerosas especies de mamíferos incluyendo al delfín *T. truncatus*. se manifiesta con lesiones en forma de anillo o agujeros con puntilleo negro en la piel, aparecen aisladas con un diámetro de 0.5 a 3 cm, son de color gris con bordes oscuros, se observan en la superficie dorsal y en la aleta caudal, pueden persistir por meses o años sin signos de enfermedad en el animal, aunque este virus no aparenta causar serios problemas en la salud de los animales, el desarrollo de estas lesiones usualmente coinciden con periodos de inmunodepresión y estrés en los delfines. Cuando las lesiones son supurativas, es necesario administrar una terapia para infecciones secundarias con antibióticos. Para el diagnóstico, se debe tomar una biopsia donde se incluya tejido normal y de la lesión, ya que por lo general este virus se encuentra en la periferia de la lesión y ocasiona cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (Kennedy, 2001).

## **Calicivirus**

Existen reportes de 14 serotipos que se han aislado de mamíferos marinos, incluyendo al delfín *T. truncatus*, la lesión más consistente son las vesículas en la piel, las cuales han sido asociadas a lesiones y viejas cicatrices. Estas vesículas pueden tener de diámetro de 1 mm a 3 cm, las lesiones en piel generalmente se resuelven sin ningún tratamiento. Este virus puede ser aislado de hisopos rectales o de la aspiración del líquido vesicular, colocado en frascos con solución de fosfato con glicerol (pH 7.2) y congelado. No existen reportes de efectos citopáticos, ni de casos de zoonosis, pero su manejo debe ser con cuidado (Kennedy, 2001).

### **1.1.6.3 Enfermedades micóticas**

Los hongos miceliados y levaduriformes son usualmente oportunistas o invasores secundarios; estos microorganismos son un riesgo en la salud de los animales que se encuentran inmunodeprimidos. *Aspergillus fumigatus*, *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* spp. y zigomicetos (*Apophysomyces elegans*, *Rhizomucor pusillus*, *Saksenaea vasiformis*), son considerados patógenos oportunistas, donde otros patógenos endémicos como *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* y *Histoplasma capsulatum* son capaces de infectar hospederos sanos (Reidarson *et al.*, 2001). Estos hongos logran ingresar al hospedero por inhalación, trauma, o ingestión, para después alojarse en los pulmones, en la piel o en el tracto gastrointestinal (Reidarson *et al.*, 2001). Debido a que los hongos son pobremente transmisibles entre los animales, las micosis son frecuentemente endémicas y raramente provocan una epidemia (Reidarson *et al.*, 2001). Se han reportado en dos ocasiones como casos de zoonosis en los cuales en uno de ellos se encontró implicado *Blastomyces dermatitidis* en delfines *T. truncatus* y en el otro caso a *Loboa lobo* en el delfín del Amazonas (Reidarson *et al.*, 2001).

### **Aspergilosis pulmonar**

*Aspergillus fumigatus*, es la infección micótica reportada con mayor frecuencia en cualquier mamífero marino (Medway, 1973; Reidarson *et al.* 1998). En algunos delfines este microorganismo ha ocasionado neumonía necrozante y encefalitis (Domingo *et al.*, 1992). Se caracteriza por afectar el sistema respiratorio inferior, manifestándose en nódulos pulmonares que se observan en las placas radiográficas (Medway, 1973). Reidarson menciona que la broncoscopía facilita un diagnóstico temprano y definitivo, así como un tratamiento oportuno; a diferencia de la inmunodifusión serológica en agar,

la cual identifica anticuerpos específicos circulantes de *Aspergillus fumigatus*, pero sólo son evidentes cuando la infección es activa (Reidarson *et al.*, 1998).

### **Candidiasis cutánea**

Esta enfermedad es ocasionada por la levadura *Candida albicans*, se manifiesta principalmente alrededor de las heridas, asociada en las uniones mucocutáneas, el espiráculo y la vagina; en adición a los signos cutáneos, frecuentemente también se muestra en el esófago y en el área gástrica, con signos como la regurgitación, el vómito y sacudimiento de la cabeza (Medway, 1980). La lesión patognomónica es la ulceración del esófago. De igual forma puede realizar una invasión sistémica hacia cualquier órgano, los riñones, el sistema nervioso central, las válvulas del corazón son los sitios más comunes (Reidarson *et al.*, 2001). La enfermedad clínica se asocia después del tratamiento con antibióticos y del agua, cuando el animal está inmunodeprimido o la conjunción de todas las anteriores. Los factores predisponentes son la contaminación fecal y desechos orgánicos del alimento (Medway, 1980). *C. albicans*, es un microorganismo considerado como patógeno oportunista, es parte de la microbiota normal de las mucosas, donde reside como comensal. Se ha podido aislar en delfines *T. truncatus* en vida libre en Florida, en una proporción de 4 a 54%, lo cual también es comparable con lo observado en diversos cetáceos que viven en acuarios (Reidarson *et al.*, 2001).

### **Lobomycosis**

*Loboa lobi*, enfermedad fúngica que se presenta como una dermatitis crónica granulomatosa, se ha observado en humanos, en el *T. truncatus* y *Sotelia guianensis*; la transmisión es por contacto directo y las lesiones pueden localizarse en cualquier parte del cuerpo del animal, las lesiones histológicas muestran una acantosis caracterizada por la proliferación de células escamosas (Sweeney y Ridway, 1975). Este microorganismo no ha podido ser aislado y su diseminación sistémica tampoco ha sido demostrada (Reidarson *et al.*, 2001).

#### **1.1.6.4 Enfermedades parasitarias**

Diversos parásitos se han encontrado en mamíferos marinos, algunos como hallazgos a la necropsia en animales encallados, debido a lo extenso en este tema sólo se mencionaran los parásitos encontrados en el delfín *T. truncatus*.

## **Protozoarios:**

Ciliados

*Kyaroikeus cetarius*

Fue el primero parásito descrito en el espiráculo del delfín *T. truncatus*, donde se encuentra comúnmente en casi el 50% en animales de vida libre, aunque de igual forma ha sido mencionado en otros delfines, se ha observado en piel y linfonodos (Dailey, 2001). Las infecciones suelen ser en el tracto respiratorio superior y se han visto en conjunción con *Nasitrema* spp. (Sweeney *et al.*, 2003).

*Chilodonella* spp.

Encontrado en la mucosa del espiráculo y en la piel lesionada. Estos ciliados son considerados patógenos oportunistas, aunque se desconoce su patogenicidad (Dailey, 2001).

Apicomplejos.

*Cystoisospora delphini*,

Coccidea descrita como causante de enteritis en mamíferos marinos (Dailey, 2001).

## **Helmintos:**

*Anisakis* spp.

Nemátodos de éste género se pueden encontrar en el estómago, su diagnóstico es por inspección fecal, las infecciones no son muy severas y el tratamiento es con antihelmínticos. Cuando los animales son capturados tienen que ser tratados contra estos nematodos, debido que es frecuente encontrar a los delfines de vida libre con este parásito, cuando los delfines están en cautiverio y son alimentados con pescado congelado el desarrollo de parasitismo gastrointestinal es raro (Sweeney y Ridway, 1975).

*Campula rochebruni*

Trematodo encontrado en el estómago, adherido a la mucosa del conducto hepático y pancreático, causando obstrucción. El diagnóstico se hace por la determinación de la presencia de huevos en las heces (Sweeney y Ridway, 1975).

*Nasitrema* spp.

Es el trematodo que se encuentra con mayor frecuencia en el cerebro de los pequeños odontocetos, primariamente ocasiona infección parasitaria en los senos paranasales, ocasiona inflamación, mal olor, predispone a infecciones bacterianas que afectan el tracto respiratorio; en algunas ocasiones, las formas adultas de *Nasitrema* migran a

través de las paredes de los senos nasales, hacia el cerebro, ahí causan encefalitis y necrosis cerebral, los signos que presentan son pérdida del equilibrio, signos generalizados del sistema nervioso central y sacudimiento de la cabeza (Sweeney y Ridway, 1975; Dailey, 2001). Por ello se ha pensado que *Nasitrema* juega un papel en el varamiento de odontocetos (Fowler, 1993). Aunque no se ha resuelto el ciclo vital, se sospecha que las formas larvianas se encuentran en los peces, los cuales realizan el papel de hospederos intermediarios (Fowler, 1993).

## **1.2 MICROBIOTA NORMAL**

### **1.2.1 Definición**

La microbiota normal es el término que describe a bacterias, virus, protozoarios y hongos que habitan en diferentes regiones anatómicas y que mantiene una estrecha relación con la homeostasis de los animales y del humano. Estos microorganismos están adaptados para vivir en el hospedero sin causar daño o enfermedad (Ingraham e Ingraham, 2000; Sorum y Sunde, 2001; Tlaskalova *et al.*, 2004). Asimismo, la microbiota normal puede ser transitoria o permanente. La microbiota transitoria es aquella que se encuentra en periodos cortos y está constituida por microorganismos provenientes del ambiente; y la microbiota que persiste por un largo periodo de tiempo es llamada permanente y es similar entre individuos de la misma especie (Ingraham e Ingraham, 2000; Hernández *et al.*, 2004).

Los microorganismos están presentes en el ambiente y se encuentran en continuo contacto con los animales y humanos; esta interacción comienza desde el nacimiento y durante el transcurso de la vida del animal, por ingestión o inhalación de microorganismos, cada región anatómica crea un ambiente selectivo donde unos microorganismos son favorecidos más que otros (Tlaskalova *et al.*, 2004). De tal forma los microorganismos presentes en superficies internas y externas como la cavidad oral, tracto gastrointestinal, respiratorio, genitourinario, mucosa conjuntival y la piel en animales sanos son referidos como microbiota normal (Sorum y Sunde, 2001; Ingraham e Ingraham, 2000; Tlaskalova *et al.*, 2004). Algunos de estos microorganismos no son patógenos en la región anatómica donde habitan, pero pueden llegar a ser patógenos en regiones distintas (Levinson y Jawetz, 2000).

### **1.2.2 Composición y función**

La microbiota normal se establece por la interacción del hospedero con el ambiente, va a estar determinada por factores tales como edad, raza, hormonales, dieta, estrés, comportamiento sexual, medicación, estación del año, localización geográfica, alojamiento, densidad de población, contacto con otros animales o procedimientos de limpieza (Sorum y Sunde, 2000; Trujillo, 1992). La composición de la microbiota normal está integrada por bacterias, hongos, virus y protozoarios, los cuales van a formar parte de un mecanismo natural complejo en la superficie de las mucosas y la piel, que interactúan en la resistencia contra microorganismos patógenos debido a la producción de sustancias y péptidos antimicrobiales, competencia por nutrientes y la producción de enzimas extracelulares las cuales son inhibitorias o interfieren con el ataque de los patógenos oportunistas (Sorum y Sunde, 2000; Levinson y Jawetz, 2000; Tlaskalova *et al.*, 2004). Además, la microbiota normal se encarga de la digestión de sustratos metabolizables, producción de vitaminas, estimulación del sistema inmune, desarrollo de las células de la mucosa. En la mucosa del intestino se menciona que interviene en el desarrollo y expansión del tejido linfoide, el mantenimiento y regulación de la respuesta inmune y la regulación del tránsito intestinal (Kelly y Conway, 2005).

### **1.2.3 Interacción con el sistema inmunológico**

Se ha observado que la respuesta del sistema inmunológico presenta cierta tolerancia hacia la microbiota normal, esta respuesta consiste en tres fases: (1) detección del microorganismo, (2) la traducción del reconocimiento del microorganismo a una apropiada señalización y (3) la inducción de una respuesta efectora apropiada (Kelly y Conway, 2005), esta cadena es desarrollada principalmente por diversas familias de receptores y sistemas de señales de transducción envueltas en el reconocimiento de moléculas conservadas de los microorganismos, algunos de estos receptores son los de tipo toll-like (TLR) y los tipo Nod1 y Nod2 (en su traducción al inglés nucleotide-binding oligomerisation domain proteins), similares a estos hay factores del hospedero que antagonizan la función de estos receptores (tollip, SIGIRR, ST2 y proteínas Nod), los cuales proveen de un importante discernimiento dentro de los mecanismos de la supresión de la respuesta inmune requerida para mantener un estado de baja respuesta en relación a la microbiota normal (Kelly y Conway, 2005; Portnoy, 2005). Sin embargo recientemente se ha sugerido una función sinérgica de moléculas efectoras derivadas del hospedero y los microorganismos, que antagonizan y modulan la señalización mediada

por los TLR, mediando así la transducción y a las fases efectoras (Kelly y Conway, 2005). Otros autores comentan que los TLR pueden ser capaces de reconocer y discriminar entre microorganismos patógenos y comensales, esto se ha observado porque a pesar de una continua exposición a una gran cantidad de microorganismos comensales, las células epiteliales no responden hacia una respuesta inflamatoria, manteniendo así una baja respuesta inmune (Kelly y Conway, 2005).

Asimismo, esta situación no es benéfica para el hospedero cuando las características del microorganismo promueven la enfermedad, ya que representa un posible factor de virulencia porque puede no ser reconocido por el sistema inmunológico (Kelly y Conway, 2005). Esto se ha observado cuando los comensales atraviesan la mucosa e infectan las válvulas del corazón y dan como origen una endocarditis infecciosa, el repertorio de la respuesta inmune contra los patógenos endógenos es programado para una tolerancia sistémica (Herzenberg, 2000).

La coexistencia de los microbiota normal es usualmente beneficiosa para el hospedero, la interacción constante entre ambos va a tener un papel importante en la coevolución para una supervivencia conjunta (Steiner *et al.*, 2000).

#### **1.2.4 Relación con estrés y enfermedad**

En el año de 1936, Hans Selye publicó las tres etapas del Síndrome producido por diversos agentes nocivos, (1) alarma y adaptación, (2) eventos hormonales y (3) resistencia, agotamiento y muerte; donde los síntomas son independientes de la naturaleza del agente nocivo o del tipo de fármaco utilizado. Moberg en los años ochenta definió las tres etapas del estrés, (1) reconocimiento del estímulo estresante, (2) la respuesta del cuerpo hacia el estímulo y (3) las consecuencias resultantes del cuerpo. Se ha mencionado que la periódica activación de la respuesta hacia el estrés es benéfica para mantener la salud, de igual forma señala que si esta respuesta es incontrolada, excesiva y prolongada, el resultado es hacia una etapa de diestres, que no siempre resulta perjudicial para el individuo (Aubin y Dierauf, 2001).

Cuando los factores que ocasionan estrés en el animal son severos o persistentes y el animal no llega a adaptarse a ellos, se genera un desequilibrio perjudicial en el animal cuyas consecuencias pueden manifestarse a nivel inmune, psíquico, metabólico y reproductivo. Si el resultado culmina en una alteración en el funcionamiento del sistema

inmune, entonces el animal es vulnerable a enfermedades infecciosas y puede desarrollar una condición patológica. Los mamíferos marinos tanto en cautiverio como en vida libre están sujetos a una serie de eventos que pueden ocasionarles estrés, como por ejemplo: el ambiente social, la predación, la competencia por el alimento, el parasitismo, la captura, la transportación, el aislamiento, la sobrepoblación, instalaciones inadecuadas y ruidos excesivos.

Se han llevado a cabo diversos estudios en los delfines *T. truncatus* para determinar los indicadores del estrés: neutrofilia, eosinopenia, linfopenia, leucocitosis, hiperglicemia, incremento de cortisol y aldosterona en el suero, incremento en la sedimentación de eritrocitos, hipoferremia, incremento en la osmolaridad de la orina y cambios en la microflora normal del tracto respiratorio (Aubin y Dierauf, 2001). En este último punto, se ha observado que cuando se presentan alteraciones en las condiciones ambientales, fisiológicas, nutricionales o inmunológicas, algunos de los miembros de la microbiota normal pueden volverse oportunistas y causar enfermedad. Esta condición se puede presentar especialmente en individuos inmunodeprimidos; asimismo, se ha observado también que puede presentarse cuando se administra tratamiento médico con antimicrobianos de amplio espectro (Tlaskalova *et al.*, 2004).

El cloro y otros componentes antimicrobianos añadidos al agua, más el tratamiento médico con antimicrobianos, pueden afectar la microbiota normal causando la diseminación de los patógenos, los cuales tendrán una ventaja en la competencia para establecer infecciones en animales inmunodeprimidos (Buck, 1980). Ciertas bacterias que son parte de la microbiota normal son poco dañinas y suelen ser benéficas bajo ciertas circunstancias, pero pueden causar inflamación local o sistémica si se pierde la integridad de la superficie del hospedero (Hornef *et al.*, 2002). La interacción del hospedero y de los microorganismos es una línea frágil que puede fluctuarse provocando la muerte del hospedero, la eliminación del microorganismo, estados de latencia de este mismo, la colonización o al comensalismo, en estas últimas situaciones se puede revertir al desarrollo de la enfermedad. De tal manera la virulencia es una variable dependiente a la susceptibilidad del hospedero, al contexto y naturaleza de la interacción hospedero-microorganismo (Casedevall y Pirofski, 2001).

### ***1.2.5 Importancia en mamíferos marinos***

La información sobre la microbiota normal es importante cuando se intenta rehabilitar animales varados o en cautiverio, debido a que permite un mayor entendimiento del papel de las bacterias en los delfines con desordenes fisiológicos, así como para evaluar el estado de salud en mamíferos marinos de vida libre, y en forma específica para definir los métodos de evaluación y prevención de diferentes enfermedades infecciosas de delfines en cautiverio y evaluar el riesgo de transmisión hacia los humanos; esto último ha sido poco entendido debido a la escasez de información de los microorganismos que se encuentran asociados con estas especies y por lo cual debe cobrar una mayor importancia debido al auge que se ha presentado en los últimos años con el estrecho contacto de los delfines con los humanos, por ejemplo en la delfinoterapia y el nado con delfines, esto debido a que la mayoría de las personas que asisten a estas terapias son de la tercera edad, niños y mujeres embarazadas, los cuales tienen un mayor riesgo de estar inmunodeprimidos. De igual forma puede ser de utilidad para mejorar o implementar medidas de bioseguridad que permita un mejor manejo de estos animales en cautiverio.

### **1.3 JUSTIFICACIÓN**

En México existen dos tipos de instalaciones que contienen a los delfines en cautiverio, en base a la NOM 135 SEMARNAT 2004, se define a la instalación abierta como aquella que mantiene a los mamíferos marinos en su hábitat natural, la cual recibe intercambio de agua del exterior, con lo cual se diferencia de las instalaciones cerradas por que la calidad de agua es regulada por sistemas de filtración. Aún cuando existen algunos informes de bacterias patógenas en el *T. truncatus*, el conocimiento acerca de su microbiota en el tracto respiratorio y genital es limitado y por lo tanto se desconoce su posible patogenicidad y potencial zoonótico (Buck, 1980). El conocimiento de la microbiota normal del tracto respiratorio y el área genital en diferente época de año en ambos tipos de instalación permitirá un mayor entendimiento de los microorganismos relacionados con estos delfines y de las instalaciones que los contienen, así como aquella potencialmente patógena para los delfines y para el personal que labora con ellos, lo que permitirá un mejor manejo de esta especie y de las instalaciones que los contienen.

## **1.4 HIPÓTESIS**

La variabilidad de especies bacterianas y de levaduras, será mayor en el tracto respiratorio y en el área genital en los delfines que se encuentran en instalaciones abiertas en comparación con los que se encuentran en instalaciones cerradas.

## **1.5 OBJETIVOS**

### **1.5.1 Objetivo General**

Determinar en diferente época del año a las bacterias aerobias y levaduras presentes en el tracto respiratorio y el área genital del delfín tonina (*Tursiops truncatus*) clínicamente sanos, mantenidos en instalaciones cerradas y abiertas.

### **1.5.2 Objetivos Específicos**

1. Aislamiento e identificación de género y especie de bacterias aerobias y de levaduras a partir de muestras obtenidas del tracto respiratorio y el área genital de delfines tonina (*T. truncatus*), clínicamente sanos.
2. Comparación entre las especies bacterianas y de levaduras obtenidas a partir del tracto respiratorio y el área genital de delfines tonina (*T. truncatus*), mantenidos en instalaciones cerradas comparadas contra las obtenidas de los delfines mantenidos en instalaciones abiertas.

## **II. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1 INSTALACIONES**

En este trabajo, se realizaron los muestreos de delfines provenientes de 8 instalaciones diferentes, 5 de ellas tienen la infraestructura de instalaciones cerradas y 3 de instalaciones abiertas, con base en la Norma Oficial Mexicana NOM-135-SEMARNAT-2004, este tipo de instalaciones se encuentran definidas como:

Instalación abierta: infraestructura necesaria para el confinamiento de especies de mamíferos marinos en su medio natural, el cual recibe intercambio de agua del exterior ya sea por flujo de mareas u otras fuentes ([www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx)). Este tipo de infraestructura se encuentra en la empresa Grupo Vía Delphi (Delphinus Costa Maya en Mahahual, Delphinus Riviera Maya en Xcaret y Mundo delfines en Xel-Há).

Instalación cerrada: infraestructura necesaria para el confinamiento de especies de mamíferos marinos, con calidad de agua regulada por sistemas de filtración ([www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx)). Este tipo de infraestructura se encuentra en las empresas: CONVIMAR, (Atlantis, Aragón y Férias III), Delfiniti de México y Six Flags de México. Estas instalaciones cuentan con un sistema de filtro cerrado de arena, el cual permite el reciclamiento y el llenado de la misma. Realizan la determinación de la calidad del agua en las albercas, con base en una inspección diaria de valores como pH, salinidad y temperatura, además de un análisis microbiológico (potabilidad) cada mes, lo anterior con el fin de verificar que coincida con lo estipulado en la NOM-135-SEMARNAT-2004, donde se menciona que se deben cumplir con las siguientes condiciones:

- Potencial de Hidrógeno (pH) entre 6 y 8 unidades.
- Temperatura de 14° a 27° C.
- Salinidad de 18 a 36 partes por mil.

En cada una de las instalaciones mencionadas anteriormente se realizó la obtención de muestras de agua para la realización de un estudio bacteriológico general, lo anterior con el fin de comparar los aislamientos obtenidos de las muestras de los delfines con los del agua.

## 2.2 DELFINES

Se obtuvieron en cuatro ocasiones muestras del tracto respiratorio y el área genital de 29 delfines (*Tursiops truncatus*) clínicamente sanos, 11 delfines de ellos se encuentran en las 5 diferentes instalaciones cerradas, las cuales se localizan en la Ciudad de México y en Ixtapa, Guerrero. De las instalaciones abiertas se muestrearon a 18 delfines, que se encuentran distribuidos en 3 diferentes instalaciones en Quintana Roo.

Las características de los delfines muestreados en cada tipo de instalación fueron:

Instalaciones cerradas:

Juveniles menores de 10 años de edad	hembras 1	machos 2
Adultos mayores de 10 años de edad	hembras 4	machos 4

Instalaciones abiertas:

Juveniles menores de 10 años de edad	hembras 6	machos 3
Adultos mayores de 10 años de edad	hembras 5	machos 4

Cada empresa realiza de manera periódica exámenes físicos a sus delfines, así como análisis de sangre, análisis bacteriológicos, coproparasitoscópicos, generales de orina, citologías respiratorias, evaluación de la dieta, entre otros, para monitorear a los delfines y así conocer su estado de salud. Para este trabajo era importante que los delfines de este estudio no se encontraran cursando algún problema infeccioso y no estuvieran bajo tratamiento antimicrobiano, por lo que antes de realizar el muestreo se consultó con el MVZ responsable de cada delfín, tomando en cuenta el expediente clínico de cada animal, se observó específicamente que no se encontraran cursando con alguna patología clínica, o cursando algún problema infeccioso y por consiguiente un tratamiento con antimicrobianos en por lo menos tres semanas antes del muestreo, además de lo anterior, se prosiguió a realizar un examen físico, se tomaron muestras de sangre con tubos con EDTA para la realización de hemogramas, se tomaron muestras citológicas del tracto respiratorio y del área genital. Posteriormente se realizaron los muestreos bacteriológicos. El manejo de los delfines se realizó por condicionamiento operante por lo que no fue necesario la contención química y tuvo una duración de aproximadamente de 10 minutos máximo por delfín, con el fin de evitar el mínimo estrés y alguna alteración de sus parámetros fisiológicos.

El periodo para la obtención de las muestras de cada delfín se realizó en cuatro ocasiones, con el fin de realizar uno por cada estación del año.

- 1.- Agosto y Septiembre del 2006. Verano
- 2.- Noviembre y Diciembre 2006. Otoño
- 3.- Enero, Febrero y Marzo del 2007. Invierno
- 4.- Abril y Mayo del 2007. Primavera

### ***2.2.1 Muestreo del área genital***

Material por delfín:

Gasas estériles

2 hisopos estériles (Copan, Italia)

2 transportes AMIES con carbón activado (Copan, Italia)

Procedimiento:

Para la obtención de la muestra vaginal o prepucial, los delfines están entrenados para ir hacia donde está el entrenador y colocarse en una posición dorso ventral en la superficie del agua, el entrenador lo sujetó de la parte dorso ventral y expuso el área genital del delfín fuera del agua. La periferia del área genital se limpió con gasas estériles, la hendidura genital se separó con los dedos (se recomienda el uso de guantes estériles) y se procedió a introducir un hisopo estéril (Copan, Italia) en la vagina o en su caso en el prepucio, con movimientos circulares, se tomaron dos muestras por delfín. Cada hisopo se colocó en un medio de transporte AMIES con carbón activado (Copan, Italia), cuidando la identificación de cada muestra.

### ***2.2.2 Muestreo del tracto respiratorio***

Material por delfín:

Gasas estériles

2 bolsas estériles (Ziplock, Tailandia)

2 hisopos estériles (Copan, Italia)

2 transportes AMIES con carbón activado (Copan, Italia)

Procedimiento:

Con gasas estériles se limpió la piel de la periferia del espiráculo, se colocó una bolsa estéril (Ziplock, Tailandia) de boca ancha a unos 2 cm de distancia del espiráculo y mediante una fuerte espiración por el delfín se obtuvo una secreción profunda del tracto respiratorio. De

la bolsa se tomaron dos muestras con hisopos estériles (Copan, Italia) y se colocaron en medio de transporte AMIES con carbón activado (Copan, Italia).

Las muestras del tracto respiratorio y del área genital se transportaron a temperatura de 4°C y fueron llevadas al laboratorio del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde fueron procesadas en un máximo de 24 horas.

### **2.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

Cada muestra fue cultivada en agar sangre, agar chocolate, agar MacConkey y agar Columbia (Oxoid, Inglaterra). Los cultivos fueron incubados bajo condiciones de aerobiosis y microaerobiosis de 24 a 48 h a 37° C. Después de la incubación, cada colonia diferente fue subcultivada en agar sangre para su aislamiento en cultivo puro para realizar posteriormente su caracterización. Cada cultivo puro fue descrito macroscópicamente (morfología de la colonia, hemólisis y producción de pigmentos) y microscópicamente (reacción de Gram, forma y agrupación bacteriana), en base a esta descripción se decidió que tipo de galería del sistema API 20 (Biomérieux, Francia) se utilizaría para la identificación de bacterias o de levaduras, este sistema consiste en una serie de pruebas bioquímicas estandarizadas para determinar género y especie, que incluye diversas pruebas de asimilación de carbohidratos y pruebas enzimáticas.

De acuerdo a las características de las bacterias y levaduras se utilizaron:

1. API 20 NE para bacilos gram negativos no enterobacterias
2. API 20 E para enterobacterias
3. API 20 STAPH para estafilococos
4. API 20 STREPT para estreptococos
5. API CAux para levaduras

Posteriormente todos los aislamientos fueron almacenados a -80° C, en caldo nutritivo infusión cerebro corazón con 50% de glicerol (Sigma, USA).

### **2.4 ACTIVIDADES Y MUESTREOS COMPLEMENTARIOS**

- **Examen físico**
- **Hemograma**

Material por delfín:

Torundas con alcohol etílico al 96%

Tubos con 3ml de EDTA (Vacutainer, USA).

Agujas mariposas de 21 a 25G 3/4 X 12" (Vacutainer, USA)

Portaobjetos 25x75

Procedimiento:

El área ventral de la aleta caudal fue limpiada con torundas con alcohol, posteriormente se realizó la venopunción para la obtención de la muestra sanguínea, se depositaron aproximadamente 3ml de sangre en un tubo con EDTA. A cada muestra se le realizaron 2 frotis sanguíneos en un portaobjetos, los cuales se fijaron al aire para su posterior tinción y observación. Las muestras sanguíneas se transportaron a temperatura de 4°C en un máximo de 24 horas para la realización de hemogramas (Figura 5).



**Figura 5.** Toma de muestra de sangre.

#### ■ Citología del área genital

Material por delfín:

Gasas estériles

2 hisopos estériles

2 portaobjetos 25x75

Procedimiento:

Se expuso el área genital del delfín fuera del agua, con una gasa estéril se eliminó el exceso de agua y posteriormente se procedió a introducir un hisopo estéril en la vagina o en su

caso en el prepucio, con movimientos circulares, se tomó una muestra por delfín. Con cada hisopo se realizó un frotis girando el hisopo en la superficie del portaobjetos en una forma lineal y girando las caras del hisopo, inmediatamente después se fijó al aire y se rotuló con el nombre y área muestreada.

#### ■ **Citología del tracto respiratorio**

Material por delfín:

1 portaobjetos 25x75

Procedimiento:

Se tomó un portaobjetos y se colocó a una distancia de 10 a 15 cm del orificio del espiráculo, mediante una fuerte expiración del animal se obtuvo la muestra; inmediatamente se fijó al aire y se identificó con el nombre y área muestreada.

Las muestras citológicas y de sangre previamente identificadas con el nombre del delfín fueron llevadas al laboratorio del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde las muestras de sangre fueron procesadas en un máximo de 24 horas. Las citologías fueron teñidas con la tinción de Diff Quick (Satin Set, Baxter, EUA) para su posterior examinación.

#### ■ **Calidad del agua**

Bacteriológico general.

Material por contenedor:

1 frasco estéril con tapón esmerilado con capacidad de 125 ml.

Procedimiento:

El procedimiento sanitario para el muestro del agua se realizó con base en las especificaciones de la Norma NOM-230-SSA1-2002. Se tomaron 100ml sumergiendo el frasco con la boca hacia abajo de 15 a 30cm de profundidad. Las muestras se transportaron a temperatura de 4°C y fueron llevadas al laboratorio del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde fueron procesadas en un máximo de 24 horas.

Posteriormente se tomaron 30µl de agua del frasco, y se depositaron en agar sangre y agar MacConkey donde fueron cultivados por las técnicas convencionales. Los cultivos fueron

incubados bajo condiciones de aerobiosis de 24 a 48 h a 37° C y posteriormente se continuó con el procedimiento del análisis bacteriológico mencionado anteriormente.

## **2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó un análisis de la varianza GLM (SAS Versión 9.0); el análisis estadístico incluyó sólo a las especies bacterianas y de levaduras que tuvieran un número mayor de 5 aislamientos, analizando los siguientes efectos:

1. Tipo de instalación (abierta y cerrada). Se realizó la comparación entre el número de aislamientos realizados en ambos tipos de instalación. Individualmente se comparó a los aislamientos realizados en cada uno de los 8 parques marinos que colaboraron con el trabajo, 5 parques con la infraestructura de instalaciones cerradas, de las cuales una de ellas con agua proveniente del mar y los otros 3 parques del tipo de instalaciones abiertas.
2. Muestreos. Se realizó la comparación del número de aislamientos de cada uno de los 4 muestreos efectuados en las diferentes épocas del año, además de su interacción con respecto al tipo de instalación (abierta o cerrada).
3. Áreas muestreadas. Se comparó el número de aislamientos realizados en cada área muestreada (Respiratorio y A. Genital).
4. Especies (bacterianas y de levaduras): Se realizó la comparación entre el número de aislamientos de cada especie bacteriana y de levaduras que se obtuvieron, su interacción con el tipo de instalación y el área donde se realizó la toma de muestra (Respiratorio y A. Genital).

## **III. RESULTADOS**

### **3.1 RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS**

En los cuatro periodos de muestreo se colectaron un total de 212 muestras microbiológicas, 107 del tracto respiratorio, 59 de la mucosa vaginal y 46 de la prepucial. De las instalaciones abiertas se obtuvo un mayor número de muestras tanto del tracto respiratorio como del área genital, debido a que en el segundo y tercer periodo no fue posible obtener algunas muestras de los delfines que se encontraban en las instalaciones cerradas. En el cuarto periodo en 10 de 27 muestras del área genital de ambos tipos de instalaciones no hubo crecimiento microbiano (cuadro 1). En total se obtuvieron 359 aislamientos bacterianos y 20

de levaduras, de las cuales la mayoría se aislaron de las muestras provenientes de los delfines de las instalaciones abiertas (cuadro 2).

**Cuadro 1.** Distribución del total de las muestras con respecto al tipo de instalación, los cuatro muestreos y área muestreada.

MUESTREO	Respiratorio		Mucosa vaginal		Mucosa prepucial		TOTAL
	IA	IC	IA	IC	IA	IC	
<b>PRIMER</b>	18*	11	11*	5	7	6	58
<b>SEGUNDO</b>	18*	6	11	2	7*	4*	48
<b>TERCERO</b>	18	7	11	4	7	3*	50
<b>CUARTO</b>	18	11*	10	5**	6***	6****	56
<b>TOTAL</b>	72	35	43	16	27	19	212

IA = Instalaciones abiertas

IC = Instalaciones cerradas

\* No se obtuvo aislamiento de una muestra.

\*\* No se obtuvo aislamiento de 2 muestras.

\*\*\* No se obtuvo aislamiento de 3 muestras.

\*\*\*\* No se obtuvo aislamiento de 5 muestras.

**Cuadro 2.** Distribución del número de aislamientos por tipo de muestra y por tipo de instalación.

Muestra	Bacterias		Levaduras		Totales
	IA	IC	IA	IC	
Tracto Respiratorio	117	53	15	4	189
Mucosa Vaginal	83	33	1		117
Mucosa Prepucial	50	23			73
<b>Totales</b>	<b>250</b>	<b>109</b>	<b>16</b>	<b>4</b>	<b>379</b>

IA = Instalaciones abiertas

IC = Instalaciones cerradas

De las muestras del tracto respiratorio se obtuvieron 170 aislamientos bacterianos y 19 de levaduras, en el cuadro 3 se indica a cada una de las especies que se obtuvieron en cada muestreo por tipo de instalación, las bacterias que comparten los delfines en ambos tipos de instalaciones son: *Staphylococcus aureus* (23%), *Vibrio alginolyticus* (8%) y *Micrococcus* spp. (6%), teniendo estas dos últimas una mayor presencia durante el año en las instalaciones abiertas, se puede observar también el aislamiento en ambas instalaciones de *Escherichia coli* (5%), *Proteus vulgaris* (5%), *Pseudomonas aeruginosa* (4%), *Aeromonas hydrophila* (3%) y diversas especies del género *Staphylococcus* coagulasa negativas, entre otras. En cuanto a la presencia de levaduras, en las instalaciones abiertas se presentó una mayor cantidad y diversidad de especies en el primer muestreo, que correspondió a la época de verano y a la temporada de lluvias, *Candida tropicalis* presentó el mayor porcentaje de aislamiento en ambas instalaciones, seguida de *Candida parapsilosis*, *Candida norvegensis*, *Cryptococcus laurentii* (estas 3 últimas presentes sólo en instalaciones abiertas) y *Candida albicans*, la cual sólo se aisló en una ocasión en las instalaciones cerradas. Del total de estos aislamientos corresponden a 50 especies bacterianas diferentes y 5 de levaduras, en el cuadro 5 se observa su distribución entre los tipos de instalaciones y se observa que comparten 14 especies bacterianas y 2 de levaduras.

**Cuadro 3.** Especies bacterianas y de levaduras aisladas del tracto respiratorio por cada por tipo de instalación en cada uno de los 4 muestreos realizados (I, Verano, II, Otoño, III, Invierno, IV, Primavera).

GRUPO	MICROORGANISMOS	I. ABIERTAS				I. CERRADAS				Total N (%)	% I. Abiertas	% I. Cerradas
	MUESTREOS	I	II	III	IV	I	II	III	IV			
	Número de aislamientos totales	32	25	31	29	19	7	14	13			
Staphylococcus	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	10	6	5	4	3	5	4	39 (23)	20	30
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	3	1				1	1		6(4)	3	4
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		1	2	1			1		5 (3)	3	2
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>				3				1	4(2)	3	2
	<i>Staphylococcus hominis</i>				1	1		2		4 (2)	1	6
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1							1	2 (1)	1	2
	<i>Staphylococcus sciuri</i>			1						1 (1)	1	0
	<i>Staphylococcus capitis</i>	1								1 (1)	1	0
	<i>Staphylococcus auricularis</i>	1								1 (1)	1	0
	<i>Staphylococcus lentus</i>	1								1 (1)	1	0
	<i>Staphylococcus warneri</i>			1						1 (1)	1	0
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>						1			1 (1)	0	2
	<i>Staphylococcus simulans</i>								1	1 (1)	0	2
	<i>Staphylococcus spp.</i>					2			2	4 (2)	0	8
Otros cocos Gram (+)	<i>Micrococcus spp.</i>	5		2	1	2				10 (6)	7	4
	<i>Micrococcus luteans</i>				2					2 (1)	2	0
	<i>Micrococcus lylae</i>			3						3 (2)	3	0
	<i>Streptococcus mitis</i>		1							1 (1)	1	0
	<i>Aerococcus viridans</i>					1				1 (1)	0	2
	<i>Gemella haemolysans</i>	1								1 (1)	1	0
	<i>Enterococcus faecalis</i>			1						1 (1)	1	0
	<i>Enterococcus durans</i>	1								1 (1)	1	0
	<i>Enterococcus amnigenus</i>				1					1 (1)	1	0
<i>Kocuria varians</i>		1		1					2 (1)	2	0	
Enterobacterias	<i>Escherichia coli</i>	1	3		3	1				8 (5)	6	2
	<i>Proteus mirabilis</i>				1					1 (1)	1	0
	<i>Proteus vulgaris</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	8 (5)	3	8

Continuación cuadro 3.....

GRUPO	MICROORGANISMOS	I. ABIERTAS				I. CERRADAS				Total N (%)	% I. Abiertas	% I. Cerradas
	MUESTREOS	I	II	III	IV	I	II	III	IV			
	Número de aislamientos totales	32	25	31	29	19	7	14	13			
Bacilos Gram (-) no fermentadores	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2	2	5	1	1		2		13 (8)	9	6
	<i>Vibrio vulnificus</i>			1	1					2 (1)	2	0
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1								1 (1)	1	0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1	2	1			1		6 (4)	4	2
	<i>Pseudomonas putida</i>					1				1 (1)	0	2
	<i>Pseudomonas luteola</i>	2	1						1	4 (2)	3	2
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2		1						3 (2)	3	0
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>			1						1 (1)	1	0
	<i>Aeromonas hydrophila</i>		1	1	2	1				5 (3)	3	2
	<i>Aeromonas sobria</i>	1		1	1					3 (2)	3	0
	<i>A. salmonicida masoucida</i>							1		1 (1)	0	2
	<i>Shewanella putrefaciens</i>	2	1		2					5 (3)	4	0
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>			1		1				2 (1)	1	2
	<i>Photobacterium damsela</i>	1								1 (1)	1	0
	<i>Burkholderia cepacia</i>			1						1 (1)	1	0
	<i>Achromobacter xylooxidans</i>	1								1 (1)	1	0
	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1								1 (1)	1	0
	<i>Pasteurella pneumotropica</i>		1							1 (1)	1	0
	<i>Brevundimonas diminuta</i>				1					1 (1)	1	0
	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	0					3			3 (2)	0	6
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0					1			1 (1)	0	2	
<i>Oligella urethralis</i>								1	1 (1)	0	2	
<i>Pasteurella multocida</i>								1	1 (1)	0	2	
Levaduras	<i>Candida albicans</i>						1			1		
	<i>Candida tropicalis</i>	3	1	2	3	1	1		1	12		
	<i>Candida parapsilosis</i>	1	2		1					4		
	<i>Candida norvegensis</i>	1								1		
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	1								1		

Con respecto a las muestras obtenidas del área genital, se obtuvieron de la mucosa prepucial 73 aislamientos bacterianos y de la mucosa vaginal 116 aislamientos bacterianos y uno de levadura. En el cuadro 4, se menciona a cada una de las especies que se aislaron durante los 4 muestreos en cada tipo de instalación, las cuales corresponden a 53 diferentes especies bacterianas y 1 de levadura, de éstas 18 especies bacterianas son las que comparten los dos tipos de instalaciones en el área genital (Cuadro 5): *Staphylococcus epidermidis*

(14%), *Staphylococcus aureus* (10%), *Micrococcus* spp. (8%), *Escherichia coli* (5%) y *Vibrio alginolyticus* (5%).

**Cuadro 4.** Especies bacterianas y de levaduras aisladas del área genital por cada por tipo de instalación en cada uno de los 4 muestreos realizados (I, Verano, II, Otoño, III, Invierno, IV, Primavera).

GRUPO	MICROORGANISMOS	I. ABIERTAS				I. CERRADAS				Total N (%)	% I. Abiertas	% I. Cerradas
		I	II	III	IV	I	II	III	IV			
	Número de aislamientos	41	30	36	26	24	13	12	7	189	133	56
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	5	3	4	2	1	1	1	1	18 (10)	11	7
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	9	9	2			1	2	27 (14)	18	5
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>			1	4	1	1			7 (4)	4	4
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	1	2		2		1			6 (3)	4	2
	<i>Staphylococcus warneri</i>	1	2		3					6 (3)	5	0
	<i>Staphylococcus hominis</i>	4	2							6 (3)	5	0
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	2								2 (1)	2	0
	<i>Staphylococcus lentus</i>	1								1 (1)	1	0
	<i>Staphylococcus intermedius</i>		1							1 (1)	1	0
	<i>Staphylococcus spp.</i>					1				1 (1)	0	2
	Otros cocos Gram (+)	<i>Micrococcus spp.</i>	5	2	2	2	3		1		15 (8)	8
<i>Micrococcus luteans</i>		3		1	1	1		1		7 (4)	4	4
<i>Micrococcus lylae</i>				3	2					5 (3)	4	0
<i>Gemella haemolysans</i>		2								2 (1)	2	0
<i>Gemella morbillorum</i>						1				1 (1)	0	2
<i>Gardnerella vaginalis</i>									1	1 (1)	0	2
<i>Kocuria varians</i>				1						1 (1)	1	0
<i>Kocuria kristinae</i>			1							1 (1)	1	0
<i>Aerococcus urinae</i>		1								1 (1)	1	0
<i>Aerococcus viridans</i>						1				1 (1)	0	2
<i>Streptococcus mitis</i>		1								1 (1)	1	0
<i>Streptococcus dysgalactiae ssp equisimilis</i>							2			2 (1)	0	4
<i>Streptococcus grupo L</i>								2		2 (1)	0	4
Enterobacterias	<i>Escherichia coli</i>	1	2		2	2	1		1	9 (5)	4	7
	<i>Escherichia vulneris</i>	1								1 (1)	1	0
	<i>Proteus vulgaris</i>					1				1 (1)	0	2

Continuación cuadro 4.....

GRUPO	MICROORAGNISMOS	I. ABIERTAS				I. CERRADAS				Total N (%)	% I. Abiertas	% I. Cerradas
	MUESTREOS	I	II	III	IV	I	II	III	IV			
	Número de aislamientos	41	30	36	26	24	13	12	7	189	133	56
Bacilos Gram (-) no fermentadores	<i>Vibrio alginolyticus</i>	3	1	3	1			1		9 (5)	6	2
	<i>Vibrio cholerae</i>	1				1	1			3 (2)	1	4
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>				1			1		2 (1)	1	2
	<i>Vibrio vulnificus</i>							1	1	2 (1)	0	4
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1		1			2			4 (2)	2	4
	<i>Aeromonas sobria</i>					1	2			3 (2)	0	5
	<i>Aeromonas salmonicida masoucida</i>								1	1 (1)	0	2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1		1		1				3 (2)	2	2
	<i>Pseudomonas luteola</i>		1	1						2 (1)	2	0
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>		1	1	2			1		5 (3)	3	2
	<i>Pseudomonas putida</i>				1					1 (1)	1	0
	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	1					1			2 (1)	1	2
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>			2						2 (1)	2	0
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>		1	1						2 (1)	2	0
	<i>Burkholderia cepacia</i>						1			1 (1)	0	2
	<i>Shewanella putrefaciens</i>				1		1		1	3 (2)	1	4
	<i>Photobacterium damsela</i>	1	2				1	1	1	6 (3)	2	5
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1					1			2 (1)	1	2
	<i>Acinetobacter iwoffii</i>						1			1 (1)	0	2
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>				1		1			2 (1)	1	2
	<i>Bacillus brevis</i>			1						1 (1)	1	0
	<i>Chryseobacterium indologenes</i>			1						1 (1)	1	0
	<i>Brevundimonas vesicularis</i>					1				1 (1)	1	0
<i>Empedobacter brevis</i>					1				1 (1)	1	0	
<i>Pasteurella spp.</i>						1			1 (1)	0	2	
<i>Pantoea spp.</i>							1		1 (1)	0	2	
<i>Ochrobactrum anthropi</i>							1		1 (1)	0	2	
Levaduras	<i>Candida parapsilosis</i>		1									

En el cuadro 5, se indica el total de especies de bacterias y de levaduras que se obtuvieron por delfín en cada tipo de instalación durante los 4 muestreos, asimismo se observan cuantas especies son las que comparten y cuales no entre los dos tipos de instalaciones.

En las muestras provenientes de las instalaciones abiertas se tiene un mayor número de diversidad de especies aisladas, en comparación con las muestras de las instalaciones cerradas, tanto en tracto respiratorio como en el área genital.

**Cuadro 5.** Total de especies aisladas del tracto respiratorio y el área genital en cada tipo de instalación.

	Respiratorio		Área Genital	
	IA	IC	IA	IC
Total de especies aisladas	45	26	39	33
Especies que comparten entre las instalaciones	16	16	18	18
Especies no compartidas	29	10	21	15

IA = Instalaciones abiertas

IC = Instalaciones cerradas

### 3.2 RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Se obtuvieron durante los cuatro periodos de muestreo 19 especies bacterianas y una de levadura con un aislamiento mayor a 5 veces, con lo cual se realizó un diseño para el análisis estadístico. En los efectos que fueron analizados se observaron los siguientes resultados:

**1. Tipo de instalación (abierta y cerrada).** En la comparación de los aislamientos entre ambos tipos de instalación se encontró un efecto con una  $p < .04$ , en los aislamientos de las instalaciones abiertas se encontró una proporción de 7% a diferencia de las instalaciones cerradas que presentaron 4%. Por lo que se mostró que hay un mayor aislamiento en las instalaciones abiertas que en las cerradas.

Individualmente se observaron las proporciones de los aislamientos realizados en cada uno de los 8 parques marinos, donde se obtuvo un rango de 2 a 6% (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Proporción de aislamiento por tipo de instalación en los 8 parques marinos.

Parque Marino	Tipo de Instalación	Proporción	Error
1	0	2%	0.02
2	0	6%	0.02
3	0	4%	0.01
4	0	3%	0.01
5	0	4%	0.01
6	1	7%	0.01
7	1	7%	0.01
8	1	7%	0.01

0= Instalación cerrada

1= Instalación abierta

2. **Muestreos.** No se observó diferencia en los aislamientos de cada muestreo,  $p < .36$ , de igual forma no mostró efecto en los aislamientos en cada tipo de instalación en las diferentes épocas del año. En el muestreo 2 y 4 se obtuvo una proporción de 5%, a diferencia del muestreo 1 y 3 con una diferencia del 6%.
  3. **Áreas muestreadas.** No mostró efecto en los aislamientos por cada área muestreada (Respiratorio y A. Genital),  $p < .75$ .
  4. **Especies (bacterianas y de levaduras):** Se observó un efecto en el número de aislamientos de cada especie bacteriana y de levaduras que se obtuvieron,  $p < .0001$ , su interacción con el tipo de instalación  $p < .043$  y el área donde se realizó la toma de muestra (Respiratorio y A. Genital)  $p < .0001$ , y la interacción de estos tres efectos,  $p < .0061$ .
- A) Interacción entre la proporción del aislamiento de cada una de las 20 especies.** En relación al número de aislamientos de cada especie se observó que hubo diferencia estadística mostrando a *Staphylococcus aureus* con una proporción mayor a todas (24%), seguida de *Staphylococcus epidermidis* (12%) y *Micrococcus* spp. (11%), la que obtuvo menor proporción fue *Pseudomonas luteola* (2%). En el cuadro 7 se puede ver el comportamiento de las proporciones de cada una de las 20 especies analizadas.

Analizando por cada grupo, es visible que el género que se aisló con mayor presencia fue *Staphylococcus* spp., el grupo con mayor diversidad de especies fueron los bacilos Gram (-) no fermentadores y el grupo de las enterobacterias tuvieron un menor aislamiento con respecto a los otros cuatro grupos.

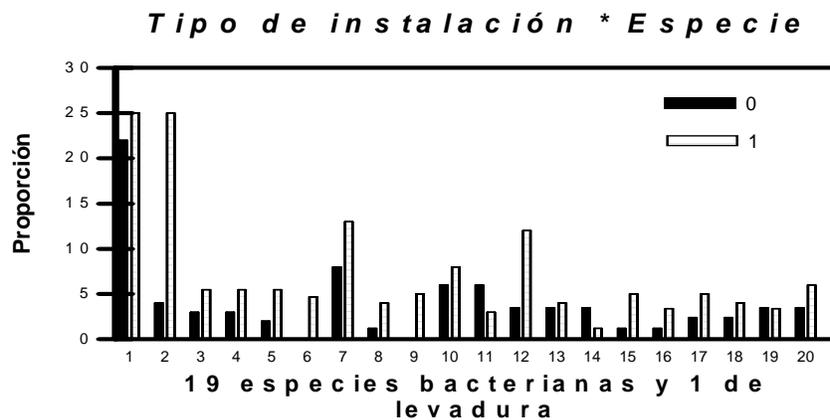
**Cuadro 7.** Distribución de los porcentajes de aislamiento de las 19 especies bacterianas y una de levadura.

Grupo	20 Especies (Bacterias y levaduras)	Porcentaje	Error
<i>Staphylococcus</i>	(1) <i>Staphylococcus aureus</i>	24%	0.015
	(2) <i>Staphylococcus epidermidis</i>	12%	0.015
	(3) <i>Staphylococcus xylosus</i>	4%	0.015
	(4) <i>Staphylococcus hominis</i>	4%	0.015
	(5) <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4%	0.015
	(6) <i>Staphylococcus warneri</i>	2%	0.015
Otros cocos Gram (+)	(7) <i>Micrococcus</i> spp.	11%	0.015
	(8) <i>Micrococcus luteans</i>	3%	0.015
	(9) <i>Micrococcus lylae</i>	3%	0.015
Enterobacterias	(10) <i>Escherichia coli</i>	7%	0.015
	(11) <i>Proteus vulgaris</i>	4%	0.015
Bacilos Gram (-) no fermentadores	(12) <i>Vibrio alginolyticus</i>	8%	0.015
	(13) <i>Aeromonas hydrophila</i>	4%	0.015
	(14) <i>Aeromonas sobria</i>	3%	0.015
	(15) <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	3%	0.015
	(16) <i>Pseudomonas luteola</i>	2%	0.015
	(17) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4%	0.015
	(18) <i>Shewanella putrefaciens</i>	3%	0.015
	(19) <i>Photobacterium damsela</i>	3%	0.015
Levaduras	(20) <i>Candida tropicalis</i>	5%	0.015

**B) Interacción tipo de instalación y de las 20 especies aisladas.** En los resultados estadísticos de esta interacción podemos mencionar (Figura 6) que la especie que se aisló con mayor proporción en ambos tipos de instalación fue *Staphylococcus aureus* con una proporción en las I. Abiertas de (25%) y en las cerradas de (23%).

En las I. Abiertas se encontró con mayor número de aislamientos de *S. epidermidis* (20%), *Micrococcus* spp. (13%), *V. alginolyticus* (12%), *P. alcaligenes* (5%), *E. coli* (8%), *P. aeruginosa* (5%), *S. putrefaciens* (4%) y *C. tropicalis* (6%), en comparación con las I. Cerradas.

En las I. Cerradas no se obtuvo el aislamiento de 2 especies que si se aislaron en las I. Abiertas: *S. warneri* y *M. lylae*.



**Figura 6.** Distribución de las proporciones estadísticas del aislamiento de las 20 especies bacterianas y una de levadura con respecto al tipo de instalación. 0= Instalaciones Cerradas, 1= Instalaciones Abiertas. ((1) *S. aureus*, (2) *S. epidermidis*, (3) *S. xylosum*, (4) *S. hominis*, (5) *S. haemolyticus*, (6) *S. warneri*, (7) *Micrococcus* spp., (8) *M. luteans*, (9) *M. lylae*, (10) *E. coli*, (11) *P. vulgaris*, (12) *V. alginolyticus*, (13) *A. hydrophila*, (14) *A. sobria*, (15) *P. alcaligenes*, (16) *P. luteola*, (17) *P. aeruginosa*, (18) *S. putrefaciens*, (19) *P. damsela*, (20) *C. tropicalis*).

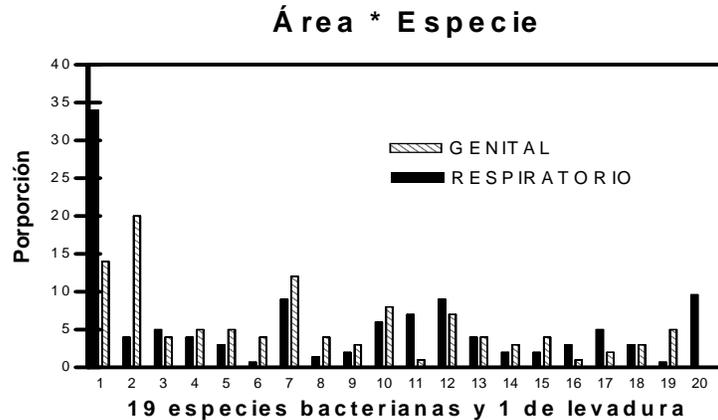
**C) Interacción área y especies.-** En las proporciones de los aislamientos de las 20 especies aisladas con respecto a las muestras obtenidas del tracto respiratorio y el área genital, se pueden mencionar algunas de las relaciones y diferencias (Figura 7):

*S. aureus* tiene un mayor número de aislamientos en el tracto respiratorio que en el área genital (34%); a lo contrario, *S. epidermidis* (21%) fue la que se aisló mayormente en el área genital.

En las muestras del área genital no se aislaron microorganismos que si se hallaron en el tracto respiratorio como *C. tropicalis* con una proporción de (10%) y *P. vulgaris* (7%). En las

muestras del área genital tuvieron mayores aislamientos de *P. damsela* (6%), *E. coli* (8%) y *Micrococcus* spp. (12%), en comparación con las del tracto respiratorio.

En las muestras del tracto respiratorio se realizaron mayores aislamientos de *V. alginolyticus* (9%), *P. aeruginosa* (5%) y *P. vulgaris* (7%) en comparación con las muestras del área genital.



**Figura 7.** Distribución de las proporciones del aislamiento de las 19 especies bacterianas y una de levadura con respecto al área muestreada (respiratorio y área genital). ((1) *S. aureus*, (2) *S. epidermidis*, (3) *S. xylosus*, (4) *S. hominis*, (5) *S. haemolyticus*, (6) *S. warneri*, (7) *Micrococcus* spp., (8) *M. luteans*, (9) *M. lylae*, (10) *E. coli*, (11) *P. vulgaris*, (12) *V. alginolyticus*, (13) *A. hydrophila*, (14) *A. sobria*, (15) *P. alcaligenes*, (16) *P. luteola*, (17) *P. aeruginosa*, (18) *S. putrefaciens*, (19) *P. damsela*, (20) *C. tropicalis*).

**D) Tipo de instalación, área y especies.-** Realizando la comparación de la proporción en estos 3 efectos, es posible tener un panorama más amplio del comportamiento de estos microorganismos en el tracto respiratorio y el área genital de los delfines en cada tipo de instalación (Figura 8), de lo cual se puede mencionar:

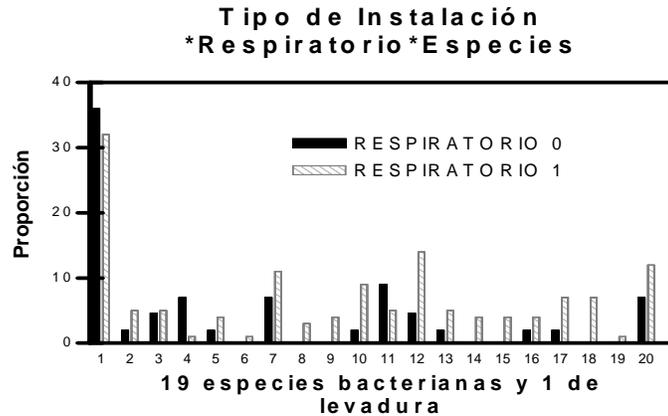
**Tracto respiratorio:**

En las muestras de ambas instalaciones la especie que predominó fue *S. aureus* en las instalaciones cerradas (36%) y en las I. Abiertas (32%).

En las muestras de las instalaciones abiertas, después de *S. aureus*, las especies que predominaron fueron *V. alginolyticus* (14%) y *C. tropicalis* (12%). En las muestras de este tipo de instalación sólo se aisló a *S. warneri* (1%), *M. luteans* (3%), *M. lylae* (4%), *A. sobria* (4%), *P. alcaligenes* (4%), *S. putrefaciens* (7%) y *P. damsela* (1%), además de tener un

mayor número de aislamientos de *E. coli* (10%), *A. hydrophila* (5%) y *P. aeruginosa* (7%) en comparación con los aislamientos de las instalaciones cerradas.

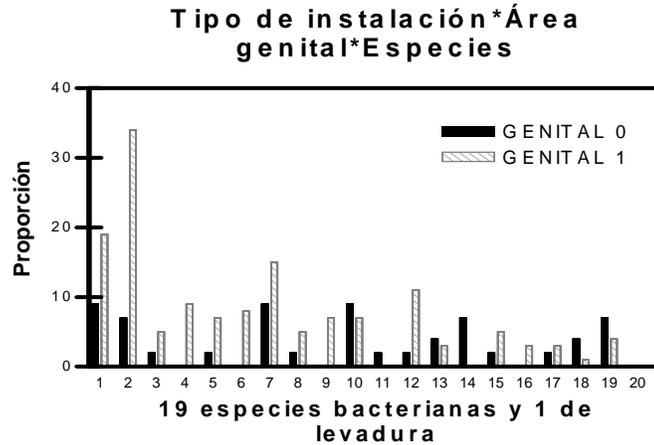
En las muestras de las instalaciones cerradas, las especies que presentaron una proporción mayor de aislamientos fueron *S. aureus* (36%), *P. vulgaris* (9%) y *Micrococcus* spp. (7%).



**Figura 8.** Distribución de las proporciones estadísticas del aislamiento de las 19 especies bacterianas y una de levadura en las muestras del tracto respiratorio en cada tipo de instalación (abierta y cerrada). Respiratorio 0= Instalación cerrada, Respiratorio 1= instalaciones abiertas. ((1) *S. aureus*, (2) *S. epidermidis*, (3) *S. xylosum*, (4) *S. hominis*, (5) *S. haemolyticus*, (6) *S. warneri*, (7) *Micrococcus* spp., (8) *M. luteus*, (9) *M. lylae*, (10) *E. coli*, (11) *P. vulgaris*, (12) *V. alginolyticus*, (13) *A. hydrophila*, (14) *A. sobria*, (15) *P. alcaligenes*, (16) *P. luteola*, (17) *P. aeruginosa*, (18) *S. putrefaciens*, (19) *P. damsela*, (20) *C. tropicalis*).

**Área genital:**

En las muestras de las instalaciones abiertas la bacteria que predominó fue *S. epidermidis* (35%), contrariamente a las instalaciones cerradas la cual fue *S. aureus* (9%). Se observó además la presencia de especies que no se aislaron en las instalaciones cerradas como: *S. hominis* (10%), *S. warneri* (8%), *M. lylae* (7%) y *P. luteola* (3%), de igual forma se observaron especies que no crecieron en las instalaciones abiertas pero que si se observaron en las instalaciones cerradas como *P. vulgaris* (2%) y *A. sobria* (7%). En las muestras de ambos tipos de instalación no se observó el crecimiento de *C. tropicalis*.



**Figura 9.** Distribución del porcentaje de aislamiento de las 20 especies bacterianas y de levaduras en las muestras del área genital en cada tipo de instalación (abierta y cerrada). Genital 0= muestras del área genital de las instalaciones cerradas, Genital 1= muestras del área genital de las instalaciones abiertas. ((1) *S. aureus*, (2) *S. epidermidis*, (3) *S. xylosum*, (4) *S. hominis*, (5) *S. haemolyticus*, (6) *S. warneri*, (7) *Micrococcus* spp., (8) *M. luteans*, (9) *M. lylae*, (10) *E. coli*, (11) *P. vulgaris*, (12) *V. alginolyticus*, (13) *A. hydrophila*, (14) *A. sobria*, (15) *P. alcaligenes*, (16) *P. luteola*, (17) *P. aeruginosa*, (18) *S. putrefaciens*, (19) *P. damsela*, (20) *C. tropicalis*).

### 3.3 RESULTADOS DE LOS MUESTREOS COMPLEMENTARIOS

#### 3.3.1 Citologías

**Citologías del tracto respiratorio:** Se obtuvieron 101 citologías del tracto respiratorio, las cuales se examinaron de acuerdo a Sweeney *et al.*, 2003, el cual menciona que si al observar una citología del tracto respiratorio en un campo de 40x se llegará a encontrar más de cinco células inflamatorias, es considerado que el individuo puede estar cursando por un proceso inflamatorio local, bajo estos parámetros, se obtuvieron durante los cuatro muestreos 13 citologías las cuales fueron consideradas bajo un proceso inflamatorio local (Cuadro 9), de las cuales, en el cuadro 10 se puede observar su relación con los aislamientos bacterianos y de levaduras que se le realizaron al individuo, así como la presencia u ausencia de de parásitos y hongos miceliados. De estas 13 citologías, 10 de ellas pertenecían a delfines que se encontraban en instalaciones abiertas, también se puede observar que en 5 de 13 individuos la bacteria que se aisló con mayor frecuencia fue *Staphylococcus aureus*, y en 3 de 5 individuos

estuvo asociada con otras bacterias como: *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Kocuria varians* y *Proteus vulgaris*. Otros hallazgos observados en las citologías del tracto respiratorio fue la presencia en 30 ocasiones del parásito *Kyaroikeus cetarius*, el cual sólo se presentó en los delfines que se encuentran en instalaciones abiertas y en las instalaciones cerradas con agua de mar (Figura 6).

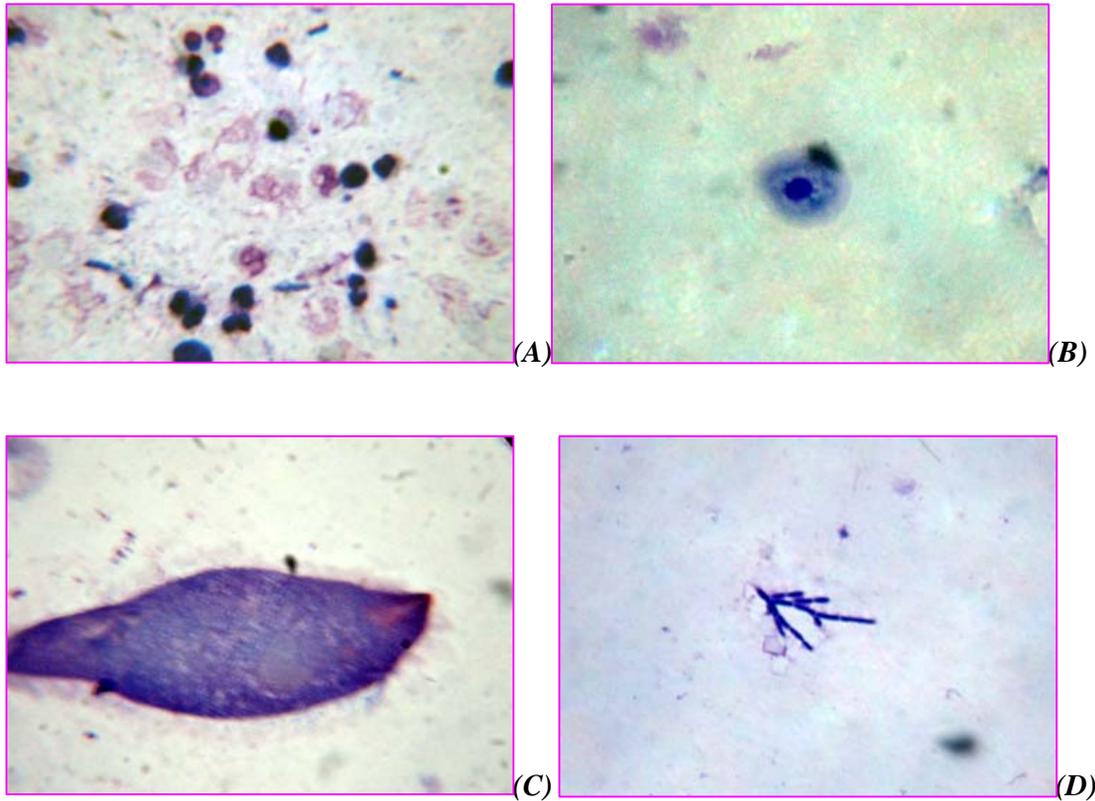
**Citologías del área genital:**

De la mucosa prepucial: Fueron evaluadas 38 citologías, de las cuales todas presentaban células de descamación y muy pocas tenían presencia de bacterias o de células inflamatorias (Cuadro 8).

De la mucosa vaginal: Fueron evaluadas 52 citologías, de las cuales ninguna presentó células de inflamación, y muy pocas presentaron bacterias (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Resultados de las citologías del tracto respiratorio, mucosa prepucial y vaginal durante los 4 muestreos, la presencia de células inflamatorias, bacterias, parásitos, levaduras y miceliados.

Muestras y número de muestreo	Citologías examinadas	Sin presencia de células inflamatorias	Presencia de 5 > células inflamatorias	Presencia de Bacterias	Presencia de Parásitos	Presencia de Levaduras	Presencia de Miceliados
Respiratorio							
1	27	26	1	8	5	4	0
2	23	16	7	21	9	13	1
3	23	20	3	13	8	4	1
4	28	26	2	10	7	3	1
Prepuciales							
1	10	9	-	1	-	-	-
2	9	8	-	4	-	1	-
3	9	8	-	-	-	-	-
4	10	9	-	5	1	-	-
Vaginales							
1	11	11	-	2	-	-	-
2	12	12	-	2	-	-	-
3	14	14	-	-	-	-	-
4	15	15	-	-	-	-	-



**Figura 10.** Tinción Diff Quick, 100x. **(A)** Tracto respiratorio. Células inflamatorias, detritus celular y bacterias. **(B)** Mucosa vaginal. Célula basal **(C)** Tracto respiratorio. *Kyaroiikeus cetarius*. **(D)** Tracto respiratorio. Pseudomicelio.

### 3.3.2 Hemogramas

Se realizaron 89 hemogramas durante los cuatro muestreos, los parámetros normales se basaron en el libro Handbook of marine mammals medicine (Bossart *et al.*, 2001). En 86 hemogramas no se observaron alteraciones de los parámetros normales, en 3 se encontraron alteraciones en el conteo celular, de los cuales coinciden con los individuos que presentaron un proceso de inflamación local en las citologías del tracto respiratorio (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Delfines que presentaron un proceso inflamatorio local en las citologías del tracto respiratorio, su relación con las bacterias y levaduras aisladas, presencia o ausencia de otros microorganismos y alteraciones en el hemograma.

INDIVIDUO MUESTREO 1	Aislamiento de: Bacterias y Levaduras	PRESENCIA DE:			Alteraciones en el hemograma
		Levaduras	Miceliados	Parásitos	
C 7	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i>				S/A
<b>MUESTREO 2</b>					
C 4	<i>Staphylococcus xylosum</i>	*			Leucocitosis y neutrofilia
A 16	<i>Staphylococcus aureus</i>	*		*	S/A
A 18	<i>Candida parapsilosis</i>	*			S/A
A 14	<i>Staphylococcus aureus</i>	*			S/A
A 8	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Kocuria varians</i>	*			Eosinofilia
A 5	<i>Staphylococcus aureus</i>	*			S/A
A 2	<i>Pseudomonas luteola</i> <i>Streptococcus mitis</i>	*		*	S/A
<b>MUESTREO 3</b>					
A 2	<i>Aeromonas sobria</i>	*			S/A
A 16	<i>Staphylococcus aureus</i>			*	S/A
A 18	<i>Staphylococcus aureus</i>		*		S/A
<b>MUESTREO 4</b>					
A 4	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Proteus vulgaris</i>				S/A
C 4	<i>Staphylococcus spp.</i>				Monocitosis y eosinofilia

S/A = Sin alteraciones.

\* = Presencia de.

### 3.3.3 Análisis del agua

La mayoría de las muestras obtenidas del agua de cada instalación no presentaron crecimiento microbiano (cuadro 10), algunos de los aislamientos mencionados coinciden con los realizados en los delfines de esas mismas instalaciones, como se puede ver en la instalación 1A, con *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas alcaligenes* y *Photobacterium damsela*, las cuales se aislaron en los delfines de esas instalaciones, y esas mismas especies también están dentro de las 20 especies que se aislaron más de 5 veces (cuadro 10).

**Cuadro 10.** Aislamientos realizados de las muestras de agua de las instalaciones que presentaron crecimiento de bacterias, durante los 4 muestreos.

<b>Instalaciones</b>	<b>2C</b>	<b>4C</b>	<b>5CM</b>	<b>1A</b>	<b>2A</b>	<b>3A</b>
<b>Microorganismos</b>						
<i>Pseudomonas putida</i>			*			
<i>Micrococcus</i> spp.			**			
<i>Aeromonas hydrophila</i>					**	
<i>Photobacterium damsela</i>				**		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>				**		**
<i>Escherichia coli</i>						*
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>				**		
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	*					
<i>Pseudomonas luteola</i>		**				

\* = Presencia del microorganismo en las muestras de agua de las instalaciones.

\*\* = Presencia del microorganismo en las instalaciones y en los delfines.

#### **IV. DISCUSIÓN**

En la literatura existe poca información sobre aspectos microbiológicos asociados con los delfines tonina (*T. truncatus*) y de otros cetáceos, dentro de la información existente se encuentra la relacionada a bacterias patógenas en cetáceos varados y en menor proporción de la microbiota normal asociada (Buck, 1980; Buck *et al.*, 2006). El conocimiento de la microbiota normal presente en delfines en cautiverio permitirá tener un mayor entendimiento del papel de las bacterias en los desórdenes reproductivos y respiratorios de delfines encallados, así como un manejo adecuado de éstos en cautiverio.

Los resultados estadísticos demostraron que existe una mayor diversidad de especies bacterianas y de levaduras en el tracto respiratorio y en el área genital de los delfines que se encuentran en instalaciones abiertas en comparación con los que se encuentran en instalaciones cerradas. Estos resultados sugieren que hay diferencia en el número de aislamientos de cada especie bacteriana y de levaduras en los distintos tipos de instalaciones.

De tal forma, encontramos que en las muestras de ambos tipos de instalaciones *Staphylococcus aureus* fue la bacteria que se aisló con mayor proporción en el tracto respiratorio durante los 4 periodos de muestreo, ocupando el segundo lugar en el área genital después de *S. epidermidis*. Con anterioridad nuestro grupo de investigación observó también que el género *Staphylococcus* predominaba en el tracto respiratorio y en el área genital de esta misma especie de delfines (Avalos *et al.*, 2005). A diferencia de nuestro trabajo, Buck (2006), aisló del tracto respiratorio de delfines en vida libre una mayor proporción de especies de *Vibrio*, en lugar de especies de *Staphylococcus*, nosotros lo atribuimos a lo observado por Murray (1976), el cual menciona que *Staphylococcus aureus* es común aislarlo en delfines en cautiverio en Florida, señalando que el aislamiento de esta bacteria se realizó en una proporción de 1:7 inmediatamente después de la captura y que esta proporción aumentaba 2:7 después de la 4ta y 6ta semana en cautiverio. Este aumento de proporciones no se atribuyó al contacto con los humanos, porque este mismo autor realizó un estudio de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de delfines en cautiverio y los del personal del acuario y mostraron diferencia genética entre ambas, sugiriendo que provenían de distintos orígenes (Murray *et al.*, 1976). En este trabajo, los delfines de los cuales se tomaron las muestras tienen más de un año en cautiverio, por lo que es posible que *Staphylococcus aureus* se haya aislado en mayor proporción a diferencia de los reportados en vida libre. Diversos autores han mencionado que *S. aureus* forma parte de la microbiota normal de estos individuos en vida libre (Murray *et al.*, 1976; Buck *et al.*, 2006; Back, 1984), sin embargo debe considerarse también que ha sido reportado en ballenas y delfines como agente causal de meningoencefalitis y bronconeumonía (Back, 1984). Por lo que se puede sugerir que *S. aureus* forma parte de la microbiota normal pero puede llegar a ser patógeno oportunista cuando el delfín está inmunodeprimido. Otras bacterias de este mismo género denominadas *Staphylococcus* coagulasa negativa (CNS) y las especies de *Micrococcus* spp., fueron aisladas en varias ocasiones en tracto respiratorio y en el área genital. Los estafilococos en general son los mayores componentes de la microbiota normal del ecosistema cutáneo, incluyendo piel y mucosas de animales y del humano; en el ecosistema cutáneo generalmente tienen una relación benigna con su hospedero y funcionan como comensales (Barrow y Felthman, 1995; Kloos y Bannerman, 1994). Están incluidos como patógenos primarios: *S. aureus* y *S. saprophyticus*; y como patógenos oportunistas *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* (Barrow y Felthman 1995; Von Eiff, 2002). El grupo *Staphylococcus* coagulasa negativa (CNS) ha cobrado una mayor importancia

en los últimos años, debido al crecimiento como patógenos oportunistas implicados en implantes quirúrgicos y terapias inmunosupresivas y como patógenos nosocomiales en infecciones sistémicas, en este sentido *S. lugdunensis* es más patógeno que otras especies de estafilococos (Von Eiff, 2002; Kloos y Bannerman, 1994). En el laboratorio clínico, uno de los problemas es el poder distinguir si son clínicamente significativos y diferenciar las cepas patógenas de las contaminantes. Otra consideración importante es que los CNS frecuentemente son fuente de intercambio de genes de resistencia antimicrobiana entre especies que incluyen *S. aureus* o *S. intermedius* (Sorum y Sunde, 2001). Los CNS y los *Micrococcus* spp. no han sido reportados como causantes de enfermedad en delfines *T. truncatus*, por lo que se puede sugerir que estos microorganismos son parte de la microbiota normal en tracto respiratorio y área genital de estos cetáceos, porque se hallaron con alta proporción en estas zonas anatómicas y son parte de la microbiota normal de piel y otras mucosas en otros mamíferos (Sorum y Sunde, 2001).

Otros cocos Gram positivos se aislaron con menor proporción del tracto respiratorio y el área genital, algunos de ellos forman parte del género *Streptococcus* spp., en el área genital se aisló a *Streptococcus mitis* y *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, y del tracto respiratorio a *Streptococcus mitis*, aunque no se obtuvo un gran número de estos aislamientos, se encontraron en ambos tipos de instalaciones, de lo cual se puede mencionar que *Streptococcus* spp. ha sido implicado como causante de una significativa mortalidad y morbilidad entre los mamíferos marinos, diversas especies han sido reportadas en el *T. truncatus*, como *S. zooepidemicus* y diversos  $\beta$ -hemolíticos, los aislamientos se han realizado a partir de abscesos en piel, bronconeumonía, pielonefritis, miocarditis, metritis, septicemia y osteomielitis (Evans *et al.*, 2006); Evans (2006), mencionó que aunque esto quizás no sea un problema en animales en vida libre se debe tener cuidado en poblaciones en cautiverio mantenidos en áreas confinadas, debido a que un animal infectado puede transmitir directamente la bacteria a otros mamíferos marinos o peces (Evans *et al.*, 2006), sin embargo se menciona que estas bacterias pueden ser consideradas como parte de la microflora normal en algunas especies de mamíferos marinos (Jonson S, *et al.* 2006; Evans *et al.*, 2006). Una de las especies de este género que se aisló con mayor proporción fue *Streptococcus dysgalactiae* el cual se encuentra en el epitelio y mucosas como comensales de muchos mamíferos y aves, así también es considerado patógeno oportunista en animales domésticos. La subespecie *equisimilis* causa enfermedad en una amplia variedad de especies animales incluyendo al

humano, en el delfín *T. truncatus* no hay ningún reporte de que ocasione algún proceso infeccioso, por lo que se podría considerar parte de la microbiota normal transitoria debido a que no se aisló en la mayoría de los delfines.

Por otra parte, a partir de las muestras del tracto respiratorio y área genital de los delfines en ambos tipos de instalaciones, se obtuvo un alto porcentaje de bacilos Gram negativos no enterobacterias. La importancia de este tipo de microorganismos en los mamíferos marinos ha sido descrita previamente (Kawashma *et al.*, 2004; Buck *et al.*, 2006), en el presente estudio éste fue uno de los grupos en los que se identificaron gran diversidad de especies, muchas de las cuales son ubicuas en ambientes acuáticos donde viven estos delfines por lo que se pueden considerar como contaminantes, sin embargo, en algunas condiciones se pueden adaptar a las condiciones del hospedero para formar parte de la microbiota normal de estos individuos, entre éstas se puede mencionar a los géneros: *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Oligella* spp. y *Pasteurella* spp. (Buck *et al.*, 2006), es importante señalar que las neumonías asociadas a infecciones bacterianas secundarias o primarias, se han reportado con relativa frecuencia en cetáceos en vida libre, especialmente en los de talla pequeña, y han ocasionado la muerte del animal cuando se encuentran asociadas a bacterias Gram negativas: *Edwardsiella* spp., *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. y *Pasteurella* spp. (Kawashma *et al.*, 2004). Estas últimas cuatro se aislaron en este trabajo en delfines clínicamente sanos por lo que se puede considerar que forman parte de la microbiota normal, pero pueden convertirse en patógenos oportunistas cuando el delfín se encuentra inmunodeprimido.

Buck (2006), identificó al género *Vibrio* spp., como el más frecuente en tracto respiratorio y heces de delfines en vida libre (Buck *et al.*, 2006), en este trabajo la especie *V. alginolyticus* fue una de las bacterias con mayor número de aislamientos tanto del área genital como del tracto respiratorio, esta relación la podemos atribuir a que los vibrios tienen como hábitat normal el agua salobre y dulce donde se encuentran en altas densidades, también se pueden hallar en organismos marinos y en ambientes como estuarios, costas, sedimentos y en la acuicultura (Thompson *et al.*, 2004), en los delfines *T. truncatus* se han descrito tanto en individuos sanos como enfermos, en Hawai se han aislado rutinariamente de heces, espiráculo y faringe a *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae* (sin antígeno O) y vibrios no clasificados (Schroeder *et al.*, 1985; Beck y Rice, 2003). En otras especies de delfines, los vibrios se han asociado a hepatitis necrótica, bronconeumonía focal aguda, y

dermatitis activa en aletas, tejido subcutáneo y la punta del rostro, *V. alginolyticus* causa estomatitis necrótica y *V. parahaemolyticus* se aisló de un pulmón, la posible vía de entrada por la cual los vibrios invaden el sistema vascular es a través de la mucosa intestinal, el pulmón y las heridas orales (Schroeder *et al.*, 1985; Tangredi y Medway, 1980). En este estudio, aunque en forma general no se observó diferencia estadística entre los aislamientos realizados entre los muestreos en cada época del año, se puede mencionar que los vibrios se presentaron en mayor proporción en la época de verano e invierno, lo cual coincide con lo descrito por Tangredi y Medway, los cuales mencionan que los vibrios halófilos se presentan durante el invierno en el sedimento y durante el verano cuando la temperatura del agua incrementa (Tangredi y Medway, 1980), este evento se ha observado que coincide con otros estudios en las fechas de varamiento de delfines (Tangredi y Medway, 1980) y en enfermedades diarreicas en los humanos por la relación del consumo de comida proveniente del mar, por lo general en individuos inmunodeprimidos y con altos niveles de hierro en el suero, en los humanos inmunodeprimidos también se ha reportado a *V. vulnificus* como un agente etiológico importante en las infecciones por herida y septicemia (Oliver *et al.*, 1982; Thompson *et al.*, 2004), otra de las especies mayormente aisladas en este trabajo *V. alginolyticus*, ha sido reportado esporádicamente en infecciones humanas (Kawashma *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2004). Esto implica que sólo una minoría de cepas de vibrios son patógenas y algunas se pueden considerar como patógenos oportunistas para los humanos y animales (Thompson *et al.*, 2004).

En este trabajo, en el área genital se aisló un porcentaje bajo de *V. cholerae* (2%), el cual es el agente causal del cólera en humanos, una enfermedad severa que ocurre principalmente en países en vías de desarrollo como resultado del deficiente saneamiento en el suministro del agua (Thompson *et al.*, 2004; Oliver *et al.*, 1982, Schmidt *et al.*, 1979), esto coincide con el estudio de Faruque, quien realizó desafíos con esta bacteria en humanos, y concluyó que la concentración de *V. cholerae* toxigénico usualmente detectado en las superficies del agua es mucho menor que la requerida para inducir infección y causar una enfermedad clínica en humanos (Faruque *et al.*, 2006), por lo que se puede sugerir que a pesar de haber sido identificada en este trabajo, no es un factor de riesgo para los humanos, ya que es una bacteria que se encuentra normalmente en el medio acuático. Algunos investigadores señalan que las personas que mantienen un contacto estrecho con mamíferos marinos deben estar concientes del riesgo del potencial zoonótico de estos microorganismos (Schroeder *et al.*, 1985; Tangredi y Medway, 1980).

Otro microorganismo aislado en este trabajo y el cual se había clasificado como un nuevo patógeno de las especies del género *Vibrio*, asociado a úlceras en distintos peces, fue reclasificado como *Photobacterium damsela*, el cual es habitante de estuarios y del mar, la patogenicidad de esta especie ha sido reconocida en una gran variedad de peces, siendo uno de los principales problemas en la acuicultura, de igual forma se ha reportado en infecciones de heridas y enfermedades fatales en humanos, en una gran variedad de mamíferos marinos y en tiburones, lo cual se ha registrado exponencialmente en los últimos tiempos, se considera que un gran número de peces son portadores asintomáticos, aunque también puede ser aislado normalmente de crustáceos (Botella *et al.*, 2002; Vaseeharan *et al.*, 2007), por lo que su presencia en este trabajo se puede inferir a que es un microorganismo ubicuo del ambiente marino, el cual puede entrar en contacto con los peces que se dan de alimento a los delfines o que están dentro del entorno natural de las instalaciones abiertas, ya que en estas últimas fue donde se encontró en mayor número, al igual se encontró en los aislamientos que se realizaron en el agua de estas instalaciones, es importante señalar que en el delfín *T. truncatus* no ha sido reportado como causante de enfermedad en el tracto respiratorio y en el área genital que fue donde se aisló en mayor número.

Otro género que se aisló ampliamente fue *Pseudomonas* spp., el cual es un extenso grupo de microorganismos que incluye patógenos para animales y plantas (Gyles *et al.*, 2004), de los cuales en este trabajo se encontró una mayor diversidad de especies y un mayor número de aislamientos en las instalaciones abiertas, esto lo atribuimos al estrecho contacto con un ambiente natural donde hay plantas y tierra, el cual es el hábitat normal de este microorganismo, a diferencia de las instalaciones cerradas donde no existe dicho entorno y puede ser un factor importante la cloración del agua, aunque de igual forma hubo aislamientos de algunas especies de este género, quizás porque cuando el delfín nace adquiere parte de la microbiota normal de su madre y del ambiente donde vive, con lo cual pudo haber estado en contacto con este microorganismo, también se encontró en los aislamientos que se realizaron en el agua de estas instalaciones. La especie que se aisló mayormente en tracto respiratorio y área genital en ambos tipos de instalaciones fue *P. aeruginosa*, el cual es un microorganismo ubicuo en la mayoría de los ambientes naturales incluyendo el agua, plantas, tierra y aguas residuales, es un patógeno oportunista y generalmente requiere de una alteración en las defensas inmunológicas del hospedero para establecer infección, se ha visto que ocasiona neumonía, bacteremia e infecciones en el tracto urinario y heridas quirúrgicas en humanos y

otros animales, otitis en perros y dermatitis en borregos (Gyles *et al.*, 2004). En diversos mamíferos marinos *Pseudomonas aeruginosa* es conocida como un patógeno oportunista y aparentemente es común encontrarlo (Back, 1984).

Otra especie similar en un 70 % a *Pseudomonas* y que se aisló mayormente en el tracto respiratorio de los delfines en las instalaciones abiertas fue *Shewanella putrefaciens*, es una bacteria bacilo Gram negativa, de distribución mundial, particularmente en ambientes marinos, recientemente se le ha asociado a infecciones en humanos, los signos clínicos y la epidemiología son similares a las infecciones por *Aeromonas* spp. y vibrios halófilos (Holt *et al.*, 2005), en el delfín *T. truncatus* no se ha asociado como causante de enfermedad, y en las muestras del tracto respiratorio de los delfines en las instalaciones cerradas no se obtuvo aislamiento, sin embargo si se obtuvieron 2 aislamientos del área genital, por lo que se puede sugerir que forma parte de la microbiota normal transitoria del tracto respiratorio de los delfines en instalaciones abiertas o como contaminante debido al protocolo de muestreo utilizado en este trabajo.

De igual forma, otro microorganismo ubicuo del ambiente es *Aeromonas* spp., el cual comprende un grupo de microorganismos con una amplia distribución en el ambiente acuático (Hatha *et al.*, 2005), en diversos estudios han cobrado mayor interés las especies móviles, debido a que se han reportado como patógenos de varios animales y en los humanos (Hatha *et al.*, 2005). En el intestino de los peces se alberga una gran cantidad de estos microorganismos, siendo el principal *A. hydrophila*, seguido de *A. caviae* y *A. sobria*. De estas 3 especies *A. hydrophila* fue la que se encontró con mayor número de aislamientos en ambos tipos de instalación tanto en el tracto respiratorio como en el área genital, este microorganismo ha sido implicado en etiologías de una gran variedad de enfermedades en los peces (Loghothetis y Austin, 1996; Hatha *et al.*, 2005). En el delfín *T. truncatus* existe un reporte donde se le asoció a dermatitis ulcerativa, neumonía y septicemia (Cusick y Bullock, 1973), su presencia en los delfines de este trabajo puede estar influenciada a que los peces son parte principal de su alimentación y al medio acuático en el que viven, ya que también se realizó el aislamiento en el agua de algunas instalaciones.

Un hallazgo importante de las especies que se aislaron con menor proporción pero que comparten ambos tipos de instalaciones, en tracto respiratorio y área genital se pueden mencionar a *Acinetobacter calcoaceticus*, *Burkholderia cepacia*, *Plesiomonas shigelloides*, los cuales no han sido documentados con anterioridad en delfines *T. truncatus*.

Las especies de *Acinetobacter* son bacilos aerobios Gram negativos, que pueden causar infección y pueden sobrevivir por periodos prolongados en el ambiente y en las manos del humano, su capacidad de infectar individuos sanos y su propensión de desarrollar resistencia antimicrobiana ha causado la preocupación entre la comunidad de las enfermedades infecciosas (Sunenshine *et al.*, 2007).

Por otra parte, el complejo de *Burkholderia cepacia* pertenece a un grupo que comprende 9 especies, las cuales son Gram negativas, rutinariamente aisladas del ambiente, no forman parte de la microflora normal en humanos, ni animales (Baldwin *et al.*, 2007), por lo que se pueden considerar como contaminante del medio ambiente debido al protocolo de muestreo. A su vez *Plesiomonas shigelloides* se aisló con bajo porcentaje en la mucosa vaginal y en tracto respiratorio en los dos tipos de instalación, esta bacteria es ubicua y pertenece al grupo de las enterobacterias, es encontrada en agua fresca o agua de mar, particularmente en clima calido a tropical, recientemente ha sido implicada en enfermedades diarreicas en humanos, debido al consumo de alimento mal cocido, en enfermedad extraintestinal se presenta sólo en individuos inmunodeprimidos y existe un reporte en la cual se aisló del área genital ocasionando salpingitis, ha sido aislada de otros individuos como peces, anfibios y mariscos; en delfines no ha sido reportada en ninguna implicación de enfermedad (Roth, 2002), por lo que se podría considerar parte de la microbiota normal transitoria en tracto respiratorio y de la mucosa vaginal en instalaciones cerradas y abiertas.

Otro de los grupos que se aislaron en este trabajo son los pertenecientes a la familia de las enterobacterias, las cuales al compararla con los demás grupos tuvo una baja presencia, sin embargo hubo 2 especies que se encontraron dentro de las 20 especies aisladas más de 5 veces, entre ellas están *Escherichia coli* y *Proteus vulgaris*, estas 2 se han mencionado con anterioridad asociadas a bronconeumonías por múltiples agentes en el delfín *T. truncatus* (Medway y Schryver, 1973), de lo cual se puede mencionar también que el género *Proteus* spp. está ampliamente distribuido en el ambiente y es parte de la microflora normal del tracto gastrointestinal en humanos, otra de las especies de este género que se aisló en este trabajo y que también está implicado en lesiones en el hígado y pulmón de un delfín *T. truncatus* es *Proteus mirabilis* (Parson y Jefferson, 2000), sin embargo estas especies aisladas en la mucosa vaginal y prepucial no son considerados potencialmente patógenos.

Por su parte, *Escherichia coli* se ha asociado también a procesos de neumonía en estos delfines y otros mamíferos marinos (Medway y Schryver, 1973; De Guise *et al.*, 1995), sin embargo la presencia de estas enterobacterias se puede atribuir a que estas bacterias pueden ser parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de estos delfines y debido a que son evacuadas hacia el agua, vía heces de los mismos delfines, este puede ser un medio por el cual entren en contacto con el tracto respiratorio y el área genital, sin embargo se han aislado de delfines clínicamente sanos por lo que se podría sugerir que forman parte de la microbiota normal, en algunos como transitoria y en otros quizás como permanente, para lo cual se necesitarían más estudios al respecto, estas enterobacterias se observaron con una mayor proporción en las instalaciones abiertas en comparación con las cerradas, esto lo atribuimos a la cloración del agua en estas últimas instalaciones.

En lo que respecta al aislamiento de levaduras, se puede mencionar que sólo se aisló una levadura de la mucosa vaginal, lo cual lo podemos atribuir a contaminación de la muestra debido al protocolo de muestreo, ya fuera con la piel del delfín o con el agua donde habitan, y debido a la baja presencia en esta área, no se puede sugerir que formen parte de la microbiota normal de la mucosa vaginal, sin embargo se sugiere hacer más estudios al respecto ya que este tipo de levaduras suelen encontrarse como parte de la microbiota normal de la mucosa vaginal en el humano (Fidel y Sobel, 1996).

Con respecto a las muestras del tracto respiratorio se obtuvieron 5 especies de levaduras, algunas de ellas no reportadas con anterioridad en estos mamíferos marinos. De las especies que se aislaron con mayor proporción fue *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis*, y con menos proporción a *Candida albicans*, *Candida norvegensis* y *Cryptococcus laurentii*. Esto coincide con los resultados del trabajo de Buck (2006), donde *C. tropicalis* se aisló con mayor porcentaje en tracto respiratorio y en las muestras anales; cabe señalar que en varios mamíferos marinos incluyendo al *T. truncatus*, diversas especies de *Candida* han sido implicadas en trastornos de piel, del tracto respiratorio y digestivo, ocasionando una micosis sistémica y la muerte (Buck, 1980; Dun y Back, 1982).

La presencia de estas levaduras en las muestras del tracto respiratorio en este trabajo, se explica debido a que algunas de estas son comensales del tracto intestinal de estos mamíferos marinos (Buck, 1980; Back, 1984), y son excretadas al agua donde los delfines habitan, y pueden entrar en contacto con el tracto respiratorio, tanto en los delfines en instalaciones abiertas como en las instalaciones cerradas, debido a que los métodos de

tratamiento fallan en erradicar las levaduras en los sistemas de recirculación del agua y además *C. albicans* no es particularmente sensible a los bajos niveles de cloración, ni combinando UV con cloro (Dun y Buck, 1982), esto ha propuesto también, que las infecciones de *Candida* puede ser transmitida de un cetáceo a otro por el agua como vía de transmisión, aunque la densidad de estas levaduras sea baja (menos de 60 cel/L) (Dun y Buck, 1982). La especie que se ha reportado frecuentemente como patógeno oportunista en estos animales ha sido *C. albicans*, la cual puede o no aparece en pequeñas cantidades en el tracto gastrointestinal de cetáceos en cautiverio clínicamente sanos (Buck, 1980; Dun y Buck, 1982), por lo que algunos autores mencionan que las bajas densidades de esta levadura en el agua, sugieren que el microorganismo puede ser un patógeno oportunista en cetáceos, enfatizando la importancia de erradicarlo de la fuente, lo que es el tracto digestivo (Dun y Buck, 1982). Es también importante indicar que los delfines de algunos parques incluidos en este estudio comparten instalaciones con algunos pinnípedos, los cuales pueden ser portadores y responsables de introducir *C. albicans* en el agua (Buck, 1980). La presencia de diversas especies de levaduras en este trabajo, han sido reportadas previamente en tierra y agua de mar, son comunes en el humano, en mamíferos terrestres y marinos (Buck, 1980; Back, 1984), algunas de ellas pueden ser parte de la microbiota normal en estos delfines y pueden llegar a ser patógenos oportunistas cuando el individuo se encuentra inmunodeprimido.

Las infecciones bacterianas han sido relacionadas directamente con la muerte de diversos mamíferos marinos (Parsons y Jefferson 2000), las cuales pueden ser secundarias a infecciones virales, parasitarias o a traumas. Poco se conoce sobre la microbiota normal en la mucosa vaginal y del prepucio de estos delfines, así como también de la presencia de infecciones y enfermedades de transmisión sexual. En otros mamíferos, los agentes bacterianos y virales son la causa más común de endometritis, reabsorción fetal, abortos y mortalidad en crías (Howard *et al.*, 1993), sin embargo en mamíferos marinos la información es escasa con respecto al tema y no hay asociación entre bacterias o agentes virales en desordenes reproductivos en el *T. truncatus*, existe un reporte en cautiverio donde menciona a *Brucella* spp., la cual ocasionó aborto (Higgings, 2000), y otro donde se observaron cálculos de estruvita en la vagina los cuales pueden ser atribuidos a infecciones bacterianas, remanentes fetales y fluido seminal coagulado (McFee y Osborne 2004). La microbiota normal en la mucosa vaginal es considerada en otros mamíferos, porque pueden convertirse en patógenos oportunistas durante la preñez, debido a que durante esta etapa la microbiota vaginal puede

ascender dentro del útero resultando en una placentitis, septicemia fetal, neumonía fetal o ser la causa de muerte neonatal (Howard *et al.*, 1993).

El ambiente marino contiene una gran cantidad de bacterias, la mayoría de las cuales son ubicuas e inocuas. La gran diversidad de microorganismos aislados en este trabajo sugiere que los mamíferos marinos albergan microbiota normal que bajo ciertas condiciones ocasionan problemas de salud al hospedero, un ambiente en calidad deficiente puede permitir o desencadenar la fisiología del estrés incluyendo la inmunodepresión, por lo cual habrá un incremento en la susceptibilidad hacia bacterias del ambiente que en otra circunstancia son inocuas. En cetáceos en cautiverio, se debe tener precaución cuando se utilizan indiscriminadamente antimicrobianos de amplio espectro, debido a que podrían ocurrir severas alteraciones en la homeostasis, por que se elimina gran parte de la microbiota normal que sirve como protección de las mucosas, permitiendo la colonización de microorganismos oportunistas que invaden el epitelio y provocan una variedad de infecciones clínicas que pueden culminar en la muerte del individuo (Ruiz *et al.*, 2002; Frasca *et al.*, 1996).

El ambiente en las instalaciones cerradas se caracteriza por realizar tratamientos antimicrobianos al agua, como la cloración, lo cual puede proveer las condiciones apropiadas para microorganismos resistentes, incluyendo levaduras, que pueden convertirse en patógenos oportunistas en animales susceptibles o establecerse en otros como portadores sanos (Buck, 1980). Adicionalmente, se debe tener en cuenta que los cetáceos en vida libre también son potencialmente vulnerables a la resistencia antimicrobiana y a una amplia gama de patógenos del ser humano y del ganado, anteriormente se ha detectado resistencia antimicrobiana en mamíferos marinos en vida libre, lo cual sugiere que esta resistencia podría atribuirse al contacto directo con el afluente de las aguas residuales (Thompson, 2007). En vida libre, las infecciones dejan a los animales débiles y reducen su habilidad para evitar las redes de pescas (Parsons y Jefferson, 2000). Diversos agentes que se han visto que poseen un potencial de enfermedad para animales terrestres y humanos han sido aislados de mamíferos marinos: *B. mallei*, *Salmonella* spp., *Neisseria mucosa*, *Clostridium chauvoei* y *Leptospira interrogans* (Smith, 1978), ninguna de estas especies se aisló en el presente trabajo.

Las bacterias y levaduras identificadas en los delfines de este trabajo son comparables con la microbiota normal de tracto respiratorio, vagina y prepucio de otros mamíferos

terrestres (Baba *et al.*, 1983; Howard *et al.*, 1993) y marinos, (Johnson *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2004) de igual forma son similares a las bacterias aisladas en un estudio realizado a partir de 245 muestras del tracto respiratorio de delfines *T. truncatus* en vida libre (Buck *et al.*, 2006). El crecimiento bacteriano y de levaduras en este trabajo ocurrió sin la presencia de un proceso inflamatorio (87%), esto se observó con la realización de las citologías y de los hemogramas, los cuales sirvieron para confirmar que los delfines estaban clínicamente sanos, en 16 citologías del tracto respiratorio mostraron resultados que podían asociarse a un proceso inflamatorio local y 3 de estos delfines presentaron alteraciones en el hemograma, en dos de ellos no asociados a infección bacteriana, ya que mostraron eosinofilia, la cual está relacionada con la presencia de parásitos, esto sugiere que la mayoría de los microorganismos aislados en este trabajo son parte de la microbiota normal transitoria o permanente de delfines *Tursiops truncatus* en cautiverio. Es importante señalar que hubo un mayor número de individuos de las instalaciones abiertas con un posible proceso de inflamación local en las citologías del tracto respiratorio, esta situación se observó acentuada después de la época de lluvia, lo cual se asocia a un posible mayor flujo de agua en esta época que ocasiona un intercambio de microorganismos del mar a las instalaciones. Otro de los hallazgos que se pudieron observar en las citologías del tracto respiratorio entre los delfines de ambos tipos de instalación es que el parásito *Kyaroikeus cetarius* se presentó sólo en los delfines de las instalaciones abiertas y en la instalación cerrada con agua de mar.

Es importante señalar que este trabajo es el primero en su tipo que se realiza en México y de los primeros en el mundo, por lo que la información obtenida es de gran valor tanto a nivel de información básica del delfín *T. truncatus*, como de información en el área clínica. Hasta el momento no existen reportes publicados acerca de la microbiota normal en el área genital y el prepucio en estos delfines.

## V. CONCLUSIONES

1. Existe una mayor cantidad y diversidad de especies bacterianas y de levaduras tanto en el tracto respiratorio como en el área genital de los delfines que se encuentran en instalaciones abiertas en comparación con los que se encuentran en instalaciones cerradas.
2. Se observó diferencia en tipo y número de aislamientos de cada uno de los 8 parques marinos.
3. No se observó diferencia en tipo y número de aislamientos entre los muestreos en los diferentes tipos de instalación.
4. En las muestras de ambos tipos de instalaciones, *Staphylococcus aureus* fue la bacteria que se aisló con mayor proporción en el tracto respiratorio durante los 4 periodos de muestreo, ocupando el segundo lugar en el área genital después de *Staphylococcus epidermidis*.
5. En forma general el género que se aisló con mayor presencia fue *Staphylococcus*, el grupo con mayor diversidad de especies fueron los bacilos gram (-) no fermentadores y el grupo de las enterobacterias presentó un menor aislamiento con respecto a los otros grupos.
6. El crecimiento bacteriano y de levaduras ocurrió sin la presencia de un proceso inflamatorio (87%), lo que indica que los delfines estaban clínicamente sanos, esto sugiere que los microorganismos aislados en este trabajo son parte de la microbiota normal permanente o transitoria de delfines *Tursiops truncatus* en cautiverio.
7. La microbiota normal permanente que es similar entre los individuos de la misma especie en ambos tipos de instalación en el tracto respiratorio fue: *S. aureus* (23%), *V. alginolyticus* (8%) y *Micrococcus* spp. (6%), teniendo estas dos últimas una mayor presencia durante el año en las instalaciones abiertas, se puede observar también el aislamiento en ambas instalaciones de *E. coli* (5%), *P. vulgaris* (5%), *P. aeruginosa* (4%), *A. hydrophila* (3%) y diversas especies del género *Staphylococcus* coagulasa negativas, entre otras.
8. En el área genital las especies bacterianas que compartieron los dos tipos de instalaciones fueron: *S. epidermidis* (14%), *S. aureus* (10%), *Micrococcus* spp. (8%), *E. coli* (5%) y *V. alginolyticus* (5%).

## VI. REFERENCIAS

1. Allen FJ, Ridway HS, G. GW. Vaccination of porpoise (*Tursiops truncatus*) against *Erysipelothrix rhusopathiae* infection. J Wildl Dis 1971; 7: 292-295.
2. Aubin D, Dierauf AL. Stress in marine mammals. In: Dierauf AL, Gulland FMD, editors. Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease, and Rehabilitation. USA: CRC Press, 2001.
3. Avalos RT. Bacterias asociadas al aparato respiratorio y al área genital del delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) en cautiverio. (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.
4. Baba E, Hata H, Fukata T, Arakawa A. Vaginal and uterine microflora of adults dogs. Am J Vet Res 1983; 44 (4): 606-609.
5. Back JD. Microbiology observations on two stranded live whales. J Wildl Dis 1984; 20(2): 149-150.
6. Baldwin A, Mahenthiralingam E, Drevinek P, Vandamme P, Govan JR, Waine DJ, LiPuma JJ, Chiarini L, Dalmastrì C, Henry DA, Speert DP, Honeybourne D, Maiden MCJ, Dowson CJ. Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infections. Emerg Infect Dis 2007; 13 (3).
7. Barrow GI, Felthman RKA. Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria. 3ed. Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press, 1995.
8. Beck BM, Rice CD. Serum antibody levels against select bacterial pathogens in Atlantic bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, from Beaufort NC USA and Charleston harbour, Charleston, SC, USA. Mar Environ Res 2003; 55: 161-179.
9. Bossart GD, Reidarson TH, Dierauf LA, Duffield DA. Pathology of marine mammals. In: Dierauf AL, Gulland FMD, editors. Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease, and Rehabilitation. USA: CRC Press, 2001.
10. Botella S, Pujalte MJ, Macia MC, Ferru's MA, Hernández J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) and biochemical typing of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. J Appl Microbiol 2002; 93: 681-688.
11. Bourg G, O'Callaghan D, Boschirolì ML. The genomic structure of *Brucella* strains isolated from marine mammals gives clues to evolutionary history within the genus. Veterinary Microbiology (En prensa).
12. Buck JD. Occurrence of human-associated yeast in the feces and pool waters of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). J Wildl Dis 1980; 16: 141-149.

13. Buck JD, Wells RS, Rhinehart HL, Hansen LJ. Aerobic microorganisms associated with free ranging bottlenose dolphin in costal gulf of Mexico and Atlantic ocean waters. *J Wildl Dis* 2006; 42 (3): 536-544.
14. Carwardine M, Hoyt E, Fordyce ER, Gill P. Ballenas, delfines y marsopas. Barcelona: Omega, 1999.
15. Casadevall A, Pirofski L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *JID* 2001; 184: 337-344.
16. Cusik PK, Bullock BC. Ulcerative dermatitis and pneumonia associated with *Aeromonas hydrophyla* infection in the bottle-nosed dolphin. *J Am Vet Med Assoc* 1973; 163: 578-579.
17. Dailey MD. Parasitic diseases. In: Dierauf AL, Gulland FMD, editors. *Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease, and Rehabilitation*. USA: CRC Press, 2001.
18. De Guise S, Lagacé A, Béland P, Girard C, Higgins R. Non-neoplastic lesions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) and other marine mammals from the St Lawrence Estuary. *J Comp Pathol* 1995; 112(3): 257-71.
19. Domingo M, Visa J, Pumarola M, Marco AJ, Ferrer L, Rabanal R, Kennedy S. Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Vet Pathol*. 1992; 29(1): 1-10.
20. Dun JL, Buck JD, Spotte S. Candidiasis in captive cetaceans. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 181(11): 1316-21.
21. Dunn, L. J., Buck, J. D. Robeck, T. R. (2001). Bacterial diseases of cetaceans and pinnipeds. In *Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease, and Rehabilitation*. Edited by Dierauf, L. A., Gulland, F. M. D. USA: CRC Press.
22. Evans JJ, Pasnik DJ, Klesius PH, Al-Ablani S. First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Wildl Dis* 2006; 42 (3): 561-569.
23. Faruque SM, Biswas K, Udden SMN, Ahmad QS, Sack DA, Fair GB, Mekalanos JJ. Transmissibility of cholera: In vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103 (16): 6350-6355.
24. Fernández AY. Delfín nariz de Botella, (*Tursiops truncatus*) (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 1991.
25. Fidel PL, Sobel JD. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9 (3): 335-348.
26. Frasca S, Lawrence Dunn J, Cooke JC, Buck JD. Micotic dermatitis in Atlantic white side dolphin, a pygmy sperm whale, and two harbor seals. *JAVMA* 1996; 208 (5): 727-729.

27. Folkens AP, Reeves RR, Stewart BS, Clapham PJ, Powell JA. Guide to marine mammals of the World. New York: Nacional Audubon Society, 2002.
28. Foster G, Mcmillan AP, Godfroid J, Howie F, Ross HM. A review of *Brucella* sp. Infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Vet Microb* 2002; 90: 563-580.
29. Fowler ME. Cetacea (Whales, dolphins and porpoise) *Zoo and Wild Animal Medicine*. 5th ed. Philadelphia: Saunders, 1993.
30. Gódínez RCR. Anatomía reproductiva, ciclo estral, gestación, lactancia y algunas estrategias reproductivas usadas en delfines nariz de botella (*Tursiops truncatus*) en cautiverio, así como bases para el establecimiento de un programa reproductivo en México (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 1992.
31. Gorostieta GCE. Manual del delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*), cautiverio y delfinoterapia (tesis de licenciatura). México (Toluca): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México, 2003.
32. Gudmundsdóttir S, Gudmundsdóttir B. Induction of inflammatory cytokines by extracellular products and LPS of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* spp. *achromogenes* in mice and mouse cell cultures. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 71-83.
33. Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3era ed, Iowa, USA: Blackwell publishing. 2004.
34. Hatha M, Vivekanandhan AA, Chistol GJJ Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. *Int J Food Microbiol* 2005; 98: 131-134.
35. Hernández CR, Martínez CHL, Díaz AA, Romero OA, Godínez RC, Zavala GA, Verdugo RA. Aerobic bacterial flora of the nasal cavity in Gulf of California sea lion (*Zalophus californianus*). *Vet J* 2004; 170(3): 359-63.
36. Herzenberg MC. Persistence of infective endocarditis. In: Nataro JP, Blaser MJ, Cunningham RS editors. Persistent bacterial infections. Washington, D.C. 2000.
37. Holtl HM, Gahrn-Hansenl B, Bruun B. *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological characteristics. *Clin Microbiol Infect* 2005;11(5): 347-52.
38. Higgins R. Bacteria and fungi of marine mammals: A review. *Can Vet J* 2000; 41: 105-116.
39. Howard J, Munson L, McAloose D, Kriete M, Bush M, Wildt DE. Comparative evaluation of seminal, vagina, and rectal bacterial flora in the cheetah and domestic cat. *Zoo Biol* 1993; 12:81-96.
40. Hornef MW, Wick M, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nature immunology* 2002; 3: 1033-1035.

41. Ingraham JL, Ingraham CA. Introduction to microbiology. 2<sup>nd</sup> ed. Ed. Brooks/Cole, 2000.
42. Johnson S, Lowenstine L, Gulland F, Jang S, Imai D, Almy F, DeLong R, Gardner I. Aerobic bacterial flora of the vagina and prepuce of California sea lions (*Zalophus californianus*) and investigation of associations with urogenital carcinoma. *Vet Microbiol* 2006; 114: 94-103.
43. Kawashima M, Kuwamura M, Takeya M, Yamate. Morphologic characteristics of pulmonary macrophages in cetaceans; particular reference to pulmonary intravascular macrophages as a newly identify type. *J Vet Pathol* 2004; 41:682-686.
44. Kelly D, Conway S. Bacterial modulation of mucosal innate immunity. *Molec Immunol* 2005; 42: 895-901.
45. Kennedy S. Viral diseases. Health, Disease, and Rehabilitation. In: Dierauf AL, Gulland FMD, editors. *Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease, and Rehabilitation*. USA: CRC Press, 2001.
46. Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase negative *Staphylococcus* *Clin Microbiol Rev* 1994; 7 (1): 117-140.
47. Levinson W, Jawetz E. *Medical Microbiology and Immunology*. 6<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill, 2000.
48. Loghothetis PN, Austin B. Variations in antigenicity of *Aeromonas hydrophila* strains in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum: an association with surface characteristics. *Fish Shellfish Immunol* 1996; 6:47-55.
49. McFee WE, Osborne CA. Struvite calculis in the vagina of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Wildl Dis* 2004; 40 (1): 125-128.
50. Medway W, Schryver HF. Respiratory problems in captive small cetaceans. *J Am Vet Med Assoc* 1973; 163: 571-573.
51. Medway W. Some bacterial and mycotic diseases of marine mammals. *J Am Vet Med Assoc* 1980; 177: 831-834.
52. Murray M, Streitfeld, Chapman CG. *Staphylococcus aureus* infection of captive dolphins (*Tursiops truncatus*) and oceanarium personnel. *AM J Vet Res* 1976; 37(3): 303-305.
53. Oliver JD, Warner RA, Cleland DR. Distribution and ecology of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting marine vibrios in coastal waters of the Southeastern United States. *Appl Environ Microbiol* 1982: 1404-1414.
54. Parsons ECM, Jefferson TA. Post mortem investigations on stranded dolphins and porpoises from Hong Kong waters. *J Wildl Dis* 2000; 36 (2): 342-356.
55. Portnoy DA. Manipulation of innate immunity by bacterial pathogens. *Current opinion in immunology* 2005, 17:25-28.

56. Reiderson TH, Harell JH, Rinaldi MG, McBain J. Bronchoscopic and serologic diagnosis of *Aspergillus fumigatus* pulmonary infection in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). J Zoo Wildl Med 1998; 29 (4): 451-5.
57. Reiderson TH, McBain JF, Dalton LM, Rinaldi MG. Mycotic diseases. In: Dierauf AL, Gulland FMD, editors. Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease, and Rehabilitation. USA: CRC Press, 2001.
58. Robeck TR, Atkinson SKC, Brook F. Reproduction. In: Dierauf AL, Gulland FMD, editors. Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease, and Rehabilitation. USA: CRC Press, 2001.
59. Roth T, Hentsch C, Erard P, Tschantz P. Pyosalpinx: not always a sexual transmitted disease? Pyosalpinx caused by *Plesiomonas shigelloides* in an immunocompetent host. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 803-805.
60. Ruiz SD, Romero CL, Sánchez VJT, Tay J. Intestinal candidiasis. A clinical report and comments about this opportunistic pathology. Mycopathologia 2002; 156: 9-11.
61. Schmidt U, Chmel H, Cobbs C. *Vibrio alginolyticus* infections in humans. J Clin Microbiol 1979; 10 (5): 666-668.
62. Schroeder JP, Wallace JG, Cates MB, Greco SB, Moore WB. An infection by *Vibrio alginolyticus* in an Atlantic bottlenose dolphin housed in an open ocean pen. J Wildl Dis 1985; 21 (4): 437-438.
63. Sentiel A, Lowenstine LJ. Gross and microscopic anatomy. In: Dierauf AL, Gulland FMD, editors. Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease, and Rehabilitation. USA: CRC Press, 2001.
64. Smith AW, Vedros NA, Akers TG, Gilmartin WG. Hazard of diseases transfers from marine mammals to land mammals. Review and recent findings. JAVMA 1978; 173 (9).
65. Sorum H, Sunde M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. Vet Res 2001; 32: 227-241
66. Steiner M, Hentschel U, Hacker J. Symbiosis and pathogenesis: Evolution of the microbe-host interaction. Naturwissenschaften 2000; 87: 1-11.
67. Sunenshine RH, Wright MO, Maragakis LL, Harris AD, Song X, Hebden J, Cosgrove SE, Anderson A, Carnell J, Jernigan DB, Kleinbaum DG, Perl TM, Standiford HC, Srinivasan A. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infection mortality rate and length of hospitalization. Emerg Infect Dis 2007; 13 (1): 97-103.
68. Sweeney JC, Ridway SH. Common diseases of small cetaceans. JAVMA 1975; 167:533-539.
69. Sweeney JC, Reddy ML, Lipscomb TP, Bjorneby JM, Ridway SH. Handbook of cetacean cytology. 3ra ed. USA: Dolphin Quest, 2003.

70. Tangredi BP, Medway W. Post-mortem isolation of *Vibrio alginolyticus* from an atlantic white-sided dolphin (*Lagenorhynchus acutus*). J Wildl Dis 1980; 16 (3)
71. Thompson PM. Developing water quality standards for coastal dolphins. Mar Pollut Bull 2007; 54: 123–127.
72. Thompson FL, Lida T, Swings J. Biodiversity of Vibrios. Microbiol Mol Biol Rev 2004; 68 (3): 403–431.
73. Tlaskalova HH, Stepankova R, Hudcovic T, Tuckova L, Cukrowska B, Lodinova-Zadnikova R, et al. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. Immunology Letters 2004; 93: 97-108.
74. Trujillo HM. Determinación de la microflora normal de ojo en equinos del hipódromo de las americas (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 1992.
75. Tsang KW, Kinoshita R, Rouke N, Yuen Q, Hu W, Lam WL. Bronchoscopy of cetaceans J Wildl Dis 2002; 38 (19): 224-227.
76. Vaseeharan B, Sundararaj S, Murugan T, Chen JC. *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* associated with diseased black tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius in India. Appl Microbiol 2007; 45: 82–86.
77. Von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase negative staphylococci. Infect Dis 2002; 2.
78. SEMARNAT. semarnat.gob.mx

**Anexo 1.** Aislamientos realizados en tracto respiratorio y área genital de cada uno de los delfines provenientes de instalaciones cerradas, durante los 4 muestreos.

### AISLAMIENTOS DEL TRACTO RESPIRATORIO

#### HEMBRAS

DELFIN	1	2	3	4
C1	<i>Micrococcus</i> spp.	S/M	<i>Staphylococcus aureus</i>	S/C*
C2	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	S/M	<i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Oligella urethralis</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> <i>masoucida</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
C3	<i>Candida tropicalis</i> <i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Acinetobacter johnsonii</i> <i>Micrococcus</i> spp.	S/M	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pasteurella multocida</i>	<i>Staphylococcus lugdunensis</i> <i>Candida tropicalis</i>
C4	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus xylosum</i>	S/M	<i>Staphylococcus</i> spp.
C5	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i>

S/M= SIN TOMA DE MUESTRA

S/C= SIN CRECIMIENTO

## MACHOS

DELFIN	1	2	3	4
C6	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	S/M	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas luteola</i>
C7	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	S/M	<i>Staphylococcus hominis</i>
C8	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida tropicalis</i>	S/M	<i>Staphylococcus aureus</i>
C9	<i>Acinetobacter johnsonii</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	S/M	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus xylosum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>
C10	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus</i>	S/M	<i>Staphylococcus</i> spp. <i>Staphylococcus simulans</i>
C11	<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

S/M= SIN TOMA DE MUESTRA

## AISLAMIENTOS DEL AREA GENITAL

### HEMBRAS

DELFIN	1	2	3	4
C1	<i>Micrococcus spp</i> <i>Photobacterium damsela</i>	S/M	<i>Photobacterium damsela</i>	S/C
C2	<i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Burkholderia cepacia</i>	S/M	<i>Micrococcus spp.</i> <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>masoucida</i>
C3	<i>Acinetobacter iwoffii</i> <i>Micrococcus luteans</i> <i>Micrococcus spp.</i>	S/M	<i>Vibrio vulnificus</i> <i>Vibrio alginolyticus</i>	S/C
C4	<i>Pasteurella spp.</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Streptococcus dysgalactiae ssp equisimilis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Ochrobactrum anthropi</i>	S/M	<i>Vibrio vulnificus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Escherichia coli</i>
C5	<i>Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis</i> <i>Aerococcus viridans</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Streptococcus grupo L</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

S/M= SIN TOMA DE MUESTRA

S/C= SIN CRECIMIENTO

### MACHOS

DELFIN	1	2	3	4
C6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S/M	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	S/C
C7	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus grupo L</i> <i>Pantoea spp.</i> <i>Aeromonas sobria</i> <i>Vibrio cholerae</i>	S/M	S/C
C8	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas sobria</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	S/M	S/C
C9	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Micrococcus spp.</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	S/M	S/C	S/C
C10	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Photobacterium damsela</i>	S/M	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
C11	<i>Vibrio cholerae</i> <i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	S/C	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Micrococcus luteus</i>	S/C

S/M= SIN TOMA DE MUESTRA

S/C= SIN CRECIMIENTO

**Anexo 2.** Aislamientos realizados en tracto respiratorio y área genital de cada uno de los delfines provenientes de instalaciones abiertas, durante los 4 muestreos.

### AISLAMIENTOS DEL TRACTO RESPIRATORIO

#### HEMBRAS

DELFIN	1	2	3	4
A1	<i>Candida tropicalis</i> <i>Enterococcus durans</i> <i>Gemella haemolysans</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida tropicalis</i> <i>Micrococcus spp</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Micrococcus luteans</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>
A2	<i>Pseudomonas luteola</i> <i>Aeromonas sobria</i>	<i>Pseudomonas luteola</i> <i>Streptococcus mitis</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas sobria</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
A3	<i>Staphylococcus xylosum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcus spp.</i> <i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Vibrio vulnificus</i>
A4	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Micrococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Proteus vulgaris</i>
A5	<i>Candida parapsilosis</i> <i>Pseudomonas luteola</i> <i>Micrococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
A6	<i>Escherichia coli</i> <i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Micrococcus lylae</i>	<i>Escherichia coli</i>
A7	<i>Staphylococcus xylosum</i> <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Staphylococcus xylosum</i> <i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pasteurella pneumotropica</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>
A8	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> <i>Staphylococcus auricularis</i> <i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Kocuria varians</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus hominis</i>
A9	<i>Staphylococcus xylosum</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Vibrio vulnificus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Micrococcus lylae</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Micrococcus luteans</i>
A10	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Micrococcus lylae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida tropicalis</i>
A11	<i>Staphylococcus lentus</i> <i>Micrococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> <i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Enterobacter amnigenus</i>

## MACHOS

DELFIN	1	2	3	4
A12	<i>Candida norvegensis</i> <i>Pseudomonas alcaligenes</i> <i>Photobacterium damsela</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Candida tropicalis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
A13	S/C	<i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Candida parapsilosis</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
A14	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Micrococcus</i> spp. <i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
A15	<i>Micrococcus</i> spp.	S/C	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Kocuria varians</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Proteus mirabilis</i>
A16	<i>Cryptococcus laurentii</i> <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida tropicalis</i>
A17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Micrococcus</i> spp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i>
A18	<i>Candida tropicalis</i> <i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>

S/C= SIN CRECIMIENTO

## AISLAMIENTOS DEL AREA GENITAL

### HEMBRAS

DELFIN	1	2	3	4
A1	<i>Staphylococcus sciuri</i> <i>Staphylococcus lentus</i> <i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Pseudomonas luteola</i>	<i>Bacillus brevis</i>	<i>Micrococcus luteans</i> <i>Micrococcus lylae</i>
A2	S/C	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
A3	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Micrococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Micrococcus</i> spp. <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Micrococcus</i> spp.
A4	<i>Staphylococcus warneri</i> <i>Micrococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Kocuria kristinae</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Micrococcus lylae</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
A5	<i>Gemella haemolysans</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus mitis</i>	<i>Photobacterium damsela</i> <i>Candida parapsilosis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus xylosum</i> <i>Staphylococcus warneri</i>
A6	<i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Micrococcus</i> spp.	S/C	<i>Micrococcus luteans</i> <i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Escherichia coli</i>
A7	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Escherichia vulneris</i> <i>Micrococcus</i> spp. <i>Staphylococcus sciuri</i> <i>Gemella haemolysans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Pseudomonas luteola</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
A8	<i>Staphylococcus xylosum</i> <i>Pseudomonas oryzae</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Staphylococcus intermedius</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Micrococcus lylae</i>	<i>Brevundimonas vesicularis</i> <i>Staphylococcus warneri</i>
A9	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>Staphylococcus xylosum</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i>	S/M
A10	<i>Escherichia coli</i> I <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Micrococcus luteans</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus warneri</i>
A11	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Photobacterium damsela</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Micrococcus lylae</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>

S/C= SIN CRECIMIENTO

S/M= SIN TOMA DE MUESTRA

## MACHOS

DELFIN	1	2	3	4
A12	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Micrococcus luteans</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Micrococcus</i> spp <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	S/M
A13	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Photobacterium damsela</i> <i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Micrococcus lylae</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Empedobacter brevis</i>
A14	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Aerococcus urinae</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	S/C
A15	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Micrococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Micrococcus</i> spp. <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Kocuria varians</i>	S/C
A16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Micrococcus luteans</i>	<i>Micrococcus</i> spp. <i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	S/C
A17	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Micrococcus</i> spp. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Pseudomonas alcaligenes</i>
A18	<i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Vibrio cholerae</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Escherichia coli</i>

S/M= SIN TOMA DE MUESTRA

S/C= SIN CRECIMIENTO