



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Programa de Maestría en Ciencias de la Producción y Salud Animal

“Estudio bacteriológico en cloaca y detección de iridovirus en tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea*) de “La Escobilla”, Oaxaca, México”

Para la obtención de grado de Maestría en Ciencias

Alumna: Paula Aguilar Claussell

Tutor principal: José Ramírez Lezama

Comité Tutoral: Susana Mendoza Elvira
Carlos González-Rebeles Islas

México, D.F. febrero de 2011



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.

Dedicatorias

A mi mamá a Nadi y a Aze que siempre me han apoyado en todos los sentidos con cariño incondicional. A mi papá, donde quiera que esté, por cuya memoria el esfuerzo nunca es ni será en vano.

A Irving por su ayuda para coleccionar las muestras y por su gran apoyo y cariño que siempre han estado conmigo. A su mamá Vero y familia por su generosa ayuda y comprensión en momentos difíciles.

A mis amigos Agus, Abi, Carlitos, Cinthya, Eli, Edgar, Jon, Josa, José Luis, Luis, Mine, Nubi, Rutsi, Sari Mtz., Sarita Salinas: Todos están en mi corazón. Por compartir momentos buenos y no tan buenos, por su apoyo y por decir lo adecuado cuando más los necesité.

Agradecimientos

A Pepe mi tutor, a la Dra. Susy y al Dr. Carlos por su paciente orientación y a todos los profesores que compartieron su experiencia y conocimiento conmigo.

Al laboratorio de Bacteriología de la FES Cuautitlán, en particular a la M.en C. Susana Mendoza Elvira y sus alumnos por su apoyo para trabajar parte de las muestras.

Al laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana campus Xochimilco y en particular al Dr. Daniel Martínez por su estrecha colaboración en el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al laboratorio de Patología Clínica y de patología de la FMVZ por su valiosa colaboración a pesar de los contratiempos y por permitirnos trabajar en sus espacios.

Al Centro Mexicano de la Tortuga y su personal, a la CONANP y a la SEMARNAT por otorgarme todas las facilidades y permisos para realizar las actividades de campo. A la Bióloga Laura Sarti por brindarnos su apoyo y orientación.

Al MVZ Angel García Hernández por su colaboración para contactarme con dichas instituciones.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, a sus profesores y administrativos, a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme todo lo necesario para llegar a este punto.

Al PAPIIT por apoyarnos con la parte financiera del proyecto. Al CONACYT por otorgarme la beca que sirvió de sustento económico durante el desarrollo del proyecto.

INDICE

1. Introducción	Página
1.1 Antecedentes	1
2. Revisión de literatura	
2.1 Generalidades de las tortugas marinas	8
2.1.1 Anatomía y fisiología	8
2.1.2 Alimentación	10
2.1.3 Comportamiento reproductivo y anidación	10
2.2 Bacteriología en tortugas	12
2.3 Iridovirus	13
Objetivos e hipótesis	18
3. Material y métodos	
3.1 Toma de muestras	19
3.1.1 Bacteriología	20
3.1.2 Virología	21
3.1.3 Manejo y traslado de muestras	22
3.2 Estudio bacteriológico	22
3.2.1 Pruebas bioquímicas	23
3.3 Determinación de Iridovirus por PCR	24
3.3.1 Extracción de ADN	24
3.3.2 Control interno	25
3.3.2.1 Extracción de plásmido por lisis alcalina	25
3.3.3 PCR	26
4. Resultados	
4.1 Bacteriología	28
4.2 Virología	29
5. Discusión	31
6. Anexos	35
7. Referencias	37
8. Apéndices	
8.1 Lista de figuras	40
8.2 Lista de tablas	40

RESUMEN

Se realizó un estudio bacteriológico a partir de 50 hisopos cloacales principalmente en búsqueda de bacterias aerobias. Se aislaron 13 géneros bacterianos de 19 de las muestras, en su mayoría enterobacterias, en el resto no hubo crecimiento. Las especies bacterianas encontradas coinciden con referencias previas acerca de la flora normal en la cloaca de tortugas marinas, sin embargo se aisló en 5 muestras *Salmonella spp*, lo que indica que pudieran ser individuos infectados que no manifiestan signos de enfermedad.

Por otra parte se analizaron 50 muestras de sangre de tortugas marinas de la especie golfina (*Lepidochelys olivacea*) que anidan en “La Escobilla”, Oaxaca, México, para detectar por medio de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) la presencia de iridovirus. Los resultados para detección de iridovirus fueron negativos, lo cual pudiera indicar que las tortugas analizadas no han sido infectadas por dicho agente viral por lo menos hasta la fecha de muestreo.

Palabras clave: flora cloacal, PCR, iridovirus, tortugas marinas, golfina.

ABSTRACT

A bacteriological analysis was made from 50 cloacal q-tips looking for aerobic bacteria. There were 13 genera in 19 samples, most of them enterobacteria. In the rest of samples there was no growth. The bacterial species found are in agreement with previous references about normal flora in sea turtles cloaca, however in 5 samples *Salmonella spp* was isolated, which indicates that there could be infected individuals that doesn't show sickness signs.

Also, there were analyzed 50 samples of blood from sea turtles of the specie olive ridley (*Lepidochelys olivacea*) nesting in “La Escobilla”, Oaxaca, México for detecting by PCR analysis the presence of iridovirus. All 50 samples were negative for iridovirus. Iridovirus detection was negative, which may indicates that analyzed turtles were not infected by that viral agent, at least until sampling date.

Key words: cloacal flora, PCR, iridovirus, sea turtles, olive ridley.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Las tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea*) también conocidas como caguama, amarilla, garapachi, frijolilla, oliva, guaragua y carpintera, son reptiles marinos de la familia *Cheloniidae* que habitan en las costas del Océano Pacífico y de México. Es la tortuga marina más pequeña, ya que alcanza hasta 70 cm de largo del caparazón y llega a pesar un máximo de 45 kg. (Hoff G.L., Frye F.L, 1984).

Desde tiempos prehispánicos, la tortuga marina ha jugado un papel muy importante en la alimentación, cultura y economía de varios estados del país. Se tienen registros de que los caparazones eran usados como escudos en batallas entre distintas culturas mesoamericanas, sobretodo las que se encontraban cerca de zonas costeras, como la Maya. (Lutz *et al*, 2003)

Existían también en varias culturas como la Azteca, Maya, Mixteca y Zapoteca, dioses con distintas capacidades que se representaban portando un caparazón de tortuga. En su mayoría, estos dioses estaban relacionados con el agua, las tormentas, el soporte del cielo o incluso del mundo. En los reportes de Diego de Landa y de Oviedo, después de la conquista, se menciona el gran tamaño y el buen sabor de las tortugas marinas. (Lutz *et al*, 2003)

En los años 60's y 70's e incluso ya entrados los 80's, la pesquería de tortugas marinas fue considerada una importante y altamente costosa actividad económica en el país, lo cual ocasionó el rápido decremento en la población de diferentes especies de tortugas marinas en México (Lutz *et al*, 2003).

Las tortugas adultas acostumbran desovar en diferentes playas del Pacífico mexicano. En la mayor de ellas, "La Escobilla", Oaxaca, por ejemplo, casi

desaparecieron debido a décadas de colecta de huevos y matanza de juveniles y adultos para aprovechar su carne y su piel. Sin embargo, desde la veda absoluta a la pesquería legal de tortugas en México en el año de 1990, esta población se ha recuperado. Es uno de los mayores éxitos obtenidos en la conservación de las tortugas marinas y quizá el mejor ejemplo de cómo las leyes de conservación tales como la ley moratoria publicada en 1990, en combinación con la ley efectiva de protección de las playas de anidación y la aplicación de las mismas, pueden realmente ayudar a la recuperación de las poblaciones (García *et al.*, 2003).

Actualmente las tortugas golfinas se encuentran clasificadas en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) como “en peligro”, “amenazada” por la USESA (United States Endangered Species Act) y en el Apéndice I del CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora silvestres), siendo su estado poblacional histórico previo catalogado como común y actualmente ha pasado a la categoría de rara. (Eckert *et.al.*, 2000)

La Escobilla es actualmente el sitio más importante para el desove de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) debido a la enorme cantidad de tortugas que llegan por temporada. En cada noche de arribada masiva se registra un promedio de 4-5 mil animales desde que anochece hasta el amanecer (Johnson, 1993).

Escobilla se localiza en la parte central de la costa del estado de Oaxaca, en el tramo comprendido entre Puerto Escondido y Puerto Ángel. El área que limita al oeste con la barra del río Cozoaltepec, y al este con la barra del río Tilapa, que abarca aproximadamente 7.5 km de costa, es la principal zona de anidación y se encuentra resguardada por el ejército mexicano. Hacia el norte se encuentra ubicado Puerto Escondido y hacia el sur las playas de Mazunte y las Bahías de Huatulco, sitios considerados como turísticos de mediana o alta afluencia. (Johnson, 1993).

Debido a la importancia de éste sitio para la conservación de la especie, y a su cercanía con zonas altamente turísticas (Figura 1), se decidió trabajar con tortugas que llegan cada año a desovar en esta playa.



Figura 1. Ubicación de la playa “La Escobilla” en el estado de Oaxaca, México. Indicado por la marca en forma de pera. Mapa tomado de INEGI,2009.

Actualmente en México se encuentran 8 especies de tortugas marinas que han adoptado sus costas como zonas de alimentación, reproducción y anidación; sin embargo, es de llamar la atención que, debido al comportamiento dócil y pelágico (en la superficie) de los quelonios, se han convertido en el blanco de numerosos métodos de depredación y de numerosos efectos por la contaminación cada vez mayor del agua marina. (Márquez, 1996)

Cabe destacar que las zonas turísticas mencionadas se encuentran en desarrollo, sobre todo las pequeñas playas al sur, por lo cual no cuentan con sistemas adecuados para el manejo de aguas residuales, con lo que aumenta la cantidad de agua contaminada que se descarga directamente hacia el mar. Otro factor importante es la cercanía con la desembocadura de 2 ríos, lo cual aumenta el riesgo de contaminación. (Mujeriego, 1990)

Por consecuencia, toda la zona se encuentra en un alto riesgo de contaminación, sobre todo biológica y química, lo que pone en riesgo a los animales y asentamientos humanos que habitan en la zona costera y que dependen del consumo y venta de productos pesqueros del lugar. (Mujeriego, 1990)

Se ha determinado que las aguas negras contienen cantidades variables de virus y bacterias patógenas o potencialmente patógenas para los humanos y animales, entre las más comunes se encuentran las enterobacterias. Así mismo se ha determinado la presencia de diferentes virus en aguas residuales (Mujeriego, 1990).

Los virus son parásitos intracelulares obligados, por lo que sólo son capaces de multiplicarse dentro de la célula huésped. En principio cualquier virus excretado es capaz de producir infección en un organismo susceptible a través de su ingestión y un tratamiento inadecuado del agua residual puede ser un factor importante que determine su transmisión (Mujeriego, 1990).

La supervivencia de las bacterias en el agua depende mucho de la presencia de otros microorganismos que las depreden, por lo que sobreviven más en aguas "limpias" que en aguas sucias. En cambio, hay evidencia de que la supervivencia de los virus es mayor en aguas contaminadas, presumiblemente como resultado de un efecto protector al adherirse en partículas sólidas suspendidas en agua sucia. En agua de ríos y mares la supervivencia de los microorganismos es variable (Mujeriego,1990) :

- Bacterias: El tiempo máximo es 20 días (20-30°C).
- Virus: Aumenta con la disminución de la temperatura. A 20-30°C sobreviven unos 2 meses y a 10 °C sobreviven unos 9 meses.

Debido a que las tortugas marinas cuentan con una flora bacteriana que actúa de manera benéfica, es importante monitorear si las condiciones ambientales han

afectado de alguna manera su equilibrio, pues en ocasiones se alteran las poblaciones bacterianas incorporando diferentes especies o mostrando variación en las proporciones de las más comunes, por lo que pueden llegar a actuar como oportunistas o incluso como patógenas. Algunas de las causas por las que se ocasiona un desequilibrio pueden ser fisiológicas, aunque el medio ambiente también juega un papel muy importante. El detectar alguna variación importante en la flora cloacal de una tortuga puede ser indicativo de variaciones a diferentes niveles, ya sea fisiológicos o ambientales. (Jacobson, 2007)

Las tortugas marinas comienzan su arribo a la zona de anidación aproximadamente unos 20 a 30 días antes del desove masivo, primero en mar abierto para llevar a cabo el proceso de cortejo y cópula. Posteriormente, se van acercando a la zona costera para depositar los huevos fecundados. Durante todo este tiempo las tortugas permanecen en la zona de riesgo. (Márquez, 1996)

Generalmente se agrupan miles de hembras en espera del momento adecuado para el desove masivo unos 2 a 3 días antes del evento, lo que hace aún más susceptibles a este grupo de animales, tanto al contacto con agentes presentes en el agua, como al contagio por contacto directo de algunas enfermedades. (Mc Arthur *et.al.*, 2004)

Algunos autores han propuesto que el aislamiento de *Salmonella spp.* sea utilizado como indicador de agua contaminada, pues en ciertas circunstancias tiene un periodo de supervivencia mayor al de los coliformes (American Public Health Association, 1981).

Por otra parte, el iridovirus representa la primera infección viral en reptiles; incluso, inicialmente, este agente intracelular fue considerado un protozooario llamado *Pyrbemociton lareutolae* por Chatton y Blanc en 1914. La naturaleza viral del agente fue descubierta en estudios en un gecko infectado (*Gebyra variegata*) en el

año de 1966 por Stehben y Johnston. El iridovirus ha sido aislado tanto de individuos enfermos como de aquellos sin signología aparente y en especies muy variadas de reptiles, ya sea en cautiverio o en vida libre: tortugas terrestres, camaleones, iguanas, tortugas de concha blanda, serpientes y otros reptiles (Jacobson, 2006).

Por otro lado, existen numerosos reportes de la presencia de iridovirus en diferentes especies de organismos de la familia *Chelonidae* (Benetka *et.al.*, 2007), a la vez que la OIE (2007) publica en sus tarjetas de enfermedades en animales acuáticos que las enfermedades causadas por *iridovirus*, y en particular el *ranavirus* es una de las causas más importantes de enfermedades infecciosas en animales poiquiloterms, principalmente en anfibios; aunque la susceptibilidad alcanza también a peces y reptiles. Indica también que los mecanismos de transmisión pueden ser por vía horizontal, por ingestión de agua contaminada o por transmisión vertical, aunque ésta última no ha sido confirmada. (Eckert *et.al.*, 2000).

Existen 3 tipos de iridovirus que pueden afectar a las tortugas y a los reptiles en general: los *ranavirus*, *lymphocistivirus*, y *megalocytivirus*. Dentro de éstos 3 géneros, se ha considerado al de los *ranavirus* como el más importante en cuanto a infecciones en anfibios por su capacidad de causar grandes índices de mortandad en animales silvestres, sin embargo, su impacto en reptiles ha sido poco estudiado (Jacobson, 2006).

Actualmente existen numerosas especies dentro del género *ranavirus* específicamente aisladas en alguna especie de tortuga, como por ejemplo, el virus de la tortuga *Testudo*, *Terrapene*, *Box turtle*, *Tortoise*, *Trionix* (concha blanda) y *Gopherus*. (Mc Arthur *et.al.*, 2004)

Cabe señalar que los ranavirus ocasionan enfermedades necróticas crónicas que en muchas ocasiones no son visibles externamente, por lo que la infección podría pasar desapercibida y aparentar casos de muertes súbitas que a la necropsia revelen necrosis sistémica. (Benetka *et.al.*,2007).

Recientemente, partículas parecidas a iridovirus fueron observadas en ostras japonesas adultas (*Crassostrea gigas*) sufriendo erosión en las branquias y mortalidades anormales en México. (Cáceres-Martínez y Vazquez-Yeomans, 2003). Considerando sus vías de transmisión, pudieran haber entrado en contacto con alguna especie de tortugas marinas al ser ingeridas.

En un estudio realizado en tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea*) de las playas de Cuyutlán, Colima, México se identificaron granulomas renales, hemocromatosis y degeneración hepáticas severas, lesiones necróticas severas en riñones y pulmón, sin identificar agentes infecciosos específicos, por lo que resultaría de gran importancia realizar más estudios en la zona del Pacífico (Gámez *et.al.*,2009).

Con base en los reportes e investigaciones mencionados, este proyecto de investigación está encaminado a identificar la flora bacteriana en cloaca y la presencia de iridovirus (ranavirus) en sangre de la población de tortugas golfinas que desovan en la playa de La Escobilla, Oaxaca; con la finalidad de identificar si hay alguna variación en la flora o la presencia del virus y así determinar si la población pudiera estar afectada o en riesgo. En caso de resultar positivo alguno de los dos casos sería indispensable para el bienestar de la población determinar sus orígenes y efectos en la población.

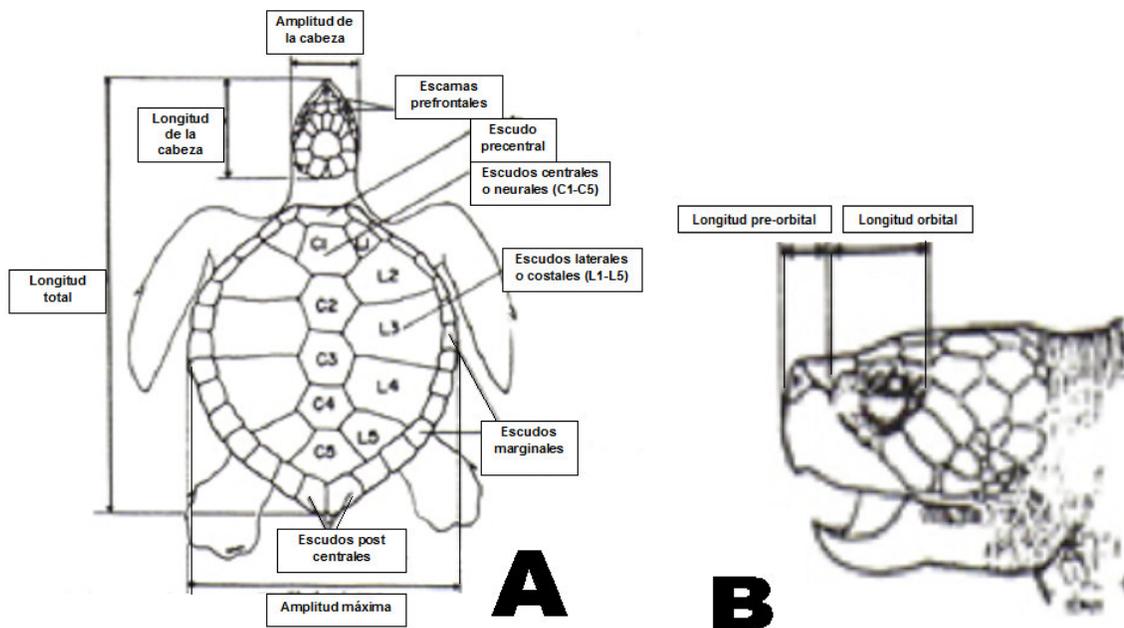
2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de las tortugas marinas

2.1.1 Anatomía y fisiología.

Las tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea*) pertenecen a la familia *Cheloniidae* y junto con la tortuga lora (*Lepidochelys kempii*) son las más pequeñas de las 9 especies que existen actualmente (Fowler, 1993).

Tienen un caparazón de queratina sumamente resistente con placas óseas intercaladas y en forma de escudos. Los escudos del caparazón y cabeza permiten la identificación de cada especie de manera confiable y específica (Fowler, 1993)(Figura 2).



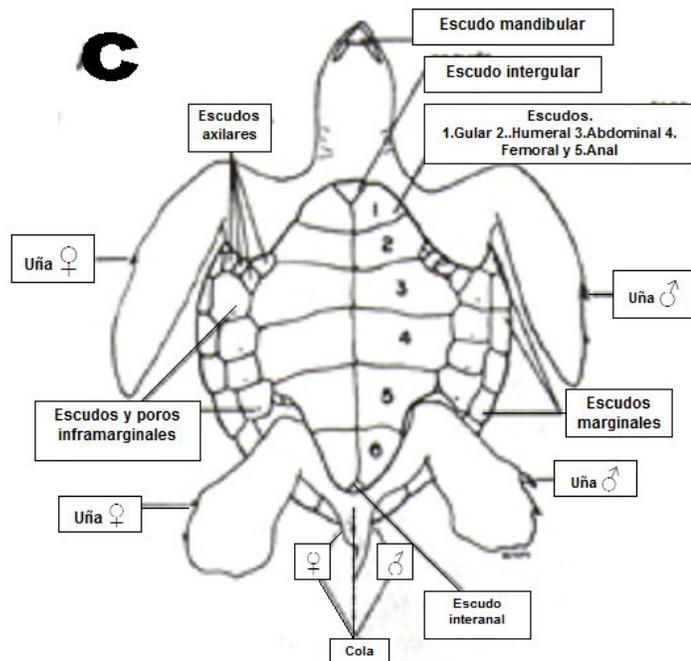


Figura 2. Caparazón de tortuga marina en vista dorsal (A), cabeza (B) y plastrón en vista ventral (C).

La tortuga golfina se distingue por contar con un caparazón casi circular, 4 escudos en el puente conformado por los escudos inframarginales (con poros), 6 o más pares de escudos laterales en ocasiones asimétricos, un peso promedio de 45kg, máximo 70cm de longitud del caparazón, pequeñas uñas en la cara lateral externa de las 4 aletas, 6 placas del plastrón y rara vez se le encuentra más al norte de los 13°N. En etapas juveniles tienen coloración gris carbón y en etapa adulta un color verde grisáceo. Como todas las especies de tortugas marinas, cuentan con una cavidad celómica sin diafragma y son poiquilothermas (Wyneken *et. al.*, 2008).

Debido a que requieren salir a respirar constantemente, son animales que habitan la superficie marina, principalmente en el día. Tienen un esófago cubierto con espículas queratinizadas en dirección caudal para deglutir su alimento y que pase directamente al estómago de manera segura y sin lesionar la mucosa.(Wyneken *et.al.*,2008)

Al no poseer músculo diafragmático, cuentan con una sola cavidad llamada celómica en la que se encuentran los órganos blandos.(Girling S.J., Raiti P., 2004)

La columna vertebral se encuentra fusionada con el caparazón, por lo que es rígida y sumamente resistente. Los escudos centrales corren sobre ella y, al igual que los escudos laterales, tienen placas óseas para brindarles mayor dureza. En su estructura anatómica cuentan, al igual que las aves, con una cámara en la cual desembocan el tracto urinario, digestivo y reproductor, llamado cloaca (Wyneken *et. al*, 2008).

2.1.2 Alimentación

Sus zonas de alimentación se encuentran en sitios cercanos a la superficie (pelágicos) y principalmente se basa en algas, crustáceos, moluscos y algunos peces. (Wyneken *et.al.*,2008)

Se ha identificado que regularmente, cerca de la playa de anidación se encuentran zonas de alimentación para las crías localizadas en la cercanía o dentro de grandes depresiones rocosas con abundancia de corales y/o vegetación para protección de las crías. (Márquez,1996)

En las etapas juveniles los grupos se dispersan y ha sido poco estudiado su comportamiento alimenticio, sin embargo, en la edad adulta, las tortugas golfinas se consideran omnívoras al consumir tanto algas y otras plantas marinas, como crustáceos, moluscos y peces (Márquez,1996).

2.1.3 Comportamiento reproductivo y anidación

La reproducción de esta especie de tortugas tiene ciclos muy específicos, en los cuales las condiciones climáticas y geográficas son importantísimas.

Las hembras y machos permanecen solitarios o en grupos pequeños la mayoría del tiempo, sin embargo, alrededor de los meses de septiembre y octubre, se juntan en grupos más numerosos y cercanos a las zonas de anidación para llevar a cabo el apareamiento. (Márquez,1996)

Los machos suelen localizar a la hembra receptiva por su agudo olfato y llevan a cabo un cortejo no muy prolongado en el que la hembra es sometida por el macho dominante. En ocasiones se llevan a cabo peleas para poder copular con una hembra receptiva. (Wyneken *et.al.*, 2008)

Una vez que la hembra recibe el esperma del macho, tiene la capacidad de almacenarlo en forma viable por periodos cortos de tiempo, para poder permitir la fertilización cuando ésta se encuentre muy cerca de la zona de anidación. (Márquez,1996)

Una vez que la hembra se desplaza hasta la zona de anidación, permanece ahí durante 2 a 4 días antes de salir a desovar; esto con la finalidad de que se conforme un desove masivo o “arribada”. La arribada es un fenómeno evolutivo que se lleva a cabo aproximadamente cada luna nueva de los meses de agosto a diciembre o enero de cada año. (Marquez,1996)

Una hembra tiene la capacidad de desovar una sola vez por temporada, sin embargo, depositan en promedio 90-100 huevos por nidada. Es común que salgan a explorar en la playa de anidación varias ocasiones antes de completar el desove. Las tortugas golfinas, junto con las lora, son las únicas que realizan desoves masivos de esa magnitud (Wyneken *et.al.*, 2008).

2.2 Bacteriología en tortugas

Se han realizado numerosos estudios bacteriológicos en tortugas con la finalidad de determinar qué especies habitan de manera natural como parte de su flora y cuales son oportunistas y potencialmente patógenas. Algunos de esos trabajos se mencionan a continuación.

En Nancite, Costa Rica (Santoro *et al*, 2006) se determinó que las especies bacterianas más comunes encontradas en la cloaca y las fosas nasales de tortugas golfinas fueron (#positivas / #muestras totales): *Aeromonas spp.* (13/45) y *Citrobacter freundii* (6/45) en la cloaca, y *Bacillus spp.* (32/45), *Staphylococcus aureus* (6/45) y *Corynebacterium spp.* (5/45) en las fosas nasales.

Otro estudio realizado en tortuga caguama (*Caretta caretta*) en individuos del mar Mediterráneo central (Foti *et al*,2009) determinó la presencia de *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia spp.*, *Providencia spp.*, *Morganella spp.*, *Pantoea spp.*, *Pseudomonas spp.* and *Shewanella spp* en muestras de hisopos cloacales.

En Carolina del Norte, Estados Unidos, K. H. Valentine y su equipo (2007) detectaron la presencia de DNA de *Bartonella spp* en tortugas pericas (*Caretta caretta*) y concluyeron que las bacterias pueden actuar como patógenos oportunistas, causando enfermedad sólo en animales inmunodeprimidos o con desnutrición.

En tortugas marinas, las bacterias aisladas en mucosas más frecuentemente son : *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Escherichia coli*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Proteus sp*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Edwardsiella sp* y *Flavobacterium sp.* , mismas que pueden ocasionar

importantes enfermedades como la estomatitis ulcerativa, rinitis obstructiva bronco-neumónica, dermatitis focal erosiva (FED), enfermedad cutánea septicémica ulcerativa (SCUD) o la dermatitis papilar (PD), sobre todo en animales inmuno comprometidos (Jacobson *et al.* 1991).

Para el diagnóstico bacteriano en general, es necesaria la realización de múltiples pruebas a partir de cultivos primarios que evidencian las características particulares de estructura y/o metabolismo de cada género y especie, por ejemplo, las salmonellas son bacilos gram negativos de 0.4-0.6micras de grosor y de 1-3 micras de longitud, móviles (con excepción de *S.gallinarum* y *S.pullorum*) no producen esporas y, salvo algunas excepciones, no presentan cápsula. No utilizan el malonato de sodio, hidrolizan la arginina y descarboxilan la lisina y la ornitina (Brooks *et.al.*,2004).

2.3 Iridovirus.

Los iridovirus son virus con DNA lineal de doble cadena, icosaédricos, que pueden ser cubiertos o desnudos pero igualmente infecciosos y que miden de 120 a 300nm de diámetro. Son citoplasmáticos, aunque su replicación ocurre primero en una fase nuclear y luego otra citoplasmática (Chinchar *et.al.*, 2005) (Figura3).

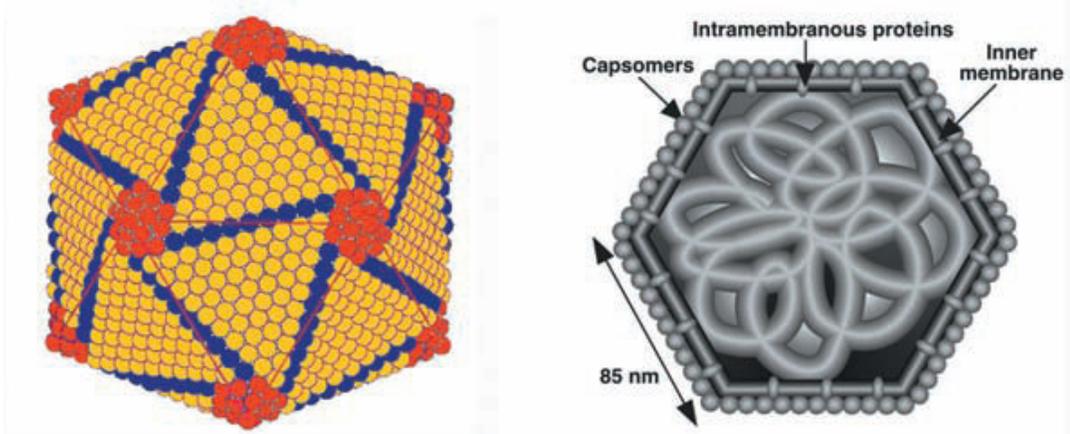


Figura 3. Estructura de la familia *Iridoviridae*. Imagen tomada de Chinchar *et.al.*, 2005.

Su genoma contiene de 140 a 330 kb y codifica para la producción de 30 proteínas diferentes, dependiendo del género. Entre éstas proteínas existe una que se encuentra en mayor proporción (alrededor del 42%) y que está altamente conservada en los iridovirus: la proteína principal de la cápside o MCP por sus siglas en inglés. (Specter *et.al*, 2000)

Dentro de la familia de los iridovirus se encuentran 5 diferentes géneros, de los cuales 2 afectan principalmente a insectos e invertebrados: Iridovirus y chloriridovirus; y 3 que afectan animales poiquiloterms como peces, anfibios y reptiles: Ranavirus, lymphocistivirus y megalocytivirus. El género más comúnmente asociado a las enfermedades descritas en tortugas es el de ranavirus (Jacobson *et.al*, 2006).

Las enfermedades ocasionadas por los iridovirus pueden producir una enorme variedad de lesiones como estomatitis, esofagitis, gastroenteritis ulcerativas necróticas, neumonía, traqueitis, conjuntivitis, edema palpebral, necrosis hepática y/o pancreática, cutánea y renal, hiperemia en tracto digestivo desde boca hasta cloaca con lesiones ulcerativas y prácticamente afecta cualquier tejido mayor, excepto músculo estriado y cardíaco, aunque puede ser aislado a partir de ellos debido a la presencia de sangre (Jacobson *et.al.*, 2006).

Entre las enfermedades más importantes asociadas con iridovirus se encuentran la enfermedad necrótica del Gecko, la ranaviriosis del sapo leopardo, la infección necrótica de las salamandras, la necrosis posterior de los camaleones y lesiones en iguanas. En la familia *Chelonidae* se encuentran la enfermedad del “cuello rojo” en tortugas de concha blanda, las enfermedades de vías respiratorias altas y las lesiones necróticas generalizadas en tortugas de los géneros *Testudo*, *Gopherus* y *Terrapene* (Jacobson *et.al*,2006).

Originalmente se cree que los iridovirus entraron en contacto con los reptiles a través de la ingestión de insectos infectados pero que poco a poco el virus mutó hasta ser capaz de infectar otras especies. Hoy en día su diseminación es tan fácil como ingerir agua contaminada con escamas, plumas o algún otro fomite que haya estado en contacto con el virus (Clark H.F., Karzon D.T., 1972).

El efecto de la temperatura en virus de vertebrados poiquiloterms es de particular interés. Estudios de termoestabilidad revelaron que el iguana virus, viniendo de un vertebrado de sangre fría, muestra una vida media de 13hr a 37°C bajo condiciones en las que previamente se había determinado la vida media de 2.4hr para herpes virus simples. El iguanavirus a 36°C se replica eficientemente y es el primer virus de vertebrado poiquiloterms que se ha demostrado que tiene esa capacidad, lo cual no es sorprendente en vista del hecho de que es también el primer virus aislado de un poiquiloterms tropical (Clark H.F., Karzon D.T., 1972).

La mayoría de las investigaciones se han enfocado en la potencial contaminación de hábitats marinos y estuarios con virus entéricos humanos como resultado de liberación de aguas residuales. Si los virus pueden sobrevivir en hábitats marinos, las aguas costeras usadas para recreación y cultivo de crustáceos sirve como reservorio y se convierte en un reto de salud pública. Los virus entéricos humanos incluyendo el de hepatitis A, poliovirus, echovirus y rotavirus no solo persisten después de la exposición al agua marina, sino que también ha sido documentado que son arraigados por algunos organismos acuáticos (Currie *et.al.*, 2000).

Debido a las características ya mencionadas de los virus de animales poiquiloterms, se puede deducir que éstos tienen una mayor capacidad para mantenerse viables y algunos de ellos para sobrevivir en aguas marinas después de haber sido eliminados en aguas residuales, por lo que es muy probable que los iridovirus sean transportados por descargas de aguas negras y se mantengan viables en aguas marinas cercanas a la costa.

Una de las principales técnicas para detección de ADN viral es por medio del PCR, mientras que, a través del aislamiento viral y, en ocasiones, de estudios histopatológicos, se puede determinar la presencia de algunos iridovirus (Mc Arthur *et.al.*,2004). Al teñir la muestra de tejido con Hematoxilina y eosina se suelen observar cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en pequeñas cantidades (principalmente en eritrocitos), sin embargo, ésta última técnica no constituye un método de diagnóstico confiable para ranavirus (Hoff G.L., Frye F.L., 1984).

Para la identificación de ADN viral por PCR se debe identificar un fragmento del genoma previamente conocido (por ejemplo, la secuencia amino o carboxilo de la proteína para la que codifica) para ser amplificados (“copiados”) utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés) (Brock T.D. y Madigan M.T.,1993).

El PCR es en si una técnica muy simple: dos oligonucleótidos son sintetizados cada uno como secuencia complementaria de una cadena opuesta (de un segmento en cada una de las cadenas) del ADN blanco en posiciones que delimiten el segmento que va ser amplificado. Los oligonucleótidos sirven como cebadores con sus extremos 3' orientados en direcciones opuestas(Brooks *et.al.*, 2004).

El PCR se divide en tres etapas: Desnaturalización, alineamiento y extensión. En la fase de desnaturalización el ADN que contiene el segmento que será amplificado se calienta aproximadamente a 95°C para separarlo en cadenas sencillas (Turner P.C. *et.al.*, 2000).

Después, en la fase de alineamiento, se requiere la presencia de grandes cantidades de oligonucleótidos sintéticos para permitir que, por hibridación, se encuentren las secuencias complementarias. La temperatura de alineamiento

varía alrededor de los 55°C dependiendo de las condiciones específicas de cada secuencia en las que se posicionan los iniciadores con su cadena de ADN correspondiente (Turner P.C. *et.al.*, 2000).

Por último, en la fase de extensión se generan las contrapartes de la cadena original, es decir, la nueva copia. Estos ciclos se repiten en numerosas ocasiones para formar una cantidad exponencial de copias y así poder detectarlas fácilmente (Turner P.C. *et.al.*, 2000).

Los segmentos son amplificados utilizando una ADN polimerasa termoestable que sea resistente a la fase de desnaturalización, como la *Taq* ADN polimerasa, aislada de una bacteria hipertermófila (Turner P.C. *et.al.*, 2000).

La infección ranaviral asociada con la mortalidad en varias especies de quelonios ha sido previamente descrita, sugiriendo que todas las especies de quelonios deben ser considerados susceptibles a la enfermedad ranaviral. Así mismo, se sugiere que tortugas infectadas con dosis subletales pueden servir como reservorios de infección para otros quelonios e incluso anfibios. Los ranavirus son considerados una amenaza global para las poblaciones de anfibios basados en la especificidad de su hospedero, alta virulencia y distribución global, sin embargo, también debería considerarse a los ranavirus como una amenaza para las poblaciones de quelonios (Johnson *et.al.*, 2007).

OBJETIVO GENERAL

Determinar la flora bacteriana cloacal y la presencia de iridovirus en tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea*) al momento del desove.

Objetivos particulares

- 1) Identificar géneros y especies bacterianos propios de la flora bacteriana cloacal de tortugas marinas.
- 2) Identificar la presencia de iridovirus a través de PCR en individuos aparentemente sanos.

HIPÓTESIS

Si se determina la presencia de especies bacterianas reportadas comúnmente en la cloaca y se detecta iridovirus en muestras sanguíneas de tortugas marinas al momento del desove, se podría inferir que posiblemente actúan como portadoras asintomáticas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Toma de muestras.

Se colectaron 50 muestras de tortugas hembra aparentemente sanas y libres de lesiones externas de la especie *Lepidochelys olivacea* que se encontraban desovando en la playa de “La Escobilla”, Oaxaca, México. El muestreo se realizó durante aproximadamente 12 horas desde las 7 pm a las 7 am en una sola noche de arribada en el mes de agosto de 2009. Se realizó en esas circunstancias con la finalidad de no realizar muestreos duplicados debido a la gran similitud entre individuos y a la variabilidad en los ciclos reproductivos de cada una de las tortugas, pues en ocasiones la misma tortuga sale a desovar en 2 o 3 noches consecutivas.

Para determinar el estado general de salud de la tortuga se evaluaron las siguientes características:

- Integridad del caparazón.
- Ausencia de papilomas en aletas cuello y cara.
- Ausencia de lesiones cutáneas, laceraciones o soluciones de continuidad.
- Movilidad y reactividad positivas y normales.
- Brillantez, claridad y reactividad ocular adecuadas.
- Ausencia de secreciones purulentas en cualquier cavidad.
- Ausencia de edemas o deshidratación.
- Reflejos pupilar e interdigital positivos.
- Ausencia de signos de enfermedad respiratoria.

Si algún individuo no cumplía con una o más de las condiciones enlistadas, se descartaba como sujeto apto para el muestreo con la finalidad de evitarle alguna complicación a causa del procedimiento, pues se trata de individuos en vida libre que no pueden mantenerse en observación para verificar su evolución posterior.

Para acceder a la cloaca se removió arena de la parte trasera del nido que permitiera visibilidad adecuada tanto de la cavidad y paredes del mismo, como de la cola y tren posterior de la tortuga.

El acercamiento a los animales fue cauteloso, dirigiendo la luz de las lámparas únicamente al sitio de interés (cola o cuello) y procurando manipular sólo animales en estado de “abstracción” por el desove, es decir, animales que ya tuvieran listo su nido y se dispusieran al comienzo del depósito de huevos.

Todo el procedimiento se realizó proporcionando los máximos cuidados y mínima manipulación a cada individuo. El muestreo fue realizado entre 3 personas que tenían experiencia en toma de muestras y manejo de tortugas marinas.

A continuación se detallan los procedimientos para la toma de muestras de manera separada.

3.1.1 Toma de muestras para bacteriología.

Se tomó la muestra en la cloaca de la tortuga introduciendo la punta de algodón de un hisopo estéril en la cavidad con un movimiento circular para que entrara en contacto con la pared de la misma y con el moco que se encontraba en ella.

A continuación se colocó el hisopo en un tubo con medio de cultivo Stuart semisólido, cerrándolo y marcándolo de acuerdo al número de individuo muestreado. Se mantuvo en refrigeración hasta su análisis en el laboratorio.

3.1.2 Toma de muestras para virología.

Las muestras sanguíneas fueron tomadas en el seno cervical dorsal de las tortugas marinas (Figura 4) manteniendo la cabeza de la tortuga lo más recta posible y con el cuello totalmente estirado. Es muy importante la desinfección del área antes de la punción y ejercer presión con un algodón limpio al momento de retirar la aguja para detener el sangrado de manera inmediata.

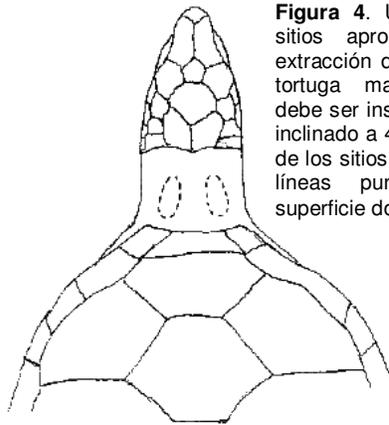


Figura 4. Ubicación de los sitios apropiados para la extracción de sangre de una tortuga marina. La aguja debe ser insertada en ángulo inclinado a 45° dentro de uno de los sitios indicados por las líneas punteadas en la superficie dorsal del cuello.

La toma de muestras sanguíneas se realizó con jeringas de 5ml y agujas de 3.8 cm. calibre 21 estériles, una nueva por cada individuo. La cantidad de sangre recomendada en la literatura es de 3ml/kg de peso, por lo que se pueden coleccionar hasta 120-135ml (ya que su peso oscila entre los 40 y 45 kg) sin embargo, se obtuvieron 5ml de cada individuo, quedando muy por debajo de la cantidad límite de sangre por individuo mencionada en la literatura (Mader, 2006).

Los 5ml de sangre se coleccionaron con jeringa pero fueron colocados en tubos sin anticoagulante para facilitar su manejo. Los tubos se mantuvieron en refrigeración hasta su traslado al laboratorio.

3.1.3 Manejo y traslado de muestras

Ya en los tubos, las muestras se identificaron y se colocaron en una hielera con refrigerantes para mantenerlas aproximadamente a 4 °C mientras se trasladaban al laboratorio para su estudio posterior.

Las muestras para bacteriología deben ser analizadas lo más rápido posible o en su defecto, transportadas en refrigeración (4 °C) sin rebasar las 48 horas posteriores a la toma.

Una vez en el laboratorio, las muestras sanguíneas fueron congeladas a -70 °C y los hisopos para bacteriología se mantuvieron en refrigeración para su cultivo primario lo más rápido posible.

3.2 Estudio bacteriológico

Para la identificación de las colonias bacterianas, los hisopos se sembraron directamente en cada uno de los siguientes medios de cultivo como cultivo primario: agar XLD con y sin sal, agar Mac Conkey con y sin sal y agar SS (Salmonella-Shigella) para su incubación a 30 y 37 °C durante 48 horas. También se sembraron en agar sangre para ser incubadas en virobiosis (anaerobiosis).

El crecimiento bacteriano fue evaluado en cuanto a su morfología, patrón de crecimiento, bordes, etc. para orientar el diagnóstico hacia algún posible género.

Posteriormente, de las cajas con crecimiento se sembraron cajas de agar BHI para realizar la tinción de Gram y se tomaron muestras para la posterior realización de pruebas bioquímicas.

3.2.1 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas realizadas fueron: Catalasa, nitritos, urea, SIM, óxido-fermentación, citratos, TSI, LIA y Rojo de metilo-Voges Proskauer. Los resultados se evaluaron para determinar el género y la especie de las colonias en estudio.

En algunos casos se realizaron pruebas de sensibilidad a diferentes antibióticos con la finalidad de aumentar la precisión del aislamiento.

Para comprobar la presencia de *Salmonella spp.* se inoculó la muestra con un asa microbiológica en caldo selenito (23g por litro). Una vez disuelto se colocó en tubos de vidrio de 10ml cada uno y se le inoculó una asada de la muestra. Se incubó a 37°C por 24 horas y posteriormente se sembraron en medio Mac Conkey.

El medio Mac Conkey permite identificar si las bacterias contienen la enzima lactasa. Se sembraron sólo las cajas que tuvieran signos de crecimiento en el caldo selenito (turbidez) con asa microbiológica en un sistema de 4 estrías para cultivo primario. Se dejaron incubando a 37°C por 24 horas.

Una vez incubadas se verificó el crecimiento, tipo de colonias y de fermentación. Sólo las cajas con bacterias no fermentadoras de lactosa fueron seleccionadas para las pruebas bioquímicas.

Para concluir el aislamiento se realizaron las 4 pruebas bioquímicas básicas: Urea, citratos, TSI y SIM, mencionadas previamente.

3.3 Determinación de Iridovirus por PCR.

Para la determinación de Iridovirus se siguieron los siguientes pasos: extracción de ADN a partir de muestras sanguíneas, obtención de un control interno y por último el PCR.

3.3.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN en este estudio se utilizó el kit Quiagen mini (50) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante para la extracción de ADN de tejidos y fluidos corporales, pues se realizó a partir de sangre (Anexo 1).

Al finalizar cada extracción de ADN se realizó una electroforesis para comprobar la presencia del material genético. Si no se observa la banda se debe repetir la extracción (Fig. 5).

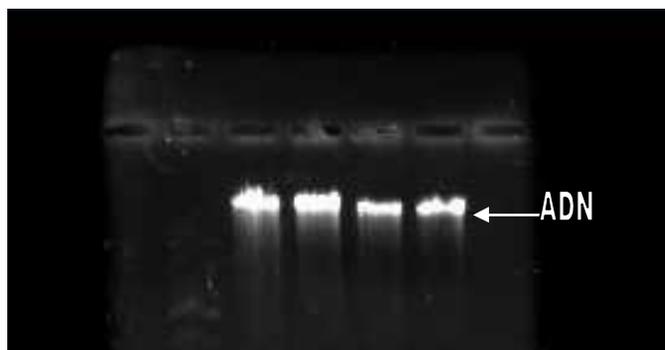


Figura 5. Extracción de ADN de las muestras S18, S34, S40 y S47. Las bandas se observan en el nivel de las 23,000 pares de bases (marcador Λ Hind III) , por lo que el ADN está presente.

Una vez comprobada la extracción se hizo una medición para conocer la cantidad exacta de ADN en cada una de las muestras. Dicha medición se realizó en el espectrofotómetro Bio Rad - Smart Spec Plus® en una celda translúcida o “cuveta” de 2ml con una dilución 1 en 1000 (2 μ l de muestra en 1,998 μ l de amortiguador de

elución o solución TE) con la finalidad de ajustar la concentración de ADN a 1ng/ml en cada una de las muestras por analizar.

3.3.2 Control Interno

Para elaborar el control interno se utilizó el plásmido Puc4k como vector, pues contiene el gen de resistencia a kanamicina que nos permitió la amplificación con los iniciadores para el ranavirus tipo 3 (FV3-kan). Una vez amplificado, se obtiene el fragmento control del ranavirus asociado con el gen de resistencia a kanamicina, los cuales se observan como una banda de aproximadamente 800 pares de bases al momento de realizar la electroforesis.

El plásmido puc4k se obtuvo de bacterias *E.coli* transformadas que se cultivaron en medio LB líquido y sólido posteriormente con kanamicina y ampicilina, para reproducirlas y obtener una cantidad adecuada para la extracción del plásmido por lisis alcalina. Una vez sembradas en placa (medio sólido), se tomaron 6 colonias para suspenderlas en 50ml de medio LB líquido con kanamicina y ampicilina (1mg/ml de cada antibiótico) y dejarlas crecer por 16 horas a 37°C (toda la noche u “overnight”). Al alcanzar esta etapa las bacterias se encuentran en crecimiento exponencial y es el momento ideal para realizar la extracción del plásmido por el método de Lisis alcalina.

3.3.2.1 Extracción de plásmido puc4k por lisis alcalina

La extracción se hizo siguiendo el protocolo midi descrito por Sanbrook en 2008 (Anexo 2). Una vez extraído el plásmido se comprobó su presencia por electroforesis (3914pb) y se juntó el contenido de las muestras que resultaron positivas en un solo tubo de 1.5ml (Figura 6).

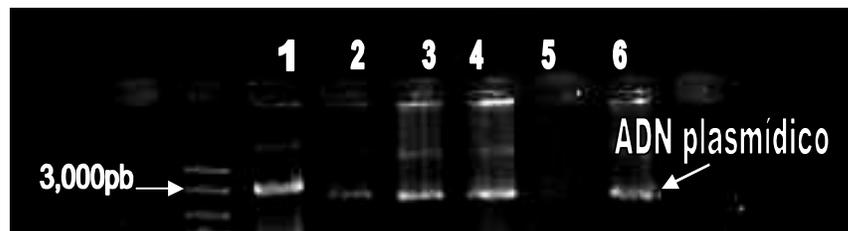


Figura 6. Comprobación por electroforesis de la extracción del plásmido puc4k. Se observan las bandas de 3000pb en 5 de los 6 carriles.

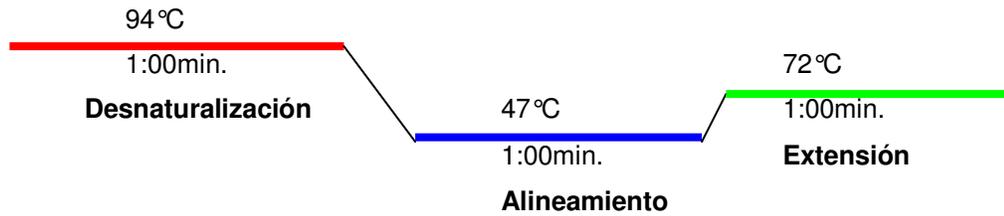
El plásmido puc4k aislado, se mantuvo en congelación (-15°C) para posteriormente correr un PCR con el plásmido y con los iniciadores FV3-kan que detectan el gen de resistencia a kanamicina. El resultado de este PCR es el fragmento de material genético que contiene el gen de FV3.

3.3.3 PCR

Para la identificación por PCR del ADN de iridovirus, específicamente del ranavirus 3, se amplificó un segmento del gen que codifica para la proteína de la cápside mayor o MPC (apH) de 500pb con las secuencias 5'-GACTTGCCACTTATGAC en sentido y 5'-GTCTCTGGAGAAGAAGAAT-3' en antisentido. Es una secuencia altamente conservada y específica para esta especie viral.

A cada tubo para PCR se le agregaban los siguientes elementos: 45µl de Super mix, 2µl de iniciador FV3- F, 2µl de iniciador FV3-R, 1µl de Control Interno y 1.5µl de muestra de ADN de tortuga marina (1ng/ml).

Los tubos para PCR se colocaban en el termociclador (Corbett CG1-96 ó Techne TC-312) y se corría el programa llamado FV que realizaba 3 ciclos repetidos 30 veces. El programa mantiene las siguientes constantes:



Las electroforesis se realizaron colocando en un gel de agarosa al 1%, un carril con 2 μ l de marcador Gene Ruler y un carril con 1.5 μ l de amortiguador de carga (1X) combinado con 1.5 μ l de la muestra amplificada por cada prueba que se quisiera comprobar. La electroforesis se realizó a 85V durante 40-45 minutos. Posteriormente se colocó el gel en una solución de bromuro de etidio (20 μ l/100ml) para tinción durante 10 minutos como mínimo. Al terminar la tinción se pasaban al fotodocumentador Bio Rad Gel doc XR para revelar con luz ultravioleta y capturar las imágenes obtenidas.

4. RESULTADOS

4.1 Bacteriología

De los hisopos cloacales se obtuvieron los resultados en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de los aislamientos bacteriológicos en muestras de cloaca de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) al momento del desove.

Número de muestra	Género	Especie	Abundancia relativa
1	**	-----	-----
2	**	-----	-----
3	**	-----	-----
4	**	-----	-----
5	**	-----	-----
6	**	-----	-----
7	**	-----	-----
8	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	++++
9	**	-----	-----
10	<i>Serratia</i>	<i>spp</i>	++++
11	<i>Enterobacter</i>	<i>spp</i>	++++
12	**	-----	-----
13	<i>Klebsiella</i>	<i>spp</i>	+
14	**	-----	-----
15	<i>Edwardsiella</i>	<i>ictaluri</i>	
16	**	-----	-----
17	<i>Butiauxella</i>	<i>ferrugutiae</i>	
18	<i>Serratia</i>	<i>entomophila</i>	
19	**	-----	-----
20	**	-----	-----
21	**	-----	-----
22	<i>Streptococcus</i>	<i>faecalis</i>	++
23	**	-----	-----
24	<i>Streptococcus</i> <i>Pseudomona</i>	<i>Grupo D</i> <i>aeruginosa</i>	+
25	**	-----	-----
26	**	-----	-----
27	**	-----	-----
28	**	-----	-----
29	<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Klebsiella</i>	<i>spp</i> <i>spp</i> <i>spp</i>	+++ ++++ +++
30	**	-----	-----
31	**	-----	-----
32	<i>Salmonella</i>	<i>spp</i>	+++
32	<i>Shigella</i>	<i>spp</i>	+++
33	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	+++++
34	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	+++++
35	**	-----	-----
36	**	-----	-----
37	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	+++
38	**	**	**
39	**	**	**

40	<i>Salmonella</i>	<i>spp</i>	++
41	**	-----	-----
42	**	-----	-----
43	<i>Salmonella</i>	<i>spp</i>	+++
44	<i>Salmonella</i>	<i>tiphy</i>	
45	**	-----	-----
46	<i>Pseudomona</i>	<i>aeruginosa</i>	**
47	<i>Pseudomona</i>	<i>aeruginosa</i>	**
48	<i>Yersinia</i>	<i>enterocolítica</i>	**
49	<i>Pseudomona</i>	<i>aeruginosa</i>	**
50	**	**	**

** Muestras negativas

De las 50 muestras se obtuvieron 19 con crecimiento bacteriano positivo, de las cuales se aislaron 13 géneros distintos que corresponden a enterobacterias. Las otras 31 no presentaron crecimiento bacteriano desde el cultivo primario, por lo cual fueron descartadas. Las muestras que no revelaron crecimiento a 30 o 37°C en un lapso de incubación de 72 horas fueron consideradas negativas.

4.2 Virología

Un control interno es un fragmento de ADN exógeno que amplifica bajo las mismas condiciones que nuestro fragmento objetivo. Se utiliza para comprobar que se lleve a cabo de manera adecuada la amplificación al momento de realizar un PCR. Esto permite darle validez a la prueba sin requerir de un control positivo.

Debido a que no contamos con la extracción previa de iridovirus en algún paciente con diagnóstico confirmado ni con algún otro método que nos permita utilizarlo como control positivo, fue necesario el uso de un control interno.

El fragmento de material genético obtenido por lisis alcalina puede ser usado como control interno de la prueba si los resultados, al ser comprobados por electroforesis, muestran una banda de 800pb, pues comprueba una amplificación del fragmento de interés en PCR's posteriores con las mismas constantes térmicas.

Al realizar el PCR se le agregó el control interno más la muestra clínica, de esta manera se comprueba que la amplificación se realizó correctamente al observar la banda de 800pb; se consideraría positiva la muestra para iridovirus al observar también una banda de 500pb que correspondería al amplificado de la secuencia que codifica para la proteína de la cápside mayor del ranavirus (Figura 7).

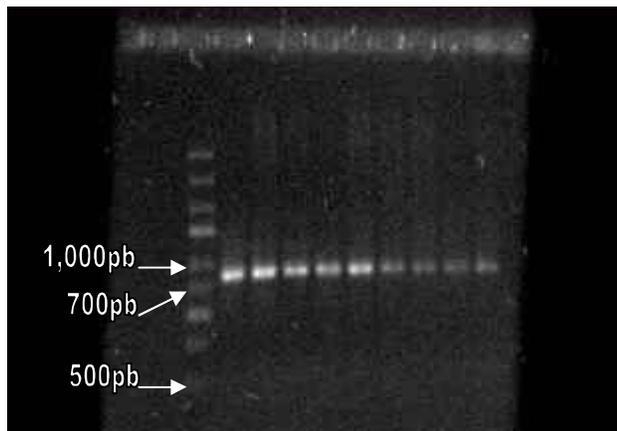


Figura 7. Electroforesis para comprobar la amplificación del PCR de las muestras S8-S11 y S16-S20. Se observan en todas las columnas bandas de 800pb pero ninguna de 500pb, lo cual indica que las muestras evaluadas fueron negativas para ranavirus.

De las 50 muestras de ADN que fueron evaluadas por medio de PCR ninguna mostró bandas de 500pb, todas mostraron únicamente las de 800pb, por lo tanto se consideran todas negativas para detección de ranavirus tipo 3.

5. DISCUSIÓN

Los estudios bacteriológicos pueden ayudar a determinar las condiciones generales de salud de un individuo cuando se trata de evaluar la presencia de una flora microbiana normal que se encuentra de manera constante en alguna cavidad específica de un individuo. En este caso, las tortugas marinas que presentan un estado de salud bueno, por lo general mantienen una flora bacteriana cloacal en presencia de las especies más comunes de manera equilibrada y sin signos de enfermedad. Para saber las especies que conforman la flora bacteriana normal de las tortugas marinas es necesario recurrir a resultados de investigaciones previas en poblaciones similares a las que se están estudiando, como referencias.

Los hallazgos del estudio bacteriológico en la población de tortugas golfinas de “La Escobilla”, Oaxaca, México coinciden con los resultados de varios estudios previos realizados en distintas especies de tortugas marinas, pues la mayoría de textos reportan el aislamiento de especies como *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Serratia*, *Edwardsiella* y otras (Jacobson *et.al.* 1991, Valentine *et al.* 2007, Santoro *et.al.*2006 y Foti *et.al.*2009) como parte de la flora bacteriana de tortugas marinas en las costas del Pacífico. Lo que nos lleva a concluir que encontramos las especies bacterianas más comúnmente reportadas identificadas en la cloaca de tortugas.

Sin embargo, es de llamar la atención el hecho de que se haya identificado *Salmonella spp.* en 5 de las muestras, pues, al ser una bacteria catalogada como patógena, genera la disyuntiva de si debe o no ser reportada como parte de la flora normal de algún reptil, incluyendo cualquier especie de tortuga. Jacobson y su equipo (1991) la mencionan como “una de las especies más comunes” encontradas en tortugas marinas, sin embargo, no se puede mencionar como parte de su flora normal.

En numerosos textos se menciona que algunas especies de tortugas de agua dulce como *Trachemis scripta elegans* o *Trionyx* pueden ser portadoras de *Salmonella spp.* como resultado de la infección desde etapas muy tempranas de su desarrollo, sin embargo no se considera como parte de su flora normal, sino que se mantiene una infección controlada de manera permanente y que en situaciones de inmunosupresión puede ocasionar cuadros severos de enfermedad (Bordeau,1988 y 1989).

Por todo esto, no podemos considerar a la *Salmonella spp.* en los hallazgos de este estudio como parte de la flora normal, sino mas bien como un hallazgo común que actúa como infección latente y controlada hasta que el individuo portador manifieste alguna situación que desencadene la enfermedad.

Otras especies potencialmente patógenas como *Yersinia* y *Pseudomona* también fueron aisladas, sin embargo es difícil que ocasionen cuadros de infección en animales poiquilotermos (Bordeau,1988 y 1989).

En relación a los objetivos del estudio, se logró el objetivo de determinar la flora cloacal obteniendo resultados que coinciden con los reportes previos, por lo que podemos decir que la flora se encuentra sin alteraciones relevantes y que al parecer no han manifestado cambios representativos en las especies que la conforman, lo que nos indica un estado general de equilibrio. En lo que respecta al ranavirus, se logró determinar que las tortugas muestreadas no presentan signos de infección por ranavirus tipo 3 y que tampoco la mantienen de manera latente, lo cual resulta favorable para la población de tortugas golfinas que desovan en la playa de “La Escobilla”, Oaxaca.

Por otro lado, por el hecho de que las tortugas en constante riesgo de entrar en contacto con aguas contaminadas, es muy importante el monitoreo frecuente

dirigido hacia las principales amenazas biológicas para la especie, como el ranavirus.

Afortunadamente, las tortugas monitoreadas resultaron negativas para la infección por ranavirus hasta la fecha del muestreo (agosto 2009), sin embargo no debemos considerar que la población se encuentra libre de la infección o fuera de riesgo, pues el número de casos no es representativo de la población, por lo que sería sumamente importante realizar muestreos mayores, constantes y aleatorios para verificar con más precisión si han entrado en contacto o no con tan peligroso agente patógeno, en cuyo caso requeriría de acciones drásticas para evitar mortandades masivas como las ocurridas previamente en otras especies. Tal es el caso de las tortugas “cajita” (*Terrapene carolina*) que sufrieron eventos de mortalidad masiva en Estados Unidos en los estados de Georgia en 1991, Texas en 1998 y en un santuario de Pennsylvania en 2004, en donde posteriormente fueron evaluados y resultaron positivos para ranavirus tipo 3. Considerando los hallazgos junto con la signología mostrada por los individuos afectados, se puede considerar a dicho agente como causa de muerte (Johnson *et. al.* 2008).

Es bien conocido que el ranavirus es una amenaza para anfibios y se ha comprobado como agente causal de mortalidades masivas, por lo cual se la ha dado mucha difusión al problema y se han implementado diferentes medidas de control, sin embargo, aún se desconoce si las tortugas marinas pueden ser afectadas de la misma manera, por lo que es indispensable realizar más estudios en función de conocer si pueden o no ser afectadas y si están o han estado en contacto con el agente para poder tomar nuevas medidas preventivas.

La propuesta para continuar esta línea de investigación sería la de muestrear de manera periódica y en números mayores a tortugas que se encuentren en la playa de La Escobilla, destacando que, en caso de encontrar animales enfermos o muertos sería indispensable tratar de determinar las causas de muerte a través de

pruebas de diagnóstico complementarias y de ser posible, de diagnóstico molecular para los agentes virales más importantes, como pudieran ser el herpesvirus o ranavirus tipo 3. Sería de gran importancia realizar una prueba de diagnóstico rápido y confiable para determinar la presencia de dichos agentes, pues en el presente estudio sólo se realizó el PCR como una herramienta para la detección de DNA viral pero no se planeó desarrollar una prueba diagnóstica, para lo cual hubiera sido necesario realizar una estandarización y determinar de manera precisa la sensibilidad de la prueba, así como su grado de confiabilidad.

Así mismo, se recomienda el monitoreo constante de la flora bacteriana de los individuos sanos en diferentes cavidades (oral, nasal y cloacal) para detectar cuáles son las especies más comunes y en un futuro identificar de manera oportuna algún cambio importante y reportarlo inmediatamente.

Hasta ahora no existen casos reportados de ranaviriosis en quelonios de nuestro país, sin embargo debemos estar alertas, pues si ya ha habido numerosos reportes en países vecinos y cuadros similares no confirmados, es probable que pudieran surgir los primeros casos (ver el apartado de revisión de literatura).

6. ANEXOS

6.1 Pasos para la extracción de ADN.

1. Colocar 30µl de proteasa (proteínasa K) en tubos de 1.5ml.
2. Añadir 300µl de muestra sanguínea. Vortex 15 segundos.
3. Agregar 300µl buffer AL (de lisis). Vórtex 15 segundos.
4. Incubar a 56 °C durante 30 minutos en baño maría.
5. Centrifugar 1 pulso (Microcentrífuga Hermle Z160M).
6. Colocar 300µl de etanol frío al 100%. Vórtex 15 segundos.
7. Centrifugar 1 pulso (Microcentrífuga Hermle Z160M).
8. Colocar la mezcla en la columna con el tubo colector de 2ml.
9. Centrifugar a 8000 RPM por 1 minuto. Descartar el filtrado. Repetir si es necesario hasta filtrar totalmente el contenido de la columna.
10. Añadir 500µl de amortiguador AW1.
11. Centrifugar a 8000 RPM por 1 minuto. Descartar el filtrado.
12. Agregar 500µl de amortiguador AW2.
13. Centrifugar a 14,000 RPM por 3 minutos.
14. Centrifugar a 14,000 RPM por 1 minuto.
15. Pasar la columna a un tubo de 2ml. Descartar filtrado.
16. Centrifugar a 14,000RPM por un minuto.
17. Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml y desechar el filtrado.
18. Agregar 100µl de amortiguador AE (de elusión) y reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
19. Centrifugar a 10,000 RPM durante 3 minutos.
20. Conservar a -20 °C.

6.2 Procedimiento para la extracción de plásmidos.

1. Centrifugar el cultivo en medio líquido a 14,000RPM por 10 minutos (6 tubos con 1.5ml cada uno).
2. Retirar el sobrenadante.
3. Suspender el sedimento en 200 μ l de solución I. Vórtex hasta que alcance una suspensión total.
4. Preparar la solución II al momento, mezclando NaOH 0.2N, SDS al 1% y agua destilada.
5. Agregar 400 μ l de solución II a cada tubo y mezclar suavemente (sin vórtex).
6. Incubar 1 a 2 minutos a -15°C .
7. Agregar 300 μ l de solución III fría y mezclar en vórtex lento.
8. Colocar a -15°C por 5 minutos.
9. Centrifugar a 12,000 RPM por 5 minutos y transferir el sobrenadante a otro tubo (Microcentrífuga Hermle Z160M).
10. Añadir un volumen de fenol-cloroformo y centrifugar a 12,000RPM por 12 minutos.
11. Transferir el sobrenadante a otro tubo.
12. Agregar dos volúmenes de etanol frío al 100%, homogenizar e incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
13. Centrifugar a 12,000 RPM por 5 minutos y retirar el sobrenadante por decantación o con pipeta muy cuidadosamente.
14. Secar la pastilla a temperatura ambiente.
15. Suspender en 30 μ l de solución TE y mantener en congelación.

7. REFERENCIAS

1. American Public Health Association et al. "Methods for the examination of water and wastewater". 15 edition. New York, APHA, 1981.
2. Benetka V., Grabensteiner E., Gumpenberger M., Neubauer C., Hirschmüller B., Möstl K. "First report of an iridovirus (Genus Ranavirus) infection in a Leopard tortoise (Geochelone pardalis pardalis)". Vet. Med. Austria / Wien. Tierärztl. Mschr. 94 (2007), 243 – 248.
3. Bourdeau P. "Pathologie des tortues 3e. partie: affections respiratoires, autres affections d'organs et thérapeutique" Le Point Vétérinaire. 21(119)1989, p. 45-62.
4. Bourdeau P. "Pathologie des tortues 2e. partie: affections cutanées et digestives" Le Point Vétérinaire. 20 (118)1988, p.871-874.
5. Brock T.D., Madigan M.T. "Microbiología" 2a. edición. Prentice Hall Hispanoamericana. México, 1993.
6. Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. "Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg" 18ª. Edición en español. Manual Moderno. México, 2004.
7. Cáceres-Martinez, J., and Vásquez-Yeomans, R. (2003). "Erosión branquial en el ostión japonés *Crassostrea gigas* y su relación con episodios de mortalidad masiva en el Noroeste de México". Bol. PRONALSA. March 2003, 15–19.
8. Chinchar, V. G., Essbauer, S., He, J. G., Hyatt, A, Miyazaki, T., Seligy, V. & Williams, T. (2005). "Iridoviridae. In "Virus Taxonomy: VIII Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses" (C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball, Eds.), pp. 163-175. Elsevier, London (ISBN: 0122499514).
9. Clark H.F., Karzon D.T. "Iguana Virus, a Herpes-Like Virus Isolated from Cultured Cells of a Lizard, *Iguana iguana*" Infection and Immunity Journal Vol. 5, No. 4, Apr. 1972, p. 559-569
10. Currie S.S., Brown D.R., Gaskin J.M., Jacobson E.R., Ehrhart L.M., Blahak S., Herbst L. H., Klein P.A. "Persistent Infectivity of a Disease-Associated Herpesvirus in Green Turtles after Exposure to Seawater". Journal of Wildlife Diseases, 36(4), 2000, pp. 792–797.
11. Eckert, K. L., K. A. Bjorndal, F. A. Abreu- Grobois y M. Donnelly (Editores). 2000. "Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas". Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4.

12. "Fibropapillomas in Marine Turtles: A Workshop at the 18th Annual Symposium on Biology and Conservation of Sea Turtles". *Marine Turtle Newsletter* 82:10-12. 1998.
13. Fowler, M.E "Zoo & wild animal medicine" Current therapy 3. W.B Saunder Company. U.S.A., 1993.
14. Foti M., Giacobello C., Bottari T., Fisichella V., Rinaldo D. and Mammina C. "Antibiotic Resistance of Gram Negatives isolates from loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the central Mediterranean Sea". *Marine Pollution Bulletin*.V. 58, No.9, 2009, p.1363-1366.
15. Gámez V.S., García M.L.J., Osorio S.D., Vázquez G.J.L., Constantino C.F. "Patología de las tortugas marinas (*Lepidochelys olivacea*) que arribaron a las playas de Cuyutlán, Colima, México" *Veterinaria México*,40(1)2009. p.69-78.
16. Girling S.J., Raiti P. "Manual of Reptiles" 2nd. Ed. British Small Animal Veterinary Association (BSAVA). USA, 2004.
17. Hoff G.L., Frye F.L. "Diseases of amphibians and reptiles" Plenum Press. New York, U.S.A, 1984.
18. Hope K. V., Harms C.A., Cadenas M.B., Birkenheuer A.J., Marr H.S., Braun-McNeill J., Maggi R.G., Breitschwerdt E.B. "Bartonella DNA in Loggerhead Sea Turtles". *Emerging infectious diseases*. Vol. 13 No. 6. Junio 2007.
19. Jacobson E.R. "Infectious diseases and pathology of reptiles. Color atlas and text". CRC Press. USA, 2007.
20. Johnson K.A., Sierra J.L., Erosa A.I. "Un tesoro de la naturaleza: Las tortugas marinas". EDAMEX, México, 1993.
21. Johnson A. J., Pessier A. P. and Jacobson E. R. "Experimental Transmission and Induction of Ranaviral Disease in Western Ornate Box Turtles (*Terrapene ornata ornata*) and Red-Eared Sliders (*Trachemys scripta elegans*)" *Veterinary Pathology* 44:3 (2007) pág. 285.
22. Lutz P.L., Musick J.A., Wyneken J. "The biology of sea turtles. Volume II" CRC press. USA, 2003.
23. Mader D.R., "Reptile medicine and surgery" Saunders Elsevier. Canada, 2006.
24. Márquez René "Las tortugas marinas y nuestro tiempo" Fondo de Cultura Económica. México, 1996.
25. Mc Arthur S., Wilkimson R., Meyer J. "Medicine and surgery or tortoises and turtles" Blackwell Publishing. Oxford,UK. 2004.

26. Montilla F.J.A., Hernández R. J.L., Alvarado A. M.C. "Valores hematológicos de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) presente en la Alta Guajira, Venezuela". Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XVI, N° 3, 219 - 226, 2006.
27. Mujeriego, R. "Manual Práctico de Riego con Agua Residual Municipal Regenerada". Ediciones de la Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona,1990.
28. Muñoz Gutiérrez Juan Francisco. "Determinación de la presencia de ADN de Herpesvirus en muestras de fibropapiloma de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), del campamento tortuguero la "Escobilla", Oaxaca." Tesis para obtener el título de MVZ. México, 2009.
29. Orós J., Lackovich J.K., Jacobson E.R., Brown D.R., Torrent A., Tucker S., Klein P.A. "Fibropapilomas cutáneos y fibromas viscerales en una tortuga verde (*Chelonia mydas*)" Rev. Esp.Herp. (1999)13: 17-26.
30. Pelczar M.J. Jr., Reid R. D. "Microbiología" 2ª.edición. McGraw-Hill. México, 1982.
31. Piñera-Pasquino L. "Patterns of antibiotic resistance in bacteria isolated from marine turtles". Tesis para obtención de grado de Maestría en Estudios Ambientales. USA, Abril,2006.
32. Santoro M., Hernandez G., Caballero M., García F. "Aerobic bacteria flora of nesting green turtles (*Chelonia mydas*) from Tortuguero National National park, Costa Rica". Journal of Zoo & Wildlife Medicine. 2006. 37(4)549-552.
33. Santoro M., Orrego C.M., Hernández G.G. "Flora bacteriana cloacal y nasal de *Lepidochelys olivacea* (Testudines: Cheloniidae) en el pacifico norte de Costa Rica." Universidad de Costa Rica. Publication Date: 01-MAR-06.
34. Specter S., Hodinka R.L., Young S.A. "Clinical Virology Manual" ASM Press. Washington, USA, 2000.
35. Turner P.C. McLennan A.G., Bates A.D., White M.R.M. "Molecular biology" 2nd. Edition. Bios Springer. UK,2000.
36. Wyneken J., Godfrey M.H., Bels V. "Biology of turtles" CRC press. USA, 2008.

8. APÉNDICES

8.1 Lista de figuras

Figura 1. Ubicación de playa “La Escobilla”, Oaxaca, México.

Figura 2. Identificación anatómica de tortugas golfinas.

Figura 3. Estructura de los iridovirus.

Figura 4. Sitio de extracción de muestra sanguínea en tortugas marinas.

Figura 5. Extracción de ADN de muestras S18,S34, S40 y S47.

Figura 6. Comprobación por electroforesis de la extracción del plásmido puc4k.

Figura 7. Electroforesis para comprobar la amplificación del PCR de las muestras S8-S11 y S16-S20.

8.2 Lista de tablas

Tabla1. Resultados de los aislamientos bacteriológicos en muestras de cloaca de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) al momento del desove.