



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**Detección de *Salmonella* spp. en huevos no eclosionados de tortuga golfina
(*Lepidochelys olivacea*) del pacífico sur mexicano**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA

MVZ RAÚL MELÉNDEZ ARMAS

TUTOR:

MC JOSÉ RAMÍREZ LEZAMA

Departamento de Patología: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM

COMITÉ TUTORAL:

DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ

Laboratorio de Microbiología Molecular; Departamento de Microbiología e Inmunología: Facultad de
Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM

DRA. OLIVIA RODRÍGUEZ MORALES

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"
Departamento de Microbiología e Inmunología: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM

ASESOR TÉCNICO:

MC SALVADOR EDUARDO ACEVEDO MONROY

Laboratorio de Microbiología Molecular; Departamento de Microbiología e
Inmunología: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

MARZO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 Mayra por ser mi motivo constante de alegría y regalarme los mejores momentos de mi vida
A mi mamá y a mi papá porque me siguen impulsando a soñar y lograr mis objetivos
A mis hermanos y a mi sobrina por recordarme el lugar a donde pertenezco
A Tito, Chimi, Chuy y Gatito por su amor y lealtad incondicional*

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México por darme esta gran oportunidad.

A mi tutor MC José Ramírez Lezama por su calidad humana, respeto y confianza. Los recursos, su conocimiento y el tiempo para la realización de este trabajo fueron fundamentales para su conclusión. Al Dr. Antonio Verdugo Rodríguez por otorgarme los recursos y herramientas en el Laboratorio de Microbiología Molecular además de compartir su experiencia y conocimiento conmigo.

A la Dra. Olivia Rodríguez Morales por el profesionalismo que me transmitió, por todos sus consejos y el tiempo dedicado a la mejora de este trabajo.

Al MC Salvador Eduardo Acevedo Monroy por ser uno de los primeros en creer en esta investigación, su visión, experiencia y guía en toda la metodología fueron muy importantes en el trabajo.

A los departamentos de Patología y Microbiología e inmunología de la FMVZ-UNAM por todas las facilidades otorgadas.

Al MVZ Carlos Salas por contactarme con los responsables de las playas tortugueras, su hospitalidad, recomendaciones y experiencia con tortugas marinas fueron de gran valor para la metodología.

A la Dra. Adriana Laura Sarti Martínez por compartir su amplia experiencia en tortugas marinas para el diseño del trabajo y por la guía proporcionada para obtener los permisos correspondientes.

A los coordinadores o directores de cada uno de los sitios de muestreo por su hospitalidad, las facilidades otorgadas para llegar a los sitios de muestreo, así como su asesoría para la toma de las muestras: Biól. Enrique Ocampo (ANP SANT Playa de Tierra Colorada), Biól. Rosario Juárez (RPC Playa Tortuguera Cahuitán), Biól. Edda Carolina González (ANP PN Lagunas de Chacahua), Biól. Ivon Marcela Chacón (CMT), Biól. Dennis Bermúdez (CMT), Biól. Erika Peralta (ANP SANT Playa de Escobilla), Biól. Alejandro Tavera (RPC Playa Tortuguera Barra de la Cruz).

A mi Mamá y a mi Papá por acompañarme en esta gran aventura.

A mi jurado la Dra. Xochitl Vega, el Dr. Ricardo Oropeza y el Dr. Guillermo Valdivia por el tiempo y las observaciones para mejorar el trabajo.

A la MC Larisa Chávez Soriano por sus consejos y gentil atención

A la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y a la Dirección General de Vida Silvestre por conceder el permiso de colecta científica correspondiente.

Al Centro Mexicano de la Tortuga (CMT) por permitir desarrollar este trabajo en los sitios de muestreo que se encuentran bajo su cargo.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Molecular por su disposición y consejos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 TORTUGA GOLFINA (<i>Lepidochelys olivacea</i>) Y SU REPRODUCCIÓN.....	10
1.2 ESTADO DE CONSERVACIÓN.....	11
1.3 SALMONELOSIS EN REPTILES.....	11
1.4 TRANSMISIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. EN TORTUGAS.....	12
1.5 TRANSMISIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. EN EL HUEVO DE TORTUGA GOLFINA (<i>Lepidochelys olivacea</i>).....	13
1.6 PATOGENICIDAD DE <i>Salmonella</i> spp. EN REPTILES.....	13
1.7 EPIDEMIOLOGÍA DE <i>Salmonella</i> spp. EN TORTUGAS.....	14
1.8 DIAGNÓSTICO DE <i>Salmonella</i> spp. EN REPTILES.....	14
1.9 ANTECEDENTES.....	15
2. JUSTIFICACIÓN.....	16
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVOS.....	16
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	16
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
5.1 SITIOS DE MUESTREO.....	17
5.2 IDENTIFICACIÓN Y REVISIÓN DE LOS NIDOS.....	18
5.3 POBLACIÓN MUESTRA.....	18
5.4 TOMA DE MUESTRAS.....	19
5.5 AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO DE <i>Salmonella</i> spp. DE LOS HUEVOS NO ECLOSIONADOS.....	21
5.5.1 Preenriquecimiento y enriquecimiento selectivo.....	21
5.5.2 Aislamiento en medios de cultivo selectivos.....	22
5.5.3 Identificación con pruebas bioquímicas.....	22
5.6 DETECCIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. por PCR.....	23
5.6.1 Preparación de la muestra control.....	23
5.6.2 Extracción de ADN de las muestras en RV y Se.....	23
5.6.3 Iniciadores.....	23
5.6.4 PCR.....	24
5.6.5 Electroforesis.....	24
5.7 ESTUDIO PATOLÓGICO DE LOS EMBRIONES.....	24
5.7.1 Examen macroscópico externo e interno.....	24
5.7.2 Examen histopatológico.....	25
5.8 PERMISO DE COLECTA CIENTÍFICA Y DECLARACIÓN DE ÉTICA.....	25
5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
6. RESULTADOS.....	26
6.1 RESULTADOS POR CULTIVO BACTERIOLÓGICO.....	26
6.1.1 Resultados por cultivo bacteriológico del ANP SANT Playa de Tierra Colorada.....	28
6.1.2 Resultados por cultivo bacteriológico de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán.....	29

6.1.3	Resultados por cultivo bacteriológico del ANP SANT Playa de Escobilla.....	30
6.1.4	Resultados por cultivo bacteriológico de la RPC PLAYA Tortuguera Barra de la Cruz.....	31
6.1.5	Resultados por cultivo bacteriológico del ANP PN Lagunas de Chacahua.....	32
6.1.6	Resultados por cultivo bacteriológico de los 63 HNE.....	32
6.2	RESULTADOS POR PCR.....	34
6.2.1	Resultados por PCR del ANP SANT Playa de Tierra Colorada.....	34
6.2.2	Resultados por PCR de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán.....	35
6.3	RESULTADOS DEL ESTUDIO PATOLÓGICO.....	36
6.3.1	Resultados del estudio patológico del ANP SANT Playa de Tierra Colorada.....	36
6.3.2	Resultados del estudio patológico de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán.....	39
6.3.3	Resultados del estudio patológico del ANP SANT Playa de Escobilla.....	41
6.3.4	Resultados del estudio patológico de la RPC Playa Tortuguera Barra de la Cruz.....	43
6.3.5	Resultados del estudio patológico del ANP PN Lagunas de Chacahua....	45
6.3.6	Nefrocalcinosis.....	47
6.3.7	Celomitis.....	48
6.3.8	Dermatitis.....	48
6.3.9	Hepatitis.....	48
6.3.10	Malformaciones congénitas.....	48
7.	DISCUSIÓN.....	49
8.	CONCLUSIONES.....	59
9.	PROSPECTIVA.....	60
10.	REFERENCIAS.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Sitios de muestreo.....	17
Figura 2.	Limpieza del nido.....	20
Figura 3.	Revisión de características físicas de los huevos.....	20
Figura 4.	Selección de huevos.....	20
Figura 5.	Crías encontradas vivas de los nidos seleccionados.....	20
Figura 6.	Liberación de crías.....	20
Figura 7.	Preparación del área de trabajo.....	20
Figura 8.	Embrión de tortuga golfina (<i>L. olivacea</i>).....	21
Figura 9.	Toma de muestras de órganos.....	21
Figura 10.	Embrión en formol al 10%.....	21
Figura 11.	PCR de los HNE del ANP SANT Playa de Tierra Colorada.	34
Figura 12.	PCR de los HNE de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán.....	35
Figura 13.	Embrión #11 del ANP SANT Playa de Tierra Colorada en EDE tardía.....	37
Figura 14.	Embrión #2 del ANP SANT Playa de Tierra Colorada con ciclopía y albinismo..	37
Figura 15.	Embrión #15 del ANP SANT Playa de Tierra Colorada con ciclopía y albinismo. <i>Salmonella</i> spp. (+).....	37
Figura 16.	Fotomicrografía del embrión #7 de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán.....	39
Figura 17.	Fotomicrografía del embrión #13 de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán.....	39
Figura 18.	Fotomicrografía del embrión #13 de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán.....	39

Figura 19. Embrión #3 del ANP SANT Playa de Escobilla en etapa temprana.....	41
Figura 20. Embriones gemelares idénticos del HNE #1 del ANP SANT Playa de Escobilla...	41
Figura 21. Fotomicrografía del embrión del HNE #5 del ANP SANT Playa de Escobilla.....	41
Figura 22. Fotomicrografía del embrión #6 de la RPC Playa Tortuguera Barra de la Cruz...	43
Figura 23. Fotomicrografía del embrión #9 de la RPC Playa Tortuguera Barra de la Cruz...	43
Figura 24. Fotomicrografía del embrión #12 de la RPC Playa Tortuguera Barra de la Cruz...	43
Figura 25. Embrión #3 con arrinia y albinismo del ANP PN Lagunas de Chacahua.....	45
Figura 26. Embrión #4 con arrinia, anoftalmia y albinismo del ANP PN Lagunas de Chacahua	45
Figura 27. Fotomicrografía del embrión #1 del ANP PN Lagunas de Chacahua.....	45
Figura 28. Fotomicrografía del embrión #1 del ANP PN Lagunas de Chacahua (Gram).....	46
Figura 29. Fotomicrografía del embrión #4 del ANP PN Lagunas de Chacahua.....	46

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sitios de muestreo y localización.....	17
Cuadro 2. Iniciadores reportados para la identificación de <i>Salmonella</i> spp.....	23
Cuadro 3. Reactivos y cantidad utilizada para la reacción de PCR.....	24
Cuadro 4. Cantidad de muestras colectadas y nidos aprovechados por sitio de muestreo.....	26
Cuadro 5. Géneros bacterianos aislados a partir de albumen, vitelo y mezcla de órganos de los 63 HNE colectados.....	27
Cuadro 6. Número de aislados identificados en los diferentes medios de cultivo provenientes del ANP SANT Playa de Tierra Colorada.....	28
Cuadro 7. Número de aislados identificados en los diferentes medios de cultivo provenientes de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán.....	29
Cuadro 8. Número de aislados identificados en los diferentes medios de cultivo provenientes del ANP SANT Playa de Escobilla.....	30
Cuadro 9. Número de aislados identificados en los diferentes medios de cultivo provenientes de la RPC Playa Tortuguera Barra de la Cruz.....	31
Cuadro 10. Número de aislados identificados en los diferentes medios de cultivo provenientes del ANP PN Lagunas de Chacahua.....	32
Cuadro 11. Bacterias aisladas con mayor frecuencia.....	33
Cuadro 12. Resultados positivos a <i>Salmonella</i> spp. por PCR.....	36
Cuadro 13. Examen patológico de embriones del ANP SANT Playa de Tierra Colorada.....	38
Cuadro 14. Examen patológico de embriones de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán.....	40
Cuadro 15. Examen patológico de embriones del ANP SANT Playa de Escobilla.....	42
Cuadro 16. Examen patológico de embriones de la RPC Playa Tortuguera Barra de la Cruz.	44
Cuadro 17. Examen patológico de embriones del ANP PN Lagunas de Chacahua.....	47

ANEXOS

Anexo 1. PCR de los HNE #5 y #6 provenientes del ANP SANT Playa de Tierra Colorada....	76
Anexo 2. PCR de los HNE #7 y #8 provenientes del ANP SANT Playa de Tierra Colorada....	76
Anexo 3. PCR de los HNE #10 y #11 provenientes del ANP SANT Playa de Tierra Colorada...	77
Anexo 4. PCR del HNE #15 proveniente del ANP SANT Playa de Tierra Colorada.....	77
Anexo 5. PCR del HNE #1 proveniente de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán.....	78
Anexo 6. PCR del HNE #6 y #7 provenientes de la RCP Playa Tortuguera Cahuitán.....	78
Anexo 7. PCR del HNE #8 y #9 provenientes de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán.....	79

RESUMEN

Detección de *Salmonella* spp. en huevos no eclosionados de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) del pacífico sur mexicano; Meléndez Armas Raúl; Ramírez Lezama José; Verdugo Rodríguez Antonio; Rodríguez Morales Olivia.

La tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) es una especie en peligro de extinción que anida en las costas de México. En el tema reproductivo, para lograr la recuperación y manejo de su población es importante determinar los factores que afectan su éxito de eclosión. En huevos de tortugas se ha demostrado que *Salmonella* spp. se transmite de forma vertical. Esta bacteria puede localizarse en alguna estructura particular del huevo como el cascarón, el albumen, el vitelo o el embrión al transmitirse durante las diferentes fases de su formación en el aparato reproductor de la hembra. El objetivo de este trabajo es detectar *Salmonella* spp. mediante aislamiento bacteriológico y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en huevos no eclosionados de tortuga golfina (*L. olivacea*) para estudiar si se asocia a muerte embrionaria. Se obtuvieron 63 huevos no eclosionados de 24 nidos ubicados en corrales de incubación de cinco playas del pacífico sur mexicano en la temporada de anidación del 2019. Se recolectaron muestras de albumen, vitelo, embriones y una mezcla de órganos. En el cultivo bacteriológico con medios selectivos no se aisló *Salmonella* spp. pero se obtuvieron siete géneros bacterianos Gram negativos. Se utilizó PCR para la amplificación de un fragmento de 285 pb del gen *invA* de *Salmonella* spp.; se detectó el 12.7% (8 de 63) de huevos no eclosionados de tortuga golfina (*L. olivacea*) positivos a esta bacteria en al menos una de las muestras de albumen, vitelo o conjunto de órganos. En los embriones estudiados la mineralización renal (10.9%) fue la principal lesión encontrada seguida de la celomitis (5%), la hepatitis necrótica (1.6%), y la dermatitis (1.6%); se encontraron cinco embriones con malformaciones congénitas (10%). Existen diferentes factores que podrían haber interferido en el aislamiento de *Salmonella* spp. a partir de las muestras colectadas de los huevos no eclosionados como los factores antimicrobianos propios del huevo, competencia microbiana o factores medioambientales. Las lesiones pueden estar relacionadas a etiología tóxica, nutricional, hipoxia o por microorganismos oportunistas. A diferencia del cultivo bacteriológico, la PCR fue el método diagnóstico que permitió la detección de *Salmonella* spp.; por lo que, la identificación molecular se puede considerar el método de elección para la detección en muestras derivadas de los huevos de tortuga marina. Estos resultados pueden contribuir a fortalecer el desarrollo de más estrategias de manejo y conservación para esta y otras especies de tortugas además de informar sobre el riesgo potencial en salud pública por la presencia de *Salmonella* spp. y otras bacterias zoonóticas en los huevos de esta especie de tortuga marina.

ABSTRACT

Detection of *Salmonella* spp. in unhatched eggs of olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) from the Mexican South Pacific; Meléndez Armas Raúl; Ramírez Lezama José; Verdugo Rodríguez Antonio; Rodríguez Morales Olivia.

The olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) is an endangered species that nests off the coasts of Mexico. On the reproductive issue, to achieve the recovery and management of their population it is important to determine the factors that affect its hatching success. In turtle eggs it has been shown that *Salmonella* spp. is transmitted vertically. This bacterium can be located in a particular structure of the egg such as the shell, the albumen, the yolk or the embryo when it is transmitted during the different phases of its formation in the female reproductive system. The objective of this work is to detect *Salmonella* spp. by means of bacteriological isolation and polymerase chain reaction (PCR) in unhatched olive ridley sea turtle (*L. olivacea*) eggs to determinate whether it is associated with embryonic death. 63 unhatched eggs were obtained from 24 nests located in incubation pens on five beaches of the Mexican South Pacific in the 2019 nesting season. Samples of albumen, yolk, embryos and set of organs were collected. In the bacteriological culture with selective media, *Salmonella* spp. was not isolated but seven Gram negative bacterial genera were obtained. PCR was used for the amplification of a 285 bp fragment of the *Salmonella* spp *invA* gene; 12.7% (8 of 63) of unhatched olive ridley sea turtle (*L. olivacea*) eggs were detected positive for this bacterium in at least one of the albumen, yolk or set of organ samples. In the embryos studied, renal mineralization (10.9%) was the main lesion found, followed by coelomitis (5%), necrotic hepatitis (1.6%), and dermatitis (1.6%); Five embryos with congenital malformations were found (10%). There are different factors that could have interfered with the isolation of *Salmonella* spp. from the samples collected from the unhatched eggs such as the antimicrobial factors of the egg, microbial competition or environmental factors. The lesions may be related to a toxic, nutritional, hypoxic etiology or opportunistic microorganisms. Unlike bacteriological culture, PCR was the diagnostic method that allowed the detection of *Salmonella* spp.; therefore, molecular identification can be considered the method of choice for detection in samples derived from sea turtle eggs. These results may contribute to strengthening the development of more management and conservation strategies for this and other species of turtles, as well as informing about the potential risk to public health due to the presence of *Salmonella* spp. and other zoonotic bacteria in the eggs of this species of sea turtle.

1. INTRODUCCIÓN

Durante el siglo XX se presentó un incremento en la comercialización intensiva de los productos de tortuga marina como huevos, carne, caparazón, aceite y piel. Debido a las prácticas de extracción no sustentables se ha provocado una disminución de la población mundial de todas las especies, y en consecuencia, se han desarrollado programas de conservación con el objetivo principal de prevenirlas de su extinción (Eckert et al., 2000). En México pueden encontrarse seis de las siete especies existentes a nivel mundial de tortugas marinas, por lo que nuestro país es reconocido en el ámbito de la biología y conservación de estas especies. Debido a las amenazas y estado de sus poblaciones se iniciaron trabajos de conservación desde los años sesenta en las playas de anidación del país (Márquez, 1996).

1.1 TORTUGA GOLFINA (*Lepidochelys olivacea*) Y SU REPRODUCCIÓN

La tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) es considerada la tortuga marina más abundante del mundo con un amplio rango de distribución en aguas tropicales y subtropicales (Eckert et al., 2000). En México anida en toda la costa del pacífico mexicano principalmente en las playas de los estados de Oaxaca y Guerrero. Su temporada de anidación abarca desde julio a enero con su pico de anidación en septiembre y octubre; sin embargo, las anidaciones pueden ocurrir durante todo el año. Una hembra deposita en cada nidada alrededor de 100 huevos, los cuales tardan 45 días en promedio en eclosionar. Esta especie se caracteriza por un comportamiento de anidación de forma solitaria y por anidación en arribada, característica particular del género *Lepidochelys* donde se presenta la conformación de grandes concentraciones de hembras anidando en condiciones limitadas de tiempo y espacio (Abreu et al., 2016; SEMARNAT, 2018).

Dentro de los principales objetivos para lograr la recuperación y manejo de las poblaciones de tortugas marinas se encuentra la investigación sobre la biología de reproducción y anidación, siendo una de sus prioridades determinar el éxito de eclosión y los factores que lo afectan (Richardson, 2000). Con tal fin se realizan acciones dedicadas a la protección y seguimiento de nidos *in situ*, que son aquellos que permanecen en el lugar donde desovó la tortuga y de nidos colocados en un sitio diferente al lugar donde desovó la tortuga, por ejemplo, en corral o vivero (SEMARNAT, 2013). En la tortuga golfina (*L. olivacea*) el éxito de eclosión es variable entre la anidación en arribada, anidación solitaria o incubación en corral, por lo tanto, es una preocupación por la conservación mundial de la especie (Bézy et al., 2015). El éxito de eclosión de los reptiles ovíparos depende de una interacción entre las características bióticas y abióticas de la anidación para un desarrollo embrionario exitoso. Los datos actuales sugieren que el bajo éxito de eclosión puede estar

asociado con la abundancia de microorganismos como bacterias y hongos que pueden estar presentes en la arena de los nidos, oviducto de la hembra infectada, durante la deposición del huevo al contaminarse por heces, en las mareas que hacen contacto con los nidos, por el contacto con vertebrados e invertebrados plaga o por las malas prácticas de higiene en la reubicación de nidos a corral o vivero. Todos estos factores se ven estimulados principalmente por la alta densidad de tortugas en la anidación por arribada, que trae como consecuencia, un bajo éxito de eclosión; sin embargo, las causas y efectos principales pueden ser difíciles de determinar (Bézy et al., 2015; Keene et al., 2014; Swiggs et al., 2018; Wyneken et al., 1988).

1.2 ESTADO DE CONSERVACIÓN

Actualmente la tortuga golfina (*L. olivacea*) está clasificada como especie “en peligro de extinción” de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010), en el Apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, 2021) y clasificada como “vulnerable” en la Lista Roja de la Unión Mundial de la Conservación (IUCN, 2008).

1.3 SALMONELOSIS EN REPTILES

Se ha reportado que los reptiles son portadores de *Salmonella* spp. (Kaufmann & Morrison, 1966; Lamm et al., 1972), una bacteria perteneciente a la familia de las enterobacterias, la cual se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo, aerobio o anaerobio facultativo, no esporulado, generalmente lactosa negativo y móvil (Barrow & Feltham, 1993). Incluye dos especies: *S. bongori* y *S. enterica*, la cual se subdivide en seis subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI) de las que se han reconocido más de 2500 serovariedades (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014). La salmonelosis es una enfermedad infecciosa que afecta a mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces. Es una de las zoonosis más importantes asociada principalmente al consumo de alimentos contaminados de origen animal crudos o poco cocidos o también por la higiene deficiente durante la interacción del ser humano con reptiles (Kaufmann et al., 1972; Kaufmann & Morrison, 1966; Lamm et al., 1972). En el ser humano puede provocar gastroenteritis, pero también puede existir bacteriemia e infección sistémica principalmente en individuos inmunosuprimidos o inmunocomprometidos: bebés y niños menores de 5 años, ancianos y personas con tratamiento inmunosupresor o enfermedad inmunosupresora (Bosch et al., 2016; Braun et al., 2015; Johnson-Delaney & Gal, 2019; Lamm et al., 1972; Pasmans et al., 2013).

Estudios han demostrado que, en algunas colecciones de reptiles, más del 93% de los animales pueden albergar *Salmonella* spp. y tanto *S. bongori* como *S. enterica*, sus subespecies y

serotipos, pueden encontrarse en reptiles, y aunque algunos serotipos son específicos del hospedador como, por ejemplo, *S. Java* y *S. Urbana* en las tortugas, todos los serotipos dentro de *S. enterica* deben considerarse como patógenos potenciales para animales y humanos. De las seis subespecies de *S. enterica*, las subespecies IIIa y IIIb se asocian más comúnmente con reptiles silvestres y cautivos. La subespecie I, especialmente los serovares Poona, Java, Pomona, Newport, Saintpaul y Muenchen, también están asociados con reptiles cautivos. En los estudios de reptiles silvestres se sugiere que la infección puede ser menos frecuente. En seres humanos la subespecie I de *S. enterica* está más fuertemente relacionada con enfermedad, pero los serovares más patógenos como Typhimurium y Enteritidis, generalmente están asociados con alimentos y no con reptiles (Gal & Johnson-Delaney, 2019; Gay et al., 2014; Johnson-Delaney & Gal, 2019).

1.4 TRANSMISIÓN DE *Salmonella* spp. EN TORTUGAS

En tortugas *Salmonella* spp. se transmite principalmente de forma horizontal por la vía oral-fecal, pero se ha demostrado que también se transmite de forma vertical; la bacteria puede penetrar los huevos por lo que las crías pueden estar infectadas desde su incubación (Feeley & Treger, 1969). Se considera que *Salmonella* spp. puede localizarse en alguna estructura particular del huevo como el cascarón, el albumen o clara, el vitelo o yema o en el embrión al transmitirse durante las diferentes fases de su formación en el aparato reproductor de la hembra, ya que si la madre estaba infectada sistémicamente con *Salmonella* spp. o con otras bacterias u hongos se podrían transmitir estos agentes a los huevos; además, de forma experimental se ha demostrado la capacidad de la bacteria para atravesar una o todas las estructuras de huevos de tortuga (Al-Bahry et al., 2009; Chiodini, 1982; Feeley & Treger, 1969; Holgersson et al., 2016). En diferentes especies de tortugas se ha comprobado principalmente la presencia de *Salmonella* spp. y otras bacterias Gram negativas patógenas u oportunistas en: heces (Corrente et al., 2004), huevo (Ayala, 1991; D'aoust et al., 1990; Keene, 2012), cloaca (Aguilar, 2011; Constantino, 2011), líquido cloacal (Keene et al., 2014; Navas, 2013), órganos como intestino, hígado, bazo o pulmón (González et al., 2005; Hill et al., 2019; Pasmans et al., 2002, 2003), otras partes del cuerpo (Gaertner et al., 2008; Santoro, et al., 2006a, 2006b), en el medio ambiente del reptil (Bauwens et al., 2006; D'aoust et al., 1990) como en la arena (Keene et al., 2014); sin embargo, se conoce poco sobre la presencia de *Salmonella* spp. en el embrión y su asociación directa sobre el éxito de eclosión.

1.5 TRANSMISIÓN DE *Salmonella* spp. EN EL HUEVO DE TORTUGA GOLFINA (*Lepidochelys olivacea*)

La composición del huevo de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) fue estudiada por Mora-Castro et al. (1997) quienes reportaron que la alta humedad en cada una de sus estructuras como el cascarón, clara y yema, en comparación con el huevo de gallina (*Gallus domesticus*), probablemente lo haga más susceptible a la contaminación microbiana. El huevo del reptil presenta un cascarón con diferentes funciones: separa y protege el embrión en desarrollo de su entorno, modula el movimiento de agua y gases dentro y fuera del huevo y sirve como fuente de calcio para el embrión en desarrollo (Sahoo et al., 1998; Zhou et al., 2011). El cascarón del huevo de tortuga marina se conforma de una capa exterior inorgánica y calcárea compuesta de una forma de carbonato de calcio llamado aragonita, formada por unidades nodulares, dispuestas de forma irregular con espacios abiertos, y una capa orgánica subyacente constituida por la membrana del cascarón o membrana testacea con fibras enredadas y densas de espesor variable. No hay cutícula en el exterior del huevo, ni una estructura de poros distintiva (Sahoo et al., 1996, 2010). Las modificaciones en la composición y estructura pueden ser causadas por lixiviación, humedad externa, abrasión por partículas de suelo, degradación microbiana extrínseca o características intrínsecas propias de la especie o derivadas de la nutrición de la hembra (Ferreira et al., 2016; Mine, 1995). Aunque el cascarón de los huevos de tortuga no poseen el mismo sistema de poros que el cascarón del huevo de gallina su estructura le confiere mayor permeabilidad y por ende una mayor velocidad de descomposición (Castro-González & Pérez-Gil, 2011; Mora-Castro et al., 1997; Youngsabanant & Nuamsukon, 2020). Se ha estudiado la actividad antibacteriana de la clara del huevo de tortuga golfina (*L. olivacea*) y otras especies de tortugas, en donde se ha encontrado mayor actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y un efecto nulo sobre Gram negativas (López-Hurtado et al., 2010). El líquido cloacal que recubre los huevos en el oviducto y en la ovoposición, es poco probable que funcione como una barrera antimicrobiana y se ha sugerido que podría actuar como un factor contaminante de los huevos, ya que existen anomalías en su consistencia y coloración; además, heces y otros materiales de desecho también salen por la cloaca (Keene et al., 2014; Navas, 2013).

1.6 PATOGENICIDAD DE *Salmonella* spp. EN REPTILES

La salmonelosis clínica es rara en reptiles, la patogénesis y los mecanismos que utiliza *Salmonella* spp. para colonizar persistentemente a los reptiles son poco conocidos, pero existe una mayor predisposición por estrés, deshidratación, altas cargas parasitarias, traumatismos, tumores y otras enfermedades infecciosas (DuPont et al., 1978; Gal & Johnson-Delaney, 2019). En tortuga de orejas rojas (*Trachemys scripta elegans*) la temperatura ambiental tiene un papel determinante, ya

que dentro del rango de su zona de temperatura óptima preferida (ZTOP) a 26 °C la bacteria solo es aislada de intestino, mientras que fuera de su ZTOP a 37 °C se logra encontrar de forma sistémica en hígado y bazo (Pasmans et al., 2002). Se puede presentar como enteritis, salpingitis, celomitis, dermatitis, abscesos, osteomielitis, osteoartritis, septicemia o enfermedad granulomatosa (Chiodini, 1982; González et al., 2005; Isaza et al., 2000; Jacobson, 2007; Pasmans et al., 2013).

1.7 EPIDEMIOLOGÍA DE *Salmonella* spp. EN TORTUGAS

En México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) solo reporta los casos semanales por fiebre tifoidea, paratifoidea y otras salmonelosis sin clasificación; teniendo así un acumulado de 2,085 casos, 2,742 casos y 4,822 casos respectivamente, hasta la semana 08 de 2022 (DGE, 2022). En Estados Unidos del año 2015 al 2020, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés: *Centers for Disease Control and Prevention*) reportan 805 brotes y 35 muertes causados por *Salmonella* spp. de origen alimenticio, de los cuales 32 brotes fueron causados por el consumo de huevo correspondiente al producto de la ovulación de aves domésticas aceptado para consumo humano, con 493 enfermos, 79 hospitalizaciones y un fallecimiento (CDC, 2022a). También se reportan casos de salmonelosis relacionados con la tenencia de tortugas como mascotas, teniendo del 2015 al 2021 diez brotes con 460 enfermos, 158 hospitalizaciones y una muerte (CDC, 2022b). En otros países son pocos los reportes de brotes o casos (Reza et al., 2020). No se reportan datos similares de vigilancia epidemiológica relacionados con salmonelosis por el consumo de subproductos de tortuga marina; sin embargo, existen reportes de casos (Aguirre et al., 2006; López-Quintana et al., 2015; Magnino et al., 2009).

1.8 DIAGNÓSTICO DE *Salmonella* spp. EN REPTILES

Para la detección de *Salmonella* spp. en reptiles se han desarrollado diferentes técnicas diagnósticas, y las más utilizadas son el cultivo bacteriológico y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Gal & Johnson-Delaney, 2019; Mitchell, 2006; Wellehan & Divers, 2019). Para el diagnóstico por aislamiento bacteriológico de *Salmonella* spp. se recomienda un preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo y medios de cultivo selectivos (Ayala, 1991; Bauwens et al., 2006; Castro-González & Pérez-Gil, 2011; Corrente et al., 2004; Gaertner et al., 2008; Harvey & Price, 1983; Kodjo et al., 1997; Mitchell, 2006; Mora-Castro et al., 1997; Pasmans et al., 2002; Penagos et al., 2018; SSA, 2015). La implementación de métodos moleculares como la PCR proporciona mayor ventaja que el cultivo bacteriológico en cuanto a especificidad, sensibilidad y disminución del tiempo de detección (Constantino, 2011; Corrente et al., 2017; Hahn et al., 2007; Mitchell, 2006; Navas, 2013; Palomino-Camargo & Gonzalez-Muñoz, 2014; Santos et al., 2001). El

gen *invA* contiene secuencias conservadas en el género *Salmonella* spp. (Rahn et al., 1992), el cual se encuentra en la llamada isla de patogenicidad 1 que codifica proteínas para el sistema de secreción tipo III por lo que su amplificación por medio de la PCR ha sido reconocida como referencia para la detección de *Salmonella* spp. (Malorny et al., 2003).

1.9 ANTECEDENTES

Feeley & Treger (1969) aislaron *S. braenderup*, clasificada ahora como *S. enterica* subs. *enterica* serovar Braenderup, en huevos y crías de tortuga de orejas rojas (*Pseudemys scripta elegans*, ahora *Trachemys scripta elegans*) expuestos artificialmente. Chiodini (1982) realizó aislamientos de *S. enteritidis* y *S. arizonae* en embriones de serpiente de agua del norte (*Natrix sipedon*) infectadas por vía oral, con lo que sugirió la infección vertical en reptiles. Michael-Marler, et al. (1983) infectaron huevos, embriones y crías de tortuga de orejas rojas (*P. s. elegans*, ahora *T. s. elegans*) con *Salmonella* spp. erradicándola con una solución de antibiótico y realizando una evaluación con aislamiento bacteriológico y necropsia sin describir lesiones. D'Aoust et al. (1990) encontraron huevos fértiles de importación de tortuga de orejas rojas (*P. s. elegans*, ahora *T. s. elegans*) infectados con *S. poona* y *S. arizonae*. Pasmans et al. (2002) describieron la patogenia de *Salmonella* spp. en tortugas de orejas rojas (*T. s. elegans*) aislando la bacteria en diferentes órganos dependiendo de la vía de infección y temperatura corporal. Al-Bahry et al. (2009) confirmaron por microscopía electrónica que *Salmonella* Typhimurium atravesaba todas las estructuras del huevo de tortuga verde (*Chelonia mydas*) después de 30 minutos de exposición artificial del huevo a la bacteria. Keene et al. (2014) reportaron el aislamiento de diferentes bacterias por cultivo bacteriológico de arena de los nidos, cloaca, líquido cloacal y huevos de tortuga golfina (*L. olivacea*) incluida *Salmonella* spp. en playas de Costa Rica. Hill et al. (2019) encontraron en su estudio que las patologías más frecuentes en tortuga laúd (*Dermodochelys coriacea*) en etapa embrionaria fueron la mineralización renal y la neumonía bacteriana encontrando *Salmonella* spp. entre las bacterias aisladas. En México, Constantino (2011) detectó *Salmonella* spp. en la cloaca de diferentes especies de tortugas mantenidas como mascotas utilizando cultivo bacteriológico y PCR con la amplificación de un fragmento del gen *invA*. Aguilar (2011) detectó *Salmonella* spp. en la cloaca de tortugas golfinas (*L. olivacea*) del pacífico mexicano mediante cultivo bacteriológico. Navas (2013) detectó *Salmonella* spp. de líquido cloacal de tortugas golfinas (*L. olivacea*) del pacífico mexicano por cultivo bacteriológico y por PCR con la amplificación de un fragmento del gen *invA* sugiriendo la probable contaminación del huevo.

2. JUSTIFICACIÓN

La tortuga golfina (*L. olivacea*) es una especie en peligro de extinción que requiere especial atención sobre los factores que tienen un impacto negativo en su reproducción, lo que es indispensable para la conservación de la especie. El éxito reproductivo está influenciado por la estrecha interacción de los factores bióticos y abióticos de la anidación, en donde la abundancia microbiana ha tenido un papel significativo sobre el desarrollo embrionario. Bajo un enfoque conservacionista y por su impacto en salud pública es necesario conocer si los embriones de esta especie son una fuente potencial de transmisión de *Salmonella* spp. ya que aportará elementos importantes sobre la patogenicidad y epidemiología de la salmonelosis. En la investigación sobre *Salmonella* spp. y los huevos de tortuga se han utilizado principalmente técnicas de aislamiento bacteriológico; sin embargo, se requieren de métodos más efectivos como la PCR con una alta especificidad y sensibilidad para la detección de la bacteria.

3. HIPÓTESIS

Se detectará *Salmonella* spp. asociada a muerte embrionaria en huevos no eclosionados de tortuga golfina (*L. olivacea*).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Detectar *Salmonella* spp. mediante aislamiento bacteriológico y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en huevos no eclosionados de tortuga golfina (*L. olivacea*) para estudiar si se asocia a muerte embrionaria.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Realizar el muestreo de huevos no eclosionados de tortuga golfina (*L. olivacea*) obtenidos de nidos en corral.

4.2.2 Aislar *Salmonella* spp. en las muestras recolectadas de huevos no eclosionados de tortuga golfina (*L. olivacea*) mediante métodos selectivos de cultivo bacteriológico.

4.2.3 Detectar *Salmonella* spp. mediante PCR punto final.

4.2.4 Realizar el estudio patológico macro y microscópico de todos los embriones colectados, positivos o negativos a *Salmonella* spp.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 SITIOS DE MUESTREO

El muestreo se llevó a cabo durante los meses de octubre y noviembre de 2019 en cinco playas del pacífico sur mexicano: cuatro en el estado de Oaxaca y una en el estado de Guerrero como se muestra en el Cuadro 1. Los sitios de muestreo tienen una o dos denominaciones diferentes: Área Natural Protegida (ANP), Región Prioritaria de Conservación (RPC), Santuario (SANT) o Parque Nacional (PN) (Fig. 1) (Google, 2020). Se realizó el muestreo de huevos no eclosionados (HNE) de nidos reubicados en corrales de incubación.

Cuadro 1. Sitios de muestreo y localización.

ESTADO	LUGAR	MUNICIPIO	COORDENADAS GEOGRÁFICAS
OAXACA	RPC Playa Tortuguera Cahuitán	Santa María Tonameca	17°22'55"N, 93°30'56"W
	ANP PN Lagunas de Chacahua	Santiago Tapextla	17°17'15"N, 93°28'45"W
	ANP SANT Playa de Escobilla	San Pedro Tututepec	16°14'51"N, 95°07'31"W
	RPC Playa Tortuguera Barra de la Cruz	Santiago Astata	16°46'55"N, 95°16'42"W
GUERRERO	ANP SANT Playa de Tierra Colorada	Cuajinicuilapa	16°40'02"N, 94°57'54"W

RPC: Región Prioritaria de Conservación; ANP: Área Natural Protegida; PN: Parque Nacional; SANT: Santuario; N: al Norte del Ecuador; W: al oeste del meridiano de Greenwich.

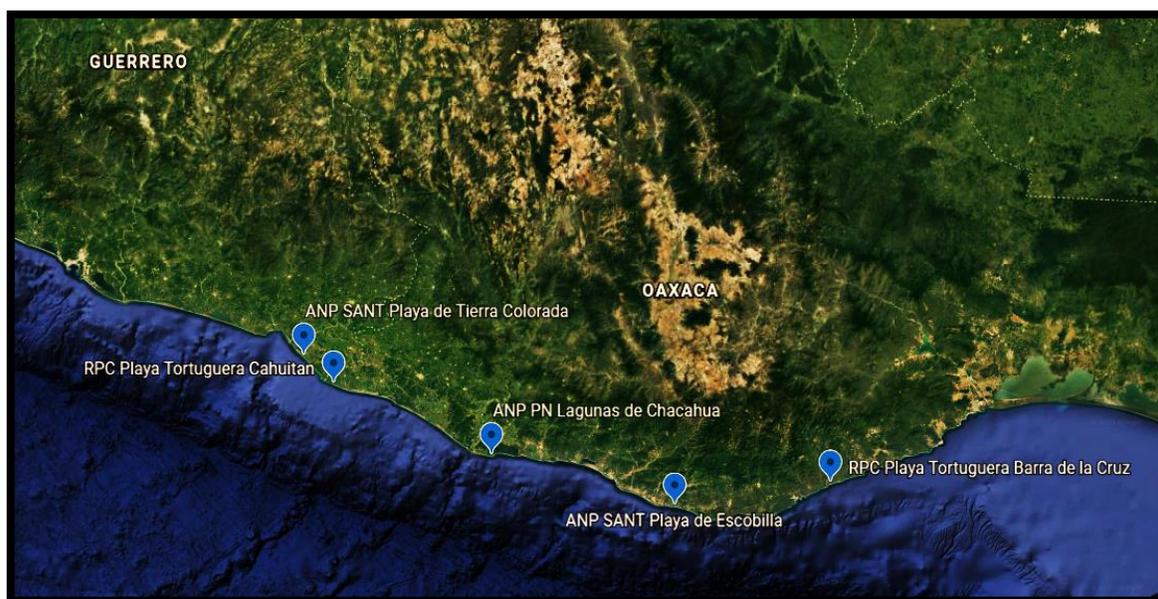


Figura 1. Sitios de muestreo. Sitios donde se realizó el muestreo de los huevos no eclosionados en los estados de Oaxaca y Guerrero (Imagen: modificado de Google Earth).

5.2 IDENTIFICACIÓN Y REVISIÓN DE LOS NIDOS

Previo a la toma de las muestras se tuvo en cuenta el registro de fecha de anidación proporcionado por el responsable de cada playa para poder calcular la fecha probable de eclosión de los huevos de acuerdo al tiempo promedio de incubación de la tortuga golfina (*L. olivacea*) correspondiente a 45 días. El tiempo en el que pudo realizarse la toma de muestras fue tomando como referencia el punto 6.8.6. de la revisión de nidos de la NOM-162-SEMARNAT-2012 que establece las especificaciones para la protección, recuperación y manejo de las poblaciones de las tortugas marinas en su hábitat de anidación. Se revisaron los nidos una vez que se cumpliera con los siguientes criterios:

1. Cuando el número de crías emergidas fuera igual o mayor al 50% de los huevos sembrados por nido.
2. Cuando no se hubieran registrado emergencias de crías después de tres días de haber finalizado el periodo promedio de incubación.
3. Cuando se hubieran cumplido tres días, a partir de que se encontró la primera cría emergida del nido (SEMARNAT, 2013).

Mediante el tipo de identificación utilizado en los corrales de incubación de cada playa se localizaron los nidos disponibles de tortuga golfina (*L. olivacea*). Cada uno de los nidos estaba protegido con una malla de metal para confinar a las crías eclosionadas. Se realizó la limpieza de los nidos disponibles con crías o sin crías eclosionadas (Fig. 2) y se seleccionaron huevos que por sus características físicas fueran probablemente no eclosionados como un cascarón íntegro, con algunas manchas oscuras y a la palpación y/o ovoscopia contuvieran el embrión (Figs. 3 y 4). En una base de datos se registraron los HNE seleccionados para el estudio y los datos de número de nido, fecha de incubación y eclosión, cantidad de huevos incubados, porcentaje de eclosión y observaciones; el porcentaje de eclosión para cada nido se determinó dividiendo el número de huevos eclosionados entre el número total de huevos incubados multiplicado por 100. En caso de encontrar crías vivas se ayudó en el registro y manejo de liberación de estas (Figs. 5 y 6).

5.3 POBLACIÓN MUESTRA

En cada sitio de muestreo se obtuvo un máximo de 15 HNE de acuerdo a la disponibilidad de nidos de tortuga golfina (*L. olivacea*) para obtener hasta 75 HNE en total.

5.4 TOMA DE MUESTRAS

Los huevos seleccionados se transportaron a un área de trabajo limpia, sin exposición directa del sol ni viento (Fig. 7). Los huevos seleccionados se limpiaron externamente con agua destilada para eliminar la arena y se desinfectaron con alcohol etílico al 70%. Se preparó una zona de esterilidad con dos lámparas de alcohol y utilizando guantes estériles se realizó un corte sobre el cascarón del huevo con tijeras previamente esterilizadas mediante flameado con alcohol. No se seleccionaron HNE donde el desarrollo embrionario fuera menor del 29% lo cual es posible estimar mediante la observación macroscópica, en la cual uno de los principales indicadores es la pigmentación del iris (Miller et al., 2017).

El embrión se colocó en una caja de Petri estéril (Fig. 8) y con hisopo estéril se obtuvo una muestra de albumen y vitelo; estos se colocaron en medio de transporte Cary-Blair. Se realizó una incisión con bisturí y tijeras para retirar el saco vitelino y plastrón, y como parte del estudio patológico macroscópico se obtuvo una primera evidencia del estado del embrión realizando un registro fotográfico de la cavidad celómica con los órganos expuestos (Fig. 9). Se inspeccionó la cavidad celómica con material quirúrgico previamente esterilizado mediante flameado con alcohol para detectar cada uno de los órganos; se colectó una mezcla de órganos de hígado, pulmón, corazón, riñón, bazo e intestinos colocándolos en un tubo de vidrio con solución amortiguadora salina de fosfatos estéril (PBS por sus siglas en inglés: *Phosphate Buffered Saline*). Las muestras se etiquetaron con un plumón de tinta indeleble, se mantuvieron a temperatura ambiente aproximadamente 30 min, y posteriormente se conservaron en refrigeración hasta su uso. Finalmente, los embriones se colocaron en frascos de plástico con tapa de rosca con formol al 10% (Fig. 10) (Mader, et al. 2006; Wellehan & Divers, 2019).

Las muestras se trasladaron a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM) en la Ciudad de México (CDMX) para sus análisis en el Departamento de Microbiología e Inmunología y el Departamento de Patología.



Figura 2. Limpieza del nido.



Figura 3. Revisión de características físicas de los huevos.



Figura 4. Selección de huevos



Figura 5. Crías encontradas vivas de los nidos seleccionados.



Figura 6. Liberación de crías.



Figura 7. Preparación del área de trabajo.



Figura 8. Embrión de tortuga golfina (*L. olivacea*).



Figura 9. Toma de muestras de órganos.



Figura 10. Embrión en formol al 10%.

5.5 AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO DE *Salmonella* spp. DE LOS HUEVOS NO ECLOSIONADOS

La metodología para el aislamiento de *Salmonella* spp. basado en el preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo y aislamiento en medios de cultivo selectivos se diseñó en función de diferentes técnicas como las recomendadas por la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014 “Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos patógenos” en su Apéndice A Normativo: Método de referencia para el aislamiento de *Salmonella* spp. (SSA, 2015); las recomendaciones por Mitchell (2006) y Wellehan & Divers (2019) sobre los métodos de diagnóstico para la identificación de *Salmonella* spp. en reptiles; los métodos de Roszak, et al. (1984), de Navas (2011) y Acevedo (2019) bajo ciertas modificaciones.

5.5.1 Preenriquecimiento y enriquecimiento selectivo: en una zona de esterilidad se realizó un macerado con PBS de la mezcla de órganos. Las muestras obtenidas en los medios de transporte Cary-Blair y el macerado de órganos se colocaron en tubos de vidrio de 16 x 125 mm con tapa de rosca con 10 mL de medio infusión cerebro corazón (ICC) como preenriquecimiento para aumentar la viabilidad y desarrollo en los medios selectivos; se introdujo el hisopo o 100 μ L del macerado directamente en dicho medio para incubar a 35-37 °C por 18-24 h con agitación (Roszak et al., 1984).

Por cada muestra se tomaron 100 μ L del caldo de preenriquecimiento y se transfirieron a 10 mL de cada uno de los medios de enriquecimiento selectivo para *Salmonella* spp.; en caldo selenito (Se) se incubó a 37 °C por 24 h y en caldo Rappaport Vassiliadis (RV) a 42 °C por 24 h con agitación (SSA, 2015; Vassiliadis, 1983) para aumentar la probabilidad de aislamiento en los medios de cultivo y evaluar si existe diferencia en la cantidad de aislados al utilizar uno u otro caldo de enriquecimiento selectivo para *Salmonella* spp. Las muestras cultivadas en RV y Se también se utilizaron para obtener las muestras principales del diagnóstico molecular por PCR.

5.5.2 Aislamiento en medios de cultivo selectivos: se utilizaron 1) agar entérico Hektoen (HE) y en algunos casos Verde brillante (VB), ambos de baja selectividad, 2) agar xylosa-lisina-desoxicolato (XLD) de mediana selectividad y 3) agar sulfito bismuto (SB) de alta selectividad para el aislamiento de *Salmonella* spp. (Mitchell, 2006). Se tomó una asada con asa bacteriológica de las muestras provenientes de caldo Se y RV, y se sembró por estría cruzada en cada uno de los tres medios de cultivo selectivos. Se realizó la incubación a 37 °C por 24 h.

5.5.3 Identificación con pruebas bioquímicas: de acuerdo al medio de cultivo utilizado se registraron las características de todas las colonias aisladas para someterlas a la identificación con pruebas bioquímicas; se observaron las colonias sospechosas de *Salmonella* spp. con especial atención. Cada una de las colonias aisladas se sembraron en agar Luria Bertani (LB) a 37 °C por 24 h. Se realizó la prueba de oxidasa como prueba primaria de identificación. Se utilizaron las pruebas de agar triple azúcar hierro (TSI), sulfuro indol motilidad (SIM), urea de Christensen y citrato de Simmons incubadas a 37 °C por 24 h; en algunos casos se aumentó el tiempo de incubación hasta 72 h en caso de no obtener resultados concluyentes a las 24 h. También se realizaron pruebas bioquímicas complementarias como fenilalanina desaminasa (PD), lisina descarboxilasa (LDC), *o*-nitrofenil-b-D-galactopiranosido (ONPG) e hidrólisis de la gelatina, incubadas a 37 °C por 24 h; la interpretación de los resultados se realizó de acuerdo a los manuales de Jang et al. (1986) y de Barrow & Feltham (1993).

Las colonias que por pruebas bioquímicas fueron positivas a *Salmonella* spp. se incubaron en caldo LB a 37 °C por 24 h para realizar la confirmación por PCR. En caso de no obtener resultados positivos a *Salmonella* spp. por cultivo bacteriológico, pero que a partir de los caldos de enriquecimiento selectivo para *Salmonella* spp. resultaron positivos por PCR, se utilizó un método alternativo para el posible aislamiento de la bacteria. Esto fue repitiendo todo el procedimiento desde el preenriquecimiento a una temperatura de 25°C, temperatura que también es recomendada en el diagnóstico de *Salmonella* spp. en reptiles (Rodríguez-Morales, 1996; Wellehan & Divers, 2019); en

este caso, solo se seleccionaron colonias que por sus características morfológicas en los medios selectivos fueran probablemente de *Salmonella* spp.

5.6 DETECCIÓN DE *Salmonella* spp. POR PCR

Las muestras incubadas previamente en los medios de enriquecimiento selectivo caldo Se y RV (punto 5.5.1) se utilizaron para el diagnóstico por PCR punto final para la amplificación de un fragmento del gen *invA* de *Salmonella* spp.

5.6.1 Preparación de la muestra control: se utilizó la cepa bacteriana de referencia *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 49214 como control positivo para la PCR proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Molecular (LMM) del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM. La cepa se cultivó en agar y caldo LB por 18-24 h a 37 °C, se recuperó 1 mL del cultivo en tubo para microcentrífuga de 1.5 mL, se centrifugó y repitió por dos ocasiones para obtener la biomasa o *pellet* de 2 mL. Se realizó la extracción de ADN por el método modificado de tiocianato de guanidina reportado por Pitcher et al. (1989) para obtener una alícuota de 100 µL a una concentración de 100 ng/mL.

5.6.2 Extracción de ADN de las muestras en RV y Se: se obtuvieron 1 mL de cada una de las muestras cultivadas en Se y RV en tubo para microcentrífuga de 1.5 mL, se centrifugó y repitió por dos ocasiones para obtener la biomasa o *pellet* de 2 mL. Se realizó la extracción de ADN por el método mencionado para la muestra control.

5.6.3 Iniciadores: para la amplificación de un fragmento de 285 pb del gen *invA* de *Salmonella* spp. se utilizaron los iniciadores (Cuadro 2) y la metodología modificada de Rahn et al. (1992) (Cuadro 3).

Cuadro 2. Iniciadores reportados para la identificación de *Salmonella* spp.

Gen	Secuencia	Tamaño del producto amplificado	Referencia
<i>invA</i>	PF 5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3'	285 pb	Rahn et al., 1992
	PR 5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA-3'		

PF: *Primer Forward*; PR: *Primer Reverse*

Cuadro 3. Reactivos y cantidad utilizada para la reacción de PCR.

REACTIVO	CANTIDAD
H ₂ O libre de nucleasas	18.2 µL
Buffer 10x	2.5 µL
MgCl 25 mM	4.5 µL
Albúmina 5 mg	0.75 µL
Tritón 0.01%	0.75 µL
dNTP's 100 Mm	1.25 µL
<i>invA</i> F 100 mM 1:10	1 µL
<i>invA</i> R 100 mM 1:10	1 µL
ADN	4 µL
Taq Polimerasa 5 U/mL	0.1 µL

5.6.4 PCR: las muestras preparadas en microtubos para PCR punto final se colocaron en el termociclador donde se llevó a cabo la reacción bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min y 30 ciclos más a 94 °C por 30 s; alineación a 55 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s, posteriormente una extensión final a 72 °C por 5 min (Navas, 2013).

5.6.5 Electroforesis: para observar el producto de extracción de ADN se preparó un gel de agarosa al 0.8% en amortiguador TRIS-ácido acético-EDTA (TAE) donde se cargaron los productos de la extracción, y para visualizar los productos de la PCR se preparó un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador borato de sodio (SB). Se utilizó un marcador de peso molecular (MPM) 1Kb+ (Thermo Scientific). La electroforesis se realizó por 1 h a 60 V. Los geles se tiñeron por 15 min con bromuro de etidio y se visualizaron con un fotodocumentador (Navas, 2013; Rahn et al., 1992).

5.7 ESTUDIO PATOLÓGICO DE LOS EMBRIONES

El estudio patológico se realizó en 60 de los 64 embriones; se eliminaron cuatro a causa de cambios autolíticos. Se reportaron los hallazgos encontrados en el examen macro y microscópico y se buscó su relación con las bacterias aisladas en cada uno de los HNE para poder discutir la probable causa de la muerte del embrión. Se examinó con especial atención los embriones positivos a *Salmonella* spp.

5.7.1 Examen macroscópico externo e interno: se determinó la etapa de desarrollo embrionario para su correspondiente clasificación de acuerdo a Crastz (1982) y Miller et al. (2017). De forma general, se definió como una etapa temprana de desarrollo del embrión a partir de que el embrión presentara el iris pigmentado lo cual se representó como una mancha ocular evidente hasta el periodo

en el que el tamaño del embrión sea menor o igual al volumen del saco vitelino. Dichas características son correspondientes a aproximadamente no menos del 29% del tiempo de desarrollo embrionario. Los embriones en etapa tardía correspondieron a los que tenían un tamaño mayor al volumen del saco vitelino, cuyo tiempo de desarrollo es aproximadamente más del 86%. Se reportaron las lesiones externas e internas identificadas mediante el examen macroscópico.

5.7.2 Examen histopatológico: se tomaron muestras para histopatología de acuerdo a la metodología de Prophet et al. (1995). Se realizó una selección de órganos para su corte en fragmentos más pequeños, posteriormente se colocaron en cápsulas para tejidos etiquetadas previamente con lápiz. Las cápsulas se colocaron a diferentes concentraciones de alcohol mediante un histoquinete, se incluyeron en parafina y se cortaron con microtomo a 3 μm de diámetro. Los cortes finos se tiñeron con tinción de rutina Hematoxilina-Eosina (H&E) y se fijaron en portaobjetos para su observación en microscopio fotónico. De acuerdo a lo observado en la tinción de rutina (H&E) se solicitaron tinciones especiales para evidenciar estructuras específicas.

5.8 PERMISO DE COLECTA CIENTÍFICA Y DECLARACIÓN DE ÉTICA

La investigación se realizó con el permiso para colecta científica de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) OFICIO No. SGPA/DGVS/1090/19 y avalado por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (SICUAE) de la FMVZ-UNAM, Protocolo No. SICUAE.MC-2019/1-6.

5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se analizaron mediante estadística descriptiva con la elaboración de cuadros, histogramas y gráficos para su interpretación.

6. RESULTADOS

En 2019, durante la temporada de anidación en los meses de septiembre a noviembre se aprovecharon 24 nidos correspondientes a la especie de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), de acuerdo a los registros de cada sitio de muestreo en sus corrales de incubación. Los 24 nidos fueron limpiados y se recuperó un total de 63 HNE para la obtención de muestras del estudio. En total, se tomaron 63 muestras de albumen (A), 63 de vitelo (V), 64 de mezcla de órganos (M) y 64 embriones; uno de los HNE contenía gemelos idénticos (Bárceñas & Maldonado, 2009) (Cuadro 4). De estas muestras se utilizó el A, V y M para los análisis bacteriológicos y moleculares y los embriones para el análisis patológico.

Cuadro 4. Cantidad de muestras colectadas y nidos aprovechados por sitio de muestreo.

LUGAR	HNE	Albumen	Vitelo	Mezcla de órganos	Embriones	Nidos
ANP SANT Playa de Tierra Colorada	15	15	15	15	15	11
RPC Playa Tortuguera Cahuitán	15	15	15	15	15	2
ANP SANT Playa de Escobilla	11	11	11	12*	12*	4
RPC Playa Tortuguera Barra de la Cruz	13	13	13	13	13	3
ANP PN Lagunas de Chacahua	9	9	9	9	9	4
TOTAL	63	63	63	64	64	24

HNE: Huevos no eclosionados; *: Uno de los HNE con gemelos idénticos

6.1 RESULTADOS POR CULTIVO BACTERIOLÓGICO

Posterior al preenriquecimiento y enriquecimiento selectivo se utilizaron hasta tres medios de cultivo selectivos en cada una de las muestras colectadas para el aislamiento de *Salmonella* spp.; de estos, el de mediana selectividad (XLD) y el de alta selectividad (SB) se utilizaron en todas las muestras. Los medios de baja selectividad (HE y VB) se utilizaron de acuerdo a su disponibilidad; el medio VB para el aislamiento de las muestras de 10 HNE del ANP SANT Playa de Tierra Colorada y 10 HNE de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán, y el medio HE para el aislamiento de las muestras de los 43 HNE restantes.

El cultivo bacteriológico en medios selectivos proporcionó diferentes aislados bacterianos Gram negativos de la clase de las γ -Proteobacterias y de los órdenes Pseudomonadales, Aeromonadales y Enterobacteriales. Se identificaron siete géneros bacterianos: *Aeromonas* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. y *Pseudomonas* spp.; todos los géneros se aislaron al menos una vez en los tres tipos de muestras y solo *Aeromonas* spp., *Enterobacter* spp. y *Pseudomonas* spp. se aislaron en los cinco sitios de muestreo. Se

identificaron hasta cuatro géneros bacterianos diferentes en A y V y hasta tres en la M. Solo en el ANP SANT Playa de Tierra Colorada se encontraron los siete géneros bacterianos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Géneros bacterianos aislados a partir de albumen, vitelo y mezcla de órganos de los 63 HNE colectados. Los aislados identificados por tipo de muestra se marcan con una cruz en los HNE de cada uno de los sitios de muestreo.

ANP SANT PLAYA DE TIERRA COLORADA																																		
Género bacteriano	1			2			3			4			5			6			7			8			9									
	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M				
<i>Citrobacter</i> spp.																																		X
<i>Enterobacter</i> spp.									X			X									X										X	X		
<i>Klebsiella</i> spp.																															X	X		
<i>Proteus</i> spp.	X	X	X			X												X			X	X						X			X			
<i>Providencia</i> spp.						X																												
<i>Pseudomonas</i> spp.	X	X	X			X			X	X	X				X			X							X	X				X				
Género bacteriano	10			11			12			13			14			15																		
	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M													
<i>Aeromonas</i> spp.															X						X													
<i>Enterobacter</i> spp.						X			X	X			X			X			X			X												
<i>Klebsiella</i> spp.									X			X			X						X												X	
<i>Proteus</i> spp.	X								X												X									X				
<i>Providencia</i> spp.	X	X	X						X												X	X												
<i>Pseudomonas</i> spp.						X			X			X						X	X			X	X											
RPC PLAYA TORTUGUERA CAHUITAN																																		
Género bacteriano	1			2			3			4			5			6			7			8			9									
	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M				
<i>Aeromonas</i> spp.												X																						
<i>Enterobacter</i> spp.		X	X					X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X				
<i>Klebsiella</i> spp.								X	X	X	X	X	X	X	X		X	X							X	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Pseudomonas</i> spp.	X	X		X	X		X			X	X	X	X								X	X	X	X	X		X	X		X	X	X		
Género bacteriano	10			11			12			13			14			15																		
	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M													
<i>Enterobacter</i> spp.					X		X		X	X	X	X		X	X		X	X		X	X							X	X					
<i>Klebsiella</i> spp.					X				X	X	X	X		X	X		X	X		X	X													
<i>Proteus</i> spp.									X												X	X												
<i>Pseudomonas</i> spp.	X								X						X						X	X												
ANP SANT PLAYA DE ESCOBILLA																																		
Género bacteriano	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11													
	A	V	M ₁	M ₂	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M									
<i>Aeromonas</i> spp.						X		X			X																							
<i>Citrobacter</i> spp.															X	X		X																
<i>Enterobacter</i> spp.	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X										
<i>Klebsiella</i> spp.						X		X						X	X		X																	
<i>Pseudomonas</i> spp.	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X										
Género bacteriano	10			11			12			13																								
	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M																			
<i>Citrobacter</i> spp.																																		
<i>Enterobacter</i> spp.		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X																			
<i>Proteus</i> spp.	X																																	
<i>Pseudomonas</i> spp.	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X																			
RPC PLAYA TORTUGUERA BARRA DE LA CRUZ																																		
Género bacteriano	1			2			3			4			5			6			7			8			9									
	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M				
<i>Aeromonas</i> spp.															X																			
<i>Enterobacter</i> spp.	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X	X						X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Proteus</i> spp.												X			X																			
<i>Providencia</i> spp.															X						X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
<i>Pseudomonas</i> spp.				X									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Género bacteriano	10			11			12			13																								
	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M																			
<i>Citrobacter</i> spp.																																		
<i>Enterobacter</i> spp.		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X																			
<i>Proteus</i> spp.	X																																	
<i>Pseudomonas</i> spp.	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X																			
ANP PN LAGUNAS DE CHACAHUA																																		
Género bacteriano	1			2			3			4			5			6			7			8			9									
	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M				
<i>Aeromonas</i> spp.																									X						X	X		
<i>Citrobacter</i> spp.				X	X	X				X	X	X																						
<i>Enterobacter</i> spp.	X	X	X										X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Klebsiella</i> spp.							X	X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Proteus</i> spp.																																		
<i>Pseudomonas</i> spp.	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	

A: Albumen; V: Vitelo; M: Mezcla de órganos; M1: Mezcla de órganos del embrión 1; M2: Mezcla de órganos del embrión 2.

6.1.1 Resultados por cultivo bacteriológico del ANP SANT Playa de Tierra Colorada: en el cultivo bacteriológico en medios selectivos se obtuvieron 90 (100%) aislados totales, en A 20 (22.2%), en V 35 (38.9%) y en M 35 (38.9%). El género *Proteus* spp. se encontró en un 45% en A, *Pseudomonas* spp. en un 51.4% y 34.3% en V y M, respectivamente. En este sitio de muestreo se obtuvieron siete géneros bacterianos, seis en A, cinco en V y cinco en M (Cuadro 6).

Cuadro 6. Número de aislados identificados en los diferentes medios de cultivo provenientes del ANP SANT Playa de Tierra Colorada. Se muestran los géneros bacterianos de las tres muestras obtenidas en A, V y M de los 15 HNE en los medios de enriquecimiento selectivo y en su correspondiente medio de cultivo selectivo. Los números representan la cantidad de aislados y su porcentaje correspondiente. Una cepa encontrada en alguna de las muestras podría estar representada en los dos medios de enriquecimiento selectivo y hasta en tres de los medios de cultivo selectivo.

ANP SANT PLAYA DE TIERRA COLORADA											
MUESTRA	GÉNERO BACTERIANO	RV				Se				TOTAL	%
		VB	HE	XLD	SB	VB	HE	XLD	SB		
ALBUMEN	<i>Proteus</i> spp.	1	1	1		2	1	3		9	45
	<i>Enterobacter</i> spp.			2	2				1	5	25
	<i>Pseudomonas</i> spp.			1	1				1	3	15
	<i>Aeromonas</i> spp.	1								1	5
	<i>Klebsiella</i> spp.			1						1	5
	<i>Providencia</i> spp.				1					1	5
	TOTAL									20	100
% DEL TOTAL										22.2	
VITELO	<i>Pseudomonas</i> spp.	4		2	1	3		5	3	18	51.4
	<i>Proteus</i> spp.		1	1	1		3	2		8	22.9
	<i>Enterobacter</i> spp.				2				2	4	11.4
	<i>Providencia</i> spp.		1		1	1				3	8.6
	<i>Klebsiella</i> spp.	1				1				2	5.7
	TOTAL									35	100
% DEL TOTAL										38.9	
MEZCLA DE ÓRGANOS	<i>Pseudomonas</i> spp.	1			4	1	1	1	4	12	34.3
	<i>Enterobacter</i> spp.	1		1	4	1	1		3	11	31.4
	<i>Providencia</i> spp.	1		1	1	1		1	1	6	17.1
	<i>Proteus</i> spp.	1	1		1		1	1		5	14.3
	<i>Citrobacter</i> spp.								1	1	2.9
	TOTAL									35	100
% DEL TOTAL										38.9	
TOTAL DE AISLADOS									90	100	

RV: Caldo Rappaport Vassiliadis; Se: Caldo Selenito; VB: Agar Verde Brillante; HE: Agar Entérico Hektoen; XLD: Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato; SB: Agar Sulfito Bismuto.

6.1.2 Resultados por cultivo bacteriológico de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán: en el cultivo bacteriológico en medios selectivos se obtuvieron 99 (100%) aislados totales, en A 28 (28.3%), en V 34 (34.3%) y en M 37 (37.4%). El género *Pseudomonas* spp. se encontró en un 67.9% en A, *Enterobacter* spp. en un 50% y 70.3% en V y M respectivamente. En este sitio de muestreo se obtuvieron cinco géneros bacterianos, tres en A, cuatro en V y cuatro en M (Cuadro 7).

Cuadro 7. Número de aislados identificados en los diferentes medios de cultivo provenientes de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán. Se muestran los géneros bacterianos en las tres muestras obtenidas en A, V y M de los 15 HNE en los medios de enriquecimiento selectivo y en su correspondiente medio de cultivo selectivo. Los números representan la cantidad de aislados y su porcentaje correspondiente. Una cepa encontrada en alguna de las muestras podría estar representada en los dos medios de enriquecimiento selectivo y hasta en tres de los medios de cultivo selectivo.

RPC PLAYA TORTUGUERA CAHUITÁN											
MUESTRA	GÉNERO BACTERIANO	RV				Se				TOTAL	%
		VB	HE	XLD	SB	VB	HE	XLD	SB		
ALBUMEN	<i>Pseudomonas</i> spp.	1	1	2	3	5	1	2	4	19	67.9
	<i>Enterobacter</i> spp.	3		2	1		1			7	25
	<i>Klebsiella</i> spp.	2								2	7.1
	TOTAL									28	100
										% DEL TOTAL	28.3
VITELO	<i>Enterobacter</i> spp.	4		3	3	2	2		3	17	50
	<i>Pseudomonas</i> spp.			3	3	1	1	2	4	14	41.2
	<i>Klebsiella</i> spp.	2								2	5.9
	<i>Aeromonas</i> spp.								1	1	2.9
	TOTAL									34	100
										% DEL TOTAL	34.3
MEZCLA DE ÓRGANOS	<i>Enterobacter</i> spp.	5			7	4	1		9	26	70.3
	<i>Pseudomonas</i> spp.				2	1		2	2	7	18.9
	<i>Klebsiella</i> spp.				1	1			1	3	8.1
	<i>Proteus</i> spp.			1						1	2.7
	TOTAL									37	100
										% DEL TOTAL	37.4
TOTAL DE AISLADOS										99	100

RV: Caldo Rappaport Vassiliadis; Se: Caldo Selenito; VB: Agar Verde Brillante; HE: Agar Entérico Hektoen; XLD: Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato; SB: Agar Sulfito Bismuto.

6.1.3 Resultados por cultivo bacteriológico del ANP SANT Playa de Escobilla: en el cultivo bacteriológico en medios selectivos se obtuvieron 149 (100%) aislados totales, en A 53 (35.6%), en V 54 (36.2%) y en M 42 (28.2%). El género *Enterobacter* spp. se encontró en un 52.8% en A, *Pseudomonas* spp. en un 46.3% y 42.9% en V y M, respectivamente. En este sitio de muestreo se obtuvieron cinco géneros bacterianos, cuatro en A, cinco en V y cuatro en M (Cuadro 8).

Cuadro 8. Número de aislados identificados en los diferentes medios de cultivo provenientes del ANP SANT Playa de Escobilla. Se muestran los géneros bacterianos en las tres muestras obtenidas en A, V y M de los 11 HNE en los medios de enriquecimiento selectivo y en su correspondiente medio de cultivo selectivo. Los números representan la cantidad de aislados y su porcentaje correspondiente. Una cepa encontrada en alguna de las muestras podría estar representada en los dos medios de enriquecimiento selectivo y hasta en tres de los medios de cultivo selectivo.

ANP SANT PLAYA DE ESCOBILLA									
MUESTRA	GÉNERO BACTERIANO	RV			Se			TOTAL	%
		HE	XLD	SB	HE	XLD	SB		
ALBUMEN	<i>Enterobacter</i> spp.	4	5	5	5	5	4	28	52.8
	<i>Pseudomonas</i> spp.	4	6	3	2	2	3	20	37.7
	<i>Klebsiella</i> spp.		1		1	1		3	5.7
	<i>Aeromonas</i> spp.			1			1	2	3.8
								TOTAL	53
								%DEL TOTAL	35.6
VITELO	<i>Pseudomonas</i> spp.	5	6	5	3	3	3	25	46.3
	<i>Enterobacter</i> spp.	4	4	4	2	2	1	17	31.5
	<i>Klebsiella</i> spp.		1	2		1	1	5	9.2
	<i>Citrobacter</i> spp.	2	1	1				4	7.4
	<i>Aeromonas</i> spp.	1			2			3	5.6
							TOTAL	54	100
								% DEL TOTAL	36.2
MEZCLA DE ÓRGANOS	<i>Pseudomonas</i> spp.	3	3	3	2	5	2	18	42.9
	<i>Enterobacter</i> spp.	2	4	1	2	3	2	14	33.3
	<i>Klebsiella</i> spp.	1	2	1	1	1	1	7	16.7
	<i>Citrobacter</i> spp.			1		1	1	3	4.1
							TOTAL	42	100
								% DEL TOTAL	28.2
TOTAL DE AISLADOS								149	100

RV: Caldo Rappaport Vassiliadis; Se: Caldo Selenito; HE: Agar Entérico Hektoen; XLD: Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato; SB: Agar Sulfito Bismuto.

6.1.4 Resultados por cultivo bacteriológico de la RPC PLAYA Tortuguera Barra de la Cruz: en el cultivo bacteriológico en medios selectivos se obtuvieron 137 (100%) aislados totales, en A 52 (38%), en V 39 (28.5%) y en M 46 (33.5%). El género *Enterobacter* spp. se encontró en un 44.2% y 46.2% en A y V respectivamente y *Pseudomonas* spp. en un 36.9% en M. En este sitio de muestreo se obtuvieron seis géneros bacterianos, cinco en cada una de las muestras (Cuadro 9).

Cuadro 9. Número de aislados identificados en los diferentes medios de cultivo provenientes de la RPC Playa Tortuguera Barra de la Cruz. Se muestran los géneros bacterianos en las tres muestras obtenidas en A, V y M de los 13 HNE en los medios de enriquecimiento selectivo y en su correspondiente medio de cultivo selectivo. Los números representan la cantidad de aislados y su porcentaje correspondiente. Una cepa encontrada en alguna de las muestras podría estar representada en los dos medios de enriquecimiento selectivo y hasta en tres de los medios de cultivo selectivo.

RPC PLAYA TORTUGUERA BARRA DE LA CRUZ									
MUESTRA	GÉNERO BACTERIANO	RV			Se			TOTAL	%
		HE	XLD	SB	HE	XLD	SB		
ALBUMEN	<i>Enterobacter</i> spp.	5	5	6	3	3	1	23	44.2
	<i>Pseudomonas</i> spp.	3	1	6	1		5	16	30.8
	<i>Proteus</i> spp.	2	2		1	1	1	7	13.5
	<i>Citrobacter</i> spp.		2	2				4	7.7
	<i>Providencia</i> spp.		1			1		2	3.8
								TOTAL	52
								% DEL TOTAL	38
VITELLO	<i>Enterobacter</i> spp.	3	5	5	2	2	1	18	46.2
	<i>Pseudomonas</i> spp.	2	2	4	1	2	2	13	33.3
	<i>Proteus</i> spp.	1	1	1		2		5	12.8
	<i>Citrobacter</i> spp.		2					2	5.1
	<i>Providencia</i> spp.		1					1	2.6
								TOTAL	39
								% DEL TOTAL	28.5
MEZCLA DE ÓRGANOS	<i>Pseudomonas</i> spp.	4	2	4	2	2	3	17	36.9
	<i>Enterobacter</i> spp.	4	4	4		3	1	16	34.8
	<i>Proteus</i> spp.		2	1	3	3		9	19.6
	<i>Citrobacter</i> spp.		1	1			1	3	6.5
	<i>Aeromonas</i> spp.		1					1	2.2
								TOTAL	46
								% DEL TOTAL	33.5
TOTAL DE AISLADOS								137	100

RV: Caldo Rappaport Vassiliadis; Se: Caldo Selenito; HE: Agar Entérico Hektoen; XLD: Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato; SB: Agar Sulfito Bismuto.

6.1.5 Resultados por cultivo bacteriológico del ANP PN Lagunas de Chacahua: en el cultivo bacteriológico en medios selectivos se obtuvieron 159 (100%) aislados totales, en A 49 (30.8%), en V 51 (32.1%) y en P 59 (37.1%). El género *Enterobacter* spp. se encontró en un 36.7% y 45.1% en A y V respectivamente y *Pseudomonas* spp. en un 54.2% en M. En este sitio de muestreo se obtuvieron seis géneros bacterianos, seis en A, cinco en V y seis en M (Cuadro 10).

Cuadro 10. Número de aislados identificados en los diferentes medios de cultivo provenientes del ANP PN Lagunas de Chacahua. Se muestran los géneros bacterianos en las tres muestras obtenidas en A, V y M de los nueve HNE en los medios de enriquecimiento selectivo y en su correspondiente medio de cultivo selectivo. Los números representan la cantidad de aislados y su porcentaje correspondiente. Una cepa encontrada en alguna de las muestras podría estar representada en los dos medios de enriquecimiento selectivo y hasta en tres de los medios de cultivo selectivo.

ANP PN LAGUNAS DE CHACAHUA									
MUESTRA	GÉNERO BACTERIANO	RV			Se			TOTAL	%
		HE	XLD	SB	HE	XLD	SB		
ALBUMEN	<i>Enterobacter</i> spp.	2	3	3	3	4	3	18	36.7
	<i>Pseudomonas</i> spp.	3	4	4	2	2	3	18	36.7
	<i>Citrobacter</i> spp.	1	1	1	1		1	5	10.2
	<i>Klebsiella</i> spp.	2			1	1		4	8.2
	<i>Aeromonas</i> spp.			1			1	2	4.1
	<i>Proteus</i> spp.	1	1					2	4.1
	TOTAL							49	100
							% DEL TOTAL	30.8	
VITULO	<i>Enterobacter</i> spp.	5	5	2	4	5	2	23	45.1
	<i>Pseudomonas</i> spp.	2	5	4	3	3	3	20	39.2
	<i>Klebsiella</i> spp.		1	1		1	1	4	7.8
	<i>Aeromonas</i> spp.			1			1	2	3.9
	<i>Citrobacter</i> spp.		1			1		2	3.9
	TOTAL							51	100
							% DEL TOTAL	32.1	
MEZCLA DE ÓRGANOS	<i>Pseudomonas</i> spp.	5	4	4	7	6	6	32	54.2
	<i>Enterobacter</i> spp.	1	3	2		4	1	11	18.6
	<i>Citrobacter</i> spp.	2	2	1	1	2	1	9	15.3
	<i>Klebsiella</i> spp.			2			2	4	6.8
	<i>Aeromonas</i> spp.			1			1	2	3.4
	<i>Proteus</i> spp.		1					1	1.7
TOTAL							59	100	
							% DEL TOTAL	37.1	
TOTAL DE AISLADOS								159	100

RV: Caldo Rappaport Vassiliadis; Se: Caldo Selenito; HE: Agar Entérico Hektoen; XLD: Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato; SB: Agar Sulfito Bismuto.

6.1.6 Resultados por cultivo bacteriológico de los 63 HNE: en los 63 HNE se encontraron con mayor frecuencia los géneros *Enterobacter* spp. y *Pseudomonas* spp. En A *Enterobacter* spp. 41.1% y *Pseudomonas* spp. 36%, en V *Pseudomonas* spp. 42.3% y *Enterobacter* spp. 37.1% y en M *Pseudomonas* spp. 39.3% y *Enterobacter* spp. 35.6%. Con el medio RV se obtuvo mayor cantidad de aislados en V (123), en segundo lugar A (118) y por último en M (110); con el medio Se se obtuvo mayor cantidad de aislados en M (109), en segundo lugar en V (90) y por último en A (79). La

incubación con la combinación RV más XLD permitió la obtención de más aislados en A (41) y en V (44) y la combinación RV más SB permitió obtener más aislados en M (46). La incubación con la combinación Se más SB permitió obtener más aislamientos en A (29) y M (43) y la combinación Se más XLD permitió la obtención de más aislados en V (31) (Cuadro 11).

Cuadro 11. Bacterias aisladas con mayor frecuencia. Se muestra en orden de mayor a menor la frecuencia de los géneros bacterianos identificados en las tres muestras obtenidas en albumen, vitelo y mezcla de órganos de los 63 HNE en los medios de enriquecimiento selectivo y en su correspondiente medio de cultivo. Los números representan la cantidad de aislados y una misma cepa encontrada en alguna de las muestras podría estar representada en los dos medios de enriquecimiento selectivo y hasta en tres medios de cultivo selectivo.

GÉNEROS BACTERIANOS DETECTADOS															
MUESTRA	GÉNERO BACTERIANO	RV				TOTAL RV	%RV	Se				TOTAL Se	%Se	TOTAL A, V o M	%
		VB	HE	XLD	SB			VB	HE	XLD	SB				
ALBUMEN	<i>Enterobacter</i> spp.	3	11	17	17	48	40.7		12	12	9	33	16.8	81	41.1
	<i>Pseudomonas</i> spp.	1	11	14	17	43	36.4		6	6	16	28	14.2	71	36.0
	<i>Proteus</i> spp.	1	4	4		9	7.6	2	2	4	1	9	4.6	18	9.1
	<i>Klebsiella</i> spp.	2	2	2		6	5.1		2	2		4	2.0	10	5.1
	<i>Citrobacter</i> spp.		1	3	3	7	5.9		1		1	2	1.0	9	4.6
	<i>Aeromonas</i> spp.	1			2	3	2.5				2	2	2.5	5	2.5
	<i>Providencia</i> spp.			1	1	2	1.7			1		1	1.3	3	1.5
	TOTAL	8	29	41	40	118	100	2	23	25	29	79	100	197	100
		% DEL TOTAL					59.9	% DEL TOTAL					40.1		31.3
	VITelo	<i>Pseudomonas</i> spp.	4	9	18	17	48	39.0	4	8	15	15	42	46.7	90
<i>Enterobacter</i> spp.		4	12	17	16	49	39.8	2	10	9	9	30	33.3	79	37.1
<i>Proteus</i> spp.			2	2	2	6	4.9		3	4		7	7.8	13	6.1
<i>Klebsiella</i> spp.		3		2	3	8	6.5	1		2	2	5	5.6	13	6.1
<i>Citrobacter</i> spp.			2	4	1	7	5.7			1		1	1.1	8	3.8
<i>Aeromonas</i> spp.			1		1	2	1.6		2		2	4	4.4	6	2.8
<i>Providencia</i> spp.			1	1	1	3	2.4	1				1	1.1	4	1.9
TOTAL		11	27	44	41	123	100	8	23	31	28	90	100	213	100
	% DEL TOTAL					57.7	% DEL TOTAL					42.3		33.9	
MEZCLA DE ÓRGANOS	<i>Pseudomonas</i> spp.	1	12	9	17	39	35.5	2	12	16	17	47	43.1	86	39.3
	<i>Enterobacter</i> spp.	6	7	12	18	43	39.1	5	4	10	16	35	32.1	78	35.6
	<i>Citrobacter</i> spp.		2	3	3	8	7.3		1	3	4	8	7.3	16	7.3
	<i>Proteus</i> spp.	1	1	4	2	8	7.3		4	4		8	7.3	16	7.3
	<i>Klebsiella</i> spp.		1	2	4	7	6.4	1	1	1	4	7	6.4	14	6.4
	<i>Providencia</i> spp.	1		1	1	3	2.7	1		1	1	3	2.8	6	2.7
	<i>Aeromonas</i> spp.			1	1	2	1.8				1	1	0.9	3	1.4
	TOTAL	9	23	32	46	110	100	9	22	35	43	109	100	219	100
	% DEL TOTAL					50.2	% DEL TOTAL					49.8		34.8	
TOTAL DE AISLADOS		28	79	116	127	350	55.8	19	68	91	99	277	44.2	627	100

RV: Caldo Rappaport Vassiliadis; Se: Caldo Selenito; VB: Agar Verde Brillante; HE: Agar Entérico Hektoen; XLD: Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato; SB: Agar Sulfito Bismuto; A: Albumen; V: Vitelo; M: Mezcla de órganos.

Debido a que por cultivo bacteriológico no fue posible identificar aislados correspondientes al género *Salmonella* spp. se repitió el procedimiento de incubación desde el preenriquecimiento en caldo ICC a una temperatura de 25 °C para las muestras que fueron positivas a *Salmonella* spp. por PCR, los resultados son reportados en el punto 6.2. Se seleccionaron las colonias sugerentes a *Salmonella* spp. pero por identificación bioquímica los resultados obtenidos fueron aislados del género *Proteus* spp. o no se obtuvo crecimiento bacteriológico.

6.2 RESULTADOS POR PCR

De los 63 HNE (100%) se obtuvieron ocho HNE (12.7%) positivos a *Salmonella* spp. en al menos una de las tres muestras colectadas y en uno o los dos medios de enriquecimiento selectivo utilizados. Los HNE positivos sólo corresponden a las playas ANP SANT Playa de Tierra Colorada y RPC Playa Tortuguera Cahuitán con cuatro HNE de cada sitio (Anexo 1).

6.2.1 Resultados por PCR del ANP SANT Playa de Tierra Colorada: en el ANP SANT Playa de Tierra Colorada fueron positivos los huevos #6, #7, #10 y #15; el HNE #6 fue positivo en A, V y M cultivado en RV, y positivo en A y M cultivado en Se; el HNE #7 fue positivo en A, V y M cultivado en RV, y positivo en A y V cultivado en Se; el HNE #10 y #15 solo fueron positivos en V cultivados en RV (Fig. 11).

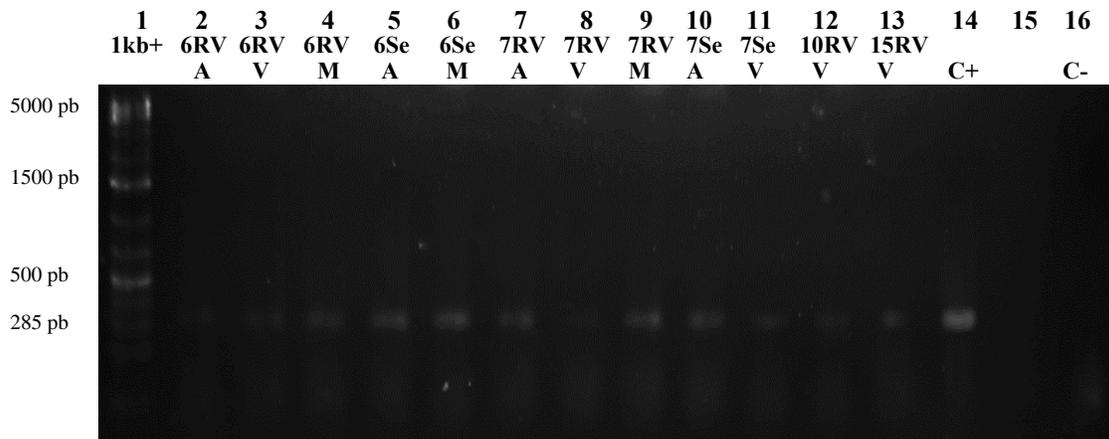


Figura 11. PCR de los HNE del ANP SANT Playa de Tierra Colorada. Gel de agarosa al 1.5% en amortiguador SB. Amplificación del fragmento del gen *invA* de 285 pb de *Salmonella* spp.

Carril 1: MPM 1 Kb+.

Carril 2-4: Resultados positivos del HNE #6 en A, V y M provenientes de medio RV

Carril 5-6: Resultados positivos del HNE #6 en A y M provenientes de medio Se.

Carril 7-9: Resultados positivos del HNE #7 en A, V y M provenientes de medio RV

Carril 10-11: Resultados positivos del HNE #7 en A y V provenientes de medio Se.

Carril 12: Resultado positivo del HNE #10 en V proveniente de medio RV

Carril 13: Resultado positivo del HNE #15 en V proveniente de medio RV

Carril 14: Control positivo para el fragmento del gen *invA* de 285 pb de *Salmonella* spp.

Carril 15: Vacío

Carril 16: Control negativo.

6.2.2 Resultados por PCR de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán: en la RPC Playa Tortuguera Cahuitán fueron positivos los HNE #1, #7, #8 y #9; el HNE #1 fue positivo en A, V y M cultivado solo en RV; el HNE #7 solo fue positivo en V cultivado en RV; el HNE #8 fue positivo en A cultivado en RV y positivo en A y M cultivado en Se; el HNE #9 solo fue positivo en A cultivado en RV (Fig. 12).

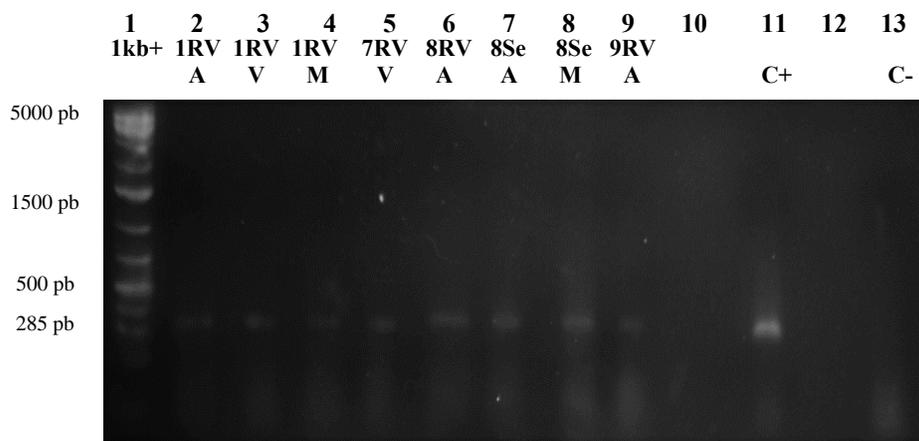


Figura 12. PCR de los HNE de la RCP Playa Tortuguera Cahuitán. Gel de agarosa al 1.5% en amortiguador SB. Amplificación del fragmento del gen *invA* de 285 pb de *Salmonella* spp.

Carril 1: MPM 1 Kb+.

Carril 2-4: Resultados positivos del HNE #1 en A, V y M provenientes de medio RV

Carril 5: Resultado positivo del HNE #7 en V proveniente de medio RV.

Carril 6: Resultado positivo del HNE #8 en A proveniente de medio RV.

Carril 7 y 8: Resultado positivo del HNE #8 en A y M provenientes de medio Se.

Carril 9: Resultado positivo del HNE #9 en A proveniente de medio RV.

Carril 10: Vacío.

Carril 11: Control positivo para el fragmento del gen *invA* de 285 pb de *Salmonella* spp.

Carril 12: Vacío.

Carril 13: Control negativo.

De los ocho huevos positivos a *Salmonella* spp., en tres de ellos (37.5%) se detectó en A, V y M; tres (37.5%) en V; uno (12.5%) en A y M y uno (12.5%) en A. Los resultados positivos se obtuvieron en su mayoría a partir de las muestras cultivadas en RV. De los cinco (100%) HNE con resultados positivos en A, dos (40%) fueron detectados exclusivamente provenientes de RV y tres (60%) de RV y Se. De los seis (100%) HNE con resultados positivos en V, cinco (83.3%) fueron provenientes de RV y uno (16.6%) de RV y Se. De los cuatro (100%) HNE con resultados positivos en M, dos (50%) provinieron de RV, uno (25%) de RV y Se y uno (25%) de Se. En total se obtuvieron 20 amplificadas, de los cuales ocho correspondieron a A (40%), siete (35%) a V y cinco (25%) a M (Cuadro 12). De los 20 amplificadas, 14 (70%) fueron con RV y seis (30%) con Se.

Cuadro 12. Resultados positivos a *Salmonella* spp. por PCR. Se muestran los resultados de todos los HNE obtenidos en los cinco sitios de muestreo provenientes de A, V y M de acuerdo a su medio de enriquecimiento selectivo.

HNE	SITIO DE MUESTREO																																
	ANP SANT PLAYA DE TIERRA COLORADA						RPC PLAYA TORTUGUERA CAHUITAN						ANP SANT PLAYA DE ESCOBILLA						RPC PLAYA TORTUGUERA BARRA DE LA CRUZ						ANP PN LAGUNAS DE CHACAHUA								
	RV			Se			RV			Se			RV			Se			RV			Se			RV			Se					
	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M	A	V	M
1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	=	-	-	=	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
6	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
7	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
8	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
9	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
15	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
T	2	4	2	2	1	1	3	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

HNE: Huevo no eclosionado; RV: Caldo Rappaport Vassiliadis; Se: Caldo Selenito; A: Albumen; V: Vitelo; M: Mezcla de órganos; +: Positivo a *Salmonella* spp.; -: Negativo a *Salmonella* spp.; =: Negativo a *Salmonella* spp. en los embriones gemelares; T: Total.

6.3 RESULTADOS DEL ESTUDIO PATOLÓGICO

Se realizó el estudio patológico de 60 de los 64 embriones colectados en los cinco sitios de muestreo; los cuatro huevos restantes mostraban cambios autolíticos lo que impidió su estudio correspondiente. Los resultados se ordenaron en los siguientes cuadros con el número de HNE y los datos del nido correspondiente: número de nido propio del sitio de muestreo, porcentaje de eclosión y días de eclosión. Se presentan los géneros bacterianos aislados por cultivo bacteriológico en cada tipo de muestra; además de los HNE positivos a *Salmonella* spp. por PCR. Se registraron los resultados del examen macroscópico y microscópico, y el diagnóstico morfológico de la muerte de cada uno de los embriones.

6.3.1 Resultados del estudio patológico del ANP SANT Playa de Tierra Colorada: en este sitio de muestreo se obtuvieron 15 HNE de 11 nidos diferentes. Los cuatro HNE positivos por PCR a

Salmonella spp. correspondieron a nidos diferentes cada uno; el huevo #6 del nido 547, el #7 del nido 548, el #10 del nido 544 y el #15 del 557. Los 15 HNE se encontraban en etapa de desarrollo embrionario (EDE) tardía (Fig. 13). En el examen macroscópico 13 embriones se observaron sin cambios morfológicos aparentes (SCMA), y se recuperaron dos embriones con malformaciones correspondientes a albinismo y ciclopía (Bárceñas & Maldonado, 2009) siendo uno de estos positivo a *Salmonella* spp. en el vitelo (Figs. 14 y 15). En el examen microscópico todos se obtuvieron sin cambios histopatológicos aparentes (SCHA) por lo que no se pudo obtener la descripción morfológica para definir su probable diagnóstico de muerte, excepto en los dos embriones que mostraron malformaciones congénitas (Cuadro 13).



Figura 13. Embrión #11 en EDE tardía del ANP SANT Playa de Tierra Colorada.



Figura 14. Embrión #2 con ciclopía y albinismo del ANP SANT Playa de Tierra Colorada.



Figura 15. Embrión #15 con ciclopía y albinismo del ANP SANT Playa de Tierra Colorada. *Salmonella* spp. (+).

Cuadro 13. Examen patológico de embriones del ANP SANT Playa de Tierra Colorada.

HNE	Datos del nido	Muestra	Género bacteriano	Examen Macroscópico	Examen Microscópico	Dx morfológico
1	N: 548 %E: 60% DI: 48	A	<i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
2	N: 549 %E: 61.53% DI: 50	V	<i>Providencia</i> spp.	EDE: tardía CM: Albinismo, ciclopía	SCHA	Congénito
		M	<i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
3	N: 547 %E: 70.68% DI: 48	V	<i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		M	<i>Enterobacter</i> spp.			
4	N: 545 %E: 71.57% DI: 50	A	<i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		M	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
5	N: 548 %E: 60% DI: 48	M	<i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
6	N: 547 %E: 70.68% DI: 48	A	<i>Proteus</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. *	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. *			
		M	<i>Salmonella</i> spp. *			
7	N: 548 %E: 60% DI: 48	A	<i>Proteus</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. *	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Proteus</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. *			
		M	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. *			
8	N: 576 %E: 69.5% DI: 47	V	<i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		M	<i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
9	N: 554 %E: 0% DI: 49	A	<i>Proteus</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Citrobacter</i> spp.			
10	N: 544 %E: 0% DI: 50	A	<i>Proteus</i> spp. <i>Providencia</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Salmonella</i> spp. * <i>Providencia</i> spp.			
		M	<i>Providencia</i> spp.			
11	N: 554 %E: 0% DI: 49	A	<i>Enterobacter</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Providencia</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
12	N: 551 %E: 63.3% DI: 48	V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		M	<i>Enterobacter</i> spp.			
13	N: 550 %E: 53.19% DI: 50	A	<i>Aeromonas</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		M	<i>Enterobacter</i> spp.			
14	N: 553 %E: 45% DI: 49	A	<i>Proteus</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Pseudomonas</i> spp.			
15	N: 557 %E: 77.5% DI: 49	A	<i>Enterobacter</i> spp.	EDE: tardía CM: albinismo, ciclopía	SCHA	Congénito
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. *			
		M	<i>Enterobacter</i> spp.			

HNE: huevo no eclosionado; Dx: diagnóstico; N: número de nido basado en la identificación propia del lugar; %E: porcentaje de eclosión; DI: días de incubación; A: albumen; V: vitelo; M: mezcla de órganos; *: identificación solo por PCR; EDE: etapa de desarrollo embrionario; CM: cambios morfológicos; SCMA: sin cambios morfológicos aparentes; SCHA: sin cambios histopatológicos aparentes.

6.3.2 Resultados del estudio patológico de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán: en este sitio de muestreo se obtuvieron 15 HNE de dos nidos diferentes. Los cuatro HNE positivos por PCR a *Salmonella* spp. correspondieron a dos nidos diferentes; los HNE #1, #7 y #8 correspondieron al nido 199 y el #9 al nido 201 (Cuadro 14). El embrión #11 se encontraba en EDE temprana y 14 embriones en EDE tardía. En el examen microscópico se encontró al embrión #7 con diagnóstico morfológico de nefrocalcinosis (Fig. 16) y el #13 con nefrocalcinosis y celomitis (Figs. 17 y 18); los 13 embriones restantes se mostraron SCMA y SCHA en los órganos estudiados por lo que no se pudo obtener la descripción morfológica para definir su probable diagnóstico de muerte.

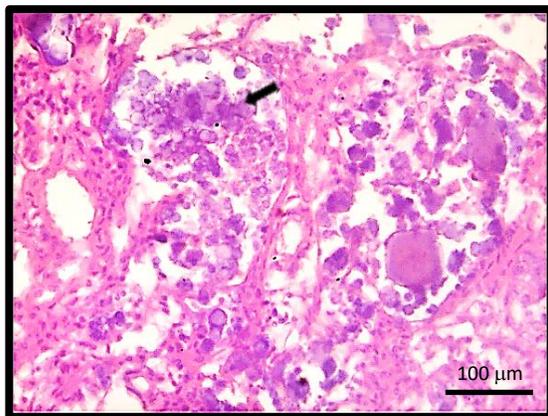


Figura 16. Fotomicrografía del embrión #7 de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán. Sección de riñón con presencia de un material morado (calcio, flecha negra) en la luz de la mayoría de los túbulos contorneados proximales (H&E 40x).

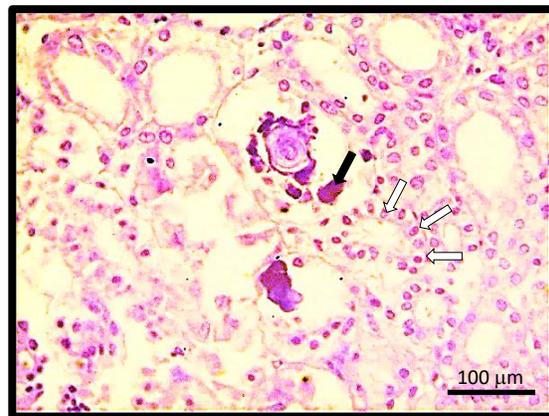


Figura 17. Fotomicrografía del embrión #13 de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán. Sección de riñón con presencia de un material morado (calcio, flecha negra) en la luz de la mayoría de los túbulos contorneados proximales (flechas blancas) (H&E 40x).

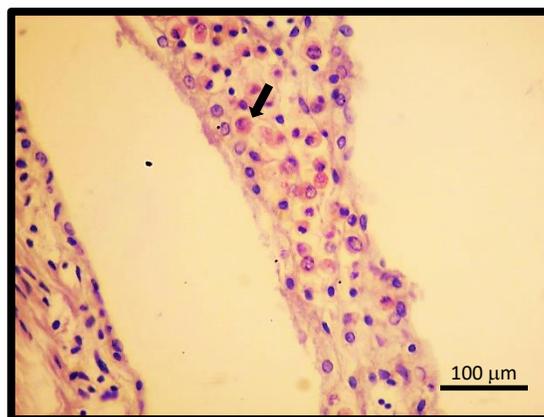


Figura 18. Fotomicrografía del embrión #13 de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán. Sección de peritoneo (celoma) en cantidad discreta y difusa de macrófagos (flecha negra) (H&E 40x).

Cuadro 14. Examen patológico de embriones de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán.

HNE	Datos del nido	Muestra	Género bacteriano	Examen Macroscópico	Examen Microscópico	Dx morfológico
1	N: 199 %E: 14% DI: 48	A	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Salmonella</i> spp.*	EDE; tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Salmonella</i> spp.*			
		M	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Salmonella</i> spp.*			
2	N: 199 %E: 14% DI: 48	A	<i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp.			
3	N: 199 %E: 14% DI: 48	A	<i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp.			
4	N: 199 %E: 14% DI: 48	A	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Aeromonas</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
5	N: 199 %E: 14% DI: 48	A	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		M	<i>Enterobacter</i> spp.			
6	N: 199 %E: 14% DI: 48	V	<i>Klebsiella</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		M	<i>Enterobacter</i> spp.			
7	N: 199 %E: 14% DI: 48	A	<i>Enterobacter</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	-Sección de riñón con presencia de un material morado (calcio) en la luz de la mayoría de los túbulos contorneados proximales	Nefrocalcinosis
		V	<i>Salmonella</i> spp.* <i>Enterobacter</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp.			
8	N: 199 %E: 14% DI: 48	A	<i>Salmonella</i> spp.* <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Salmonella</i> spp.*			
9	N: 201 %E: 14% DI: 45	A	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Salmonella</i> spp.*	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp.			
10	N: 201 %E: 14% DI: 45	A	<i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		M	<i>Klebsiella</i> spp.			
11	N: 201 %E: 14% DI: 45	A	<i>Enterobacter</i> spp.	EDE: temprana CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		M	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Proteus</i> spp.			
12	N: 201 %E: 14% DI: 45	A	<i>Klebsiella</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp.			
13	N: 201 %E: 14% DI: 45	A	<i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	-Sección de riñón con presencia de un material morado (calcio) en la luz de la mayoría de los túbulos contorneados proximales. -Sección de peritoneo (celoma) con cantidad discreta y difusa de macrófagos.	-Nefrocalcinosis y celomitis crónica, discreta, difusa.
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp.			
14	N: 201 %E: 14% DI: 45	A	<i>Klebsiella</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp.			
15	N: 201 %E: 14% DI: 45	V	<i>Enterobacter</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		M	<i>Enterobacter</i> spp.			

HNE: huevo no eclosionado; Dx: diagnóstico; N: número de nido basado en la identificación propia del lugar; %E: porcentaje de eclosión; DI: días de incubación; A: albumen; V: vitelo; M: mezcla de órganos; *: identificación solo por PCR; EDE: etapa de desarrollo embrionario; CM: cambios morfológicos; SCMA: sin cambios morfológicos aparentes; SCHA: sin cambios histopatológicos aparentes.

6.3.3 Resultados del estudio patológico del ANP SANT Playa de Escobilla: en este sitio de muestreo se obtuvieron 11 HNE de cuatro nidos diferentes. No se detectaron HNE positivos por PCR a *Salmonella* spp. Los embriones #3 y #6 se encontraban en EDE temprana (Fig. 19); los diez embriones restantes se encontraban en EDE tardía. En el HNE #1 se obtuvieron gemelos idénticos (Bárceñas & Maldonado, 2009) (Fig. 20). En el examen microscópico se encontró al embrión del HNE #5 con diagnóstico morfológico de nefrocalcinosis (Fig. 21); los nueve embriones restantes se mostraron SCMA y SCHA en los órganos estudiados, por lo que no se pudo obtener la descripción morfológica para definir su probable diagnóstico de muerte (Cuadro 15).



Figura 19. Embrión #3 en EDE temprana del ANP SANT Playa de Escobilla.



Figura 20. Embriones gemelares idénticos del HNE #1 del ANP SANT Playa de Escobilla.

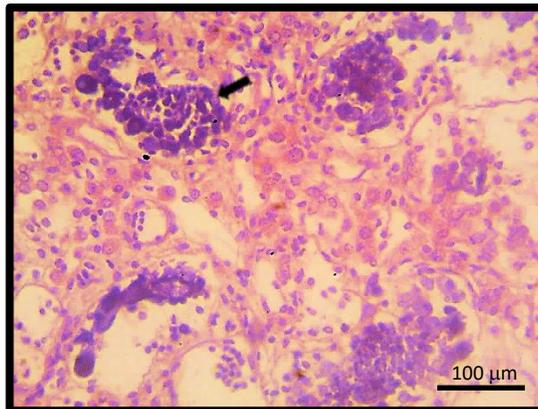


Figura 21. Fotomicrografía del embrión del HNE #5 del ANP SANT Playa de Escobilla. Sección de riñón con presencia de un material morado (calcio, flecha negra) en la luz de la mayoría de los túbulos contorneados proximales (H&E 40x).

Cuadro 15. Examen patológico de embriones del ANP SANT Playa de Escobilla.

HNE	Datos del nido	Muestra	Género bacteriano	Examen Macroscópico	Examen Microscópico	Dx morfológico
1	N: 623 %E: 77.4% DI: 52	A	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	Embrión Gemelar 1 EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Congénito
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M1	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	Embrión gemelar 2 EDE: tardía CM: SCMA		
		M2	<i>Enterobacter</i> spp.			
2	N: 623 %E: 77.4% DI: 52	A	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
3	N: 624 %E: 96.6% DI: 52	A	<i>Enterobacter</i> spp.	EDE: temprana CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Aeromonas</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp.			
		M	<i>Pseudomonas</i> spp.			
4	N: 625 %E: 71% DI: 52	A	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Aeromonas</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
5	N: 625 %E: 71% DI: 52	A	<i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	-Sección de riñón con presencia de un material morado (calcio) en la luz de la mayoría de los túbulos contorneados proximales 40x.	Nefrocalcinosis
		V	<i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Pseudomonas</i> spp.			
6	N: 625 %E: 71% DI: 52	A	<i>Aeromonas</i> spp.	EDE: temprana CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
7	N: 625 %E: 71% DI: 52	A	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
8	N: 631 %E: 35.2% DI: 51	A	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Citrobacter</i> spp.			
		M	<i>Citrobacter</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp.			
9	N: 631 %E: 35.2% DI: 51	A	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp. <i>Citrobacter</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
10	N: 631 %E: 35.2% DI: 51	A	<i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp.			
		M	<i>Pseudomonas</i> spp.			
11	N: 631 %E: 35.2% DI: 51	M	<i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido

HNE: huevo no eclosionado; Dx: diagnóstico; N: número de nido basado en la identificación propia del lugar; %E: porcentaje de eclosión; DI: días de incubación; A: albumen; V: vitelo; M: mezcla de órganos; M1: Mezcla de órganos del embrión 1; M2: Mezcla de órganos del embrión 2. EDE: etapa de desarrollo embrionario; CM: cambios morfológicos; SCMA: sin cambios morfológicos aparentes; SCHA: sin cambios histopatológicos aparentes.

6.3.4 Resultados del estudio patológico de la RPC Playa Tortuguera Barra de la Cruz: en este sitio de muestreo se obtuvieron 13 HNE de tres nidos diferentes. No se detectaron HNE positivos a *Salmonella* spp. por PCR. De los HNE #5 y #12 se obtuvieron embriones en EDE temprana; los 11 embriones restantes se encontraban en EDE tardía. En el examen microscópico se encontró al embrión #6, #9 y #13 con diagnóstico morfológico de nefrocalcinosis (Fig. 22), el #9 con celomitis (Figs. 23) y el #12 con dermatitis (Figs. 24); el embrión #10 presentó cambios postmortem avanzados por lo que no se realizaron cortes histológicos; los nueve embriones restantes se mostraron SCMA y SCHA en los órganos estudiados por lo que no pudo obtenerse el diagnóstico morfológico para definir su probable causa de muerte (Cuadro 16).

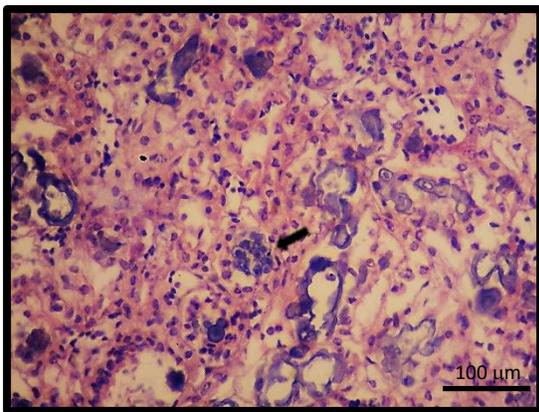


Figura 22. Fotomicrografía del embrión #6 de la RPC Playa Tortuguera Barra de la Cruz. Sección de riñón con presencia de un material morado (calcio, flecha negra) en la luz de la mayoría de los túbulos contorneados proximales (H&E 40x).

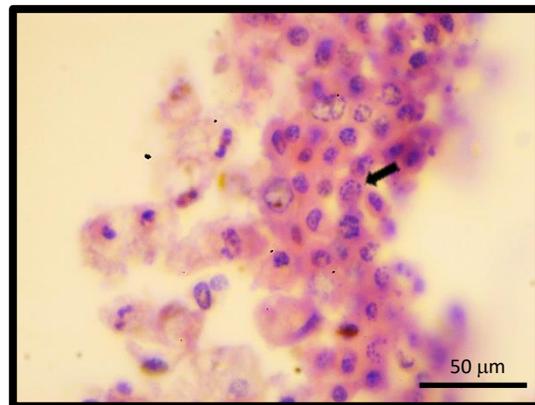


Figura 23. Fotomicrografía del embrión #9 de la RPC Playa Tortuguera Barra de la Cruz. Sección de peritoneo (celoma) con cantidad discreta y difusa de macrófagos (flecha negra) (H&E 100x).

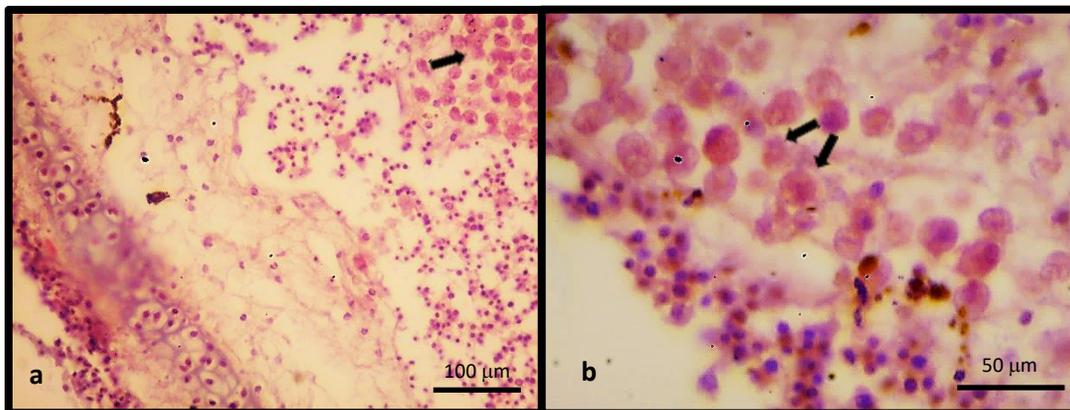


Figura 24. a. Fotomicrografía del embrión #12 de la RPC Playa Tortuguera Barra de la Cruz. Sección de piel con cantidad discreta de heterófilos y macrófagos (flecha negra) debajo de la dermis compacta (H&E 40x). b. Acercamiento de la misma fotomicrografía donde se muestra cantidad discreta de heterófilos y macrófagos (flechas negras) (H&E 100x).

Cuadro 16. Examen patológico de embriones de la RPC Playa Tortuguera Barra de la Cruz.

HNE	Datos del nido	Muestra	Género bacteriano	Examen Macroscópico	Examen Microscópico	Dx morfológico
1	N: 256 %E: 96.3% DI: 51	A	<i>Enterobacter</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		M	<i>Enterobacter</i> spp.			
2	N: 256 %E: 96.3% DI: 51	A	<i>Enterobacter</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp.			
3	N: 256 %E: 96.3% DI: 51	A	<i>Enterobacter</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp.			
4	N: 256 %E: 96.3% DI: 51	A	<i>Enterobacter</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Proteus</i> spp.			
5	N: 257 %E: 80% DI: 50	A	<i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: temprana CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Aeromonas</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
6	N: 257 %E: 80% DI: 50	A	<i>Proteus</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	-Sección de riñón con presencia de un material morado (calcio) en la luz de la mayoría de los túbulos contorneados proximales.	Nefrocalcinosis
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Providencia</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Pseudomonas</i> spp.			
7	N: 257 %E: 80% DI: 50	A	<i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
8	N: 257 %E: 80% DI: 50	A	<i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Proteus</i> spp.			
		M	<i>Proteus</i> spp.			
9	N: 257 %E: 80% DI: 50	A	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Providencia</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	-Sección de riñón con presencia de un material morado (calcio) en la luz de la mayoría de los túbulos contorneados proximales. -Sección de peritoneo (celoma) con cantidad discreta y difusa de macrófagos.	Nefrocalcinosis Celomitis crónica discreta y difusa.
		V	<i>Proteus</i> spp.			
		M	<i>Proteus</i> spp.			
10	N: 257 %E: 80% DI: 50	A	<i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía Desprendimiento de capa de queratina de los escudos del caparazón.	Nota: No se realizaron cortes histológicos debido a los cambios <i>postmortem</i> avanzados del espécimen.	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
11	N: 264 %E: 87.5% DI: 48	A	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp.			
12	N: 264 %E: 87.5% DI: 48	A	<i>Citrobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: temprana CM: SCMA	-Sección de piel con cantidad discreta de heterófilos y macrófagos debajo de la dermis compacta.	Dermatitis crónica, discreta y difusa.
		V	<i>Citrobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Citrobacter</i> spp. <i>Proteus</i> spp.			
13	N: 264 %E: 87.5% DI: 48	A	<i>Citrobacter</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	-Sección de riñón con presencia de un material morado (calcio) en la luz de la mayoría de los túbulos contorneados proximales.	Nefrocalcinosis
		V	<i>Citrobacter</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp. <i>Proteus</i> spp.			
		M	<i>Citrobacter</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			

HNE: huevo no eclosionado; Dx: diagnóstico; N: número de nido basado en la identificación propia del lugar; %E: porcentaje de eclosión; DI: días de incubación; A: albumen; V: vitelo; M: mezcla de órganos; EDE: etapa de desarrollo embrionario; CM: cambios morfológicos; SCMA: sin cambios morfológicos aparentes; SCHA: sin cambios histopatológicos aparentes.

6.3.5 Resultados del estudio patológico del ANP PN Lagunas de Chacahua: en este sitio de muestreo se obtuvieron nueve HNE de cuatro nidos diferentes. No se detectaron HNE positivos a *Salmonella* spp. por PCR. En el HNE #3 se encontró un embrión albino con arrinia o ausencia de nariz y en el HNE #4 un embrión albino con arrinia y con ausencia de ojos o anoftalmia (Figs. 25 y 26) (Bárceñas & Maldonado, 2009). En el examen microscópico se encontró al embrión #1 con diagnóstico morfológico de hepatitis (Figs. 27 y 28) y el #4 con celomitis (Fig. 29); los embriones #5, #6 y #7 presentaron cambios *postmortem* avanzados por lo que no se realizó cortes histológicos; los tres embriones restantes se mostraron SCMA y SCHA en los órganos estudiados por lo que no pudo obtenerse la descripción morfológica para definir su probable diagnóstico de muerte (Cuadro 17).



Figura 25. Embrión #3 con arrinia y albinismo del ANP PN Lagunas de Chacahua.



Figura 26. Embrión #4 con arrinia, anoftalmia y albinismo del ANP PN Lagunas de Chacahua.

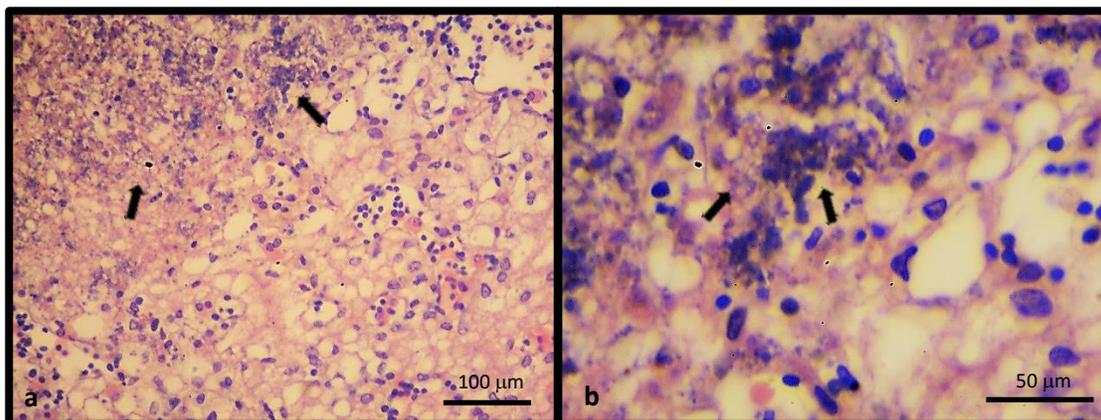


Figura 27. a. Fotomicrografía del embrión #1 del ANP PN Lagunas de Chacahua. Sección de hígado con focos múltiples de necrosis coagulativa y heterófilos escasos (flechas negras) (H&E 40x) b. Acercamiento de la fotomicrografía donde se muestra necrosis coagulativa y heterófilos escasos (flechas negras) (H&E 100x).

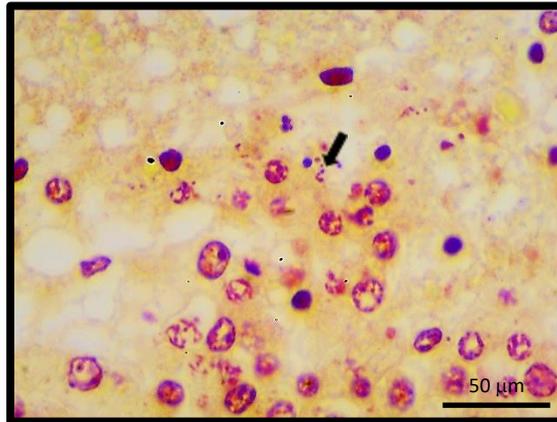


Figura 28. Fotomicrografía del embrión #1 del ANP PN Lagunas de Chacahua. Se muestra una sección de hígado con un foco de necrosis coagulativa, heterófilos escasos y bacilos Gram negativos (flecha negra) (Gram 100x).

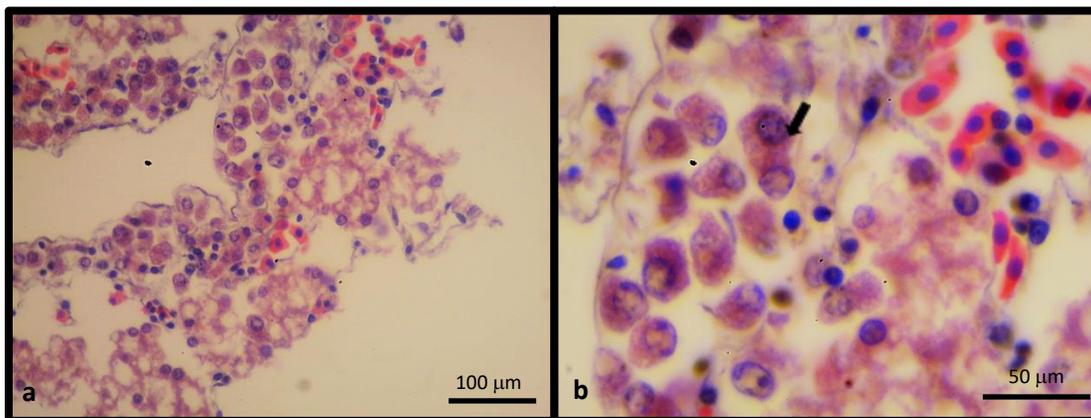


Figura 29. a. Fotomicrografía del embrión #4 del ANP PN Lagunas de Chacahua. Sección de peritoneo (celoma) con cantidad discreta de macrófagos (H&E 40x) b. Acercamiento de la misma fotomicrografía donde se observa con una flecha negra cantidad discreta de macrófagos (H&E 100x).

Cuadro 17. Examen patológico de embriones del ANP PN Lagunas de Chacahua.

HNE	Datos del nido	Muestra	Género bacteriano	Examen Macroscópico	Examen Microscópico	Dx morfológico
1	N: 1 %E: 55% DI: 48	A	<i>Citrobacter</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	-Sección de hígado con múltiples focos de necrosis coagulativa, heterófilos escasos y bacilos Gram negativos.	Hepatitis aguda y necrótica moderada multifocal.
		V	<i>Enterobacter</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
2	N: 4 %E: 70% DI: 48	A	<i>Citrobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Citrobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Citrobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
3	N: 4 %E: 70% DI: 48	A	<i>Klebsiella</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía Albino con arrinia	SCHA	Congénito
		V	<i>Klebsiella</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Pseudomonas</i> spp.			
4	N: 6 %E: 72% DI: 49	A	<i>Citrobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía Albino con arrinia y anofalmia	-Sección de peritoneo (celoma) con cantidad discreta de macrófagos.	Congénito Celomitis crónica discreta, difusa.
		V	<i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Citrobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
5	N: 7 %E: 84% DI: 49	A	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía Desprendimiento de capa de queratina de los escudos del caparazón.	Nota: No se realizaron cortes histológicos debido a los cambios <i>postmortem</i> avanzados del espécimen.	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
6	N: 7 %E: 84% DI: 49	A	<i>Enterobacter</i> spp.	EDE: tardía Desprendimiento de capa de queratina de los escudos del caparazón.	Nota: No se realizaron cortes histológicos debido a los cambios <i>postmortem</i> avanzados del espécimen.	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp.			
		M	<i>Pseudomonas</i> spp.			
7	N: 7 %E: 84% DI: 49	A	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía Desprendimiento de capa de queratina de los escudos del caparazón.	Nota: No se realizaron cortes histológicos debido a los cambios <i>postmortem</i> avanzados del espécimen.	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
8	N: 7 %E: 84% DI: 49	A	<i>Aeromonas</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
9	N: 7 %E: 84% DI: 49	A	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	EDE: tardía CM: SCMA	SCHA	Indefinido
		V	<i>Aeromonas</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			
		M	<i>Aeromonas</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.			

HNE: huevo no eclosionado; Dx: diagnóstico; N: número de nido basado en la identificación propia del lugar; %E: porcentaje de eclosión; DI: días de incubación; A: albumen; V: vitelo; M: mezcla de órganos; EDE: etapa de desarrollo embrionario; CM: cambios morfológicos; SCMA: sin cambios morfológicos aparentes; SCHA: sin cambios histopatológicos aparentes

6.3.6 Nefrocalcinosis: se presentó en el 10% (6 de 60) de los embriones estudiados. Histológicamente, consistió en la presencia de un material morado correspondiente a calcio en la luz de la mayoría de los túbulos contorneados proximales. Solo se presentó en el 10.9% (6 de 55) embriones en EDE tardía. Los cinco embriones en los que se identificó mineralización renal eran de cinco nidos diferentes y se encontró en tres de los cinco sitios estudiados. El embrión #7 de

RCP Playa Tortuguera Cahuitán presentó mineralización renal y fue positivo a *Salmonella* spp. por PCR.

6.3.7 Celomitis: se presentó en el 5% (3 de 60) de los embriones estudiados. Histológicamente, la celomitis consistió en secciones del celoma con cantidad discreta de macrófagos. Solo se presentó en el 5.45% (3 de 55) de embriones en EDE tardía. Los tres embriones en los que se identificó mineralización renal eran de cinco nidos diferentes. Ninguno de los embriones fue positivo a *Salmonella* spp.

6.3.8 Dermatitis: se presentó en el 1.6% (1 de 60) de los embriones estudiados. Histológicamente, la dermatitis consistió en una sección de piel de la cabeza que debajo de la dermis presentaba cantidad discreta de heterófilos y macrófagos. Solo se presentó en el 20% (1 de 5) de embriones en EDE temprana. Del nido donde se obtuvo este embrión se colectaron dos embriones más; uno de ellos presentó mineralización renal y otro se observó SCHA. Se aisló *Citrobacter* spp. y *Proteus* spp. de la mezcla de órganos.

6.3.9 Hepatitis: se presentó en el 1.6% (1 de 60) de los embriones estudiados. Histológicamente, la hepatitis consistió en focos múltiples de necrosis coagulativa, con escasos heterófilos y bacilos Gram negativos con un diagnóstico de hepatitis aguda y necrótica bacteriana, dicha necrosis en cantidad moderada y distribución multifocal. Se detectaron los bacilos mediante la tinción de Gram. Solo se presentó en el 1.8% (1 de 55) de embriones en EDE tardía. Se obtuvo sólo un embrión del nido del que se describió este hallazgo. Se aisló *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp. y *Proteus* spp. de la mezcla de órganos.

6.3.10 Malformaciones congénitas: se presentaron en el 10% (6 de 60) de los embriones estudiados. Histológicamente, se observaron SCHA con excepción de uno con celomitis. Los seis embriones fueron albinos, de los cuales dos presentaron ciclopía, dos arrinia, dos embriones gemelares idénticos y uno con anoftalmia. Se presentó en el 10.9% (6 de 55) de embriones en EDE tardía. Los cinco HNE de donde se obtuvieron las malformaciones congénitas pertenecieron a cinco nidos diferentes.

7. DISCUSIÓN

El presente trabajo es el primero en detectar *Salmonella* spp. mediante PCR en el huevo de tortuga golfina (*L. olivacea*). Se obtuvieron muestras de HNE, en las que el 12.7% (8 de 63) fueron positivas a *Salmonella* spp.; sin embargo, no se logró el aislamiento bacteriológico. Estos hallazgos aportan elementos importantes sobre la patogenia al permitir analizar el efecto fisiopatológico de la salmonelosis en tortugas marinas, y sobre la epidemiología debido a que las tortugas marinas son una fuente potencial de transmisión de *Salmonella* spp. La detección de esta bacteria y otros microorganismos en tortugas marinas se ha llevado a cabo principalmente a partir de cloaca y líquido cloacal (Aguilar, 2011; Keene et al., 2014; Navas, 2013). Se cuenta con muy poca información sobre la identificación de *Salmonella* spp. en embriones y huevos de tortugas, y su asociación directa con el éxito de eclosión. Este género bacteriano se ha detectado en otros estudios esporádicamente por cultivo bacteriológico o de forma experimental (Al-Bahry et al., 2009; Feeley & Treger, 1969; Hill et al., 2019; Holgersson et al., 2016; Marler et al., 1983).

Se utilizó un preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo y cultivo selectivo basado en los métodos de diagnóstico oficiales y lo reportado o recomendado por diferentes autores para aislar la bacteria en reptiles. El preenriquecimiento en medio ICC funciona como un caldo de nutrientes que selecciona y detecta pequeñas cantidades de bacterias, y permite el crecimiento no selectivo de bacterias aerobias y anaerobias; Roszak et al. (1984) reportaron que *S. enteritidis* (ahora *S. enterica* serovariedad Enteritidis) proveniente de medios acuáticos no era cultivable después de 48 h, pero al adicionar el medio ICC se lograba recuperar su cultivabilidad hasta por 21 días en medios selectivos. Sobre el uso del enriquecimiento selectivo y el cultivo en medios selectivos, varios estudios y metodologías recomendadas para el diagnóstico demuestran que este método es un factor determinante para el aislamiento de *Salmonella* spp., ya que elimina principalmente bacterias competidoras Gram positivas y otras Gram negativas, por lo que favorecen su desarrollo; sin embargo, mediante esta metodología no se logró aislar *Salmonella* spp., y por lo tanto, no se pudo establecer el método ideal para su aislamiento en HNE de tortuga golfina (*L. olivacea*). Estos estudios proporcionan poca información sobre la cultivabilidad de muestras derivadas de huevos reptilianos, ya que se enfocan principalmente en muestras de heces, cloaca, líquido cloacal, arena del nido y en las bacterias asociadas al sistema digestivo (Ayala, 1991; Bauwens et al., 2006; Castro-González & Pérez-Gil, 2011; Corrente et al., 2004; Gaertner et al., 2008; Gal & Johnson-Delaney, 2019; Hahn et al., 2007; Mitchell, 2006; SSA, 2015; Vassiliadis, 1983; Wellehan & Divers, 2019).

Mediante PCR se logró evidenciar que *Salmonella* spp. estuvo presente en una o todas las estructuras de los HNE pero podría no ser cultivable por múltiples razones. En general, se conoce que

los huevos de tortugas marinas y otras especies de tortugas contienen barreras físicas y químicas como factores antimicrobianos encontrados principalmente en el cascarón y albumen de tortuga golfina (*L. olivacea*) que combinados con los factores ambientales impiden el desarrollo bacteriano. En el estudio de López-Hurtado et al. (2010) se estudió la inhibición de crecimiento del albumen de tortuga golfina (*L. olivacea*) en algunas bacterias. Se inhibió el crecimiento de bacterias Gram positivas, pero no por completo el de algunas Gram negativas; sin embargo, no se estudió la inhibición de *Salmonella* spp. ni se describieron los factores antimicrobianos del huevo.

La principal información sobre las proteínas del huevo que funcionan como factores antimicrobianos proviene de estudios relacionados con los huevos de las aves; se sugiere que la actividad que dichas proteínas puede ser similar en los huevos de reptiles. La lisozima es un proteína que funciona como el principal factor antimicrobiano del huevo que lisa las bacterias al hidrolizar la unión β -1-4 entre el ácido N-acetilmuramínico y la N-acetilglucosamina del peptidoglicano encontrado en la pared celular de las bacterias (Hartsell, 1949). En tortuga verde (*Chelonia mydas*) se encontró un tipo de lisozima en la clara de huevo con mayor actividad lítica observada contra la bacteria Gram positiva *Micrococcus luteus*; mientras que contra las Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*, y Gram negativas como *Salmonella* Typhi, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophyla*, entre otras, la actividad lítica fue nula, pero fue importante que en el mismo estudio se encontraron tres tipos de lisozimas de dos especies de tortugas que inhibieron de forma diferente algunas bacterias (Thammasirirak et al., 2006). En tortuga caguama (*Caretta caretta*) no se ha encontrado lisozima en el albumen pero se reportó que contiene una proteína catiónica similar a una β -defensina con actividad antiviral y antibacteriana comprobada contra *Escherichia coli* y *Salmonella* Typhimurium (Suranjana et al., 2006). En general, se sabe que la lisozima tiene principal actividad contra bacterias Gram positivas; sin embargo, son pocos los estudios que detallen la actividad antimicrobiana de las lisozimas o factores similares en tortugas contra los principales patógenos bacterianos, y en donde su actividad lítica puede variar de acuerdo a la especie de tortuga. No es posible especular que *Salmonella* spp. tiene características favorables solo por ser Gram negativa, ya que podrían estar involucrados otros sistemas de defensa en el huevo de tortuga golfina (*L. olivacea*) que de forma individual o sinérgica contribuyan a la inhibición de la bacteria.

Otros factores químicos que pueden actuar como antimicrobianos del huevo son: 1) la ovotransferrina que priva a las bacterias del hierro basado en su quelación creando un ambiente deficiente en hierro para las bacterias, y también daño a las funciones biológicas de la membrana citoplasmática bacteriana (Aguilera et al., 2003; Sellier et al., 2007; Valenti et al., 1983); 2) las proteínas quelantes de vitaminas como la proteína de unión a riboflavina, la avidina que priva de

biotina y la proteína de unión a la tiamina; 3) los inhibidores de proteasas bacterianas como la cistatina, el ovomucoide, el inhibidor de ovo y la ovostatina; 4) las defensinas que inducen daño membranal, entre otros. El efecto sinérgico entre estos factores podría tener efecto antimicrobiano como el que se presenta entre la ovotransferrina y la lisozima, donde la primera desestabiliza la membrana externa de Gram negativas, y permite que la lisozima alcance e hidrolice el peptidoglicano (Baron et al., 2016).

Factores estresantes como la temperatura elevada, la cual permite una mayor actividad de factores antimicrobianos como la lisozima y el pH alcalino presentado posterior al desove por la disminución de dióxido de carbono en el huevo son otras causas para la inhibición del crecimiento de *S. Enteritidis* por su efecto bacteriostático o bactericida (Baron et al., 2016).

Pseudomonas spp. interfiere en el desarrollo de *Salmonella* spp. por competitividad dependiente de pH, temperatura y salinidad (Thomas & Wimpenny, 1996). *Pseudomonas* spp. fue la bacteria más aislada en el presente estudio, y en los HNE con resultados positivos a *Salmonella* spp. el 50% (4 de 8) tuvieron resultados positivos también a *Pseudomonas* spp., por lo que esta última podría haber interferido en el desarrollo de *Salmonella* spp. y solo haber alcanzado la cantidad mínima detectable por la sensibilidad de la PCR.

En el estudio de Roszak et al. (1984) con el caldo nutritivo ICC se logró recuperar la cultivabilidad de un aislado de *Salmonella enterica* por 21 días; sin embargo, aún fueron detectadas bacterias mediante otros métodos hasta por 60 días, las cuales no pudieron ser cultivadas, lo que sugiere que los nutrientes proporcionados por el caldo de enriquecimiento no son los únicos factores importantes para que la bacteria, que en este caso es proveniente de un medio marino, pueda ser adaptada a los medios de cultivo selectivos.

Mediante el cultivo bacteriológico se aislaron siete géneros de bacterias Gram negativas de la clase de las γ -Proteobacterias; del orden Enterobacteriaceae: *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp. y *Providencia* spp.; del orden Pseudomonadales: *Pseudomonas* spp.; y del orden Aeromonadales: *Aeromonas* spp. (Barrow & Feltham, 1993). Los estudios en donde se han aislado bacterias relacionadas a los huevos de tortugas marinas coinciden con los géneros aislados de las muestras de los HNE muestreados en este trabajo (Hill et al., 2019; Keene et al., 2014; Miller et al., 2009); sin embargo, es conveniente resaltar que los medios de enriquecimiento y cultivo selectivos utilizados en el presente estudio están enfocados al aislamiento de bacterias Gram negativas, por lo que se esperaba aislar estos géneros bacterianos. La mayoría de las bacterias Gram positivas se asocian con poca frecuencia como patógenas en los reptiles (Wellehan & Divers, 2019), y las bacterias Gram negativas son aisladas frecuentemente en reptiles sanos, ya que forman parte de su microbiota normal (Jacobson, 1984a). En el estudio de Santoro et al. (2006) se reporta la

microbiota de cloaca y fosas nasales de tortuga golfina (*L. olivacea*) donde se demuestra que las bacterias Gram negativas predominan en cloaca, lugar en donde coinciden aparatos digestivo, urinario y reproductor; y en fosas nasales predominan bacterias Gram positivas y otras Gram negativas. Las enfermedades infecciosas, como grupo, son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad de los reptiles, y en general son el resultado de inmunosupresión (Wellehan & Divers, 2019). Los géneros bacterianos encontrados en este estudio son potencialmente patógenos, y pueden aislarse de reptiles clínicamente sanos y enfermos, pero también son importantes en salud pública, ya que todos se han asociado a zoonosis (Johnson-Delaney & Gal, 2019).

En este estudio, *Enterobacter* spp. se aisló en los casos de celomitis, hepatitis y nefrocalcinosis. Fue el segundo género bacteriano más frecuentemente encontrado en todos los HNE, y coincide con ser uno de los géneros aislados de forma más común en la mayoría de los estudios similares reportados (Hill et al., 2019; Keene et al., 2014; Navas, 2013). Este microorganismo se distribuye principalmente en plantas, suelo y sistema digestivo de los animales; en reptiles se ha encontrado como parte de la microbiota o de forma incidental en orofaringe, boca, intestino, cloaca (Aguilar, 2011; Constantino, 2011; Dickinson et al., 2001; Flandry et al., 1989; Jacobson et al., 1991; McCoy & Seidler, 1973; Salb et al., 2007; Santoro, et al., 2006a; Selvarajah & Khairani-Bejo, 2019), líquido cloacal (Keene et al., 2014; Navas, 2013) y conjuntiva (Di Ianni et al., 2015). En reptiles este género bacteriano se ha encontrado en casos de dermatitis superficial de lagartos, lesiones de continuidad en piel, tromboembolismos y endocarditis séptica (Johnson & Doneley, 2018; Stephens & Rosenwax, 2018; Vogelnest, 2018), neumonía bacteriana, (Jacobson, 2007; Jacobson et al., 1991), abscesos heterofílicos (Willer et al., 2003), estomatitis (Chitty & Raftery, 2013; Holt et al., 1979), así como lesiones en cloaca, nasofaringe, sangre y piel asociadas a fibropapilomatosis por herpesvirus en tortugas marinas (Aguirre et al., 1994; Work et al., 2003). En el ser humano puede causar infecciones del tracto urinario, abscesos, neumonía e infecciones del tracto digestivo (Domínguez et al., 2008; McCoy & Seidler, 1973). Se ha demostrado que *Enterobacter sakazakii* produce enterotoxinas que pueden conducir a meningitis neonatal e incluso a la mortalidad en humanos y ratones (Pagotto et al., 2003).

El género *Proteus* spp. fue el tercer género bacteriano encontrado más frecuentemente en todos los HNE, el cual se aisló en los embriones con celomitis y dermatitis. Este es un género bacteriano hallado de forma común en estudios similares reportados en la literatura (Hill et al., 2019; Keene et al., 2014; Navas, 2013). En quelonios se ha encontrado como parte de la microbiota cutánea, de orofaringe, intestinal, cloacal (Constantino, 2011; Cooper, 1981; Dickinson et al., 2001; Jacobson et al., 1991; Santoro et al., 2006b) y en conjuntiva (Di Ianni et al., 2015). Se ha aislado en quelonios con enfermedad respiratoria (Frye, 1991; Lawrence & Needham, 1985; Snipes et al., 1980), neumonía

en embriones de tortuga (Hill et al., 2019), en enfermedad ulcerativa cutánea septicémica (SCUD, por sus siglas en inglés: *Septicemic Cutaneous Ulcerative Disease*) (Jackson & Fulton, 1970), cloacitis relacionada con distocia y salpingitis (Holt et al., 1979), conjuntivitis (Hanuskova & Tilc, 1975), abscesos heterofílicos (Willer et al., 2003), dermatitis superficiales y profundas (Jacobson, 2007; Vogelnest, 2018), gastroenteritis (Johnson, 2001), bacteremia (Jacobson, 2007), tromboembolismos sépticos y endocarditis séptica secundaria (Stephens & Rosenwax, 2018). En cloaca y nasofaringe *Proteus* spp. es un patógeno asociado con fibropapilomatosis en tortuga verde (*Chelonia mydas*) (Aguirre et al., 1994), osteopatía vertebral en serpientes (Bennett & Mehler, 2006), osteomielitis (Jacobson, 1985) y estomatitis (Hilf et al., 1990; Plowman et al., 1987). En seres humanos *Proteus* spp. causa principalmente infecciones del tracto urinario y gastroenteritis (Johnson-Delaney & Gal, 2019; McCoy & Seidler, 1973).

El género *Klebsiella* spp. fue el cuarto género bacteriano encontrado con mayor frecuencia en todas las muestras de HNE, el cual se halló en embriones con celomitis y nefrocalcinosis, pero también se le ha relacionado con neumonía bacteriana en ellos (Hill et al., 2019). Este es un género bacteriano reportado de forma común por otros autores en estudios similares (Hill et al., 2019; Keene et al., 2014; Navas, 2013). Esta bacteria se ha aislado de las superficies mucosas de los animales, así como en la vegetación, el suelo y las aguas superficiales (Bagley, 1985). En reptiles esta bacteria es considerada como microbiota normal que se ha encontrado en cloaca, cavidad oral, sistema digestivo y orofaringe (Jacobson et al., 1991). *K. pneumoniae*, se asocia comúnmente con neumonía e hipopión, el cual es material purulento en la cámara anterior del ojo (Bonney et al., 1978); se ha aislado en estomatitis (Chitty & Raftery, 2013; Tracchia, 2018b), rinitis (Martínez, 1994), hepatitis infecciosa (Divers, 2013), celomitis (Tracchia, 2018a), dermatitis (Jacobson, 2007), abscesos heterofílicos (Willer et al., 2003), tromboembolismos sépticos y endocarditis séptica secundaria (Stephens & Rosenwax, 2018), osteopatía vertebral en serpientes (Knafo, 2019) y encefalitis (Jacobson, 2007). En tortugas marinas *Klebsiella* spp. ha sido identificada en cloaca como un patógeno potencial asociado con la fibropapilomatosis en tortuga verde (*Chelonia mydas*) (Aguirre et al., 1994), así como con osteomielitis, necrosis y SCUD (Barnett, 2003); también ha sido aislada a partir de líquido cloacal (Keene et al., 2014; Navas, 2013). En el ser humano es causa de muchas infecciones nosocomiales, principalmente del tracto urinario y respiratorio (Struve & Angeliki, 2004).

El género *Citrobacter* spp. fue el cuarto género bacteriano más frecuentemente encontrado en los HNE. Se halló en embriones con celomitis, dermatitis y nefrocalcinosis. Este es un género bacteriano reportado de forma común por otros autores (Hill et al., 2019; Keene et al., 2014; Navas, 2013), el cual se distribuye principalmente en plantas, suelo e intestinos de animales. En reptiles es comúnmente encontrada como microbiota de cavidad oral, sistema digestivo, orofaringe y cloaca

(Dickinson et al., 2001; Fichi et al., 2016; Hossain et al., 2017; Lawrence & Needham, 1985; Salb et al., 2007; Snipes et al., 1980). Clínicamente este género se ha encontrado en abscesos heterofílicos (Willer et al., 2003), neumonía (Snipes et al., 1980), conjuntivitis (Di Ianni et al., 2015; Hanuskova & Tilc, 1975) y septicemia con focos necróticos en hígado, corazón, riñón y bazo (Jacobson, 2007; Vogelnest, 2018), así como en hepatitis granulomatosa o necrotizante (Jacobson, 2007; Orós et al., 2004), infecciones del tracto digestivo (Johnson, 2001), infecciones del tracto urinario (Jacobson, 2007) y osteoartritis (Isaza et al., 2000). En tortugas *Citrobacter freundii* puede causar SCUD en especies de tortugas marinas (Frye, 1991; Jackson & Fulton, 1970; Kaplan, 1957), o bien lesiones cutáneas y del caparazón (George, 1997; Vogelnest, 2018) y osteomielitis (Barnett, 2003); en cloaca y nasofaringe *Citrobacter* spp. está asociado a fibropapilomatosis por herpesvirus en tortugas marinas (Aguirre et al., 1994; Work et al., 2003). En seres humanos se logra transmitir principalmente por vía oral debido a una higiene deficiente o por mordeduras de reptiles, y causa principalmente gastroenteritis o abscesos, y también es una bacteria causante de enfermedades urinarias (Flores-Mireles et al., 2015). *Citrobacter* spp. ha sido uno de los principales microorganismos aislados en líquido cloacal, y se ha encontrado también en arena del nido, cloaca y HNE; además, este género se ha asociado con neumonía bacteriana en embriones (Aguilar, 2011; Hill et al., 2019; Keene et al., 2014; Navas, 2013).

El género *Providencia* spp. fue aislado de forma esporádica en los HNE, y no se aisló en ninguno de los embriones con lesiones histológicas. Es un género bacteriano encontrado también de forma esporádica en estudios similares reportados por otros autores (Hill et al., 2019; Navas, 2013). Este microorganismo se encuentra comúnmente como microbiota normal de la cavidad oral, intestino (Hyndman, 2018; Wellehan & Divers, 2019) y cloaca (Johnston et al., 2010) de los reptiles. Es un patógeno oportunista y *P. rettgeri* es la especie de principal preocupación en estos vertebrados por sus amplios márgenes de resistencia a los antibióticos. Las lesiones en reptiles incluyen sepsis, neumonía (Hilf et al., 1990), meningoencefalitis, esplenitis y hepatitis (Benedict & Shilton, 2016; Camus & Hawke, 2002; Kycko et al., 2013; Wellehan & Divers, 2019); este género ha sido reportado en serpientes con osteopatía vertebral (Knafo, 2019) y abscesos heterofílicos (Willer et al., 2003). En tortugas marinas se ha asociado con neumonía bacteriana en embriones (Hill et al., 2019). En seres humanos se le asocia principalmente a gastroenteritis e infecciones urinarias (O'Hara et al., 2000).

El género *Pseudomonas* spp. fue el más frecuentemente encontrado en todas las muestras de HNE del presente estudio, lo cual coincide con la mayoría de los estudios reportados en la literatura, y podría ser considerada como una de las bacterias más comúnmente relacionadas con enfermedad y zoonosis (Hill et al., 2019; Keene et al., 2014; Larock et al., 2015; Miller et al., 2009; Navas, 2013). Este agente patógeno se puede encontrar en el suelo, el agua, los desechos y los sistemas digestivos

de los mamíferos. También se ha demostrado que es patógeno en el ser humano, animales, insectos y plantas (Hilf et al., 1990; Jacobson, 1993). Se considera microbiota de reptiles, especialmente *P. aeruginosa*, la cual se encuentra en la cavidad oral, tracto intestinal y cloaca de estos vertebrados (Blaylock, 2001; Cooper, 1981; Dickinson et al., 2001; Ebani et al., 2008; Hilf et al., 1990; Mader, 2006). Esta bacteria se considera un patógeno oportunista, y en reptiles se ha asociado a estomatitis, neumonía (Aleksandrov & Petkov, 1985; Draper et al., 1981; Schumacher, 2011), dermatitis, septicemia (Branch et al., 1998; Soveri, 1984), enteritis (Gray et al., 1966; Johnson, 2001), abscesos (Willer et al., 2003), infecciones oculares (Millichamp et al., 1983), tromboembolismos sépticos y endocarditis séptica secundaria (Stephens & Rosenwax, 2018). En tortugas se ha asociado con infecciones dérmicas (George, 1997; Glazebrook & Campbell, 1990b); se le relaciona con fibropapilomatosis por herpesvirus en tortugas marinas en cloaca, nasofaringe, sangre y piel (Aguirre et al., 1994; Work et al., 2003), en infecciones de las glándulas secretoras de sal y enfermedades de los sistemas digestivo, respiratorio, sensorial, cardiovascular y esquelético de las tortugas marinas (Glazebrook & Campbell, 1990a, 1990b), así como a cloatitis relacionada con distocia y salpingitis (Holt et al., 1979). Los seres humanos contraen la infección a través del contacto directo con el reptil después de rasguños o heridas por mordedura, o bien por inhalación o ingestión del microorganismo a través de material orgánico, provocando infecciones purulentas principalmente en personas inmunocomprometidas (Moore & Flaws, 2011). *Pseudomonas* spp. ha sido una de las principales bacterias aisladas en líquido cloacal, y se ha encontrado también en arena del nido, cloaca y huevos no eclosionados, además se ha asociado con neumonía bacteriana en embriones (Aguilar, 2011; Hill et al., 2019; Keene et al., 2014; Navas, 2013).

El género *Aeromonas* spp. fue aislado de forma esporádica en los HNE, y no se aisló en ninguno de los embriones con lesiones histológicas. Este es un género bacteriano que no ha sido reportado por otros autores en estudios similares (Aguilar, 2011; Hill et al., 2019; Keene et al., 2014; Navas, 2013), y es común en lagos, estanques y aguas que albergan reptiles, anfibios o peces por lo que se ha asociado con enfermedades en estas especies (Janda & Abbott, 2010; McCoy & Seidler, 1973; Thammasirirak et al., 2006). *Aeromonas* spp. puede ser parte de la microbiota de animales sanos (Flandry et al., 1989; Hilf et al., 1990). En reptiles se encuentra comúnmente en cavidad oral y nasal, piel y cloaca (Ebani et al., 2008; McCoy & Seidler, 1973; Santoro et al., 2006a, 2006b). En estos vertebrados *Aeromonas* spp. está asociada con neumonía (Keymer, 1978a; Schumacher, 2011), estomatitis ulcerativa, lesiones cutáneas, septicemia, abscesos (Ebani et al., 2008; Glazebrook & Campbell, 1990a; Keymer, 1978a, 1978b; Page, 1961; Soveri, 1984), hepatitis (Orós et al., 2004), lesiones oculares (Cooper et al., 1980; Jacobson, 1984b), tromboembolismos sépticos y endocarditis séptica secundaria (Stephens & Rosenwax, 2018). El ácaro de la serpiente, *Ophionyssus natricis*, es

un vector de estas bacterias (Camin, 1948). En seres humanos la infección potencial con *Aeromonas* spp. puede ocurrir por el contacto de heridas con el agua o por mordeduras o rasguños infligidos por reptiles que viven en ambientes acuáticos (Johnson-Delaney, 2006), y puede estar relacionada en gastroenteritis, septicemia, peritonitis, infecciones del sistema hepatobiliar y pancreático, neumonía, infecciones del tracto genitourinario y oculares, principalmente en personas inmunocomprometidas (Janda & Abbott, 2010).

En el presente estudio se comprobó que solo mediante la PCR con la amplificación de un fragmento del gen *invA* se lograron obtener resultados positivos a *Salmonella* spp. debido a su alta sensibilidad, lo que significa que la bacteria estuvo presente en una o en las tres muestras obtenidas de los HNE, detectándose en mayor porcentaje en A, posteriormente V y en menor porcentaje en M, pero pudo ser inactivada por la acción de los factores antimicrobianos, competencia microbiana o factores medioambientales ya discutidos en esta sección. La diferencia entre cultivo bacteriológico y PCR también se ha reportado en otras muestras relacionadas al sistema reproductivo de tortugas como el líquido cloacal (Navas, 2013), muestras de heces en tortugas de varias especies (Constantino, 2011; Penagos et al., 2018; Sánchez-Jiménez et al., 2011) o en muestras de huevos de gallina (Acevedo, 2019). La colonización de *Salmonella* spp. también ha sido comprobada en cascarón, clara y yema de tortuga verde (*Chelonia mydas*) mediante microscopia electrónica de barrido después de 30 minutos de exposición artificial del huevo a la bacteria (Al-Bahry et al., 2009), pero a diferencia del presente estudio, no es posible definir si esto se realizó por transmisión vertical u horizontal ya que no se obtuvieron muestras como arena del nido, cloaca, líquido cloacal o aislamientos del tracto reproductor de la madre y cascarón de los HNE. En caso de ser una transmisión horizontal también es importante considerar el manejo de los huevos en la recolocación desde los nidos *in situ* a los corrales de incubación por su probable contaminación. Los resultados positivos por PCR solo se encontraron en los sitios ANP SANT Playa de Tierra Colorada y RPC Playa Tortuguera Cahuitán. Estos sitios están ubicados a 21 km de distancia uno del otro, siendo las playas más cercanas entre ellas, a diferencia de los otros sitios de muestreo de la costa oaxaqueña, por lo que podrían existir factores en común que solo se dan en esa zona que podrían influir en los huevos ovopositados como la actividad humana, condiciones medioambientales, mismas hembras anidadoras de la temporada, estado de salud de las hembras, etc., por lo que es importante contemplar estos factores en las investigaciones futuras relacionadas a este tema. En cuanto a la técnica empleada, el medio RV fue con el que se obtuvieron más resultados positivos de *Salmonella* spp. por PCR, en comparación del medio Se, por lo que se puede considerar un medio de cultivo de enriquecimiento selectivo de elección para el diagnóstico de este agente en muestras de huevos de tortuga marina. También es importante considerar factores que puedan inhibir la técnica de PCR para realizar las modificaciones

pertinentes en estudios relacionados, así como comparar diferentes métodos, por ejemplo, la utilización de un kit comercial para la extracción de ADN.

En el estudio patológico se describieron lesiones que pueden relacionarse a la mortalidad embrionaria en tortuga golfina (*L. olivacea*). No se han realizado estudios similares en esta especie, pero en un estudio realizado en embriones de la tortuga marina laúd (*Dermochelys coriacea*) las lesiones más comúnmente encontradas fueron la mineralización renal, la neumonía bacteriana y la degeneración y necrosis del músculo esquelético (Hill et al., 2019). En otro de los estudios realizados en embriones y crías muertas en el nido se observaron principalmente cambios musculares, degeneración tubular renal, edema pulmonar y necrosis pulmonar, hepática y renal (Miller et al., 2009). El presente estudio coincide en que en los embriones estudiados la mineralización renal (10%) también fue una de las principales lesiones encontradas seguida de la celomitis (5%), la hepatitis necrótica (1.6%), y la dermatitis (1.6%), teniendo además cinco embriones con malformaciones congénitas (10%). Estas lesiones pueden estar relacionadas a etiología tóxica, nutricional, de hipoxia o por septicemia causado por microorganismos oportunistas.

La nefrocalcinosis está relacionada al metabolismo del calcio; sin embargo, durante el desarrollo embrionario de los reptiles no ha sido completamente comprendido. El embrión obtiene la mayor parte de su calcio de la yema y el cascarón del huevo, y el túbulo distal renal es un sitio primario de absorción de calcio (Stewart & Eca, 2010). La fracción yema-albúmina en tortuga golfina (*L. olivacea*) aporta el 40% del calcio necesario para el desarrollo embrionario, el 60% restante lo proporciona el cascarón del huevo, el cual sufre una reducción en la concentración de calcio entre el momento de la puesta y la eclosión del huevo alrededor del día 40 de desarrollo, por lo que la concentración de este mineral en el cascarón del huevo disminuye desde el inicio hasta el final de la incubación (Sahoo et al., 1998). En el presente estudio solo se obtuvieron embriones en EDE tardía con nefrocalcinosis, y los nidos afectados derivaron de cinco madres diferentes de tres sitios estudiados. Las causas de estas lesiones pueden derivarse de una hipercalcemia en las hembras anidadoras debido a un alto contenido de calcio en la dieta o hipervitaminosis D₃. Otras causas son insuficiencia renal, enfermedad granulomatosa o lesiones osteolíticas. La hipercalcemia en las hembras anidadoras puede presentarse en respuesta a los estrógenos y a la actividad reproductiva (vitelogénesis) (Campbell, 2014). En el estudio de Hill et al. (2019) tampoco se observó enfermedad granulomatosa o lesiones osteolíticas, por lo que se considera que la lesión tubular renal primaria posiblemente estaba presente y oscurecida por la mineralización y descomposición. También se ha discutido sobre las bajas condiciones de humedad y su relación con la mineralización renal por la deshidratación durante la incubación (Miller et al., 2009); a este respecto, en el presente estudio no se obtuvieron los valores ambientales de humedad y temperatura durante la temporada de anidación

estudiada ni tampoco un análisis que evaluara los niveles de calcio correspondientes de cada una de las hembras anidadoras y del cascarón del huevo; además, tampoco se buscó el aislamiento de otros microorganismos relacionados al metabolismo del calcio, por ejemplo, se ha encontrado que *Fusarium solani* provoca disminución de este elemento en el cascarón (Phillott et al., 2006); aunado a ello, tampoco se realizó un análisis de la arena del nido que informara de elementos no esenciales de la incubación o con el potencial para alterar las características del huevo; por lo tanto, se deberá tener en cuenta en estudios futuros para relacionar las lesiones encontradas con este tipo de factores.

Se identificaron otros cambios patológicos como celomitis, dermatitis y hepatitis que hacen sospechar de una etiología bacteriana, ya que las bacterias aisladas (*Pseudomonas* spp, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. y *Klebsiella* spp.) son causa común de este tipo de lesiones, como ya se discutió en esta sección; en el caso del embrión con hepatitis necrótica fue en la única que se logró obtener un origen bacteriano con la tinción de Gram; sin embargo, al obtener una población mixta de microbiota bacteriana no se puede definir con exactitud al organismo causante. En ninguno de los embriones con estas lesiones se detectó *Salmonella* spp., ya que solo se obtuvo resultado positivo en los vitelos de un embrión con nefrocalcinosis, y otro con malformación congénita (ciclopía y albinismo).

8. CONCLUSIONES

1. Se detectó la presencia de *Salmonella* spp. en el 12.7% (8 de 63) de los HNE de tortuga golfina (*L. olivacea*) colectados en al menos una de las muestras de A, V o M que corresponden a la población del pacífico sur mexicano.
2. Existen diferentes factores que podrían haber interferido en el aislamiento de *Salmonella* spp. a partir de las muestras colectadas de los HNE. Esta investigación establece algunos precedentes de los puntos a considerar y la dirección de los estudios futuros relacionados a este tema. Se deberá considerar la competencia bacteriana, los mecanismos de defensa del huevo, métodos de conservación de las muestras, las temperaturas de incubación de la bacteria y los tipos de medios de cultivo, así como obtener la comparación entre huevos eclosionados y no eclosionados, muestras del aparato reproductor de las hembras que anidan y los huevos ovopositados, además de datos relacionados a su medio ambiente, características de la incubación y parámetros reproductivos; sin embargo, muchos de estos puntos podrían ser difíciles de obtener por el estado de conservación de la tortuga golfina (*L. olivacea*), el trabajo multidisciplinario que esto requiere y los permisos necesarios para su investigación.
3. A diferencia del cultivo bacteriológico, la PCR fue el método diagnóstico que permitió la detección de *Salmonella* spp.; por lo que, la identificación molecular se puede considerar el método de elección para la detección en muestras derivadas de los huevos de tortuga marina. No se pudo relacionar la detección de *Salmonella* spp. con la muerte embrionaria.
4. En esta investigación, otros factores como las condiciones medioambientales, aspectos nutricionales u otros microorganismos podrían ser los responsables de la muerte embrionaria. Los siete géneros bacterianos Gram negativos aislados son comúnmente encontrados en huevos de tortuga marina, y podrían también estar asociados a la muerte de los embriones colectados.
5. Los resultados de esta investigación proporcionan información relacionada a las posibles causas de muerte de los embriones de tortuga golfina (*L. olivacea*), los cuales pueden contribuir a fortalecer el desarrollo de más estrategias de manejo y conservación para esta y otras especies de tortugas. Este tipo de información también deberá ser empleada para los correspondientes estudios epidemiológicos, ya que se debe considerar el riesgo potencial en salud pública y la posibilidad de enfermedad al consumir huevos contaminados con *Salmonella* spp. y otras bacterias zoonóticas.

9. PROSPECTIVA

- Recolectar y analizar otro tipo de muestras correspondientes al ciclo reproductivo de las tortugas marinas para relacionarlo con los hallazgos encontrados sobre la patogenia de *Salmonella* spp.
- Analizar un mayor número de muestras de huevo de tortuga marina correspondientes a nidos de corral e *in situ*, en diferentes tiempos y playas tortugueras del país para aportar mayores elementos en la incidencia y patogenia de *Salmonella* spp. en estas especies.
- Utilizar la técnica de PCR para la detección de *Salmonella* spp. en muestras relacionadas a tortuga marina, comparar métodos de extracción del ADN y estudiar si existen agentes inhibitorios de la técnica.
- Comparar diferentes métodos de conservación de muestras y de cultivo para verificar si esto influye en la cultivabilidad de *Salmonella* spp. en huevos de tortugas marinas.

10. REFERENCIAS

- Abreu, G. F. A., Koch, V., Peckham, H., Cuevas, F. E. A., López, S. K., Delgado, T. C., Márquez, M. R., Barragán, R. A. R., & Briseño, D. R. (2016). *Las tortugas marinas en México: Logros y perspectivas para su conservación*. (1ra. ed.). Soluciones Ambientales ITZENI, A.C.
- Acevedo, S. E. (2019). *Detección molecular de Salmonella spp., Campylobacter spp. y Escherichia coli diarrogénica a partir de huevo [MC Tesis]*. CDMX (MX): Universidad Nacional Autónoma de México.
- Aguilar, P. (2011). *Estudio bacteriológico en cloaca y detección de iridovirus en tortugas golfinas (Lepidochelys olivacea) de “La Escobilla”, Oaxaca, México [MC Tesis]*. CDMX (MX): Universidad Nacional Autónoma de México.
- Aguilera, O., Quiros, L. M., & Fierro, J. F. (2003). Transferrins selectively cause ion efflux through bacterial and artificial membranes. *FEBS Letters*, 548(1–3), 5–10. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00719-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00719-1)
- Aguirre, A. A., Balazs, G. H., Zimmerman, B., & Spraker, T. R. (1994). Evaluation of Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) for potential pathogens associated with fibropapillomas. *Journal of Wildlife Diseases*, 30(1), 8–15. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-30.1.8>
- Aguirre, A. A., Gardner, S. C., Marsh, J. C., Delgado, S. G., Limpus, C. J., & Nichols, W. J. (2006). Hazards associated with the consumption of sea turtle meat and eggs: A review for health care workers and the general public. *EcoHealth*, 3(3), 141–153. <https://doi.org/10.1007/s10393-006-0032-x>
- Al-Bahry, S., Mahmoud, I., Elshafie, A., Al-Harthy, A., Al-Ghafri, S., Al-Amri, I. & Alkindi, A. (2009). Bacterial flora and antibiotic resistance from eggs of green turtles *Chelonia mydas*: An indication of polluted effluents. *Marine Pollution Bulletin*, 58(5), 720–725. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.12.018>
- Aleksandrov, M., & Petkov, A. (1985). Case of *Pseudomonas aeruginosa* infection in tropical snakes. *Veterinarno-Meditsinski Nauki*, 22(7), 53–61.
- Ayala, M. A. (1991). *Determinación Bacteriológica de los Principales Agentes que Influyen en la Mortalidad Embrionaria en el Huevo de Tortuga Golfina (Lepidochelys Olivacea) (Lic. Tesis)*. Guadalajara (Mx): Universidad de Guadalajara.
- Bagley, S. T. (1985). Habitat association of *Klebsiella* species. *Infection Control*, 6(2), 52–58. <https://doi.org/10.1017/S0195941700062603>
- Bárceñas, A., & Maldonado, A. (2009). Malformaciones en embriones y neonatos de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) en Nuevo Vallarta, Nayarit, México. *Veterinaria Mexico*, 40(4), 371–

380.

- Barnett, S. (2003). Shell Infections: When There Are Chinks in the Armor. *The Newsletter of the Mid-Atlantic Turtle & Tortoise Society, Terrapin T*, 1–8.
- Baron, F., Nau, F., Guérin-Dubiard, C., Bonnassie, S., Gautier, M., Andrews, S. C., & Jan, S. (2016). Egg white versus *Salmonella* Enteritidis! A harsh medium meets a resilient pathogen. *Food Microbiology*, 53, 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.009>
- Barrow, G. I., & Feltham, R. K. . (1993). Characters of Gram-negative bacteria. In G. I. Barrow & R. K. A. Feltham (Eds.), *Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria* (3rd., pp. 94–164). Cambridge University Press.
- Bauwens, L., Vercammen, F., Bertrand, S., Collard, J. M. & De Ceuster, S. (2006). Isolation of *Salmonella* from environmental samples collected in the reptile department of Antwerp Zoo using different selective methods. *Journal of Applied Microbiology*, 101(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02977.x>
- Benedict, S., & Shilton, C. M. (2016). *Providencia rettgeri* septicaemia in farmed crocodiles. *Microbiology Australia*, 37(3), 114–117. <https://doi.org/10.1071/ma16039>
- Bennett, R. A., & Mehler, S. J. (2006). Neurology. In D. R. Mader (Ed.), *Reptile Medicine and Surgery* (2nd. ed., pp. 239–250). Saunders Elsevier.
- Bézy, V. S., Valverde, R. A., & Plante, C. J. (2015). Olive ridley sea turtle hatching success as a function of the microbial abundance in nest sand at Ostional, Costa Rica. *PLoS ONE*, 10(2), e0118579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118579>
- Blaylock, R. S. M. (2001). Normal oral bacterial flora from some southern African snakes. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 68(3), 175–182.
- Bonney, C. H., Hartfiel, D. A., & Schmidt, R. E. (1978). *Klebsiella pneumoniae* infection with secondary hypopyon in tokay gecko lizards. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 173(9), 1115–1116.
- Bosch, S., Tauxe, R. V., & Behravesh, C. B. (2016). Turtle-associated salmonellosis, United States, 2006-2014. *Emerging Infectious Diseases*, 22(7), 1149–1155. <https://doi.org/10.3201/eid2207.150685>
- Branch, S., Hall, L., Blackshear, P., & Chernoff, N. (1998). Infectious Dermatitis in a Ball Python (*Python regius*) Colony. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 29(4), 461–464.
- Braun, S., Spalloni, W., Ferreccio, F., Postigo, J., Fernández, A., Porte, L. & Triantafilo, V. (2015). Gastroenteritis por *Salmonella* spp. en tres lactantes asociada a contacto con tortugas acuáticas. *Revista chilena de infectología*, 32(3), 334–338. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000400013>

- Camin, J. H. (1948). Mite Transmission of a Hemorrhagic Septicemia in Snakes. *The Journal of Parasitology*, 34(4), 345–354.
- Campbell, T. W. (2014). Clinical Pathology. In D. R. Mader & S. J. Divers (Eds.), *Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery* (1st., pp. 70–92). W.B.Saunders. <https://doi.org/10.1002/9783527681921.ch1>
- Camus, A. C., & Hawke, J. P. (2002). Providencia rettgeri-associated septicemia and meningoencephalitis in juvenile farmed American alligators *Alligator mississippiensis*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 14(2), 149–153. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(2002\)014<0149:PRASAM>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(2002)014<0149:PRASAM>2.0.CO;2)
- Castro-González, M. I., & Pérez-Gil, F. (2011). Composición química del huevo de tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* (Testudines: Cheloniidae) y su potencial como recurso alimenticio. *Revista de Biología Tropical*, 59(4), 1729–1742.
- CDC. (2022a). *NORS Dashboard*. Centers for Disease Prevention and Control (CDC). Recuperado el 14 de marzo de 2022. <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>
- CDC. (2022b). *List of Selected Outbreak Investigations Linked to Animals, by Year*. Centers for Disease Prevention and Control (CDC). <https://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>
- Chiodini, R. J. (1982). Transovarian passage, visceral distribution, and pathogenicity of *Salmonella* in snakes. *Infection and Immunity*, 36(2), 710-713. <https://doi.org/10.1139/Z01-221>
- Chitty, J., & Raftery, A. (2013). Inflammation of the Oral (Stomatitis) and Pharyngeal Areas. In *Essentials of Tortoise Medicine and Surgery* (pp. 251–253). Wiley Blackwell.
- CITES. (2021). *Apéndices I , II y III*. Convención Sobre El Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre. <https://www.cites.org/esp/app/appendices.php>
- Constantino, G. de J. (2011). *Identificación de Salmonella spp. en muestras cloacales de quelonios (tortugas) mantenidas como animales de compañía [Lic. Tesis]*. Distrito Federal (MX): Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cooper, J. E. (1981). Bacteria. In J. E. Cooper & O. F. Jackson (Eds.), *Diseases of the Reptilia Vol. 1* (pp. 165–191). Academic Press.
- Cooper, J. E., McClelland, M. H., & Needham, J. R. (1980). An eye infection in laboratory lizards associated with an *Aeromonas* sp . *Laboratory Animals*, 14, 149–151.
- Corrente, M., Madio, A., Friedrich, K. G., Greco, G., Desario, C., Tagliabue, S. & Buonavoglia, C. (2004). Isolation of *Salmonella* strains from reptile faeces and comparison of different culture media. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02186.x>
- Corrente, M., Sangiorgio, G., Grandolfo, E., Bodnar, L., Catella, C., Trotta, A., Martella, V., &

- Buonavoglia, D. (2017). Risk for zoonotic *Salmonella* transmission from pet reptiles: A survey on knowledge, attitudes and practices of reptile-owners related to reptile husbandry. *Preventive Veterinary Medicine*, 146(February), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.07.014>
- Crastz, F. (1982). Embryological stages of the marine turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz). *Rev. Biol. Trop*, 30(2), 120–130.
- D'aoust, J. Y., Daley, E., Crozier, M., & Sewell, A. M. (1990). Pet turtles: A continuing international threat to public health. *American Journal of Epidemiology*, 132(2), 233–238. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115652>
- DGE. (2022). *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información*. El Boletín Epidemiológico. Recuperado el 14 de marzo de 2022 <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/707851/sem08.pdf>
- Di Ianni, F., Dodi, P. L., Cabassi, C. S., Pelizzone, I., Sala, A., Cavirani, S., Parmigiani, E., Quintavalla, F., & Taddei, S. (2015). Conjunctival flora of clinically normal and diseased turtles and tortoises. *BMC Veterinary Research*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0405-x>
- Dickinson, V. M., Duck, T., Schwalbe, C. R., Jarchow, J. L., & Trueblood, M. H. (2001). Nasal and cloacal bacteria in free-ranging desert tortoises from the western United States. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(2), 252–257. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-37.2.252>
- Divers, S. J. (2013). Diagnostic Endoscopy. In D. R. Mader & S. J. Divers (Eds.), *Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery* (pp. 154–178). Elsevier Saunders. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-67117-3>
- Domínguez, O., Hernández, J. C., Piedrahíta, N., Saldarriaga, N., Vanegas, D. M., & González, J. C. (2008). Características clínico-epidemiológicas de las infecciones por *Enterobacter* en la clínica cardiovascular de Medellín: agosto de 2004 a agosto de 2006. *Medicina U.P.B.*, 27(2), 101–111.
- Draper, C. S., Walker, R. D., & Lawler, H. E. (1981). Patterns of oral bacterial infection in captive snakes. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 179(11), 1223–1226.
- DuPonte, M. W., Nakamura, R. M., & Chang, E. M. (1978). Activation of latent *Salmonella* and *Arizona* organisms by dehydration of red-eared turtles, *Pseudemys scripta elegans*. *American Journal of Veterinary Research*, 39(3), 529–530.
- Ebani, V. V., Fratini, F., Ampola, M., Rizzo, E., Cerri, D., & Andreani, E. (2008). *Pseudomonas* and *Aeromonas* isolates from domestic reptiles and study of their antimicrobial in vitro sensitivity. *Veterinary Research Communications*, 32(SUPPL. 1), 195–198. <https://doi.org/10.1007/s11259-008-9160-9>
- Eckert, K. L., Bjorndal, K. A., Abreu-grobois, F. A., & Donnelly, M. (Eds.). (2000). *Técnicas de*

Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas (Vol. 4). IUCNSSC Marine Turtle Specialist Group Publication (Vol. 4).
<https://doi.org/10.1016/j.enpol.2014.04.033>

- Feeley, J. C., & Treger, M. D. (1969). Penetration of turtle eggs by *Salmonella braenderup*. *Public Health Reports*, 84(2), 2--4.
- Ferreira, C. H., Vieira, L. G., Valdes, S. A. C., Dos Santos Mendonça, J., de Abreu Fernandes, E., & Santos, A. L. Q. (2016). Chemical characteristics and thickness of *Podocnemis expansa* posthatching eggshells (Testudines, podocnemididae). *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, 38(2), 195–200. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v38i2.28019>
- Fichi, G., Cardeti, G., Cersini, A., Mancusi, C., Guarducci, M., Di Guardo, G., & Terracciano, G. (2016). Bacterial and viral pathogens detected in sea turtles stranded along the coast of Tuscany, Italy. *Veterinary Microbiology*, 185, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.02.003>
- Flandry, F., Lisecki, M. E. J., Domingue, G. J., Nichols, R. L., Greer, D. L., & Haddad, R. J. (1989). Initial antibiotic therapy for alligator bites: Characterization of the oral flora of *Alligator mississippiensis*. *Southern Medical Journal*, 82(2), 262–266. <https://doi.org/10.1097/00007611-198902000-00027>
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 269–284.
- Frye, F. L. (1991). *Biomedical and surgical aspects of captive reptile husbandry* (2nd.). Krieger Publishing Company.
- Gaertner, J. P., Hahn, D., Jackson, J., Forstner, M. R. J., & Rose, F. L. (2008). Detection of Salmonellae in Captive and Free-Ranging Turtles Using Enrichment Culture and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Herpetology*, 42(2), 223–231. <https://doi.org/10.1670/07-1731.1>
- Gal, J., & Johnson-Delaney, C. A. (2019). Salmonellosis. In Divers S. J. & Stahl S. J. (Eds.), *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery* (3rd., pp. 1337–1338). W.B Saunders. <https://doi.org/10.1016/B0-7216-9327-X/X5001-9>
- Gay, N., Le Hello, S., Weill, F. X., de Thoisy, B., & Berger, F. (2014). *Salmonella* serotypes in reptiles and humans, French Guiana. *Veterinary Microbiology*, 170(1–2), 167–171. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.01.024>
- George, R. H. (1997). Health Problems and Diseases of Sea Turtles. In P. L. Lutz & J. A. Musick (Eds.), *The Biology of Sea Turtles* (pp. 363–385). CRC Press.
- Glazebrook, J. S., & Campbell, R. S. F. (1990a). A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. I. Farmed turtles. *Diseases of Aquatic Organisms*, 9(2), 83–95.

- <https://doi.org/10.3354/dao009083>
- Glazebrook, J. S., & Campbell, R. S. F. (1990b). A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. II. Oceanarium-reared and wild turtles. *Diseases of Aquatic Organisms*, 9(2), 97–104. <https://doi.org/10.3354/dao009097>
- González, M., Martín, P., Seva, J., Pallarés, F. J., & León, L. (2005). Granulomatous hepatitis caused by *Salmonella* Typhimurium in a spur-thighed tortoise (*Testudo graeca*). *Veterinary Record*, 157, 236–237.
- Google. (2020). *Mapa de la costa de Oaxaca y Guerrero, México en Google earth*. Recuperado el 12 de mayo de 2020 <https://earth.google.com/web/@16.34037371,-96.97298002,2489.96356659a,596456.91365942d,35y,0h,0t,0r>
- Gray, C. W., Davis, J., & McCartney, W. G. (1966). Treatment of *Pseudomonas* Infections in the Snake and Lizard Collection at Washington Zoo.pdf. *International Zoo Yearbook*, 6(1), 278.
- Hahn, D., Gaertner, J., Forstner, M. R. J., & Rose, F. L. (2007). High-resolution analysis of salmonellae from turtles within a headwater spring ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, 60(1), 148–155. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00275.x>
- Hanuskova, Z., & Tilc, K. (1975). Problems of veterinary significance concerning imported tortoises after unsuitable wintering with regard to the incidence of ophthalmic affects and oxyuridosis. *Acta Vet BRNO*, 44, 407–412.
- Hartsell, S. E. (1949). The Newer Knowledge of Lysozyme and Bacteria. *Proceedings of the Industrial Academy of Science*, 5, 44–53.
- Harvey, R. W. S., & Price, T. H. (1983). *Salmonella* isolation from reptilian faeces: A discussion of appropriate cultural techniques. *Journal of Hygiene*, 91(01), 25–32. <https://doi.org/10.1017/s0022172400059994>
- Hilf, M., Wagner, R. A., Yu, V. L., & Url, S. (1990). A Prospective Study of Upper Airway Flora in Healthy Boid Snakes and Snakes with Pneumonia. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 21(3), 318–325.
- Hill, K., Stewart, K. M., Rajeev, S., Conan, A., & Dennis, M. M. (2019). Pathology of leatherback sea turtle (*Dermochelys coriacea*) embryos and hatchlings from nests in st. kitts, West Indies (2015–16). *Journal of Wildlife Diseases*, 55(4), 782–793. <https://doi.org/10.7589/2018-07-169>
- Holgerson, M. C. N., Nichols, W. A., Paitz, R. T., & Bowden, R. M. (2016). How important is the eggshell as a source for initial acquisition of *Salmonella* in hatchling turtles? *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 325(2), 142–148. <https://doi.org/10.1002/jez.2004>
- Holt, P. E., Cooper, J. E., & Needham, J. R. (1979). Diseases of tortoises: a review of seventy cases.

- Journal of Small Animal Practice*, 20(5), 269–282. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1979.tb06721.x>
- Hossain, S., Wimalasena, S. H. M. P., De Zoysa, M., & Heo, G. J. (2017). Prevalence of *Citrobacter* spp. From Pet Turtles and Their Environment. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 26(1), 7–12. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2016.10.004>
- Hyndman, T. (2018). Reptile Pharmacology. In B. Doneley, D. Monks, R. Johnson, & B. Carmel (Eds.), *Reptile Medicine and Surgery in Clinical Practice* (1st., pp. 175–184). Wiley Blackwell.
- Isaza, R., Garner, M., & Jacobson, E. R. (2000). Proliferative osteoarthritis and osteoarthrosis in 15 snakes. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 31(1), 20–27. [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2000\)031\[0020:POAOIS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2000)031[0020:POAOIS]2.0.CO;2)
- Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., De Pinna, E., Nair, S., Fields, P., & Weill, F. X. (2014). Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 165(7), 526–530. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.004>
- IUCN. (2008). *Olive ridley turtle*. Gland: International Union for Conservation of Nature. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T11534A3292503.en>
- Jackson, C. G., & Fulton, M. (1970). A Turtle Colony Epizootic Apparently of Microbial Origin. *Journal of Wildlife Diseases*, 6, 466–468.
- Jacobson, Elliot R. (1984a). Biology and Diseases of Reptiles. In J. G. Fox, B. J. Cohen, & F. M. Loew (Eds.), *Laboratory Animal Medicine* (pp. 449–476). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-263620-2.50021-5>
- Jacobson, Elliott R. (1984b). Immobilization , Blood Sampling , Necropsy Techniques and Diseases of Crocodylians: A Review. *The Journal of Zoo Animal Medicine*, 15, 38–45. <https://doi.org/10.2307/20094678>
- Jacobson, Elliot R. (1985). Use of a polyvalent autogenous bacterin for treatment of mixed gram-negative bacterial osteomyelitis in a rhinoceros viper (*Bitis nasicornis*). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 187(11), 1224–1225.
- Jacobson, Elliot R. (1993). Snakes. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 23(6), 1179–1212. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(93\)50152-3](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(93)50152-3)
- Jacobson, Elliot R. (2007). Bacterial Diseases of Reptiles. In Elliot R. Jacobson (Ed.), *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles: Color Atlas and Text* (pp. 461--526). CRC Press Taylor & Francis Group.
- Jacobson, Elliot R., Gardiner, C. H., Brown, M. B., Adams, H. . P., Gaskin, J. M., Lapointe, J. L., Harris, R. K., & Reggiardo, C. (1991). Chronic upper respiratory desert tract disease of free-

- ranging desert tortoises (*Xerobates agassizii*). *Journal of Wildlife Diseases*, 27(2), 296–316.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 35–73. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>
- Jang, S. S, Biberstein, E. L, & Hirsh, D. C. (1986). *A diagnostic manual of veterinary clinical bacteriology and mycology*. Rev. ed.
- Johnson-Delaney, C. A., & Gal, J. (2019). Zoonoses and Public Health. In S. J. Divers & S. J. Stahl (Eds.), *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery* (3rd. ed., pp. 1359–1365). Elsevier.
- Johnson-Delaney, C. A. (2006). Reptiles Zoonoses and Threats to Public Health. In D. E. Mader (Ed.), *Reptile Medicine and Surgery* (2nd. ed., pp. 1017-1030). Saunders Elsevier.
- Johnson, J. D. (2001). Enteritis in a pair of juvenile Aldabra tortoises (*Geochelone gigantean*). *Proceedings of the American Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians Annual Conference*, 147–151.
- Johnson, R., & Doneley, B. (2018). Diseases of the Gastrointestinal System. In B. Doneley, D. Monks, R. Johnson, & B. Carmel (Eds.), *Reptile Medicine and Surgery in Clinical Practice* (1st., pp. 255–271). Wiley Blackwell.
- Johnston, M. A., Porter, D. E., Scott, G. I., Rhodes, W. E., & Webster, L. F. (2010). Isolation of faecal coliform bacteria from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Journal of Applied Microbiology*, 108(3), 965–973. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04498.x>
- Kaplan, H. M. (1957). Septicemic cutaneous ulcerative disease of turtles. *Proc Anim Care Panel*, 7, 273–277.
- Kaufmann, A. F., Fox, M. D., Morris, G. K., Wood, B. T., Feeley, J. C., & Frix, M. K. (1972). Turtle-associated salmonellosis: III. The effects of environmental salmonellae in commercial turtle breeding ponds. *American Journal of Epidemiology*, 95, 521-528. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a121420>
- Kaufmann, A. F., & Morrison, Z. L. (1966). An Epidemiologic Study of Salmonellosis in Turtles. *American Journal of Epidemiology*, 84(2), 364–370.
- Keene, E. L. (2012). *Microorganisms from Sand , Cloacal Fluid , and Eggs of Lepidochelys olivacea and Standard Testing of Cloacal Fluid Antimicrobial Properties [M Tesis]* [Indiana (USA): Indiana University-Purdue University Fort Wayne]. <https://doi.org/UMI 3402307>
- Keene, E., Soule, T., & Paladino, F. (2014). Microbial Isolations from Olive Ridley (*Lepidochelys olivacea*) and East Pacific Green (*Chelonia mydas agassizii*) Sea Turtle Nests in Pacific Costa Rica, and Testing of Cloacal Fluid Antimicrobial Properties. *Chelonian Conservation and Biology*, 13(1), 49–55. <https://doi.org/10.2744/ccb-1051.1>

- Keymer, I. F. (1978a). Diseases of chelonians: (1) Necropsy survey of tortoises. *Veterinary Record*, *103*, 548–552.
- Keymer, I. F. (1978b). Diseases of chelonians: (2) Necropsy survey of terrapins and turtles. *Veterinary Record*, *103*, 577–582.
- Knafo, S. E. (2019). Musculoskeletal System. In S. J. Divers & S. J. Stahl (Eds.), *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery* (3rd. ed., pp. 894–916). Elsevier.
- Kodjo, A., Villard, L., Prave, M., Ray, S., Grezel, D., Lacheretz, A., Bonneau, M., & Richard, Y. (1997). Isolation and Identification of *Salmonella* Species from Chelonians Using Combined Selective Media, Serotyping and Ribotyping. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *44*, 625–629. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1997.tb01016.x>
- Kycko, A., Kozaczyński, W., Jasik, A., Kędrak-Jabłońska, A., Borkowska-Opacka, B., & Reichert, M. (2013). Granulomatous pneumonia and hepatitis associated with *Providencia rettgeri* infection in a crocodile monitor lizard (*Varanus salvadorii*). *Acta Veterinaria Hungarica*, *61*(1), 51–58. <https://doi.org/10.1556/AVet.2012.052>
- Lamm, S. H., Taylor, A., Gangarosa, E. J., Anderson, H. W., Young, W., Clark, M. H., & Bruce, A. R. (1972). Turtle-associated salmonellosis: I. An estimation of the Magnitude of the Problem in the United States, 1970-1971. *American Journal of Epidemiology*, *95*(6), 511–517. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a121418>
- Larock, D. L., Chaudhary, A., & Miller, S. I. (2015). Salmonellae interactions with host processes. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(4), 191–205. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3420>
- Lawrence, K., & Needham, J. R. (1985). Rhinitis in long term captive Mediterranean tortoises (*Testudo graeca* and *T. hermannii*). *Veterinary Record*, *117*, 662–664. <https://doi.org/10.1136/vr.117.25-26.662>
- López-Hurtado, M., Castro-González, M. I., & Guerra-Infante, F. M. (2010). Actividad antibacteriana de la clara de huevo de la tortuga marina *Lepidochelys Olivacea*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, *45*(2), 353-357. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572010000200019>
- López-Quintana, B., Rivas-González, P., Toro-Rueda, C., & Enríquez-Crego, A. (2015). Infección por *Salmonella enterica* subespecie *salamae* en un paciente ecuatoguineano consumidor de carne de tortuga. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *33*(6), 430-431. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.09.012>
- Mader, D. R. (2006). Perinatology. In D. R. Mader (Ed.), *Reptile Medicine and Surgery* (2nd. ed., pp. 365–375). Saunders Elsevier.
- Mader, D. R., Paré, J. A., Sigler, L., & Rosenthal, K. L. (2006). Microbiology: Fungal and Bacterial Diseases of Reptiles. In D. R. Mader (Ed.), *Reptile Medicine and Surgery* (2nd. ed., pp. 217–

- 238). Saunders Elsevier.
- Magnino, S., Colin, P., Dei-Cas, E., Madsen, M., McLauchlin, J., Nöckler, K., Prieto Maradona, M., Tsigarida, E., Vanopdenbosch, E., & Van Peteghem, C. (2009). Biological risks associated with consumption of reptile products. *International Journal of Food Microbiology*, *134*(3), 163–175. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.001>
- Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C., & Helmuth, R. (2003). Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(1), 290–296. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.290-296.2003>
- Márquez, R. (1996). *Las tortugas marinas y nuestro tiempo*. Fondo de Cultura Económica.
- Martínez, S. (1994). *Manual Clínico de Reptiles*. Grass-Iatros.
- McCoy, R. H., & Seidler, R. J. (1973). Potential pathogens in the environment: isolation, enumeration, and identification of seven genera of intestinal bacteria associated with small green pet turtles. *Applied Microbiology*, *25*(4), 534–538. <https://doi.org/10.1128/aem.25.4.534-538.1973>
- Michael Marler, S., Brown, M. L., & Siebeling, R. J. (1983). Eradication of *Arizona hinshawii* from artificially infected turtle eggs. *Applied and Environmental Microbiology*, *45*(3), 748–754.
- Miller, D. L., Wyneken, J., Rajeev, S., Perrault, J., Mader, D. R., Weege, J., & Baldwin, C. A. (2009). Pathologic findings in hatchling and posthatchling leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*) from Florida. *Journal of Wildlife Diseases*, *45*(4), 962–971. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.4.962>
- Miller, J. D., Mortimer, J. A., & Limpus, C. J. (2017). A Field Key to the Developmental Stages of Marine Turtles (Cheloniidae) with Notes on the Development of *Dermochelys*. *Chelonian Conservation and Biology*, *16*(2), 111–122. <https://doi.org/10.2744/ccb-1261.1>
- Millichamp, N. J., Jacobson, E. R., & Wolf, E. D. (1983). Diseases of the eye and ocular adnexae in reptiles. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *183*(11), 1205–1212.
- Mine, Y. (1995). Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends in Food Science and Technology*, *6*(7), 225–232. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89083-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89083-4)
- Mitchell, M. A. (2006). *Salmonella*: Diagnostic methods for reptiles. In D. E. Mader (Ed.), *Reptile Medicine and Surgery* (2nd. ed., pp. 900–905). Saunders Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-72-169327-X/50072-9>
- Moore, N. M., & Flaws, M. L. (2011). Epidemiology and Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clinical Laboratory Science*, *24*(1), 43–46.
- Mora-Castro, R., Chaves-Quiros, A. C., & Herrera-Ramirez, C. H. (1997). Composición química del huevo de tortuga lora (*Lepidochelys olivacea*) y evaluación de su calidad física y microbiológica

- durante su almacenamiento. *Reviteca*, 6, 10–18.
- Navas, Y. R. (2013). *Aislamiento e identificación de Salmonella sp. en fluidos cloacales de tortugas golfinas (Lepidochelys olivacea) obtenidas en el pacífico mexicano [Lic. Tesis]*. CDMX (MX): Universidad Nacional Autónoma de México/Universidad Cooperativa de Colombia.
- O'Hara, C. M., Brenner, F. W., & Miller, J. M. (2000). Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 534–546. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.534-546.2000>
- Orós, J., Calabuig, P., & Déniz, S. (2004). Digestive pathology of sea turtles stranded in the Canary Islands between 1993 and 2001. *Veterinary Record*, 155(6), 169–174. <https://doi.org/10.1136/vr.155.6.169>
- Page, L. A. (1961). Experimental Ulcerative Stomatitis in King Snakes. *Cornell Veterinary*, 51, 258–266.
- Pagotto, F. J., Nazarowec-White, M., Bidawid, S., & Farber, J. M. (2003). Infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. *Journal of Food Protection*, 66(3), 370–375. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.3.370>
- Palomino-Camargo, C., & Gonzalez-Muñoz, Y. (2014). Técnicas Moleculares para la Detección e Identificación de Patógenos en Alimentos: Ventajas y Limitaciones. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*, 31(3), 535–546.
- Pasmans, F., Boyen, F., & Haesebrouck, F. (2013). *Salmonella* Infections in Exotic Pets. In A. P. Barrow & U. Methner (Eds.), *Salmonella in Domestic Animals* (2nd ed., pp. 337-350). CAB International.
- Pasmans, F., De Herdt, P., Dewulf, J., & Haesebrouck, F. (2002). Pathogenesis of infections with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Muenchen in the turtle *Trachemys scripta scripta*. *Veterinary Microbiology*, 87(4), 315-325. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00081-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00081-0)
- Pasmans, F., Van Immerseel, F., Van den Broeck, F., Bottreau, E., Velge, P., Ducatelle, R. & Haesebrouck, F. (2003). Interactions of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Muenchen with intestinal explants of the turtle *Trachemys scripta scripta*. *Journal of Comparative Pathology*, 128(2–3), 119–126. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0614>
- Penagos, M. P., Trujillo, G. C., Pérez-García, J., Sánchez-Jiménez, M. M., & Cardona-Castro, N. (2018). Presencia de *Salmonella* spp. en tortugas de río en cautiverio y en libertad en Urabá, Colombia. *Rev. CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 13(2), 111–120.
- Phillott, A. D., Parmenter, C. J., & McKillup, S. C. (2006). Calcium Depletion of Eggshell After Fungal Invasion of Sea Turtle Eggs. *Chelonian Conservation and Biology*, 5(1), 146–149.
- Pitcher, D. G., Saunders, N. A., & Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA

- with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8(4), 151-156. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>
- Plowman, C. A., Montali, R. J., Phillips, L. G., Schlater, L. K., & Lowenstine, L. J. (1987). Septicemia and Chronic Abscesses in Iguanas (*Cyclura cornuta* and *Iguana iguana*) Associated with a *Neisseria* Species. *The Journal of Zoo Animal Medicine*, 18(2/3), 86. <https://doi.org/10.2307/20460246>
- Prophet, E. B., Mills, B., Arrington, B. J., Leslie, H., & Sobin, M. D. (1995). *Métodos Histotecnológicos del Instituto de patología de las fuerzas armadas de los estados unidos de América (AFIP) (Traducción al Español)*. Registro de Patología de los Estados Unidos de America (ARP).
- Rahn, K., De Grandis, S. A., Clarke, R. C., McEwen, S. A., Galán, J. E., Ginocchio, C. & Gyles, C. L. (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*, 6, 271-279. [https://doi.org/10.1016/0890-8508\(92\)90002-F](https://doi.org/10.1016/0890-8508(92)90002-F)
- Reza, H., Habib, I., Pakzad, M., Dybing, N. A., Wang, P., & Bruce, M. (2020). A review of the public health challenges of *Salmonella* and turtles. *Veterinary Sciences*, 7(2), 1–12. <https://doi.org/10.3390/VETSCI7020056>
- Richardson, J. I. (2000). Prioridades para los Estudios sobre la Biología de la Reproducción y de la Anidación. En Eckert K. L., Bjorndal K. A., Abreu-Grobois F. A. & Donnelly M. (Eds.), *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas (Traducción al español)* (pp. 9–12). IUCNSSC Marine Turtle Specialist Group Publication (Vol. 4).
- Rodríguez-Morales, O. (1996). *Deteccion de Salmonella enterica subsp. arizonae como microbiota de serpientes en cautiverio mediante metodos microbiologicos convencionales e hibridacion de ADN utilizando como sonda el gene ompC de Salmonella enterica [Lic. Tesis]*. Distrito Federal (MX): Universidad Nacional Autónoma de México.
- Roszak, D. B., Grimes, D. J. & Colwell, R. R. (1984). Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Canadian Journal of Microbiology*, 30(3), 334–338. <https://doi.org/10.1139/m84-049>
- Sahoo, G., Mohapatra, B. K., & Dutta, S. K. (2010). Chemical Composition and Ultrastructure of Shells of Unfertilized Eggs of Olive Ridley Turtles, *Lepidochelys olivacea*. *Current Herpetology*, 29(1), 37–43.
- Sahoo, G., Mohapatra, B. K., Sahoo, R. K., & Mohanti-Hejmadi, P. (1996). Contrasting ultrastructures in the eggshells of olive ridley turtles, *Lepidochelys olivacea*, from Gahirmatha, Orissa. *Current Science Association*, 70(3), 246–249.

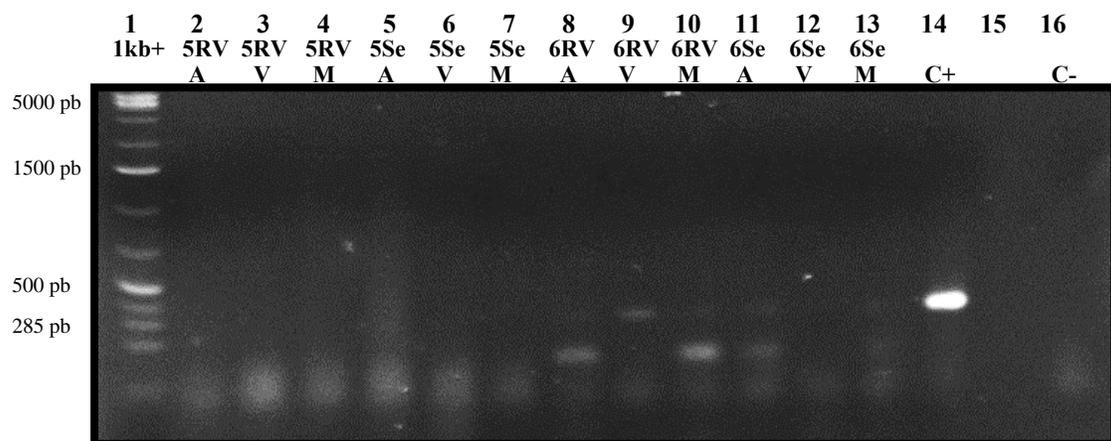
- Sahoo, G., Sahoo, R. K., & Mohanty-Hejmadi, P. (1998). Calcium metabolism in olive ridley turtle eggs during embryonic development. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, *121*(1), 91–97. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10106-X](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10106-X)
- Salb, A., Mitchell, M. A., Riggs, S., Diaz-Figueroa, O., & Roy, A. (2007). Characterization of Intestinal Microflora of Captive Green Iguanas, *Iguana iguana*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, *17*(1), 12–15. <https://doi.org/10.5818/1529-9651.17.1.12>
- Sánchez-Jiménez, M. M., Rincón-Ruiz, P. A., Duque, S., Giraldo, M. A., Ramírez-Monroy, D. M., Jaramillo, G., & Cardona-Castro, N. (2011). *Salmonella enterica* in semi-aquatic turtles in Colombia. *Journal of Infection in Developing Countries*, *5*(5), 361–364. <https://doi.org/10.3855/jidc.1126>
- Santoro, M., Hernández, G., Caballero, M., & García, F. (2006a). Aerobic Bacterial Flora of Nesting Green Turtles (*Chelonia mydas*) from tortuguero National Park, Costa Rica. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *37*(4), 549–552.
- Santoro, M., Orrego, C. M., & Gómez, G. H. (2006b). Flora bacteriana cloacal y nasal de *Lepidochelys olivacea* (Testudines: Cheloniidae) en el pacífico norte de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*, *54*(1), 43–48.
- Santos, L. R., Nascimento, V. P., Oliveira, S. D., Flores, M. L., Pontes, A. P., Ribeiro, A. R., Salle, C. T. P., & Lopes, R. F. F. (2001). Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* In Artificially Inoculated Chicken Meat. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, *43*(5), 247–250.
- Schumacher, J. (2011). Respiratory Medicine of Reptiles. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, *14*, 207–224. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2011.03.010>
- Sellier, N., Vidal, M. L., Baron, F., Michel, J., Gautron, J., Protais, M., Beaumont, C., Gautier, M., & Nys, Y. (2007). Estimations of repeatability and heritability of egg albumen antimicrobial activity and of lysozyme and ovotransferrin concentrations. *British Poultry Science*, *48*(5), 559–566. <https://doi.org/10.1080/00071660701592367>
- Selvarajah, G. T., & Khairani-Bejo, S. (2019). Identification of *Salmonella* and other Pathogenic Bacteria in Pet Red-Eared Sliders, *Trachemys scripta elegans*, from Pet Shops in the Klang Valley. *Jurnal Veterinar Malaysia*, *31*(2), 23–27.
- SEMARNAT. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial (Segunda Sección)*, 77.
- SEMARNAT. (2013). Norma Oficial Mexicana NOM-162-SEMARNAT-2012, Que establece las

- especificaciones para la protección, recuperación y manejo de las poblaciones de las tortugas marinas en su hábitat de anidación. *Diario Oficial (Primera Sección)*, 55–60.
- SEMARNAT. (2018). *Programa de Acción para la Conservación de la Especie Tortuga Golfina (Lepidochelys olivacea)*. SEMARNAT/CONANP.
- Snipes, K. P., Biberstein, E. L., & Fowler, M. E. (1980). A *Pasteurella* sp. associated with respiratory disease in captive desert tortoises. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 177(9), 804–807.
- Soveri, T. (1984). Observations of bacterial diseases of captive snakes in Finland. *Nord Vet Med*, 36(1–2), 38–42.
- SSA. (2015). Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y Servicios. Métodos de Prueba Microbiológicos. Determinación de Microorganismos Indicadores. Determinación de Microorganismos Patógenos. *Diario Oficial (Segunda Sección)*, 1–7.
- Stephens, T., & Rosenwax, A. (2018). Diseases of the Cardiovascular System. In B. Doneley, D. Monks, R. Johnson, & B. Carmel (Eds.), *Reptile Medicine and Surgery in Clinical Practice* (1st., pp. 287–297). Wiley Blackwell.
- Stewart, J. R., & Eca, T. W. (2010). Patterns of maternal provision and embryonic mobilization of calcium in oviparous and viviparous squamate reptiles. *Herpetological Conservation and Biology*, 5(2), 341–359.
- Struve, C., & Angeliki, K. (2004). Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Environmental Microbiology*, 6(6), 584–590. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00590.x>
- Suranjana, C., Nirmal, K. S., Shuvojit, B., Debjani, R., Dhruvajyoti, C., & Siddhartha, R. (2006). Small Cationic Protein From a Marine Turtle Has b- Defensin-Like Fold and Antibacterial and Antiviral Activity. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 64, 524–531. <https://doi.org/10.1002/prot>
- Swiggs, J., Paladino, F. V., Spotila, J. R., & Santidrián Tomillo, P. (2018). Depth of the drying front and temperature affect emergence of leatherback turtle hatchlings from the nest. *Marine Biology*, 165(5), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00227-018-3350-y>
- Thammasirirak, S., Ponkham, P., Preecharram, S., Khanchanuan, R., Phonyothee, P., Daduang, S., Srisomsap, C., Araki, T., & Svasti, J. (2006). Purification, characterization and comparison of reptile lysozymes. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 143(2), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.02.004>
- Thomas, L. V., & Wimpenny, J. W. T. (1996). Competition between *Salmonella* and *Pseudomonas* species growing in and on agar, as affected by pH, sodium chloride concentration and

- temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 29(2–3), 361–370. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00077-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00077-1)
- Tracchia, A. C. (2018a). Afecciones de origen traumático. In *Medicina en quelonios y otros reptiles* (1a ed ampl, pp. 409–434). Ediciones Fundación Azara.
- Tracchia, A. C. (2018b). Zoonosis. In *Medicina en quelonios y otros reptiles* (1a ed. amp, pp. 289–302). Ediciones Fundación Azara.
- Valenti, P., Antonini, G., von Hunolstein, C., Visca, P., Orsi, N., & Antonini, E. (1983). Studies on the antimicrobial activity of ovotransferrin. *International Journal of Tissue Reactions*, 5(1), 97–105.
- Vassiliadis, P. (1983). The Rappaport—Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas: An overview. *Journal of Applied Bacteriology*, 54(1), 69–76. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb01302.x>
- Vogelnest, L. (2018). Disorders of the Integument. In B. Doneley, D. Monks, R. Johnson, & B. Carmel (Eds.), *Reptile Medicine and Surgery in Clinical Practice* (1st., pp. 273–285). Wiley Blackwell.
- Wellehan, J. F. X., & Divers, S. J. (2019). Bacteriology. In S. J. Divers & S. J. Stahl (Eds.), *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery* (3rd ed., pp. 235–246). Elsevier.
- Willer, C. J., Lewbart, G. A., & Lemons, C. (2003). Aural Abscesses in Wild Eastern Box Turtles, *Terrapene carolina carolina*, from North Carolina: Aerobic Bacterial Isolates and Distribution of Lesions. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 13(2), 4–9. <https://doi.org/10.5818/1529-9651.13.2.4>
- Work, T. M., Balazs, G. H., Wolcott, M., & Morris, R. (2003). Bacteraemia in free-ranging Hawaiian green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, 53(1), 41–46. <https://doi.org/10.3354/dao053041>
- Wyneken, J., Burke, T. J., Salmon, M., & Pedersen, D. K. (1988). Egg Failure in Natural and Relocated Sea Turtle Nests. *Journal of Herpetology*, 22(1), 88–96. <https://doi.org/10.2307/1564360>
- Youngsabanant, M., & Nuamsukon, S. (2020). Morphology and elemental components of sea turtle eggshells using scanning electron microscopy. *Science, Engineering and Health Studies*, 14(1), 73–82.
- Zhou, J., Wang, S., Nie, F., Feng, L., Zhu, G., & Jiang, L. (2011). Elaborate architecture of the hierarchical hen's eggshell. *Nano Research*, 4(2), 171–179. <https://doi.org/10.1007/s12274-010-0067-8>

ANEXOS

RESULTADOS DE LA PCR DE ANP SANT PLAYA DE TIERRA COLORADA Y RPC PLAYA TORTUGUERA CAHUITAN



Anexo 1. PCR de los HNE #5 y #6 provenientes del ANP SANT Playa de Tierra Colorada. Gel de agarosa al 1.5% en amortiguador SB. Amplificación del fragmento del gen *invA* de 285 pb de *Salmonella* spp.

Carril 1: MPM 1 Kb+.

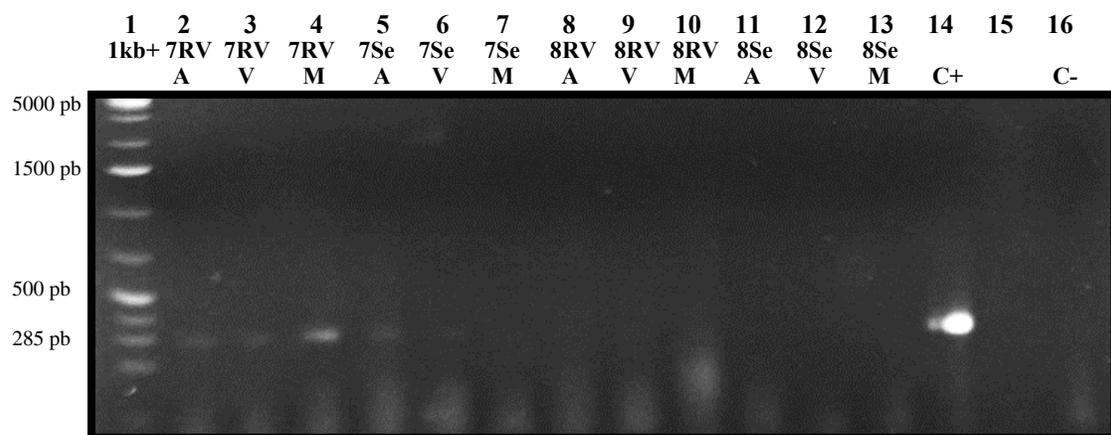
Carril 2-7: Resultados negativos del HNE #5 en A, V y M provenientes de medio RV y Se.

Carril 8-10: Resultados positivos del HNE #6 en A, V y M provenientes de medio RV.

Carril 11-13: Resultados positivos del HNE #6 en A y M y negativo en V provenientes de medio Se.

Carril 14: Control positivo para el fragmento del gen *invA* de 285 pb de *Salmonella* spp.

Carril 16: Control negativo.



Anexo 2. PCR de los HNE #7 y #8 provenientes del ANP SANT Playa de Tierra Colorada. Gel de agarosa al 1.5% en amortiguador SB. Amplificación del fragmento del gen *invA* de 285 pb de *Salmonella* spp.

Carril 1: MPM 1 Kb+.

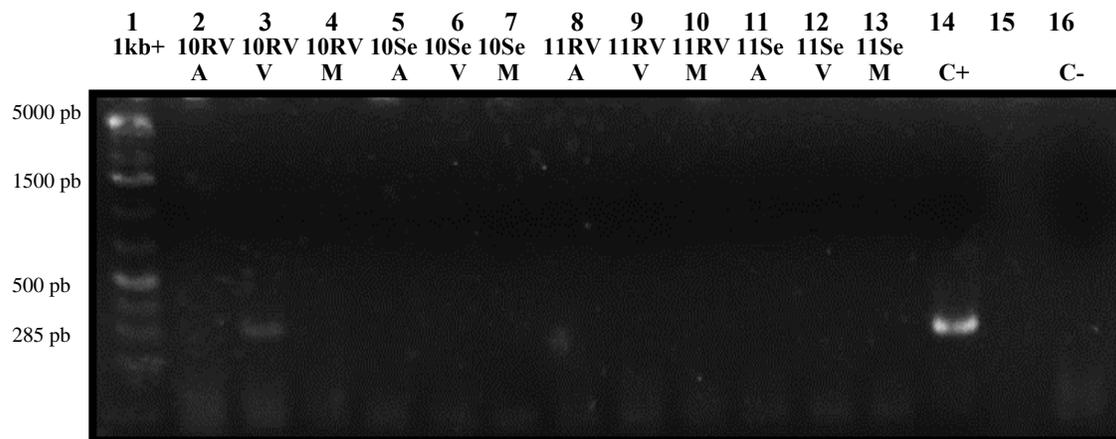
Carril 2-4: Resultados positivos del HNE #7 en A, V y M provenientes de medio RV.

Carril 5-7: Resultados positivos del HNE #7 en A y V y negativo en M provenientes de medio Se.

Carril 8-13: Resultados negativos del HNE #8 en A, V y M provenientes de medio RV y Se.

Carril 14: Control positivo para el fragmento del gen *invA* de 285 pb de *Salmonella* spp.

Carril 16: Control negativo.



Anexo 3. PCR de los HNE #10 y #11 provenientes del ANP SANT Playa de Tierra Colorada. Gel de agarosa al 1.5% en amortiguador SB. Amplificación del fragmento del gen *invA* de 285 pb de *Salmonella* spp.

Carril 1: MPM 1 Kb+.

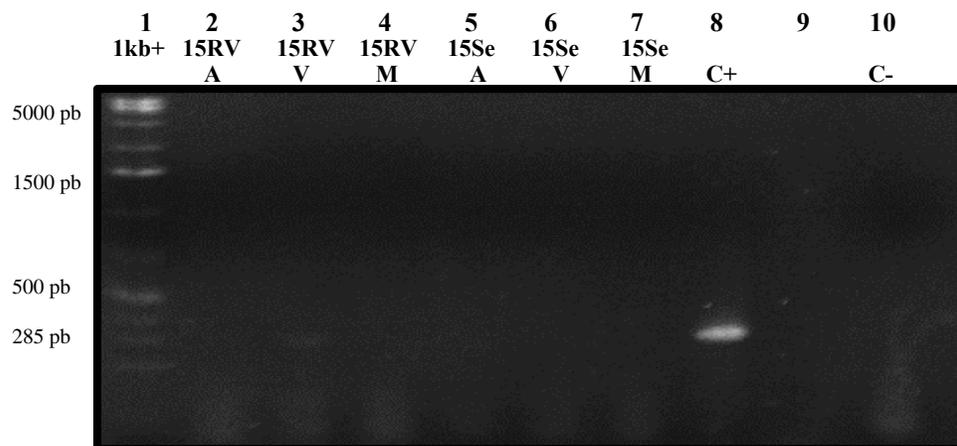
Carril 2-4: Resultado positivo del HNE #10 en V y negativos en A y M provenientes de medio RV.

Carril 5-7: Resultados negativos del HNE #10 en A, V y M provenientes de medio Se.

Carril 8-13: Resultados negativos del HNE #11 en A, V y M provenientes de medio RV y Se.

Carril 14: Control positivo para el fragmento del gen *invA* de 285 pb de *Salmonella* spp.

Carril 16: Control negativo.



Anexo 4. PCR del HNE #15 provenientes del ANP SANT Playa de Tierra Colorada. Gel de agarosa al 1.5% en amortiguador SB. Amplificación del fragmento del gen *invA* de 285 pb de *Salmonella* spp.

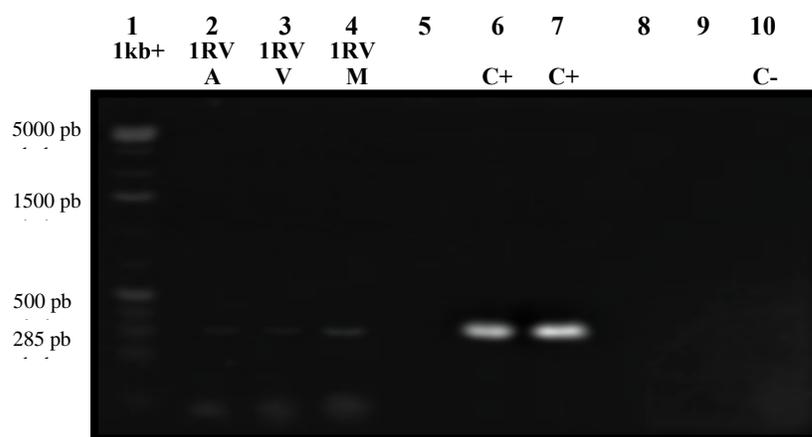
Carril 1: MPM 1 Kb+.

Carril 2-4: Resultado positivo del HNE #15 en V y negativos en A y M provenientes de medio RV.

Carril 5-7: Resultados negativos del HNE #15 en A, V y M provenientes de medio Se.

Carril 8: Control positivo para el fragmento del gen *invA* de 285 pb de *Salmonella* spp.

Carril 10: Control negativo.



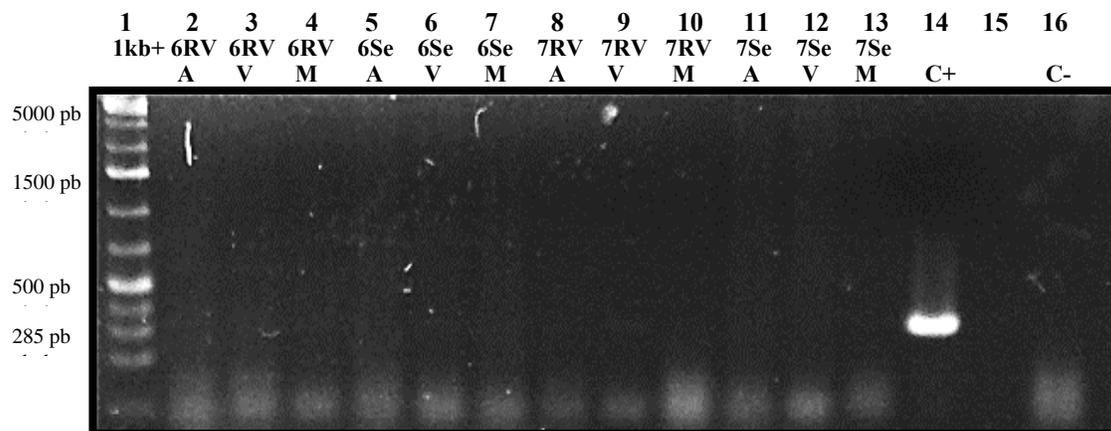
Anexo 5. PCR del HNE #1 proveniente de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán. Gel de agarosa al 1.5% en amortiguador SB. Amplificación del fragmento del gen *invA* de 285 pb de *Salmonella* spp.

Carril 1: MPM 1 Kb+.

Carril 2-4: Resultado positivo del HNE #1 en A, V y M proveniente de medio RV.

Carril 6 y 7: Control positivo para el fragmento del gen *invA* de 285 pb de *Salmonella* spp.

Carril 10: Control negativo.



Anexo 6. PCR de los HNE #6 y #7 provenientes de la RCP Playa Tortuguera Cahuitán. Gel de agarosa al 1.5% en amortiguador SB. Amplificación del fragmento del gen *invA* de 285 pb de *Salmonella* spp.

Carril 1: MPM 1 Kb+.

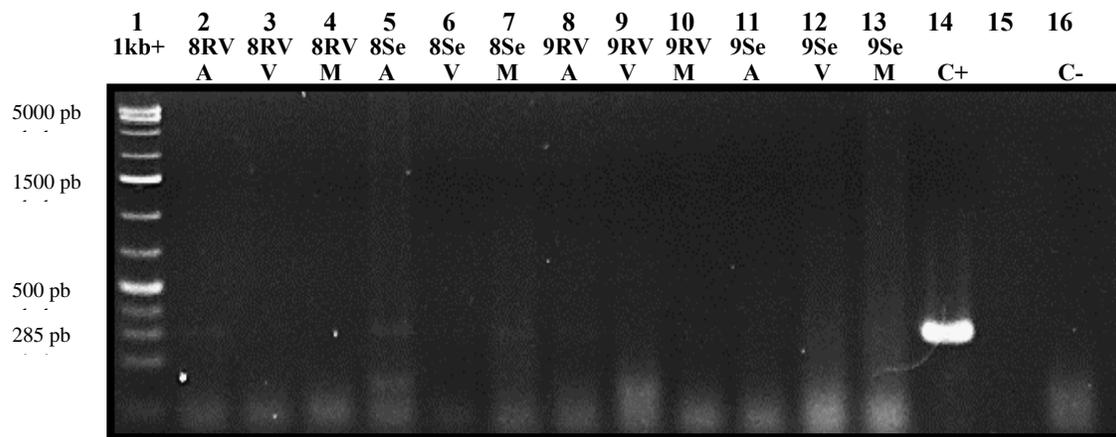
Carril 2-7: Resultados negativos del HNE #6 en A, V y M provenientes de medio RV y Se.

Carril 8-10: Resultado positivo del HNE #7 en V y negativos en A y M provenientes de medio RV.

Carril 11-13: Resultados negativos del HNE #7 en A, V y M provenientes de medio Se.

Carril 14: Control positivo para el fragmento del gen *invA* de 285 pb de *Salmonella* spp.

Carril 16: Control negativo.



Anexo 7. PCR de los HNE #8 y #9 provenientes de la RPC Playa Tortuguera Cahuitán. Gel de agarosa al 1.5% en amortiguador SB. Amplificación del fragmento del gen *invA* de 285 pb de *Salmonella* spp.

Carril 1: MPM 1 Kb+.

Carril 2-4: Resultado positivo del HNE #8 en A y negativos en V y M provenientes de medio RV.

Carril 5-7: Resultados positivos del HNE #8 en A y M y negativo en V provenientes de medio Se.

Carril 8-10: Resultado positivo del HNE #9 en A y negativos en V y M provenientes de medio RV.

Carril 11-13: Resultados negativos del HNE #9 en A, V y M provenientes de medio Se.

Carril 14: Control positivo para el fragmento del gen *invA* de 285 pb de *Salmonella* spp.

Carril 16: Control negativo.