



**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA**

TESIS

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS RESPONSABLES DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS EN TORTUGAS MOTELO DE PATAS AMARILLAS (*Chelonoidis
denticulata*) EN EL ZOOLOGICO “PARQUE ZONAL HUASCAR” DE LA CIUDAD DE
LIMA**

**SYLVIA LISSETH QUIJANDRIA ÑACARI
BACHILLER EN MEDICINA VETERINARIA**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO

LIMA-PERÚ

2019

ÍNDICE

	Pág.
Dedicatoria	i
Agradecimiento	ii
Resumen	iii
Abstract	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	
2.1 Tortuga motelo de patas amarillas (<i>Chelonoidis denticulata</i>)	3
2.1.1. Taxonomía	3
2.1.2. Morfología	3
2.1.3. Hábitat y distribución	4
2.1.4. Reproducción	4
2.1.5. Alimentación	5
2.1.6. Estado de conservación	5
2.2 Sistema respiratorio en quelonios	5
2.3 Enfermedades respiratorias de origen bacteriano en quelonio	6
2.3.1 Generalidades	6
2.3.2 Factores asociados	7
2.3.3 Afecciones respiratorias en quelonios	8
2.3.3.1 Rinitis	8
2.3.3.2 Neumonía	8
2.3.4 Bacterias asociadas a enfermedades respiratorias en tortugas	9

2.3.4.1	<i>Klebsiella spp.</i>	9
2.3.4.2	<i>Pasteurella spp.</i>	10
2.3.4.3	<i>Pseudomonas spp.</i>	11
2.3.4.4	<i>Proteus spp.</i>	13
2.3.4.5	<i>Aeromonas spp.</i>	14
2.3.5	Diagnóstico de las enfermedades respiratorias en tortugas	15
2.3.5.1	Cultivo e identificación bacteriana	15
2.3.5.2	Pruebas bioquímicas	16
2.4	Bacterias oportunistas en reptiles	18
2.4.1	<i>Enterobacter spp.</i>	18
2.4.2	<i>Serratia spp.</i>	19
2.4.3	<i>Moraxella spp.</i>	20
2.4.4	<i>Citrobacter spp.</i>	21
2.5	Antecedentes	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS		
3.1	Espacio y tiempo	27
3.2	Población y muestra	27
3.3	Diseño de investigación	28
3.4	Equipo y procedimiento	28
3.4.1	Equipos	28
3.4.2	Procedimiento	30
3.5	Diseño estadístico	33
IV. RESULTADOS		34
V. DISCUSIÓN		36

VI. CONCLUSIONES	43
VII. RECOMENDACIONES	44
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXOS	48

DEDICATORIA

- A Dios por que ha estado conmigo, cuidándome y encaminándome en cada paso que doy.
- A mi madre, por la paciencia y apoyo incondicional, con mucho amor y cariño, le dedico todo mi esfuerzo y trabajo puesto para la realización de mi tesis.
- A mis pequeños gatitos, Fanny, Toti, Rock, Fantasma y a mi perrita buba quienes me acompañaron en todo el transcurso de la carrera, enseñándome a amar y respetar a los animales.

AGRADECIMIENTO

- A mis padres y hermanos por el amor brindado, apoyo incondicional y paciencia por alcanzar una de mis grandes metas.
- Mi más grande y sincero agradecimiento a mi asesora de tesis la Mg. Nancy Carlos Erazo, principal colaboradora, durante todo este proceso, quien, con su dirección, conocimiento y enseñanza, permitió el desarrollo de este trabajo.
- Quiero agradecer a la Universidad Alas Peruanas por darme la oportunidad de estudiar y llegar hacer un profesional.
- De igual manera un agradecimiento especial a la MV. Pamela Suloaga Tapia y al zoológico “Parque Zonal Huáscar” por permitirme realizar la presente investigación dentro de sus instalaciones.
- Al Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) por otorgar el permiso para realizar el presente estudio.

RESUMEN

La tortuga Motelo de patas amarillas (*Chelonoidis denticulata*) es una especie que se encuentra en estado vulnerable y está sometida al tráfico ilegal, por lo cual existen varios zoológicos que mantienen a esta especie en cautiverio para su protección. En épocas de invierno existe una alta morbilidad y mortalidad ocasionadas por enfermedades respiratorias en las tortugas, con un éxito relativo en su tratamiento. El objetivo de la investigación fue la identificación bacteriana en la secreción nasal de las tortugas motelo de patas amarillas (*C. denticulata*) con enfermedades respiratorias mantenidas en cautiverio. El estudio se realizó en el zoológico “Parque Zonal Huáscar” que cuenta con una población de 50 individuos, para la investigación se incluyeron 26 individuos (10 machos y 16 hembras) que presentaron signos de enfermedad respiratoria. Se tomaron las muestras utilizando la técnica de hisopado nasal y estas fueron conservadas en el medio de transporte Cary Blair y refrigeradas hasta su análisis. Para la identificación bacteriana se utilizaron los medios de cultivos Agar Sangre y Agar McConkey, se aplicó la tinción Gram, pruebas de oxidasa (Merk), catalasa y bioquímicas. Se identificaron 10 especies: 46,15% (12/26) *Pseudomonas sp.*, 26,92% (7/26) *Klebsiella oxytoca*; 19,23% (5/26) *Proteus vulgaris*; 15,38 % (4/26); *Aeromonas sp.*, 15,38% (4/26); *Citrobacter koseri*, 11,53% (3/26) *Enterobacter aerogenes*, 11,53% (3/26) *Moraxella sp.*, 7,69% (2/26) *Citrobacter freundii*; 7,69% (2/26) *Pasteurella sp.* y 7,69% (2/26) *Serratia sp.* Se halló diferencia significativa según el sexo de los individuos, mostrando mayor frecuencia de *Pseudomonas sp.* en hembras (62,50 %) y de *C. koseri* (40%) y *E. aerogenes* (30%) en machos.

Palabras clave: cultivo, quelonios, tortuga, enfermedad respiratoria, bacterias.

ABSTRACT

The Yellow-legged Motelo Tortoise (*Chelonoidis denticulata*) is a species that is in a vulnerable state and is subject to illegal trafficking, this is the reason why there are several zoos that keep this species in captivity for its protection. During the winter there is a high morbidity and mortality rate of respiratory diseases in turtles, with relative success in their treatment. The objective of the investigation was to identify the bacteria in the nasal secretion of the yellow-legged turtle (*C. denticulata*) with respiratory diseases maintained in captivity. The study took place in the zoo "Parque Zonal Huáscar" which has a population of 50 individuals. For the investigation 26 individuals were included (10 males and 16 females) who showed signs of respiratory disease. Samples were taken using the nasal swab technique and these were preserved in the Cary Blair transport medium and refrigerated until analysis. For the bacterial identification, the Agar Blood and Agar McConkey media were used, Gram stain, oxidase (Merk), catalase and biochemical were applied. Ten species were identified: 46.15% (12/26) *Pseudomonas sp.*, 26.92% (7/26) *Klebsiella oxytoca*; 19.23% (5/26) *Proteus vulgaris*; 15.38% (4/26); *Aeromonas sp.*, 15.38% (4/26); *Citrobacter koseri*, 11.53% (3/26) *Enterobacter aerogenes*, 11.53% (3/26) *Moraxella sp.*, 7.69% (2/26) *Citrobacter freundii*; 7.69% (2/26) *Pasteurella sp.* and 7.69% (2/26) *Serratia sp.* Significant differences were found according to the sex of the individuals, showing a higher frequency of *Pseudomonas sp.* in females (62,50 %) and *C. koseri* (40%) and *E. aerogenes* (30 %) in males.

Key Words: culture, chelonians, turtle, respiratory disease, bacteria.

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú las tortugas reciben diferentes presiones que afectan su conservación; especialmente la caza para el consumo local de su carne y huevos, así como el comercio ilegal para abastecer el mercado de mascotas. La tortuga motelo de patas amarillas (*Chelonoidis denticulata*) es una de las especies más comercializadas a nivel local, debido a esta situación y a la destrucción de su hábitat se encuentra en estado de conservación vulnerable (1). Los individuos provenientes de tráfico ilegal son decomisados y albergados en zoológicos ubicados principalmente en la Ciudad de Lima, los cuales no presentan un clima similar al de su hábitat y esto podría afectar el estado inmunitario de las tortugas y predisponerlos a enfermedades.

Por otro lado, las enfermedades respiratorias en reptiles presentan una sintomatología muy variada, pudiendo desarrollarse un proceso leve pero recurrente, un proceso agudo que termina con un desenlace fatal por neumonía asimismo puede presentarse en individuos sin aparentes síntomas, denominados portadores asintomáticos (2). La etiología primaria puede ser de origen bacteriana, fúngica, parasitaria y vírica. Los principales agentes bacterianos involucrados en rinitis y neumonía son *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Mycoplasma spp.*, entre otros (3).

Las enfermedades respiratorias en tortugas pueden ocasionar una alta mortalidad y morbilidad en épocas de invierno, siendo de gran importancia debido a su gravedad, capacidad de diseminación y riesgo de mortalidad masiva en colecciones (4). El zoológico “Parque Zonal Huáscar” alberga una colección importante de *C. denticulata*, en donde se

han presentado de manera reiterada procesos respiratorios, principalmente en la época de invierno. Existiendo una variabilidad en la resolución de los casos, por lo cual se hace necesario identificar los agentes bacterianos implicados.

Debido a la presentación de problemas respiratorios en tortugas, a la escasa información que existe y a la variabilidad en la resolución de los casos, es de suma importancia la identificación de bacterias patógenas específicas presente en las colecciones. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue la identificación bacteriana en secreciones nasales mediante la técnica de hisopado en la tortuga motelo de patas amarillas (*Chelonoidis denticulata*) con enfermedad respiratoria en el zoológico “Parque Zonal Huáscar” ubicado en la ciudad de Lima. Esta información será de gran utilidad para la mejor comprensión de las afecciones respiratorias en quelonios mantenidos en cautiverio y posteriormente diseñar un plan terapéutico más acertado.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Tortuga motelo de patas amarillas (*Chelonoidis denticulata*)

Se han descrito en el Perú especies de tortugas, 5 marinas, 12 habitan en ambientes acuáticos (lagos y océanos) y solo 2 especies son terrestres siendo esta la Motelo de patas rojas (*Chelonoidis carbonaria*) y la tortuga motelo de patas amarillas (*Chelonoidis denticulata*) (5).

2.1.1 Taxonomía

Reino: Animal

Phylum: Chordata

Clase: Reptilia

Orden: Testudines

Familia: Testudinidae

Género: *Chelonoidis*

Nombre científico: *Chelonoidis denticulata*

Nombre común: Tortuga Motelo de patas amarillas (6).

2.1.2 Morfología

Es considerada la tortuga terrestre más grande de la zona continental de América del sur, registrando una longitud recta del caparazón de hasta 820 mm y un peso de 60 kg (7). Una característica única de esta especie es su caparazón, esta conformación esquelética es un

revestimiento protector de los órganos vitales internos. El caparazón en general es convexo y alargado en ejemplares adultos y más redondeados en juveniles. Sus extremidades no poseen dedos marcados, solo uñas y las posteriores son de tipo elefantino (7).

Se considera sexualmente dimórfica, los machos adultos son un poco más grandes que las hembras, adicionalmente exhiben una concavidad en el plastrón y poseen la cola más larga y ancha, escudos anales más abiertos y la cabeza más pequeña. Por lo contrario, las hembras poseen un caparazón más redondeado, probablemente para aumentar el espacio interno para guardar los huevos (7).

2.1.3 Hábitat y distribución

Conserva una amplia distribución desde el sur de Norteamérica hasta Argentina, así como Europa, Asia, África, Madagascar y algunas Islas oceánicas. Sin embargo, es originaria de Sudamérica y se encuentran en los bosques húmedos, tropicales y subtropicales siempre verdes. En el Perú suele encontrarse asociada a cuerpos de agua y comúnmente en zonas con vegetación tipo matorral con árboles grandes dispersos y estrato herbáceo anual del bosque inundable, en donde posiblemente encuentran condiciones favorables para descansar debido a la temperatura, humedad y a la vegetación, que proporciona lugares para camuflarse. (7).

2.1.4 Reproducción

Estos quelonios anidan entre los meses de agosto a febrero, aun cuando el apareamiento se da durante todo el año. Los huevos pueden ser depositados sobre la superficie o ser enterrado en el suelo, el tamaño de la postura varía de 1 a 8 huevos. Las hembras tienen anidación múltiple y el periodo de incubación varía entre 128 a 152 días (7).

2.1. 5 Alimentación

Es omnívora y presenta predilección por la carroña, frutas y plántulas, esporádicamente puede comer alimentos de origen animal. En cautiverio, el 50% de su alimentación está compuesto por frutas, como higos, melón, sandía, pera, manzana, papaya, piña, naranja, melocotón y uva. El resto de su alimentación es a base de plantas silvestres (diente de león, jaramago y trébol), lechuga, canónigos, coles, endibias, cogollos y otras muchas verduras, hongos y de vez en cuando de carne, insectos y moluscos. Es recomendable añadir calcio, para un conveniente crecimiento y producción de huevos (7).

2.1.6 Estado conservación

Esta categorizada en situación vulnerable (VU) según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (1). Además, la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) la categoriza en el Apéndice II, con el fin de monitorear y controlar su transporte y comercialización al exterior (8).

2.2 Sistema respiratorio en quelonios

Los reptiles en general carecen de diafragma, ejerciendo fuerza para mover el aire durante la inspiración y la espiración, el movimiento proviene de los músculos respiratorios como el intercostal, la musculatura pectoral y abdominal, provocando cambios en la vía intrapulmonar (9,10).

El sistema respiratorio en quelonios se divide en una parte inferior y otra superior, posee una estructura que separa las cavidades torácica y abdominal; esta estructura no ayuda en el movimiento de aire entre pulmones y el medio ambiente. El aire entra por las fosas nasales y atraviesa las cavidades nasales, siendo este conducto revestido por el epitelio olfativo, el epitelio de la mucosa y la glotis. La tráquea posee anillos traqueales completos y se bifurca en un bronquio intrapulmonar no ramificado izquierdo y derecho en la entrada torácica. La rama de los bronquios se encuentra bien desarrollada con pequeños pasajes de aire que terminan en el tejido alveolar. Todos los quelonios tienen pulmones de múltiples cámaras que se ubican debajo del caparazón, relativamente rígidos y pueden extenderse en sentido caudal hacia el polo craneal de los riñones (9,10).

La presencia de un epitelio sin cilios y la ausencia de un diafragma verdadero en los quelonios hace que la eliminación de ciertas partículas como cuerpos extraños o exudados inflamatorios de la tráquea o los pulmones sean difícil de expulsar y por consecuencia los desechos inflamatorios tienden a acumularse dentro del sistema respiratorio, y en casos graves se pueden producir pus caseoso que complica la eliminación del exudado (9,10).

2.3 Enfermedades respiratorias de origen bacteriano en quelonios

2.3.1 Generalidades

Las enfermedades respiratorias son procesos infecciosos con sintomatología muy variables. Algunas tortugas pueden desarrollar un proceso leve pero recurrente; otras sufren un proceso agudo que terminara con un desenlace fatal por neumonía. En ambos casos hay que tener en cuenta que no todos los animales exhiben síntomas, pudiendo haber portadores asintomáticos (2). Los problemas de las vías respiratorias se pueden dividir en

enfermedades del tracto respiratorio alta (como la rinitis que se presenta con otitis, estomatitis y alteraciones oculares) y bajo (principalmente neumonías) (3).

La etiología primaria puede ser de origen bacteriana, fúngica, parasitaria y vírica, y la secundaria puede relacionarse a factores medioambientales (nutrición, temperatura, higiene y humedad). Estos procesos se vuelven crónicos por el diseño anatómico-fisiológico del aparato respiratorio de las tortugas, con descarga nasal leve serosa hasta purulenta (3).

2.3.2 Factores asociados

Las enfermedades respiratorias en los quelonios pueden estar originadas por diversos factores, tales como:

- a) **Nutricionales:** una alimentación inadecuada o deficiente favorece y la contaminación por agentes patógenos oportunistas. La hipovitaminosis A y/o C son la causa más frecuente de carencia nutricional en reptiles en cautividad.
- b) **Manejo:** alojamientos y condiciones de mantenimiento inadecuados (temperatura y humedad), falta de higiene favorecen al acumulo de bacterias oportunistas o patógenos primarios que colonizan y atacan a los animales inmunodeprimidos durante época invernal.
- c) **Humedad:** favorece el crecimiento de patógenos en vías respiratorias altas.
- d) **Temperatura:** brindada de manera inadecuada, tanto por encima o por debajo de la temperatura óptima, producen una alteración de la inmunidad y el desarrollo de patógenos.
- e) **Infecioso:** numerosos agentes provocan enfermedades respiratorias (3).

2.3.3 Afecciones respiratorias en quelonios

2.3.3.1 Rinitis

Son muy frecuentes sobre todo en tortugas terrestres, ocasionadas principalmente por *Mycoplasma spp.* y/o *Herpesvirus*, que ocasionan lesiones inflamatorias en nariz, boca y faringe con o sin destrucción de la estructura nasal (3).

La sintomatología inicial consiste en un exudado seroso en mayor cantidad de lo normal. Las mucosidades en exceso progresan hacia mucopurulentas. Al mismo tiempo se presenta progresivamente una pérdida del apetito y una disminución de la actividad general. La entrada de aire por los orificios nasales esta dificultada por lo que el animal abre la boca durante el proceso de espiración y suele ser frecuente oír pequeños estertores y sibilancias. En estadios avanzados esta infección provoca inflamación de la mucosa bucal y lingual. El proceso avanza afectando al estado físico del animal hasta que finalmente sufre emaciación, caquexia y deshidratación (3).

2.3.3.2 Neumonía

La afectación del trato respiratorio inferior es poco frecuente en las tortugas, aunque en algunos casos pueden aparecer bronquitis (generalmente mucopurulentas) y neumonías intersticiales con edema. Las neumonías en reptiles tienen un pronóstico reservado en la mayoría de los casos, principalmente debido a la dificultad que tienen estos animales en expulsar la mucosidad producida durante el proceso infeccioso por motivos fisiológicos. En las tortugas los exudados inflamatorios tienden a acumularse en determinadas porciones del pulmón permaneciendo mucho más tiempo que en mamíferos (3).

La etiología de la enfermedad puede ser bacteriana, los agentes más comunes son *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Mycobacteria*, *Chlamydiophilla*, entre otros (3). La sintomatología cursa con anorexia, depresión, letargia, disnea, taquipnea, esfuerzo respiratorio exagerado, cianosis, descarga procedente de la glotis y coanas, se puede observar que mantienen una extensión exagerada del cuello y la boca abierta, además pueden ir acompañada de una estomatitis y rinitis (3).

2.3.4 Bacterias asociadas a enfermedades respiratorias en tortugas

La mayoría de los organismos bacterianos aislados en enfermedades respiratorias son Gram negativos y forman parte de la microbiota del tracto respiratorio. Los organismos bacterianos asociados a infecciones respiratorias en reptiles incluyen a *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Aeromonas spp.*, *Salmonella spp.* y *Staphylococcus spp.* (9).

2.3.4.1 *Klebsiella spp.*

Es una bacteria Gram negativa conocida con bastones cortos, no esporulados, capsulados e inmóviles. Se desarrolla en medios mejorados como Agar sangre y ATS y en medios especiales para enterobacterias, se caracteriza por formar unas típicas colonias mucoides muy adherentes (11).

Las bacterias que integran este género están ampliamente distribuidas en la naturaleza y en el tracto intestinal de animales y del hombre, es referida como la causante de diversas infecciones en animales como neumonía y septicemia. Es responsable de diversas patologías en animales como la rinitis atrófica asociada a infecciones purulentas de las membranas de las mucosas nasales, orofaringe y senos paranasales. Así como de neumonías, donde tiende a la destrucción tisular y origina zonas extensas de necrosis y hemorragias, pudiendo llegar a abscesos pulmonares, hemoptisis y pleuritis en casos más

graves. Algunas de estas bacterias pueden provocar enfermedad granulomatosa infecciosa de las membranas mucosas de la nariz, orofaringe y senos paranasales (11).

Klebsiella spp. es uno de los organismos bacterianos Gram negativos aislados en enfermedades respiratorias en reptiles y se considera además como parte de la microbiota en muchos reptiles (9). *K. pneumoniae* es asociada comúnmente con neumonía, además se menciona que actúa como oportunista en vías respiratorias y en el tracto genital (11).

Existen informes en reptiles en donde las infecciones bacterianas causadas por *Klebsiella*, son comunes en el tracto respiratorio, la neumonía pudo ser consecuencia de infecciones crónicas de la cavidad oral (12).

2.3.4.2 *Pasteurella spp.*

Son bacilos cortos inmóviles, Gram negativo, esporulados, aerobios y anaerobios facultativos que en subcultivos repetidos pueden ser pleomórficos, la mayoría son catalasas positivas y pueden presentar coloración bipolar cuando se obtienen de tejidos, sangre o de aislamientos recientes en cultivos. Crece en condiciones aerobias en medios enriquecidos con sangre o suero (11).

Es un microorganismo de distribución mundial, habitante y comensal de membranas y mucosas de las vías respiratorias altas, cavidad oral, tracto genital y digestivo de animales, además su supervivencia en el medio ambiente es relativamente breve. Se puede transmitir por vía endógena y exógena, por contacto directo o a través de aerosoles, invade tejidos de animales inmunodeprimidos y en humanos puede ocurrir transmisión por mordeduras, rasguños de animales portadores, ocasionando síntomas como bronquitis y neumonía (11,13,14).

Entre los factores determinantes del desarrollo de la enfermedad se puede mencionar la adherencia a las mucosas y la evasión de la fagocitosis. Esta bacteria al presentar requerimientos nutricionales mínimos, prospera en ambientes húmedos tanto en hospitales veterinarios y de humanos, aumentando las posibilidades de infección de un paciente comprometido, colonizando de esta manera el tracto respiratorio, digestivo y contaminando heridas (15,13).

En un estudio se aisló un género de *Pasteurella* del tracto respiratorio de la tortuga del desierto (*Gopherus agassizii*), proponiendo el nombre de *Pasteurella testudinis*, dado a que esta bacteria fue aislada en el tracto respiratorio de tortugas sanas, representando hasta el 100 % de los aislamientos microbianos aerobios de la cavidad nasal. Además, se identificó y relaciono a *P. testudinis* con enfermedades respiratorias y septicemia en la tortuga leopardo (*Geochelone pardalis*) en cautiverio. *Pasteurella multocida* ha sido aislada en reptiles con signos de enfermedad respiratoria, incluyendo a individuos con secreción serosa y purulenta de las fosas nasales (12,13).

2.3.4.3 *Pseudomonas spp.*

Es un bacilo Gram negativo, no esporulado, móvil por flagelos polares, aerobio y estricto, crece en medios nutritivos simples como MacConkey o en cualquier medio para cultivo de enterobacterias, son oxidasa-positivos y catalasa-positivo. Es una especie mesófila que se caracteriza por su capacidad de producir pigmentos difusibles. Además, es un microorganismo de amplia distribución en la naturaleza, se encuentra en el suelo, el agua, en todo lugar donde exista materia orgánica en descomposición y ocasionalmente en la piel, nasofaringe, mucosas, heces y tubo digestivo del hombre y animales sanos. Así mismo, ocasiona diversas infecciones oportunistas en varias especies de animales (11,13).

Este microorganismo está presente en muchas enfermedades de reptiles, es muy común que se encuentren presentes en infecciones oportunistas, como es el caso de serpientes, lagartos y tortugas con estomatitis, generando como consecuencia una infección respiratoria o gastrointestinal, pudiendo ser la causa más común de muerte en estas especies (11). *P. aeruginosa* se encuentra habitualmente en la cavidad bucal de serpientes en cautividad produciendo estomatitis necrótica en reptiles, que fueron atendidos inadecuadamente (13). En general, los individuos más expuestos a infecciones son los inmunodeprimidos, con presentación de lesiones en piel, con procesos respiratorios, neoplasias o antecedentes de tratamientos con corticoides y antibióticos (11).

Existen pocos informes de infecciones por *Pseudomonas spp.* en quelonios, uno de ellos realizado en la tortuga griega (*Testudo graeca*) con estomatitis ulcerosa y faringitis, otro descrito en dos individuos de la tortuga americana (*Trachemys scripta callirostris*) con infecciones y lesiones tegumentarias locales, difusas, orales, linguales, neumonía y septicemias (12).

En otros reptiles se ha aislado diferentes especies de *Pseudomonas spp.* de la cavidad oral de animales clínicamente sanos, mientras que en casos de reptiles enfermos con pseudoestomatitis esta bacteria puede llegar a causar neumonía a medida que se va inhalando residuos necróticos de la cavidad oral. Además, es muy común para *Pseudomonas spp.* colonizar heridas, pudiendo de esa manera causar neumonía (12).

Los casos de zoonosis por *Pseudomonas aeruginosa* son producidos por contacto directo con mucosas y/o conjuntiva con saliva de reptiles, la sintomatología en humanos se presenta con rinitis purulenta, ulcerativa, abscesos pulmonares, neumonía y efusión pleural (14).

2.3.4.4 *Proteus spp.*

Es miembro de la familia de Enterobacteriaceae, son bacilos Gram negativos, no esporulados, móviles aeróbicas y facultativamente anaeróbicas, en el cultivo se caracterizan por requerir medios simples o moderadamente selectivos y distinguirse por sus capas diseminadas, planas e incoloras. Se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo, agua y materia orgánica, habitando el microbiota intestinal de animales, y siendo además responsables de muchas infecciones urinarias (17).

Este microorganismo ha sido señalado como causante de enfermedades en reptiles mantenidos en cautiverio, es altamente patógena y oportunista, es capaz de ingresar a tejidos dañados por trauma o aprovechar las condiciones de estrés causando enfermedades graves (18,19, 20).

Proteus spp. se aislado en serpientes con enfermedades en la cavidad oral y respiratorias, siendo responsable de una alta mortalidad en colecciones de estas mismas. La especie *Proteus mirabilis* se considera saprofita y parte de la microbiota de la piel de los reptiles; sin

embargo, puede actuar adversamente en infecciones secundarias, llegando a generar problemas en el tegumento como dermatitis vesicular necrotizante (12, 21).

2.3.4.5 *Aeromonas spp.*

Es un bacilo Gram negativo, de tamaño medio, la mayoría son catalasa positivos, anaerobios facultativos y no esporulados, móviles por flagelos polares, se asemeja morfológicamente a los miembros de la familia Enterobacteriaceae y crecen en medios no enriquecidos (13).

Las especies de este género se han hallado presente en aguas dulces, así como en la cavidad oral y piel de reptiles formando parte de la microbiota natural, además su transmisión en reptiles puede implicar a un acaro (*Ophionyssus natricis*) como vector (10).

Aeromonas spp. es un patógeno oportunista, requiriendo la presencia de factores estresantes para desencadenarse, se encuentra como comensal del intestino de animales de sangre fría, peces, reptiles, anfibios y sanguijuelas e incluso pueden provocar gastroenteritis en personas sanas o cuadros septicémicos en inmunodeprimidas. Se han descrito varios tipos de infecciones por *Aeromonas spp.* en heridas por contacto con agua o suelo, animales inmunocomprometidos, septicemia, abscesos, infecciones respiratorias y del tracto gastrointestinal (15, 13).

Esta bacteria se ha identificado como un patógeno asociado a lesiones de la cavidad oral, lesiones cutáneas, neumonía y septicemia. Como es el caso de reptiles con lesiones bucales graves, donde estos pueden aspirar desechos necróticos hacia el sistema respiratorio y terminar produciendo una neumonía (12).

2.3.5 Diagnóstico de las enfermedades respiratorias en tortugas

Existen diversos métodos para llegar a un diagnóstico de enfermedad respiratoria en tortugas, tales como la toma de placas radiográficas, citologías, cultivos microbiológicos por hisopado de la cavidad nasal o lavado traqueal – pulmonar, necropsia y pruebas serológicas. Siendo el cultivo microbiológico de cavidad nasal o lavado traqueal el método más útil para identificación de bacterias como auxiliar para el tratamiento en enfermedades respiratorias (3).

2.3.5.1 Cultivo e identificación bacteriana

Se llama cultivo al proceso que consiste en propagar microorganismos brindándoles las condiciones ambientales adecuadas. Las bacterias requieren de alimento y lo consiguen de su entorno, en el laboratorio se preparan medios artificiales llamados medios de cultivos (22). Los factores que influyen sobre el crecimiento bacteriano son la temperatura, pH, actividad del agua, nutrientes y el potencial de oxidorreducción (11).

Para el aislamiento bacteriano es importante que al técnico del laboratorio se le anticipe una lista de sospecha de patógenos, de esta manera se seleccionara los medios de placa apropiados para el cultivo. En los laboratorios clínicos es común que se usen medios sólidos para el desarrollo bacteriano como el agar sangre, dado que los ácidos y otros productos

inhibitorios que lo componen se difunden fuera de las colonias bacterianas durante el crecimiento y el agotamiento de los nutrientes. Cada agar selecciona y detecta pequeñas cantidades de bacterias y permite el crecimiento no selectivo de aerobios y no aerobios (11).

Algunos de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de bacterias causantes de enfermedad respiratoria se describen a continuación.

- a. Agar Sangre: es el medio enriquecido por excelencia, que posee como principal componente a la sangre. Permite el crecimiento y aislamiento de microorganismos exigente, tales como *Klebsiella spp.* y *Pasteurella spp.*, ya que este componente evidencia la acción lítica que tienen las toxinas bacterianas (hemolisinas) frente a los hematíes, liberando la hemoglobina al medio (11,22).
- b. Agar MacConkey: es un medio selectivo para enterobacterias como *Klebsiella spp.*, y *Salmonella spp.*, utiliza las sales biliares y el cristal violeta para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas (11).

2.3.5.2 Pruebas bioquímicas

Tienen como finalidad la identificación de las bacterias que pueden ser morfológicamente parecidas, pero con actividades bioquímicas distintas. En estos tipos de pruebas se usan medios de cultivos diferenciales que permiten evaluar las actividades metabólicas sobre diferentes sustratos (azúcar, aminoácidos, etc.), además la presencia de enzimas como coagulasa o catalasa, entre otros. La evaluación frente a diferentes sustratos permite al microbiólogo realizar la identificación bacteriana, consultando tablas donde se define el género y especie bacteriana (11).

- a. Medio TSI o Kliger: es uno de los medios bioquímicos mejor creados con múltiples reacciones bioquímicas, se denomina triple azúcar hierro y en su composición hay sacarosa, glucosa y lactosa. Permite detectar tres características de los microorganismos como la producción de gas, por fermentación de azúcares, la fermentación de la lactosa o sacarosa, y la producción de sulfuro de hidrógeno gaseoso. Diferencia los bacilos Gram negativos, principalmente a las enterobacterias (11).
- b. Medio de Sim (H₂S-Indol-Motilidad): en este medio se estudian tres procesos, la producción de hidrogeno sulfurado (H₂S), el Indol y la motilidad, pero las dos primeras significan que el medio exista por naturaleza los aminoácidos de cisteína y triptófano, la primera para liberar las moléculas de H₂S y la segunda para dar Indol. La motilidad se observa por solo desarrollo invasivo del medio a temperatura ambiente y pH neutro (22).
- c. Prueba de catalasa o peroxidasa: la catalasa es una enzima respiratoria presente en las bacterias aerobias y aerobias facultativas, descomponen al peróxido de hidrogeno que se forma como un producto final del metabolismo de carbohidratos (22).
- d. Medio LIA (Agar lisina hierro): este medio contiene la lisina, un aminoácido que puede descarboxilarse, a su vez posee otros ingredientes como glucosa, otros aminoácidos azufrados y puede medir el pH (22).
- e. Citrato (Agar citrato): es un medio pobre en nutrientes que tiene como objetivo determinar la capacidad de un microorganismo de utilizar el citrato de sodio como fuente de carbono para el metabolismo y crecimiento, asimismo que el acetilo con la coenzima A y oxalacetato ingresen al ciclo de Krebs (22, 23).
- f. Urea (Agar Urea): estudia la presencia de ureasa, la urea es desdoblada hasta amoniaco, este medio con su indicador de pH de 7.0 pasa a un pH más alcalino por la formación de amonio y amoniaco lo cual indicaría que la prueba es positiva. Los microorganismos que tienen la enzima ureasa producen un cambio de color rojo-rosado en el medio (22, 23).
- g. Prueba de Oxidasa (Merck): esta prueba evalúa si una bacteria produce actividad del citocromo oxidasa y consiste en extender una parte de la colonia que se va a ensayar sobre un área de una tira para la prueba de oxidasa impregnada con el reactivo (23).

2.4 Bacterias oportunistas en reptiles

Algunas bacterias Gram negativas suelen ser habitantes normales en los reptiles, sin embargo, pueden existir elementos externos e internos, que brinden condiciones propicias tales como cambios violentos de temperatura en el entorno, estrés crónico, inmunosupresión, heridas, parásitos, virus, hongos, etc., y cuando estas condiciones se dan, las bacterias pertenecientes a la microbiota, se vuelven patógenas secundarias, produciendo enfermedades sistémicas o localizadas (24, 25).

2.4.1 *Enterobacter spp.*

Son bacillos Gram negativos, no forman esporas, son catalasas positivas y oxidasa negativos, móviles, creciendo en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, siendo su temperatura optima de crecimiento de 37°C produce pigmento amarillo brillante y forman colonias duras (11).

Las cepas de esta bacteria suelen estar más relacionadas con patologías humanas que veterinarias. Se encuentran ampliamente distribuidas, y habitan naturalmente plantas, suelo y agua; además forma parte de la microbiota entérica. Esta bacteria se relaciona con infecciones de heridas, tracto urinario, neumonías, bacteriemias hasta procesos de osteomielitis (11).

En reptiles terrestres *Enterobacter spp.* ha sido asociado a enfermedades locales y generales. Este microorganismo ha sido aislado en lesiones de reptiles, en la mayoría de las

situaciones se ha reportado como agente causal, en superficie del cuerpo, dentro de estructuras viscerales o del aparato excretor, frecuentemente aislado en reptiles enfermos mantenidos en cautiverio. Además, ha sido hallado en tortugas y serpientes con enfermedad en la cavidad oral como estomatitis (12).

2.4.2 *Serratia spp.*

Es una bacteria de la familia Enterobacteriaceae, Gram negativa facultativa, anaeróbica y motil. La característica del género es un color rosado y rojo; sin embargo, esta puede estar influenciada por las condiciones de los medios durante el cultivo, aunque algunas no logran a producir pigmentos, se considera a ambas estar asociadas a enfermedades en reptiles (25).

Son considerados no patógenos, siendo asociados con enfermedad clínica en insectos y vertebrados. Además, se recuperan frecuentemente de insectos sanos, enfermos y muertos, esto ha llevado a ser una fuerte fuente de infección en reptiles (25).

Serratia spp. se ha aislado de numerosas especies de reptiles, incluidos animales sanos y enfermos, sobre todo en la mucosa oral y cloacal. Ha sido hallada en lesiones subcutáneas como abscesos, esta patogenia en reptiles es poco conocida, debido a que este organismo suele ser parte de la microbiota oral de varias especies, los organismos posiblemente se introducen por vía subcutánea a través de una herida de mordedura u otro daño traumático en el integumento (12).

En la tortuga de caja (*Terrapene carolina*) de vida libre con signos clínicos de enfermedad respiratoria, se diagnosticó neumonía bacteriana crónica en dos individuos, realizando el

cultivó y aislando una variedad de bacterias Gram negativas, incluyendo a *Serratia marcescens*, *Acinetobacter calcoace-ticus*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas sp.*, entre otras (12).

2.4.3 *Moraxella spp.*

Es un pequeño coco bacilo Gram negativo, inmóvil aerobio que se organiza ocasionalmente en parejas y habitualmente catalasa y oxidasa positivo, con cierta tendencia a retener el colorante. La mayoría poseen exigencias nutricionales (medios complejos) siendo una característica para la identificación de las especies que la integran, además es sensible a la desecación, y su supervivencia en el medio exterior es corta, pudiendo sobrevivir hasta 72 horas en la saliva y en la superficie del cuerpo de las moscas que actúan como vectores (11,13).

Algunas cepas de origen humano provienen especialmente de conjuntivitis y de la conjuntiva sana, también se han aislado en el tracto respiratorio superior y de hemocultivos. Se menciona que se han hallado de conjuntiva sana de animales y especialmente en queratoconjuntivitis en bovinos (11).

La transmisión puede darse por contacto directo, mediante aerosoles y de un vector como la Mosca de la cara (*Musca autumnalis*), la actividad alimentaria de esta mosca estimula la transmisión de esta bacteria. Tomando en cuenta que es una bacteria de gran distribución mundial y que no solo se encuentra en la conjuntiva, si no en las vías respiratorias

superiores, donde es posible aislarla, aunque no exista sintomatología de alguna enfermedad respiratoria. Se cree que los conductos lagrimales y secreciones nasales portan el mayor número de estos microorganismos (11).

Se aislado este microorganismo en quelonios que presentaban queratitis, una inflamación de la córnea producida por varios géneros de bacterias incluida *Moraxella spp.*, además se han aislado a partir de cultivos de muestras de hígado pulmón y riñón en tortugas con patologías (26,13).

2.4.4 *Citrobacter spp.*

Es un bacilo Gram negativo, móvil, anaerobio facultativo perteneciente a la división de enterobacteriáceas, suelen producir citrato y difieren de las salmonelas en que descarboxilan lisina y fermentan lactosa con gran lentitud. *Citrobacter spp.* está ampliamente diseminado en la naturaleza encontrándose en la tierra, en el agua y ocasionalmente habita en el tracto gastrointestinal (27). Se menciona que *Citrobacter freundii* es un patógeno oportunista que se asocia a infecciones misceláneas como mastitis, onfalitis, infecciones de vías urinarias y respiratorias (11).

Existen numerosos informes que documentan infecciones por *Citrobacter spp.* en reptiles involucrando mayormente a quelonios; sin embargo, si bien no está relacionada a enfermedades respiratoria, se presenta como una bacteria oportunista, como es el caso de una enfermedad septicémica por úlcera cutánea (UD) para una variedad de tortugas de

estanque. Esta enfermedad parece estar relacionada con el manejo, siendo las condiciones de predisposición necesarias para iniciar una epizootia que incluyen una mala nutrición y mantenimiento en agua sucia estancada junto con abrasiones en la piel, pudiendo presentarse septicemia con focos necróticos en el hígado, el corazón, riñón y el bazo (12).

2.5 Antecedentes

García de la Peña y colaboradores (2016) realizaron un estudio sobre la sensibilidad de antibióticos en bacterias aerobias de la tortuga del bolsón (*Gopherus flavomarginatus*) en la ciudad de Durango (México). Se obtuvieron hisopados de la cavidad oral y otras por frotis en ojos, caparazón, plastrón, cabeza, cloaca, piel de patas, uñas, heridas cicatrizadas y excremento. Las muestras fueron inoculadas en medios cultivo generalista (agar bacteriológico) y selectivos (SS: Salmonella-Shigella, S-110: Estafilococos, EMB: Eosina y azul de metileno), posteriormente se realizaron pruebas de sensibilidad de distintos antibióticos. Se aislaron 18 especies de bacterias oportunistas como *Acitenobacter calcoaceticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacia*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.* y *Pseudomonas spp.* Mientras que tres especies se registraron en el 60% de los distintos sitios corporales de muestreo como *Enterococcus gallinarum*, *Staphylococcus lentus* y *S. xylosus*. Respecto a la sensibilidad microbiana, la gentamicina fue el antibiótico que presento el 100%, la tetraciclina un 90 % de sensibilidad seguida de la levofloxacin (28).

Salvador (2008) realizó un estudio bacteriológico con el objetivo de aislar las bacterias implicadas en neumonías y estomatitis en reptiles criados en cautiverio y mantenidos como “mascotas” en Sao Paulo (Brasil). Se estudiaron 12 reptiles: 3 boa constrictor (*Boa*

constrictor.), 5 tortuga motelo de patas rojas (*Geochelone carbonaria*) y 4 tejú (*Tupinambis meranae*). Se tomaron muestras de la secreción oral y nasal, transportadas en el medio de conservación Stuart, las muestras fueron cultivadas en agar sangre, agar MacConkey, además se hizo uso de la coloración Gram y para la diferenciación de enterobacterias se utilizó el medio de EPM Mili Citrato y las prueba Catalase staphi- test. La bacteria predominante en la cavidad oral fue *Pseudomonas aeruginosa*, en la cavidad nasal se aisló: *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella sp.* y *Pseudomonas aeruginosa*. En la tortuga motelo de patas rojas (*C. carbonaria*) se aisló únicamente *S. aureus* (29).

Santoro y colaboradores (2005) estudiaron la tortuga lora (*Lepidochelys olivacea*) en el pacífico norte de Costa Rica, el objetivo fue determinar la flora microbiana nasal y cloacal de 45 tortugas sanas. La captura se llevó a cabo durante la noche mientras se realizaba el desove, se introdujo hisopos estériles directamente en la cloaca y en los conductos nasales. Los hisopos se pusieron en medio de transporte Stuart y se cultivaron en medio agar sangre, agar MacConkey e agar sal y manitol. Se aislaron 35 y 64 bacterias en la cloaca y cavidades nasales, respectivamente. Las bacterias más frecuentes halladas en cavidades nasales fueron *Bacillus spp.* (32/45), *Staphylococcus aureus* (6/45), *Corynebacterium spp.* (5/45). Los autores concluyen que la microbiota estuvo constituida por microorganismos potencialmente patógenos para el ser humano y las mismas tortugas (21).

Silvestre y colaboradores (1999) estudiaron la etiología y descripción clínica de la rinitis crónica en la tortuga mora (*Testudo graeca*) en Barcelona. El objetivo fue el aislamiento de bacterias acompañantes de la enfermedad y la visualización de Herpesvirus en los tejidos respiratorio y bucolingual de las tortugas necropsiadas. El estudio conto con una población de 11 individuos con rinitis, se realizó un análisis hematológico, microbiológico, citológico y

radiológico, adicionalmente se realizaron evaluaciones histopatológicas de 3 tortugas muertas. Las bacterias aisladas a partir del exudado nasal fueron: *Providencia rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus xylosum*, *Achromobacter spp.*, *Chromobacterium spp.* y *Corynebacterium spp.* (15).

Aguirre y colaboradores (1994) evaluaron los patógenos asociados a la presentación de fibropapilomas en la tortuga verde (*Chelonias mydas*) en la bahía de Kaneohe (Hawái). Se capturaron 32 individuos y realizaron hisopados nasofaríngeo y cloacal. Para el cultivo se utilizaron el agar sangre, MacConkey, agar tripteína soya y agar aguamarina. Se aislaron 28 bacterias Gram negativas y 5 Gram positivos, las más comúnmente aisladas fueron: *Pseudomonas fluorescens* (68%), *Pseudomonas putrefaciens* (66%), *Vibrio alginolyticus* (50%), *Streptococcus* no hemolítico (50%), *Vibrio damsela* (47%) y *Vibrio fluvialis* (47%) (28) (30).

En el Perú no se han realizado estudios relacionados al aislamiento bacteriano mediante hisopado nasal en tortugas con enfermedad respiratoria. Sin embargo, se han llevado a cabo estudios con el fin de conocer la microbiota de reptiles, principalmente a partir de hisopados cloacales, como los realizados en lagarto caimán (*Dracaena guianensis*) en un zoológico de Lima (31), en el caimán blanco (*Caiman crocodylus*) de vida libre en el río Madre de Dios (32) y otra realizada en 6 especies de reptiles en ciudad de Pucallpa (33), por último en la tortuga motelo de patas amarillas (*Geochelone denticulata*) en la ciudad de Lima (34).

Ojeda (2017) estudio 57 individuos del lagarto caimán (*Dracaena guianensis*) mantenidos en cautiverio en un zocriadero de la ciudad de Lima, tomando hisopados cloacales con el fin de conocer la microbiota de esta especie. Para realizar el aislamiento bacteriano utilizo el cultivo en agar sangre y McConckey, mediante pruebas bioquímicas (TSI, citrato de Simmons, LIA, SIM, Lisina descarboxilasa, catalasa, oxidasa, Indol y ureasa) y el método de disco Kirby Bauer. Se aislaron 15,32% (19/124) de *Shigella sp.*, 12,09% (15/124) de *Enterobacter cloacae.*, 11,29% (14/124) de *Enterobacter aerogenes.* y *Pseudomonas aeruginosa.* Los resultados de las pruebas de sensibilidad a antibacterianos determinaron más del 90% de sensibilidad a ciprofloxacina, gentamicina, enrofloxacin y nitrofurantoina (31).

Carlos y colaboradores (2016) estudiaron 30 individuos del caimán blanco (*Caiman crocodylus*) de vida libre en el departamento de Madre de Dios. A partir de hisopados cloacales se realizó el aislamiento bacteriano utilizando los medios de cultivo Agar Mc Conkkey y SS (Salmonella- Shiguella), las pruebas bioquímicas como la TSI, LIA, Indol, IM, Citrato, Rojo de metilo y Voges. Adicionalmente se evalúa la resistencia antimicrobiana utilizando la técnica Kirby Bauer. Se aislaron las siguientes bacterias: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella sp.*, *Proteus mirabilis* y *Shigella sonnei*. Además, se halló una marcada resistencia al cloranfenicol (32).

Cavero (2013) realizo una investigación en 6 especies de reptiles entre ellos 22 individuos de tortuga motelo (*Cheloidis denticulata*), 14 individuo Boa Montana (*Boa constrictor*), 12 Individuos de tortuga Taricaya (*Podocnemis unifilis*), 9 individuos de caimán blanco (*Caimán crocodylus*), 3 individuos anaconda (*Eunectes murinos*) y 1 individuo de tortuga cupiso (*Podocnemis sextuberculata*), con el objetivo de identificar la presencia de bacterias

entéricas de potencial zoonótico en un mercado y en animales decomisados en la ciudad de Pucallpa. Se tomaron 61 muestras cloacales las cuales fueron cultivadas en agares MC, Hektoen, SS, Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa, en agar Campy CVA, donde luego se realizó el enriquecimiento en caldo selenito y agua peptonada. Para las pruebas bioquímicas se utilizaron medios como KIA, LIA, MIO, Citrato de Simmons. Aislando *Aeromonas hydrophila* en un 34% (21/61) en el total de las muestras, siendo más frecuentes en *Caimán crocodylus* (9/9) y *Boa constrictor* (5/6). Por otro lado, solo se aisló *Salmonella* entérica subespecie entérica serogrupo C2 de *Boa Constrictor* (3.28%) (33).

Por último, Ruiz (2009) evaluó la presencia de *Salmonella spp.* en 30 individuos de la tortuga motelo de patas amarillas (*Chelonoidis denticulata*) en un criadero de la ciudad de Iquitos. Se realizaron pruebas de cultivo bacteriológico y bioquímicas, en un medio enriquecido de Agar tripticasa soya, caldo Rappaport, caldo tetracionato y caldo selenito, que se sembraron en placas de agar SS, agar verde brillante (VB) y agar XLD. Los resultados demostraron que el 6,7% (2/30) de las muestras fueron positivas a *Salmonella spp.* Adicionalmente, se encontraron otras bacterias como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* y *Citrobacter spp* (34).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Espacio y tiempo

El presente estudio se realizó en el Zoológico “Parque Zonal Huáscar”, ubicado en la esquina de Av. 200 millas con Av. Revolución, distrito de Villa El Salvador, departamento de Lima (Anexo 1). Las muestras fueron procesadas en las instalaciones de un laboratorio particular, en el distrito de Lima. Las muestras fueron tomadas en el mes de diciembre del 2018.

3.2 Población y muestra

La población de estudio fue de 50 individuos de las tortugas Motelo de patas amarillas (*Chelonoidis denticulata*) albergada en el “Parque Zonal Huáscar”. Se utilizó un muestreo no probabilístico por conveniencia dado a que se deseó identificar las bacterias presentes en secreciones nasales de quelonios que presentaron signos clínicos compatibles a enfermedades respiratorias. Además, se tomó en cuenta que esta especie se encuentra en estado de conservación vulnerable (VU), según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (1) y por medio de antecedentes internacionales y nacionales que muestran investigaciones en reptiles con una población menor o similar a esta. Se identificaron 26 individuos adultos con signos clínicos compatibles a enfermedades respiratorias, 16 hembras y 10 machos. Los individuos provenían de tráfico ilegal y habían sido albergadas en el zoológico desde hace 6 meses como mínimo.

Las tortugas se encontraban albergadas en un recinto tipo externo (“*outdoor*”) de un área de 20 m² aproximadamente y cercada con barandas de metal, con substrato natural principalmente de tierra afirmada. El ambiente presentaba una poza y dormidero (1,2 m x 0.6 m) de madera. No contaban con una fuente de calor artificial.

3.3 Diseño de investigación

El trabajo de investigación fue de diseño no experimental, transversal y descriptivo. Contó con los permisos y autorizaciones respectivas, se visitó el zoológico y se seleccionó a las tortugas con enfermedades respiratorias, las cuales fueron capturadas para la obtención de la muestra, que consto del hisopado de la cavidad nasal, las cuales fueron colocadas en un medio de conservación siendo rotuladas y refrigeradas para su transporte a un laboratorio privado, donde se identificó las bacterias, mediante el procedimiento de cultivo en medios sólidos y pruebas bioquímicas.

3.4 Equipo y procedimiento

3.4.1 Equipos

Los materiales y equipos para esta investigación fueron:

- a. Sujeto de estudio
 - Tortuga Motelo de patas amarillas (*Chelonoidis denticulata*)

- b. Unidad de análisis
 - Muestra de la cavidad nasal

c. Materiales y equipos para la toma de muestra

- Guantes de nitrilo
- Mascarilla
- Medio de transporte Cary Blair
- Ficha de historia clínica
- Caja de polietileno expandido
- Gel refrigerante
- Violeta de genciana
- Microaplicadores estéril (Hisopos odontológicos) tisen
- Cámara digital

d. Servicios

- Laboratorio de microbiología
- Biblioteca
- Internet
- Impresiones
- Fotocopias
- Transporte terrestre

e. Materiales de escritorio

- Cuaderno de apuntes
- Lapicero
- USB
- Laptop

f. Capital humano

- Investigador
- Asesores
- Ayudantes del zoológico

3.4.2 Procedimiento

a) Autorización para la toma de muestra

- Se contó con la autorización para la recolección de muestra y con el permiso para la captura de las tortugas en el “Parque Zonal Huáscar” brindada por el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) otorgado mediante la Resolución General N° 032- SERFOR/DGGSPFFS (Anexo 2).
- Asimismo, se obtuvo la autorización del Zoológico y de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Alas Peruanas (N° de Resolución 219-2018-FCA-UAP) (Anexo 3).

b) Captura y Sujeción de los animales

- Se ingresó al recinto de las tortugas en el zoológico, con vestimenta de protección adecuada (scrup, guantes, mascarilla y zapatillas), donde se evaluó la condición de salud de los 50 individuos entre ellos 10 machos y 16 hembras mantenidos en el zoológico.
- La captura que se realizó fue por medio de la contención física, que se llevó a cabo bajo las indicaciones del zoológico, donde fue necesario la intervención de una segunda persona.
- Donde se sostuvo a la tortuga por detrás, usando las dos manos cada una lateral al caparazón para su posterior evaluación y procedimiento de toma de muestra.

c) Examen clínico general

- La evaluación consistió en realizar un examen clínico, donde se apreció el sexo, la condición corporal, de la piel y caparazón, así mismo se observó mucosas tales como la ocular, nasal y bucal (Anexo 4).
- Posteriormente se seleccionó a los individuos que presentaban signos de enfermedades respiratorias tales como: secreción nasal u ocular, congestión nasal u ocular, estertores y sibilancias a la auscultación. A los cuales se les colocó un código en el caparazón con

la ayuda de un plumón y violeta de genciana, para diferenciarlos y proceder a la correcta rotulación de muestras (Anexo 5).

- Luego se elaboró una ficha clínica a cada tortuga que presento signos de enfermedad respiratoria donde se realizó una anamnesis, examen físico, medición biométrica, especificando el tipo de muestra que se realizó y el tratamiento farmacológico que siguió si así fue el caso (Anexo 6).

d) Hisopado de la cavidad nasal

- Para la toma de muestra fue necesario tener acceso a la cabeza, haciendo uso del dedo índice y pulgar de la mano izquierda, que se sostuvo la cabeza de la tortuga, para evitar que esta la retraiga.
- Luego se procedió a introducir a través de los orificios nasales un hisopo estéril, haciendo movimientos de rotación contra las paredes nasales para obtener muestra suficiente de cada espécimen (Anexo 7).
- Ya obtenida la muestra de cada individuo, inmediatamente fueron colocados en medios de conservación y transporte Cary Blair, los cuales fueron rotulados según el código correlativo de cada individuo para su identificación.

-

e) Conservación y envió

- Para su conservación las muestras fueron almacenadas en una caja de polietileno expandido especial para el transporte de material biológico, que contenían gel refrigerante.
- Estas mismas se enviaron a un laboratorio privado ubicado en la ciudad de Lima para su posterior análisis.

f) Cultivo

- En las instalaciones del laboratorio se recibieron las muestras almacenadas en los medios de Cary Blair, las cuales se encontraban rotuladas.
- Posteriormente las muestras fueron sembradas en medios solidos contenidos en placas petri, con Agar sangre (medio enriquecido no selectivo) y Agar McConkey (medio

selectivo), donde se empleó el método por siembra de estría que permitió aislar colonias bacterianas y observar el desarrollo.

- El método por siembra de estría consistió en hacer uso de la asa de siembra, la cual toma una pequeña cantidad de muestra ubicado en los tubos de conservación de Cary Blair.
- Luego se introdujo la punta del asa de siembra en el medio selectivo de agar, dentro de cada placa Petri donde se tocó un extremo del medio y se ejerció las estrías de apretado a abierto, moviendo el asa de extremo a extremo, este procedimiento se volvió a repetir de 2 a 4 veces, rotando la placa.
- Cada muestra inoculada en las placas petri con el agar correspondiente, fueron colocadas en una incubadora bacteriológica a 37°C durante 48 horas, hasta obtener un adecuado crecimiento y desarrollo de las colonias (22) (Anexo 8).
- Una vez obtenido el crecimiento y desarrollo de las colonias en ambos medios (Agar sangre y Agar McConkey) se aplicó la tinción Gram cuyo objetivo fue identificar los bacilos Gram Negativos (BGN) (Anexo 9).
- El procedimiento de la tinción Gram consistió en tomar una muestra pequeña de la colonia obtenida y colocarla en una lámina porta objeto a la cual se le colocó esta tinción, para luego observar en el microscopio.
- Una vez seleccionado las colonias de bacilos Gram negativo (BGN) se realizaron las pruebas de Oxidasa (Merk) y Catalasa.

g) Pruebas bioquímicas

- Se utilizaron las pruebas de diferenciación bioquímicas para la identificación del género bacteriano de las colonias seleccionadas.
- Cada colonia aislada fue aplicada en tubos diferenciales: TSI (Agar triple azúcar hierro), Sim (Agar movilidad, indol, sulfuro de hidrogeno), Lia (Agar lisina hierro); Citrato (Agar citrato); Urea (Agar Urea).
- El procedimiento consistió en tomar una muestra de las colonias desarrolladas en los medios de cultivos ya mencionados y se procedió a realizar una nueva siembra, en un

tubo inclinado, con la ayuda de la asa de siembra por puntura y picadura siguiendo un eje longitudinal, en estos medios diferenciales.

- Luego fueron incubados a 37 °C durante 24 horas, posteriormente se realizó la lectura de las reacciones bioquímicas. Se agregaron 5 gotas del reactivo de Kovacs en los tubos con el medio SIM, para evidenciar la presencia de indol (22) (Anexo 10).

3.5 Diseño estadístico

Para la investigación y análisis estadístico se hizo uso de la estadística porcentual, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencia} = \frac{\text{Número de animales positivos}}{\text{Número total de individuos analizados}} \times 100$$

Además, se evaluó las posibles diferencias según el sexo de los individuos y la identificación bacteriana utilizando la Prueba Exacta de Fisher ($p < 0,05$) con el Software de estadística IBM SPSS Statistics Base 22.0.

IV. RESULTADOS

Se encontró que el 100% (26/26) de las tortugas con enfermedad respiratoria muestreadas fueron positivas a la presencia de bacterias Gram negativas, aislando 10 especies. La bacteria predominante fue *Pseudomonas sp.* con 46,15% (12/26); seguido de *Klebsiella oxytoca* con 26,92%; *Proteus vulgaris* 19,23%; *Aeromonas sp* 15,38 % y *Citrobacter koseri*. con 15,38 %.

Cuadro 1. Identificación de bacterias relacionadas con enfermedades respiratorias de tortugas motelo de patas amarillas (*C. denticulata*) en el zoológico “Parque Zonal Huáscar” ubicado en ciudad de Lima, en el año 2018 (n=26).

Especies	N° de individuos	Porcentaje (%)
<i>Pseudomonas sp.</i>	12	46,15
<i>Klebsiella oxytoca</i>	7	26,92
<i>Proteus vulgaris</i>	5	19,23
<i>Aeromonas sp.</i>	4	15,38
<i>Citrobacter koseri</i>	4	15,38
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	11,53
<i>Moraxella sp.</i>	3	11,53
<i>Citrobacter freundii</i>	2	7,69
<i>Pasteurella sp.</i>	2	7,69
<i>Serratia sp.</i>	2	7,69

En el cuadro 2, se observa que en las hembras se aislaron mayor frecuencia de *Pseudomonas sp.* en un 62,50% (10/16) y *klebsiella oxytoca* en un 37,50% (6/16). Para determinar si existían diferencias significativas entre las frecuencias de bacterias aisladas entre hembras y machos se empleó la prueba de estadística de Fisher, encontrándose que existían diferencias significativas en *Pseudomonas sp.* ($p=0,042$), *Citrobacter koseri* ($p=0,014$) y *Enterobacter aerogenes* ($p=0,046$).

Cuadro 2.

Frecuencia de bacterias asociadas a enfermedades respiratorias de tortugas motelo de patas amarillas (*C. denticulata*) en el zoológico “Parque Zonal Huáscar”, según el sexo (n=26).

Especie	Hembra (n=16)		Macho (n=10)		P (valor de significancia)
	N	%	n	%	
<i>Aeromonas sp.</i>	1	6,25	3	30,0	0,142
<i>Citrobacter freundii</i>	2	12,50	1	10,0	0,677
<i>Citrobacter koseri</i>	0	-	4	40,0	0,014
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	-	3	30,0	0,046
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	37,50	1	10,0	0,139
<i>Moraxella sp.</i>	3	18,75	0	-	0,215
<i>Pasteurella sp.</i>	1	6,25	1	10,0	0,631
<i>Proteus vulgaris</i>	3	18,75	2	20,0	0,657
<i>Pseudomonas sp.</i>	10	62,50	2	20,0	0,042
<i>Serratia sp.</i>	1	6,250	1	10,0	0,631

V. DISCUSIÓN

Las enfermedades respiratorias ocasionan una alta morbilidad y mortalidad en quelonios mantenidos en cautiverio, siendo importante la determinación e identificación de los agentes bacterianos responsables para realizar un tratamiento adecuado. En la presente investigación se analizaron las tortugas motelo de patas amarillas (*C. denticulata*) con enfermedad respiratoria y se logró identificar 10 especies de bacterias Gram negativas, algunas implicadas en estudios previos y otras que forma parte de la microbiota de reptiles, considerándolas altamente patógenas y oportunistas en condiciones de estrés, llegando a colonizar y causar enfermedades.

Los hallazgos bacterianos del presente estudio se encontraron relacionados a la interacción que exista entre el medio ambiente y el hospedero. Esta interacción facilita condiciones patológicas circunstanciales o patologías concomitantes, además es importante la condición inmunológica del individuo y el hacinamiento en cautiverio. Al presentarse estas situaciones las tortugas son incapaces de responder favorablemente un tratamiento.

Además, estudios y antecedentes han demostrado que las bacterias Gram negativas son microorganismos frecuentes en secreciones nasales, relacionadas a enfermedades respiratorias en reptiles como los quelonios. Basado a esto se hizo uso de medios selectivos y diferenciales como el agar MacConkey y enriquecido como el agar Sangre para la identificación de bacterias Gram negativas.

En el presente estudio la bacteria más predominante fue *Pseudomonas sp.* en un 46,15% (12/26), a diferencia a los descrito por Martínez –Silvestre y colaboradores para la tortuga mora (*Testudo graeca*) con rinitis donde *Pseudomonas aeruginosa* (11,7%) y *Pseudomonas fluorescens* (11,7%) no fueron las predominantes (15). Sin embargo, en la tortuga verde (*Chelonia mydas*) donde se evaluaron patógenos asociados a la presentación de fibropapilomatosis se identificó predominantemente *Pseudomonas fluorescens* (68%) y *P. putrefaciens* (66%) (30). En reptiles sanos esta bacteria se puede hallar en la nasofaringe y tubo digestivo (11), como lo descrito en tortuga lora (*Lepidochelys olivacea*) clínicamente sana donde se aisló *P. aeruginosa* (2,2%) y *Pseudomonas spp.* (8,8%) (21).

Sin embargo, en individuos inmunosuprimidos se ve favorecida la proliferación de *Pseudomonas spp.* y se puede aislar en ejemplares con lesiones tegumentarias locales, difusas, orales, linguales, así como en neumonía, septicemias y neoplasias (11,12). Considerando que uno de los principales factores predisponentes de la fibropapilomatosis es la inmunosupresión, a diferencia de la rinitis, el crecimiento bacteriano se ve favorecido y explicaría los hallazgos en la tortuga verde (*Chelonia mydas*). Además, esta bacteria es aislada en pseudoestomatitis y puede originar neumonía a medida que se inhala residuos necróticos de la cavidad oral, de esta manera colonizan heridas hasta conducir una neumonía (12). Este proceso pudo haber ocurrido en las tortugas de este estudio y explicaría la predominancia de esta bacteria; sin embargo, el veterinario encargado desconoce si las tortugas habían presentado pseudoestomatitis previamente.

Klebsiella oxytoca fue identificada en un 26,92 % (7/26) de las tortugas analizadas, mayor a lo reportado en el estudio realizado en la tortuga verde (*C. mydas*) donde se aisló individuos con *K. pneumoniae* en un 6,25 % (2/32) y *K. oxytoca* en un 3,12 % (1/32). *Klebsiella spp.* es responsable de diversas patologías en animales como neumonía y rinitis atrófica asociada a infecciones purulentas (11). En reptiles es una de las bacterias más comúnmente aislada en el tracto respiratorio y puede ocasionar enfermedades respiratorias (12). Como se evidencio en un tejú (*Tupinambis merianae*) con secreción nasal y un probable inicio de neumonía donde se aisló *Klebsiella sp.* (29).

La proliferación de *Klebsiella sp.* se ve favorecida cuando las condiciones medio ambientales, y la dieta son inadecuadas; es importante además resaltar que los animales en cautiverio suelen presentar estados de estrés que generan inmunosupresión en los individuos, situación que se presentaría en el presente estudio y explicaría la presencia de esta bacteria en la muestra de estudio. Sin embargo, en la investigación realizada en la tortuga verde (*C. mydas*), se halló un menor porcentaje de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, el estrés sería menor pues el estudio se realizó con especies de vida libre y con otra enfermedad no respiratoria.

En el presente estudio se identificó a *Proteus vulgaris* en un 19,23 % (5/26), mayor a lo descrito en la tortuga Lora (*L. olivacea*) donde se aisló *Proteus mirabilis* en un 6,6% (3/45) en tortugas hembra aparentemente sanas (21). *Proteus spp.* es un agente saprofito, oportunista y altamente patógeno, que inclusive forma parte la microbiota de la piel de diversos reptiles. Es capaz de ingresar a través de tejidos dañados, originando patologías graves en piel, tracto gastrointestinal, tracto respiratorio y vías urinarias (18, 19, 20). Como lo observado en la Boa mantona (*Boa constrictor*) con secreción nasal, anorexia y una probable neumonía donde se identificó *P. vulgaris* en un 8,3 % (1/12) (29). Siendo este microorganismo comúnmente aislado en individuos con enfermedad respiratoria, habría ingresado a partir de lesiones tegumentarias y originado los casos encontrados en este estudio.

Además, se ha identificado *Aeromonas sp.* en un 15,38% (4/26), comparado a lo descrito en la tortuga lora (*L. olivacea*) donde el hallazgo fue menor (6,6%) y en el cual se evaluó la microbiota nasal de tortugas sanas (21). Esta bacteria forma parte de la microbiota de reptiles, hallada en la cavidad oral, piel y del tracto intestinal. Es un microorganismo oportunista que requiere de factores estresantes para poder diseminarse y afectar animales

inmunocomprometidos originando infecciones respiratorias, del tracto gastrointestinal, abscesos en piel y septicemia (15, 13, 12). Lo cual fue observado en la tortuga del desierto (*G. agassizii*) y tortuga leopardo (*G. pardalis*) con neumonía donde se aisló *A. hydrophila* (10). Por lo cual, las tortugas del estudio debieron sufrir estrés, posiblemente ambiental (como la falta de temperatura del recinto). Esto se pudo evidenciar al momento del estudio, ya que no contaban con una fuente externa de calor como calefacción, favoreciendo la diseminación de bacterias oportunistas como *Aeromonas sp.*

Pasteurella sp. fue identificado en un 7,69 % (2/26) de los individuos del presente estudio, presentando una similitud en la investigación realizada en la tortuga mora (*T. graeca*) con rinitis, donde se aisló *P. multocida* en un 5,8% (1/11) (15). En reptiles en cautiverio, es un agente patógeno oportunista en animales inmunosuprimidos por diversos factores, pudiendo colonizar y desarrollar enfermedades respiratorias (11,13,14). Como es el caso de la tortuga leopardo (*Geochelone pardalis*) que presentaba signos de enfermedad respiratoria y septicemia, identificando *P. testudinis* (12,13).

Pasteurella sp. presenta requerimientos nutricionales mínimos, como ambientes húmedos; sin embargo, su supervivencia en el medio ambiente es relativamente breve (12,13). En el presente estudio y en el realizado en *T. graeca* no se halló un porcentaje alto, lo cual podría deberse a su baja viabilidad en el ambiente.

En el estudio se determinó *Citrobacter koseri* en un 15,38 % de (4/26) y *Citrobacter freundii* en un 7,69 % (2/26). A pesar de no encontrarse como agente causal de enfermedades respiratorias en reptiles, ha sido aislada en la tortuga mora (*T. graeca*) con rinitis crónica (15) y en la tortuga motelo de patas rojas (*G. carbonaria*) en la cavidad oral con inicio de

placas y úlceras orales (29). La presentación de la enfermedad estaría relacionada con condiciones inadecuadas en el manejo, las condiciones para iniciar una epizootia que incluyen una mala nutrición y mantenimiento en agua sucia estancada junto con abrasiones en la piel (12). El lugar de estudio contaba con una poza de cemento que era quincenalmente vaciada y limpiada con hipoclorito de sodio; sin embargo, al no contar con un sistema de desagüe adecuado o filtración, esto pudo favorecer la diseminación de la bacteria, siendo necesario mayores estudios.

En los individuos de la tortuga motelo de patas amarillas (*C. denticulata*) estudiados se aisló *Moraxella sp.* en un 11,53 % (3/26). En reptiles esta bacteria no ha sido reportada previamente en individuos con enfermedad respiratoria; sin embargo, ha sido aislada en cultivos de hígado, pulmón y riñón con diversas patologías; así como en queratitis en quelonios (26). La transmisión es por contacto directo mediante aerosoles e incluso de exudaciones a partir de los conductos lagrimales y secreciones nasales donde se encuentra esta bacteria y de un vector como la Mosca de la cara (*Musca autumnalis*) que es capaz de iniciar la infección (11). En el recinto de las tortugas estudiadas se observó una gran cantidad de moscas y mucho de los individuos presentaron un aumento en la secreción oculonasal, lo que pudo favorecer los hallazgos.

Por otro lado, *Serratia sp.* se ha identificado en el presente estudio en un 7,69 % (2/26), otra investigación realizada en dos individuos de la tortuga de caja (*Terrapene carolina*) con neumonía bacteriana se aisló *Serratia marcescens* y otras bacterias (12,25). Sin embargo, pese a no estar vinculada como agente causal de enfermedades respiratorias en quelonios, ha sido reportada en reptiles sanos y enfermos, sobre todo en la mucosa oral y cloacal, así como en lesiones subcutáneas. Además, es frecuentemente aislada en insectos, llegando a ser una fuente de infección en reptiles (12, 25). El hallazgo de *Serratia sp.* en el estudio pudo haberse originado por contacto directo con insectos que suelen circundar en el recinto.

Se describe a *Enterobacter aerogenes* en un 11,53 % (3/26). En reptiles se ha descrito en tortugas y serpientes con estomatitis (12), a diferencia a lo reportado en la tortuga lora (*L. olivacea*) que se encontraba clínicamente sana y se aisló *Enterobacter agglomerans* (4,4 %) (2/45) (21). Esta bacteria forma parte de la microbiota entérica, se ha reportado como agente causal en infecciones de superficies del cuerpo, dentro de estructuras viscerales o del aparato excretor (11,12). El hallazgo de *Enterobacter aerogenes*. en la presente investigación puede haberse registrado, al ser este un microorganismo que habita en heridas y está presente en lesiones producidas por estomatitis que suelen estar cursando procesos respiratorios infecciosos, como se observó en algunos de los individuos analizados en el estudio.

Respecto a la diferencia de bacterias aisladas según el sexo del individuo, se encontró mayor frecuencia de *Pseudomonas sp.* en las hembras, mientras que *Citrobacter koseri* y *Enterobacter aerogenes* mayor frecuencia en los machos, estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (prueba de Fisher). No se ha encontrado otro estudio que evalué alguna diferencia entre las bacterias aisladas en pacientes con enfermedad respiratoria según el sexo. Por tanto, la mayor presencia de *Pseudomonas sp.* en hembras está relacionada a la severidad de los signos clínicos más frecuentes que en machos y al ser esta bacteria predominante en enfermedades respiratorias (Anexo 12).

Por último, es necesario considerar el potencial zoonótico de las bacterias aisladas a partir del hisopado nasal de los individuos. Algunas bacterias como *P. aeruginosa* puede transmitirse por contacto directo con mucosas y/o conjuntiva del reptil; pudiendo ocasionar en el hombre rinitis purulenta, ulcerativa, abscesos pulmonares, neumonía y efusión pleural (16). Además, *Pasteurella spp.* se puede transmitir por vía inhalatoria, por mordeduras o

rasguños de animales portadores, ocasionado síntomas de bronquitis y neumonía en el hombre (14). Por lo cual es necesario que los manejadores y veterinarios encargados del manejo de estos reptiles cuenten con medidas de bioseguridad para evitar contagio.

VI. CONCLUSIONES

- Se identificaron 10 especies: 46,15% (12/26) *Pseudomonas sp.*, 26,92% (7/26) *Klebsiella oxytoca*; 19,23% (5/26) *Proteus vulgaris*; 15,38 % (4/26); *Aeromonas sp.*, 15,38% (4/26); *Citrobacter koseri*, 11,53% (3/26) *Enterobacter aerogenes*, 11,53% (3/26) *Moraxella sp.*, 7,69% (2/26) *Citrobacter freundii*; 7,69% (2/26) *Pasteurella sp.* y 7,69% (2/26) *Serratia sp.*
- Se halló diferencia significativa según el sexo de los individuos, mostrando mayor frecuencia de *Pseudomonas sp.* en hembras y *C. koseri* y *E. aerogenes* en machos.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar cultivos microbiológicos ante la presentación de individuos con signos de enfermedad respiratoria.
- Se sugiere optimizar la higiene de comederos y pozas, para evitar la contaminación de alimentos y agua por bacterias oportunistas como *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella oxytoca*, etc., responsables de enfermedades respiratorias.
- Mejorar las condiciones ambientales del recinto tales como el ambiente, temperatura, humedad del recinto, para disminuir el estrés causado en estas especies en cautividad.
- Continuar con futuras investigaciones a partir de los resultados obtenidos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Red list. The IUCN red list of threatened species (2018). Apéndice II. [acceso 20 agosto 2018];[1pagina].Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1996.RLTS.T9008A12949796.en>
2. Muro J, Ramis A, Velarde R, Pastor J, Lavin S. Rinitis crónica en tortugas terrestres mediterráneas. Rev Avepa.1998;18(2):70–84.
3. Aznarte P. Federación iberoamericana de asociaciones veterinarias de animales de compañía. Enfermedad respiratoria en tortugas.2011.3:36-53.
4. Martínez A. Manual clínico de reptiles. Ediciones grass. 1994.
5. Serfor. Guía de reconocimiento. Herramienta para el control del tráfico ilegal de tortugas terrestres y de agua dulce del Perú. Pp 6-48.
6. Vinke Sabine, Vetter Holger, Vinke Thomas, Vetter Susanne.South American Tortoises. Paraguay: Edición Chimaira; 2008.
7. Páez V, Betancourt M, Lasso C, Mora O, Bock B. Biología y conservación de las tortugas continentales de Colombia. Colombia: Serie Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros continentales de Colombia. 2012.
8. Cites [homeopage]. Apéndices I, II y III. [acceso 22 agosto 2018]; [1 pagina]. Disponible en: <https://cites.org/esp/app/appendices.php>
9. Schumacher J. Reptile respiratory medicine. Rev vet clin exot anim.2003;(6) 213-231.
10. Mitchel M, Tully T. Current therapy in exotic pet practice. 1 ed. Usa. Edicion Elsevier; 2015. Pp 82-84.
11. Stanchi N, Martino E, Gentilini E, Reinoso H, Echeverria G, Leardini A, Copes A. Microbiología Veterinaria. 1 ° Ed. Argentina. Inter- Médica. 2007.
12. Jacobson E. Infectious diseases and pathology of reptiles. Usa. Taylor & Francis. 2007.

13. Quinn P, Markey B, Carter M, Donnelly W, Leonard F. Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. España. 1ª Ed. España. EdicionesAcribia.2005.
14. Tracchia A. Medicina en quelonios y otros reptiles. 1a ed. Buenos aires: Ediciones Azara; 2018.
15. Martínez- Silvestre A, Mateu de Antonio E, Ramis A, Majo N. Etiología y descripción clínica de la rinitis crónica en tortuga Mora (*Testudo graeca*). Rev Esp Herp España. 1999; 13:27-36.
16. Armbruster Ch, Mobley H. Especies de proteus. Antimicrobe. 2 da Ed. 2002.
17. Biberstein E, Chung Z. Tratado de Microbiología Veterinaria. 1a. ed. Zaragoza: Acribia S.A; 1990.
18. Pachón A. Aislamiento, identificación y serotipificación de Enterobacterias del género *Salmonella* en una población de testudinos mantenidos en cautiverio en la estación de biología tropical Roberto Franco de la facultad de ciencias. [tesis]. Bogotá: Pontificia Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias básicas; 2009.
19. Schumacher J. Select infectious diseases of wild reptiles and amphibians. Journal of exotic pet medicine. 2006; 15(1):18-24.
20. Glazebrook J, Campbell R. A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. II. Oceanarium-reared and wild turtles. Diseases of aquatic organisms. 1990; 9:(1) 97-104.
21. Santoro Mario, Orrego Carlo, Hernandez Giovanna. Flora bacteriana cloacal y nasal de *lepidochelys olivácea* (testudines: Cheloniidae) en el pacífico norte de costa rica. Costa rica. Rev Biol Trop. 2006. 54(1):43-48.
22. Sáenz Tomas, Santa cruz A. Microbiología básica coloraciones de bacterias y bioquímica en los medios de cultivos. Editorial: imprenta unión de la universidad Peruana Unión. Perú. 2004.
23. Koneman E, Whin W, Allen S, Janda W, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Diagnostico microbiológico. 6 Ed. Argentina. 2008. Pp 38.
24. Cooper J, Jackson O. Diseases of the Reptilia. 1 ed. London. Editorial Academic Press; 1981. Vol 1. pp 165-191.

25. Hoff G, Frederic F, Jacobson E. Diseases of Amphibians and Reptiles.1 ed. New York.1984. pp 59-60.
26. Bayon A, Brotons N, Albert A, Talavera J. Patología ocular en reptiles. Rev avepa.1999;19 (3): 227-238.
27. Gonzales O, Montes F, Mayorga A, Letelier M. Infección por *Citrobacter freundii*. Servicio Recién Nacidos y Prematuros I.H.S.S. 1982; 9(1):6-7
28. Garcia C, Quezada C, Martinez J, Gonzales A, Castro R. Sensibilidad a antibióticos en bacterias aerobias de la tortuga del bolsón *Gopherus flavomarginatus*. en cautiverios en Durango México. Rev Arid Cie.2016.1:13-17.
29. Salvador T. Estudo bacteriológico de répteis em cativoiro com pneumonia e/ou estomatite e suas correlações microbiológicas. [Tesis para optar el título de postgrado de Médico Veterinario]. Brasil. Universidad de castelo branco qualittas instituto de pós graduação clínica médica e cirúrgica de animais selvagens e exóticos.2008.
30. Aguirre A, Balazs G, Zimmerman B, Spraker T. Evaluation of Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) for potential pathogens associated with fibropapillomas. Jou Wild Disea.1994. 30(1):8-15.
31. Ojeda J. Determinación de la resistencia de enterobacterias aisladas en cloaca de lagartos caimán (*Dracaena guianensis*) mantenidas en cautiverio en un zocriadero de Lima. [Tesis para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista] Perú. Universidad Científica del Sur. 2017.
32. Carlos N, Núñez Y, Gonzales H, Capuñay C. Enterobacterias y su resistencia antimicrobiana en el caimán blanco de vida libre en el rio Madre de Dios, Tambota-Peru. Rev Latino de Rec Nat. 2016;12 (2):53-59.
33. Cavero N. Bacterias entéricas de potencial zoonótico en reptiles comercializados en la ciudad de Pucallpa. [Tesis para optar el título como Médico Veterinario]. Perú. Universidad Alas Peruanas. 2013.
34. Ruiz N, Calle S, Gálvez N. Identificación de *Salmonella sp*. En tortugas Motelo (*Geochelone denticulata*) de un criadero de la ciudad de Iquitos. [Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario]. Iquitos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2009.

ANEXOS

ANEXO 1



Figura 1: A) Ingreso al Zoológico Parque Zonal Huáscar B) Recinto de las tortugas

Fuente: Elaboración propia, 2018.

ANEXO 2

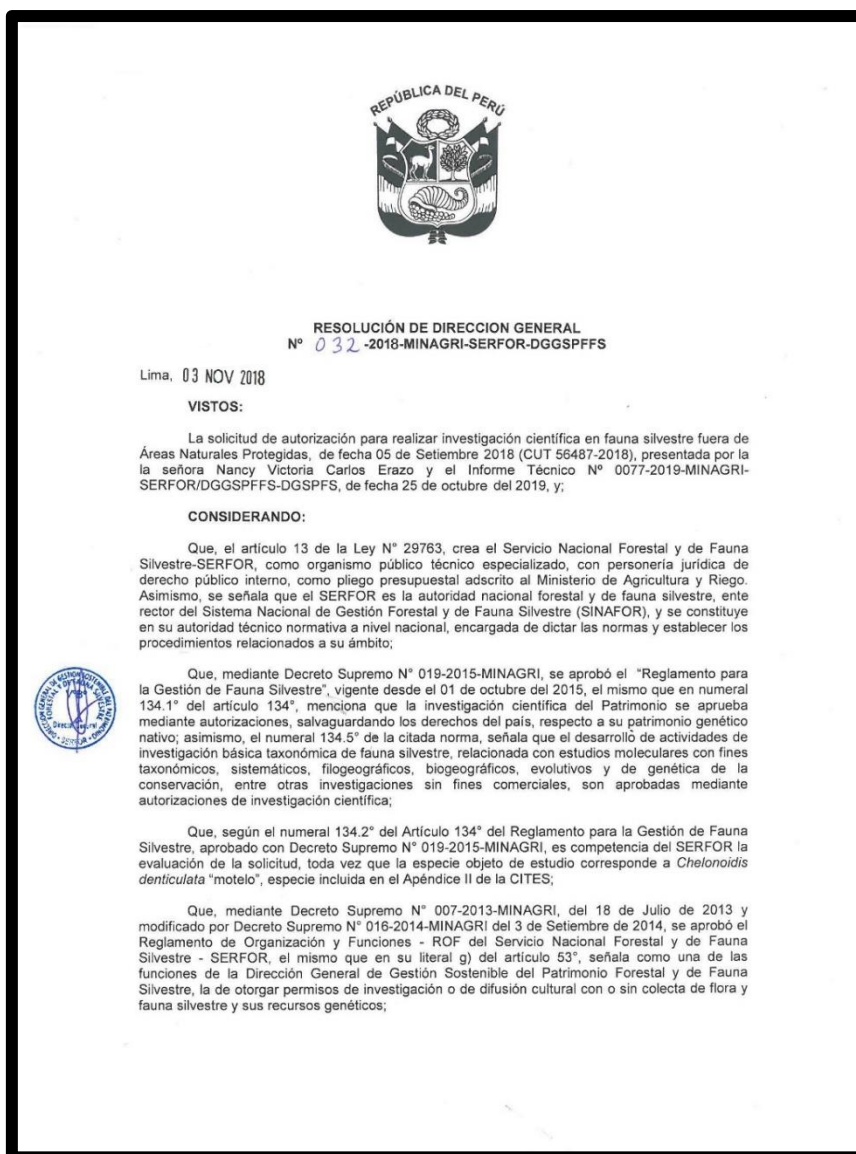


Figura 2: Resolución de Dirección General N° 032-SERFOR/DGGDPFFS

Fuente: Servicio Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR), 2018.

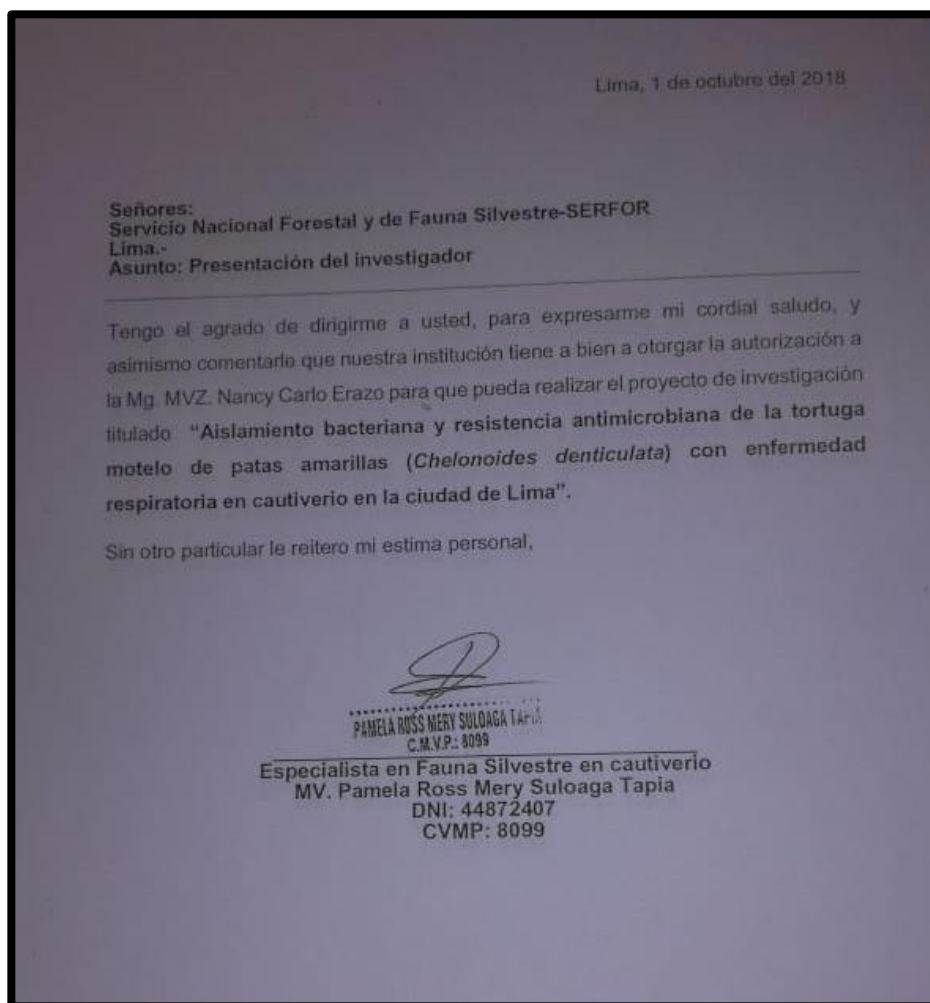
ANEXO 3

Figura 3: Autorización pertinente del parque Zonal Huáscar

Fuente: Parque Zonal Huáscar, 2018.

ANEXO 4

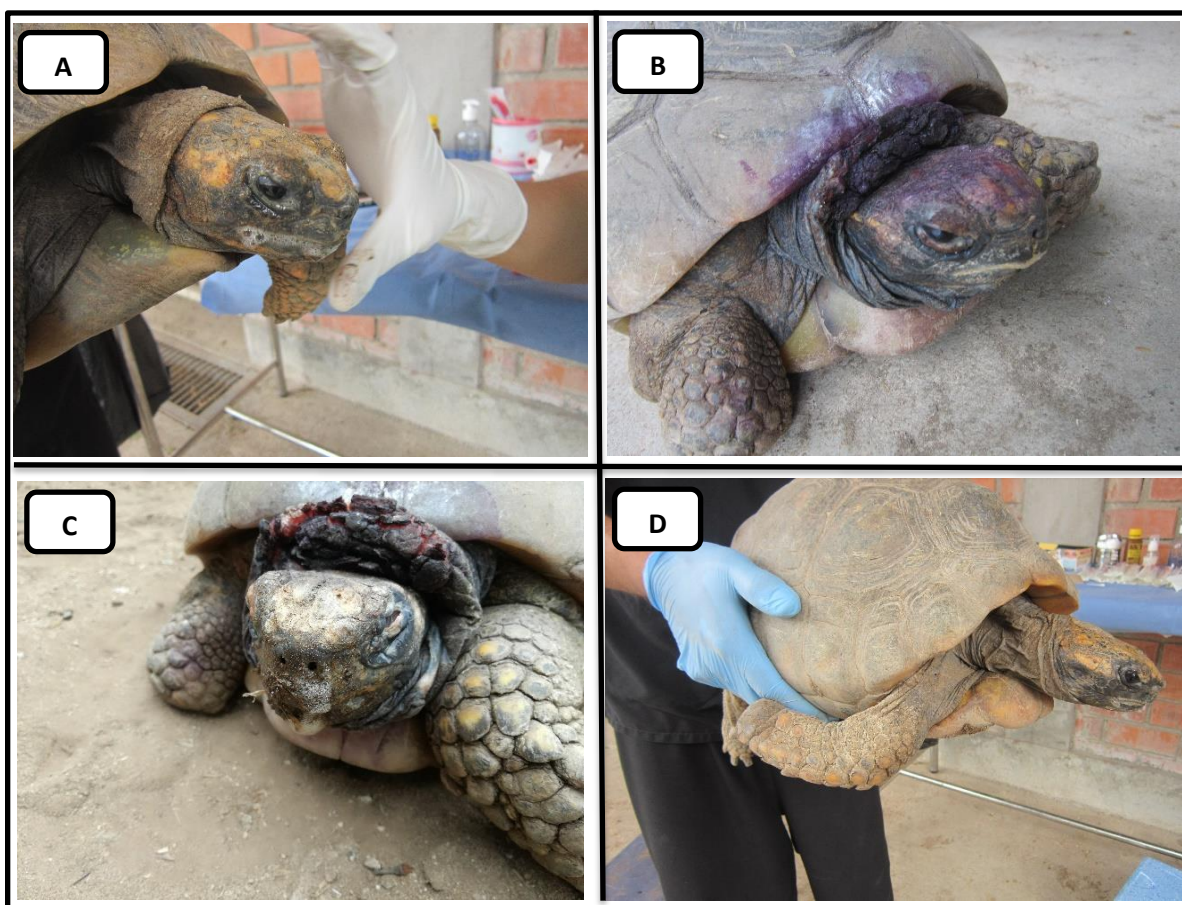


Figura 4: A) Secreción óculo-nasal B) Congestión nasal C) Hiperqueratosis D) Condición corporal

Fuente: Elaboración propia, 2018.

ANEXO 5



Figura 5: Codificación en el caparazón de la tortuga

Fuente: Elaboración propia, 2018.

ANEXO 6

HISTORIA CLÍNICA DE QUELONIOS	
FECHA: N° HISTORIA CLÍNICA: 5 CHIP O CÓDIGO: T-E	
NOMBRE CIENTÍFICO: <i>Chelonia demidoffi</i> NOMBRE COMÚN: Tortuga mora	SEXO: <input checked="" type="checkbox"/> M EDAD: SEÑAS:
ANAMNESIS	
PROCEDENCIA:	
DIETA SUMINISTRADA Y CONSUMO: <i>leche, zanahoro, tomate</i>	
SIGNOS Y DURACIÓN: <i>excreción en los intestinos, secreción ocular en los últimos 275</i>	
OBSERVACIONES:	
EXAMEN FÍSICO Y BIOMETRÍA	
PESO: <i>12,400kg</i> CONDICIÓN CORPORAL: <i>3</i> DESHIDRATACIÓN: <i>Si/severa</i> LONG TOTAL: <i>58cm</i>	LARGO CAPARAZÓN: <i>46cm</i> ANCHO CAPARAZÓN: <i>44cm</i>

	NORMAL	ANORMAL
PIEL	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
OJOS	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
NARINAS	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
BOCA	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CAPARAZÓN	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MIEMBROS	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
CLOACA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

OBSERVACIONES:
Presencia hiperematosos en piel (barrido) / Ausencia de miembros anteriores derechos

TOMA DE MUESTRA

HISOPADO NASAL SI NO

TRATAMIENTO

FÁRMACO	DOSIS	VIA	FRECUENCIA
-	-	-	-

Figura 6: Historia clínica de la tortuga T-5-E.

Fuente: Elaboración propia, 2018.

ANEXO 7

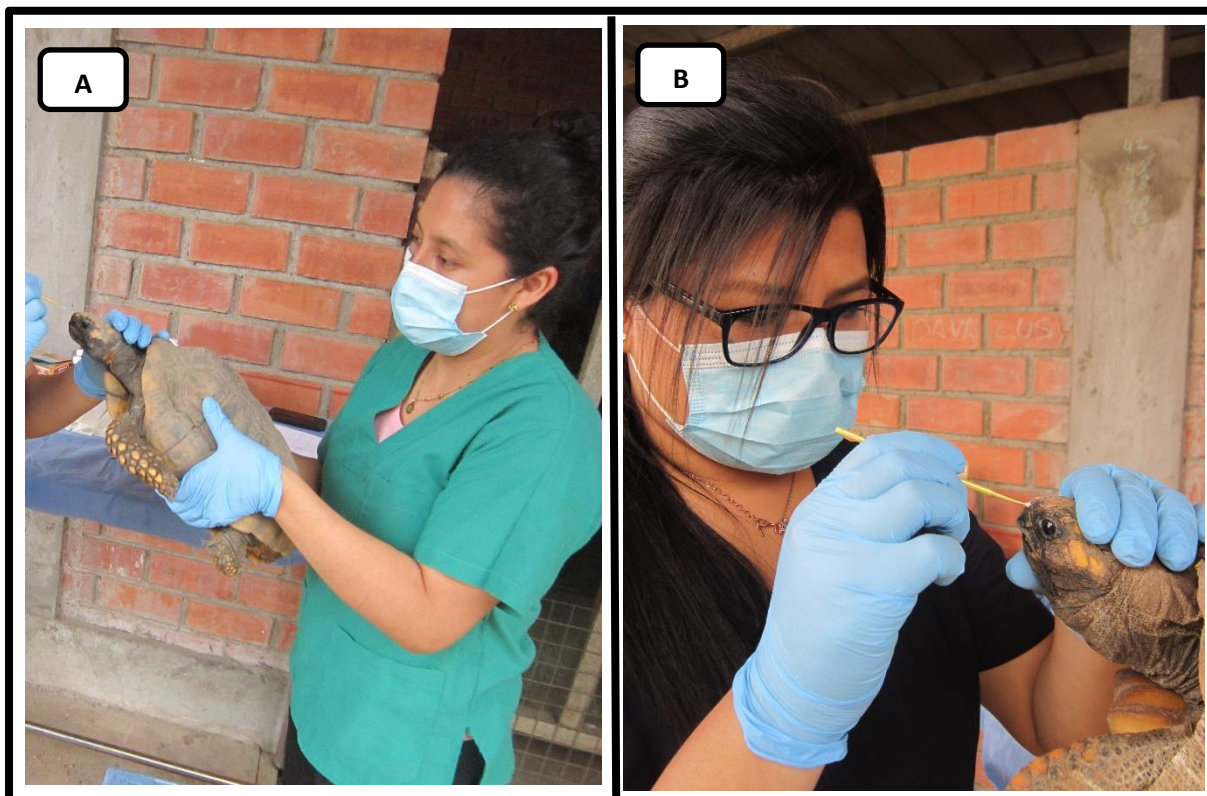


Figura 7: A) Sujeción adecuada del quelonio

B) Hisopado de la secreción nasal

Fuente: Elaboración propia, 2018.

ANEXO 8

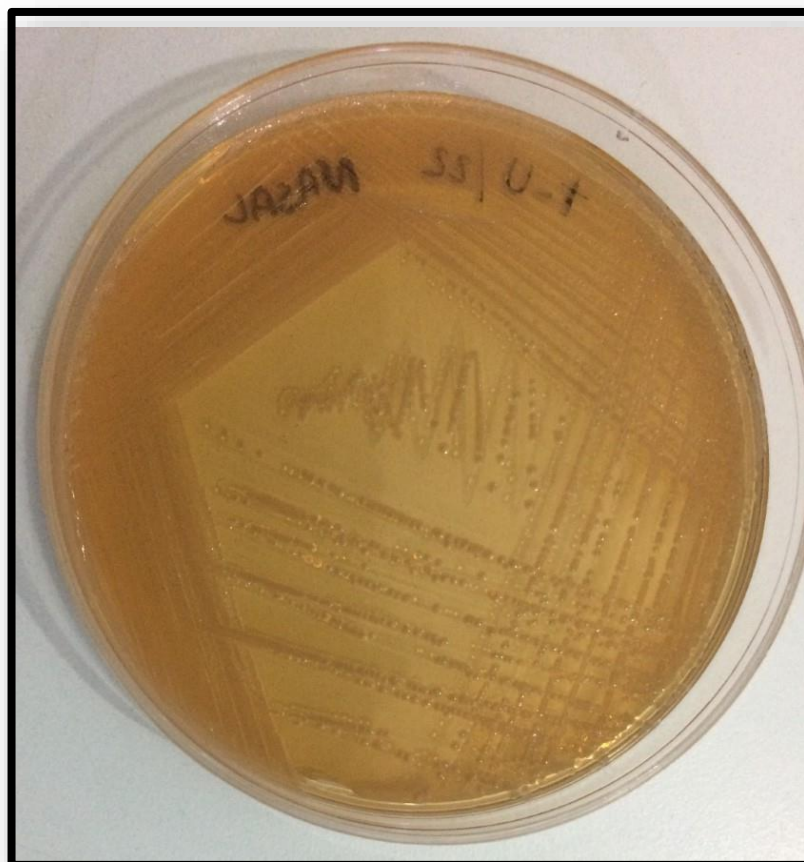


Figura 8: Aislamiento bacteriano en agar MackConkey en la muestra con código T-U-22.

Fuente: Elaboración propia, 2018.

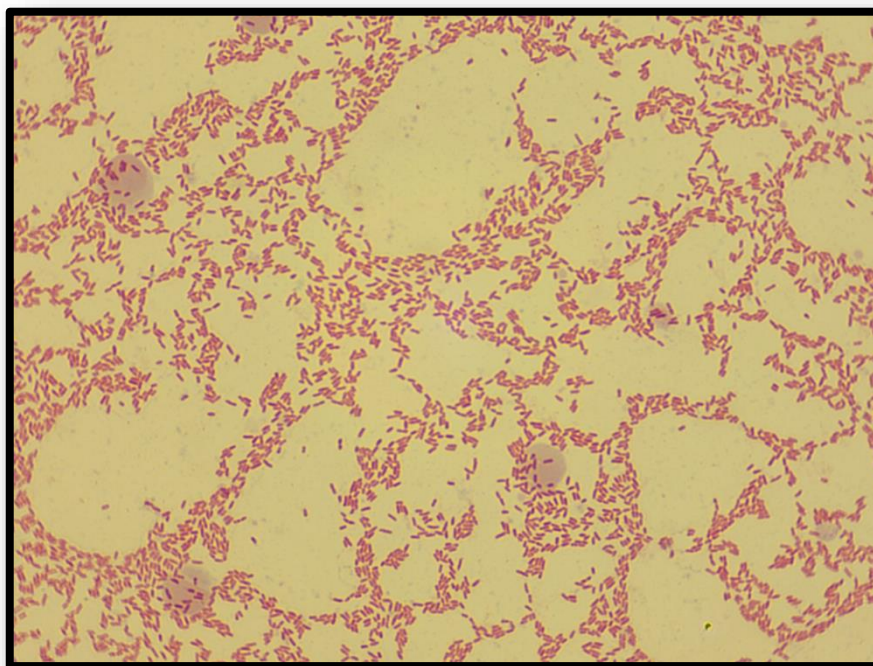
ANEXO 9

Figura 9: Colonias de bacilos Gram Negativos (BGN) en medio de tinción de Gram.

Fuente: Elaboración propia, 2018.

ANEXO 10

Figura 10: Pruebas bioquímicas realizadas de la bacteria número 2 aislada de la muestra T-9-J, con el fin de hallar el reconocimiento del género.

Fuente: Elaboración propia, 2018.

ANEXO 11

Cuadro 1. Base de datos con la codificación, sexo del individuo y resultados de la identificación bacteriana.

N°	Código	Sexo	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pasteurella sp</i>	<i>Aeromonas sp</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Serratia sp</i>	<i>Moraxella sp</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
1	T-1-A	Macho	1	1								
2	T-2-B	Macho			1							
3	T-3-C	Macho	1									
4	T-4-D	Macho				1						1
5	T-5-E	Hembra				1	1					
6	T-6-F	Hembra						1				
7	T-7-G	Hembra		1								
8	T-8-H	Hembra				1		1				
9	T-9-I	Hembra							1	1		
10	T-10-J	Macho								1	1	
11	T-11-K	Macho			1						1	
12	T-12-L	Macho			1					1	1	
13	T-13-M	Hembra							1			
14	T-14-N	Macho							1		1	
15	T-15-Ñ	Macho	1									
16	T-16-O	Hembra				1			1			
17	T-17-P	Macho				1	1					
18	T-18-Q	Hembra				1				1		
19	T-19-R	Hembra				1						
20	T-20-S	Hembra				1		1				
21	T-21-T	Hembra								1		1
22	T-22-U	Hembra							1			1
23	T-23-V	Hembra				1			1			
24	T-24-W	Hembra			1	1			1			
25	T-25-X	Hembra				1						
26	T-26-Y	Hembra				1						
n°			3	2	4	12	2	3	7	5	4	3
%			11.53	7.69	15.38	46.15	7.69	11.53	26.92	19.23	15.38	11.53

Fuente. Elaboración propia, 2018.

ANEXO 12

Cuadro 2. Base de datos con la codificación, sexo del individuo y resultados de la identificación bacteriana.

N°	Código	Sexo	Signos de enfermedad respiratoria	Bacterias
1	T-1-A	Macho	Inflamación y secreción óculo-nasal.	<i>Enterobacter aerogenes, Pasteurella sp.</i>
2	T-2-B	Macho	Secreción nasal.	<i>Aeromonas sp.</i>
3	T-3-C	Macho	Inflamación ocular.	<i>Enterobacter aerogenes</i>
4	T-4-D	Macho	Inflamación y secreción óculo-nasal.	<i>Pseudomonas sp., Citrobacter freundii</i>
5	T-5-E	Hembra	Inflamación óculo-nasal.	<i>Serratia sp.</i>
6	T-6-F	Hembra	Inflamación y secreción óculo-nasal.	<i>Moraxella sp.</i>
7	T-7-G	Hembra	Inflamación y secreción óculo-nasal, estertores, hiperqueratosis.	<i>Pasteurella sp.</i>
8	T-8-H	Hembra	Inflamación y secreción óculo-nasal, sibilancias, estomatitis.	<i>Pseudomonas sp., Moraxella sp.</i>
9	T-9-I	Hembra	Inflamación y secreción óculo-nasal, sibilancias, estomatitis.	<i>Klebsiella oxytoca, Proteus vulgaris</i>
10	T-10-J	Macho	Inflamación y secreción óculo-nasal.	<i>Proteus vulgaris, Citrobacter koseri</i>
11	T-11-K	Macho	Inflamación y secreción óculo-nasal.	<i>Aeromonas sp., Citrobacter koseri</i>
12	T-12-L	Macho	Inflamación y secreción óculo-nasal sibilancia, hiperqueratosis.	<i>Aeromonas sp, Proteus vulgaris, Citrobacter koseri</i>
13	T-13-M	Hembra	Inflamación y secreción óculo-nasal, estertores.	<i>Klebsiella oxytoca</i>
14	T-14-N	Macho	Inflamación y secreción óculo-nasal.	<i>Klebsiella oxytoca, Citrobacter koseri</i>
15	T-15-Ñ	Macho	inflamación óculo-nasal.	<i>Enterobacter aerogenes</i>
16	T-16-O	Hembra	Inflamación y secreción óculo-nasal, sibilancias.	<i>Pseudomonas sp., klebsiella oxytoca</i>
	T-17-P	Macho	Inflamación y secreción óculo-nasal	<i>Pseudomonas sp., Serratia sp.</i>
18	T-18-Q	Hembra	Inflamación y secreción óculo-nasal, estertores.	<i>Pseudomonas sp, Proteus vulgaris</i>
19	T-19-R	Hembra	Inflamación y secreción óculo-nasal, sibilancias.	<i>Pseudomonas sp.</i>
20	T-20-S	Hembra	Inflamación y secreción óculo-nasal.	<i>Pseudomonas sp., Moraxella sp.</i>
21	T-21-T	Hembra	Inflamación y secreción óculo-nasal, sibilancias.	<i>Proteus vulgaris, Citrobacter freundii</i>
22	T-22-U	Hembra	Inflamación y secreción óculo-nasal, estertores.	<i>Klebsiella oxytoca, Citrobacter freundii</i>
23	T-23-V	Hembra	Inflamación y secreción óculo-nasal, sibilancias.	<i>Pseudomonas sp., Klebsiella oxytoca</i>
24	T-24-W	Hembra	Inflamación y secreción óculo-nasal, sibilancias.	<i>Aeromonas sp., Pseudomonas sp., klebsiella oxytoca</i>
25	T-25-X	Hembra	secreción e inflamación nasal, estertores	<i>Pseudomonas sp.</i>
26	T-26-Y	Hembra	secreción e inflamación nasal, sibilancias	<i>Pseudomonas sp.</i>

