

Estado Sanitario de
Trachemys scripta elegans y
Testudo hermanni hermanni
en la Comunidad Valenciana



Universidad
Cardenal
Herrera
CEU

UNIVERSIDAD CEU CARDENAL HERRERA

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO PRODUCCION Y SANIDAD ANIMAL,
SALUD PÚBLICA VETERINARIA Y CIENCIA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



ESTADO SANITARIO DE *Trachemys scripta elegans* Y
Testudo hermanni hermanni EN LA COMUNIDAD
VALENCIANA

TESIS DOCTORAL
Jesús Cardells Peris
Valencia, 2012

Memoria presentada por D. Jesús Cardells Peris para
optar al grado de Doctor en Veterinaria por la
Universidad CEU Cardenal Herrera.

A Mamen,
por "TODD"

*“Nuestro conocimiento es una
pequeña isla en el enorme
océano del desconocimiento”*

Isaac Bashevis Singer
Premio Nobel de Literatura 1978

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar desearía agradecer a la Universidad CEU Cardenal Herrera y al departamento de Producción, Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria y a la *Conselleria de Medi Ambient, Aigua i Habitatge* por la oportunidad de ofrecerme realizar este trabajo e introducirme en un mundo casi sin explorar que es la Sanidad Animal en reptiles. Y en especial a Jose Manuel Gil, veterinario del centro de recuperación de fauna silvestre “La Granja” en el Saler (Valencia).

A mi amigo y profesor Dr. D. Ignacio Ferre Pérez, por haberme descubierto el mundo de la investigación, por su disponibilidad permanente en cualquier parte del mundo, sentido del humor y sinceridad.

Mi agradecimiento especial a los dos directores de tesis:

Al Dr. D. Santiago Vega García, por la confianza depositada en mí al escogermelo como doctorando y por ser siempre un gran ejemplo, no solo como profesional sino como persona.

A la Dra. D^a. Clara Marín Orenca, por sus conocimientos y dirección, fundamentales para la concreción de este trabajo.

Gracias a los dos por el apoyo y dedicación prestada y sobre todo por su disponibilidad permanente.

También me gustaría mostrar mi agradecimiento a todos los compañeros del departamento Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria, y Ciencia y Tecnología de los Alimentos por su preocupación, interés y apoyo, en especial a Marilena Garijo, Joaquín Ortega, Ángel García, Juan Manuel Corpa y M^a Carmen Martínez.

En lo personal, mi agradecimiento muy especial a mi mujer, Mamen, por haber creído siempre en mí y en mis posibilidades, desde que nos conocemos. A mis hijos, María y Javier, quiero agradecerles no solo su cariño y ánimo que me muestran sino también por todo el tiempo que les he robado para poder realizar mi sueño, ser doctor en veterinaria.

A mis Padres, Amparo y Jesús, a mis suegros, Carmen y Manolo, y a mi hermano, José Ramón, no sólo quiero agradecerles el apoyo logístico, con nuestros hijos y demás..., sino también el apoyo y ánimo mostrados día a día.

ÍNDICE	página
1.-Introducción	1
1.1.- Reptiles	3
1.1.1.- Evolución	3
1.1.2.- Características generales	3
1.1.3.- Distribución geográfica	4
1.1.4.- Clasificación taxonómica	4
1.1.5.- Características anatómicas	5
1.1.6.- Características fisiológicas y de comportamiento	8
1.1.7.- Características de <i>Trachemys scripta elegans</i> y <i>Testudo hermanni hermanni</i>	11
1.1.7.1.- <i>Trachemys scripta elegans</i> (Wied-Neuwied, 1839)	11
1.1.7.1.1.- Clasificación taxonómica	12
1.1.7.1.2.- Características fisiológicas y de comportamiento	13
1.1.7.1.3.- Hábitat	14
1.1.7.1.4.- Distribución geográfica	15
1.1.7.1.5.- Situación legal de <i>Trachemys scripta elegans</i> como especie invasora	18
1.1.7.2.- <i>Testudo hermanni hermanni</i> (Gmelin, 1789)	20
1.1.7.2.1.- Clasificación taxonómica	20
1.1.7.2.2.- Características fisiológicas y de comportamiento	21
1.1.7.2.3.- Hábitat	22
1.1.7.2.4.- Distribución geográfica	23
1.1.7.2.5.- Situación legal de <i>Testudo hermanni hermanni</i> como especie protegida	24
1.2.- Importancia del estado sanitario en la competencia entre especies autóctonas e invasoras	25
1.3.- Agentes patógenos en quelonios	26
1.3.1.- Bacterias	27
1.3.2.- Virus- <i>Herpervirus</i>	40
1.3.3.- Parásitos	41
1.3.3.1.- Protozoos	41
1.3.3.2.- Helmintos	42
1.3.3.3.- Hirudineos	47
1.4.- Implicación del estatus sanitario de quelonios en Salud Pública	47
2.- Objetivos	49
3.- Material y métodos	53
3.1.- <i>Trachemys scripta elegans</i>	55
3.1.1.- Zona de estudio	55
3.1.2.- Selección de la muestra	55
3.1.3.- Selección de los núcleos	57
3.1.4.- Toma de muestras	64

3.1.5.- Análisis laboratorial	68
3.1.5.1.- Aislamiento bacteriano general	68
3.1.5.2.- Aislamiento específico de <i>Salmonella</i>	68
3.1.5.3.- Aislamiento vírico	70
3.1.5.4.- Aislamiento parasitológico	70
3.2.- Análisis microbiológico de las aguas de los marjales	73
3.3.- <i>Testudo hermanni hermanni</i>	74
3.3.1.- Zona de estudio	74
3.3.2.- Selección de la muestra	74
3.3.3.- Selección de los núcleos	75
3.3.4.- Toma de muestras	79
3.3.5.- Análisis laboratorial	81
3.3.5.1.- Aislamiento específico de <i>Salmonella</i>	81
3.3.5.2.- Extracción del ADN vírico	81
3.3.5.3.- Aislamiento parasitológico	82
3.4.- Análisis estadístico	83
4.- Resultados	85
4.1.- <i>Trachemys scripta elegans</i>	87
4.1.1.- Estudio macroscópico de los órganos	87
4.1.2.- Estudio bacteriológico	88
4.1.2.1.- Estudio bacteriología por órganos vs poblaciones	88
4.1.2.1.1.- Pulmón	88
4.1.2.1.2.- Hígado	91
4.1.2.1.3.- Bazo	93
4.1.2.1.4.- Riñón	95
4.1.2.1.5.- Intestino	97
4.1.2.2.- Estudio bacteriología por poblaciones	100
4.1.2.2.1.- <i>Salmonella</i>	102
4.1.2.2.2.- Otras especies bacterianas	103
4.1.3.- Estudio de portadores de <i>Herpesvirus</i> (ChHV) en <i>Trachemys scripta elegans</i>	108
4.1.4.- Estudio parasitológico en <i>Trachemys scripta elegans</i>	109
4.1.5.- Estudio microbiológico del agua de las marjales	110
4.2.- <i>Testudo hermanni hermanni</i>	112
4.2.1.- Determinación de <i>Salmonella</i> en <i>Testudo hermanni hermanni</i>	112
4.2.2.- Estudio de portadores de <i>Herpesvirus</i> (ChHV) en <i>Testudo hermanni hermanni</i>	115
4.2.3.- Estudio parasitológico en <i>Testudo hermanni hermanni</i>	115
4.3.- Diferencias en la identificación microbiológica entre la especie invasora de las costas mediterráneas <i>Trachemys scripta elegans</i> y la especie autóctona <i>Testudo hermanni hermanni</i>	116
5.- Discusión	117
5.1.- <i>Trachemys scripta elegans</i>	119
5.1.1.- Estudio macroscópico de los órganos	119
5.1.2.- Estudio bacteriología	119
5.1.2.1.- Estudio bacteriología por órganos vs poblaciones	119
5.1.2.2.- Estudio bacteriología por poblaciones	120

5.1.2.2.1.- <i>Salmonella</i>	120
5.1.3.2.2.- Otras especies bacterianas	123
5.1.3.- Estudio vírico en <i>Trachemys scripta elegans</i>	130
5.1.4.- Estudio parasitológico en <i>Trachemys scripta elegans</i>	131
5.1.5.- Estudio microbiológico del agua de las marjales	132
5.2.- <i>Testudo hermanni hermanni</i>	133
5.2.1.- <i>Salmonella</i> en <i>Testudo hermanni hermanni</i>	133
5.2.2.- Estudio de portadores de <i>Herpervirus</i> (ChHV) en <i>Testudo hermanni hermanni</i>	137
5.2.3.- Estudio parasitológico en <i>Testudo hermanni hermanni</i>	138
5.3.- Diferencias en la identificación de agentes patógenos entre la especie invasora de las costas mediterráneas <i>Trachemys scripta elegans</i> y la especie autóctona <i>Testudo hermanni hermanni</i>	139
6.- Conclusiones	141
7.- Resumen/Summary	145
8.- Bibliografía	155
9.- Comunicaciones a congresos	175

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.- <i>Trachemys scripta elegans</i> .	12
Figura 2.- Ejemplares de <i>Trachemys scripta elegans</i> al sol.	13
Figura 3.- Situación de los marjales en la Comunidad Valenciana.	17
Figura 4.- <i>Testudo hermanni hermanni</i> .	20
Figura 5.- Ciclo biológico del género <i>Telorchis</i> (Lühe, 1899).	43
Figura 6.- Ciclo biológico de las especies de <i>Serpinema</i> (Yeh, 1960).	44
Figura 7.- Ciclo biológico de las especies de <i>Physolaptera</i> (Rudolphi, 1819).	44
Figura 8.- Ciclo biológico de las especies de <i>Falcaustra</i> (Lane, 1915).	45
Figura 9.- Ciclo biológico de las especies de <i>Aplectana</i> (Railliet y Henry, 1916).	45
Figura 10.- Nasas de captura.	56
Figura 11.- Trampas flotantes para galápagos.	57
Figura 12.- Situación de los núcleos de captura de <i>Trachemys scripta elegans</i> , en el mapa de la Comunidad Valenciana.	57
Figura 13.- Situación del marjal de Peñíscola (Castellón) en el mapa.	58
Figura 14.- Vistas del marjal de Peñíscola (Castellón).	59
Figura 15.- Situación del marjal de Almenara (Castellón) en el mapa.	60
Figura 16.- Vistas del marjal de Almenara (Castellón).	61
Figura 17.- Situación del marjal La Safor-Gandía (Valencia) en el mapa.	62
Figura 18.- Vistas del marjal La Safor-Gandía (Valencia).	63
Figura 19.- Referencia para las mediciones caparazón.	64
Figura 20.- Cuestionario a cumplimentar de cada ejemplar de <i>Trachemys scripta elegans</i> , antes y durante la necropsia.	65
Figura 21.- Situación de los núcleos de captura de <i>Testudo hermanni hermanni</i> , en el mapa de la Comunidad Valenciana.	74

Figura 22.- Situación del Parque Natural del Desierto de las Palmas (Castellón).	75
Figura 23.- Vistas del paraje del Desierto de las Palmas (Castellón).	76
Figura 24.- Situación del Parque Natural de Sierra de Irtá. (Castellón).	77
Figura 25.- Vistas de la Sierra de Irtá (Castellón).	78
Figura 26.- Código numérico utilizado en el marcaje de los quelonios.	79
Figura 27.- Tabla de recogida de datos de <i>Testudo hermanni hermanni</i> .	79
Figura 28.- Relación de ejemplares de <i>Trachemys scripta elegans</i> , según procedencia y sexo.	87
Figura 29.- Imagen de células con cuerpo de inclusión intranuclear tipo Cowdry A. Tinción verdemetilo pironina G 1000X.	108
Figura 30.- <i>Telorchis attenuata</i> , Golberg, 1911 (Digenea, Telorchidae)	109
Figura 31.- Huevos de <i>Telorchis attenuata</i> , Golberg, 1911 (Digenea, Telorchidae)	109
Figura 32.- Relación de ejemplares de <i>Testudo hermanni hermanni</i> muestreados, según procedencia y sexo.	112
Figura 33.- Huevos de oxiuridos (Familia Pharyngodomidae) en heces de <i>Testudo hermanni hermanni</i> .	115

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1.- Resumen de la toma de muestra y análisis en <i>Trachemys scripta elegans</i> .	67
Tabla 2.- Análisis coprológicos.	72
Tabla 3.- Resumen de la toma de muestras en <i>Testudo hermanni hermanni</i> .	80
Tabla 4.- Distribución microbiológica por poblaciones en pulmón de <i>Trachemys scripta elegans</i> .	89
Tabla 5.- Tabla resumen de la infección de <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo en pulmón de los animales del estudio.	90
Tabla 6.- Tabla resumen de la infección de <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo en pulmón, en los diferentes núcleos de <i>Trachemys scripta elegans</i> en libertad.	90
Tabla 7.- Tabla resumen de la infección de <i>Proteus</i> spp. en los animales del estudio.	90
Tabla 8.- Distribución microbiológica por poblaciones en hígado de <i>Trachemys scripta elegans</i> .	91
Tabla 9.- Distribución microbiológica por poblaciones en bazo de <i>Trachemys scripta elegans</i> .	93
Tabla 10.- Tabla resumen de la infección de <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo en los animales del estudio.	94
Tabla 11.- Distribución microbiológica por poblaciones en riñón de <i>Trachemys scripta elegans</i> .	95
Tabla 12.- Distribución microbiológica por poblaciones en intestino de <i>Trachemys scripta elegans</i> .	97

Tabla 13.-	Distribución de agentes infectantes por poblaciones de <i>Trachemys scripta elegans</i> .	101
Tabla 14.-	Resumen del resultado de los antibiogramas realizado a cepas de <i>Salmonella</i> procedentes de muestras de <i>Trachemys scripta elegans</i> .	102
Tabla 15.-	Tabla resumen de la infección de <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo en los animales del estudio.	104
Tabla 16.-	Tabla resumen de la infección de <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo en los diferentes núcleos de <i>Trachemys scripta elegans</i> en libertad.	104
Tabla 17.-	Número de especies bacterianas identificadas según núcleo estudiado en <i>Trachemys scripta elegans</i> .	107
Tabla 18.-	Porcentaje de infección de <i>Herpesvirus</i> (ChHV) en función del núcleo poblacional.	108
Tabla 19.-	Resultado del análisis microbiológico de las aguas de los marjales.	110
Tabla 20.-	Resumen del resultado de los antibiogramas realizado a cepas de <i>Salmonella</i> procedentes de muestras de <i>Testudo hermanni hermanni</i> .	114
Tabla 21.-	Resumen del resultado de los antibiogramas realizados a cepas de <i>Salmonella</i> procedentes de muestras de <i>Testudo hermanni hermanni</i> , según el serotipo.	114
Tabla 22.-	Huevos de oxiuridos por gramo de heces.	116

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

≤	Menor o igual que
≥	Mayor o igual que
®	Marca registrada
μg	Microgramos
μL	Microlitros
A	Animales de cautividad
ADN	Ácido desoxiribonucleico
B1	Referencia del marjal de Peñíscola
B2	Referencia del marjal de Almenara
B3	Referencia del marjal de La Safor-Gandía
BP+FC	Medio Baird-Parker RPF gelosa+Caldo Fraser completo
cc.	Centímetro cúbico
CECAV	Centro Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana
CEE	Comunidad Económica Europea
CDC	Centro de Control de Enfermedades (siglas en ingles CDC)
cm	Centímetro
CPS	Almidón-peptona-caseína
ChHV	Chelonia <i>Herpesvirus</i> ,
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i>
E	Este
ECAD	<i>E. coli</i> adherente-difusa
ECEA	<i>E. coli</i> enteroagregativa
ECEH	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
ECEI	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
ECEP	<i>E. coli</i> enteropatógena
ECET	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE.UU.	Estados Unidos
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ES	Error estándar
<i>et al.</i>	Et alii - y otros
etc.	Etcétera
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Gramo
GALT	Tejido linfoide asociado a mucosas (siglas en ingles GALT)
ha.	Hectáreas
hpg	Huevos por gramo de heces
IgD,	Inmunoglobulina tipo D
IgM	Inmunoglobulina tipo M
IgY	Inmunoglobulina tipo Y
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
Km.	Kilometro
LPS	Lipopolisacario
m	Metro
m ²	Metro cuadrado
mg	Miligramo

MKTTn	Caldo de Muller-Kauffmann
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MSRV	Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (siglas en ingles MSRV)
N	Norte
NE	Noreste
NMKL71	<i>Nordic Committee on Food Analysis</i>
NNIS	<i>National Nosocomial Infections Surveillance System</i>
°C	Grados centígrados
OMS	Organización Mundial de la Salud
p.ej.	Por ejemplo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en ingles, PCR)
PHA	Phytohemaglutinin
PVC	Policloruro de Vinilo
RVS	Caldo de Rappaport-Vassiliadis con soja
S	Svedverg
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
sp.	Especie
spp.	Especies
subsp	Subespecie
TCBS	Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa
TMP-SMZ	Trimetoprima-sulfametoxazol
TTC	Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UCH-CEU	Universidad CEU Cardenal Herrera
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
USA.	<i>Union States of America</i>
WHO	World Healt Organitation
xg	Veces la gravedad
XLD	Agar Xilosa desocicolato
XLT4	Agar Xilosa-lisina-tergitol-4

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Reptiles

1.1.1.- Evolución

Hace más de 300 millones de años, a principios del Carbonífero superior, se originó una nueva clase de vertebrados, los reptiles, probablemente descendientes de un grupo de anfibios, Labyrinthodontia (Anthracosauria).

Los avances evolutivos más importantes de estos animales fueron el huevo amniótico, la respiración pulmonar y el reforzamiento del esqueleto y el tegumento. Estas nuevas adquisiciones permitieron que se independizaran de la vida acuática y así poder conquistar nuevos hábitats disponibles en tierra. La cúspide de su evolución la alcanzaron durante el periodo Mesozoico, que duró unos 160 millones de años y que se conoce como “la edad de los reptiles”, por la enorme variedad de formas que lo poblaron. Al final de este periodo desaparecieron la mayoría de los principales grupos de reptiles, de los casi veinte órdenes que se sabe que existieron durante la época Mesozoica, sólo cuatro sobrevivieron a los cambios geológicos y climáticos del periodo que abarca el final de la era Mesozoica y el comienzo de la Cenozoica. En estos cuatro órdenes se engloban todos los reptiles que en la actualidad pueblan la tierra (Zug, 1993; Ackerman, 1997).

1.1.2.- Características generales

La clase Reptilia (latin: *reperere*, arrastrarse) es la primera de entre los vertebrados auténticamente terrestres. Los reptiles se distinguen rápidamente de los anfibios por varias adaptaciones que les permiten sobrevivir en regiones áridas y en el mar, hábitats prohibidos para los anfibios, debido a sus requisitos reproductores. Los reptiles tienen la piel seca y escamosa, casi desprovista de glándulas, que es resistente a la deshidratación. Pero una diferencia más importante fue el huevo amniótico, con cáscara, que contiene alimento y membranas protectoras que permiten el desarrollo embrionario en tierra seca (Hickman *et al.*, 2006).

1.1.3.- Distribución geográfica

Los reptiles pueblan la casi totalidad de los ecosistemas terrestres y acuáticos. Sin embargo, la mayoría de las especies se encuentran en las regiones tropicales y subtropicales, que son las más adecuadas desde el punto de vista climatológico (Zug, 1993; Ackerman, 1997). La radiación adaptativa de los reptiles se corresponde con la aparición de nuevos hábitats, los cuales fueron proporcionados por cambios climáticos y geológicos que estaban ocurriendo en el Triásico, tales como variaciones de clima de zonas frías a calientes, formación de montañas, transformaciones de terreno (Hickman *et al.*, 2006).

1.1.4.- Clasificación taxonómica

La clasificación morfológica de la clase Reptilia está basada en la presencia o no de ábsides en la región temporal del cráneo.

4

La clase Reptilia presenta un total de cuatro subclases, Synapsida, Euyapsida, Diapsida y Anapsida. Los reptiles actuales pertenecen a las dos últimas, ya que los reptiles de las dos primeras subclases mencionadas se extinguieron.

La **subclase Diapsida** se caracteriza por que, en su origen, los pertenecientes a este grupo presentaban dos ábsides en cada región temporal, cada uno de los cuales quedaba limitado por un arco en su parte inferior. Con el paso del tiempo, la evolución ha modificado estas estructuras óseas. Los reptiles diapsidos están divididos en dos líneas principales.

Línea Lepidosauria, que etimológicamente significa “reptiles con escamas”, que engloba a los órdenes Rynchocephalia y Squamata. El orden Rynchocephalia con una única familia y dos especies. El orden Squamata con 7726 especies distribuidas en cuarenta y una familia, agrupadas en los subórdenes Ophidia, Sauria y Apoda.

Línea Archosauria, que etimológicamente significa “reptiles dominantes”, donde se incluyen grupos de reptiles extinguidos como los dinosaurios y otros vivientes como el orden Crocodylia, con una única familia y veintitrés especies.

La **subclase Anapsida** está caracterizada por que los reptiles aquí incluidos no presentan ábsides en la zona temporal, el único orden viviente es el Chelonia con 300 especies agrupadas en once familias (Frank y Ramus, 1995; Ernst y Barbour, 1997).

1.1.5.- Características anatómicas

Los reptiles tienen una piel dura, seca y escamosa que les ofrece protección contra la desecación y daños físicos. La piel consta de una delgada epidermis, que se muda periódicamente, y una dermis bien desarrollada y mucho más gruesa. La dermis está provista de cromatóforos, las células presentan pigmentos que proporcionan coloraciones llamativas. Las escamas características de los reptiles están formadas principalmente por queratina, en algunos reptiles, tales como los caimanes, las escamas permanecen a lo largo de toda la vida creciendo para reemplazar el desgaste. En otros, tales como las serpientes y los lagartos, crecen nuevas escamas bajo las antiguas que son entonces mudadas a intervalos. En los quelonios, crocodílidos y algunos saurios las escamas pueden contener placas óseas de origen dérmico (osteodermos) que proporcionan mayor protección. Las dos partes del caparazón de los quelonios (espaldar en posición dorsal y plastrón en ventral) constan de dos capas: la externa, compuesta por placas córneas y la interna, compuesta por placas óseas resultado de la fusión de vértebras y costillas. Las glándulas cutáneas son pocas y localizadas (Hickman *et al.*, 2006).

El esqueleto de los reptiles está compuesto por un número muy variable de huesos, que se forman a partir de dos tipos de tejidos, el conjuntivo y el cartilaginoso. Los huesos del cráneo y de la cintura escapular proceden de la osificación del tejido conjuntivo, que se produce durante el desarrollo embrionario. El resto de huesos es fruto de la osificación del tejido cartilaginoso. La mayoría de los reptiles vivos poseen cuatro extremidades y tienen la columna vertebral dividida en la región cervical, dorso-lumbar,

sacra y caudal. Las principales excepciones son los ofidios, que carecen de extremidades al igual que de cintura escapular y esternón (Hickman *et al.*, 2006).

El sistema nervioso reptiliano es considerablemente más evolucionado que el de los anfibios. Aunque el encéfalo de los reptiles es pequeño, el cerebro ha aumentado de tamaño en relación con el resto del encéfalo. Los hemisferios cerebrales son bastante grandes y existe una clara división entre la materia gris, situada cerca de la superficie, y la materia blanca, más hacia el interior. Los lóbulos ópticos y olfatorios están bien desarrollados. Al igual que aves y mamíferos poseen doce pares de nervios craneales (Hickman *et al.*, 2006).

Los órganos de los sentidos, en general, están bien desarrollados en los reptiles. Los ojos, salvo en las culebrillas ciegas y las serpientes de vida subterránea, suelen ser grandes y están provistos de una pupila acorde a sus hábitos. En los quelonios, cocodrilos y la mayoría de los saurios, el ojo está protegido por dos párpados móviles, superior e inferior, y una membrana nictitante. Todos los reptiles carecen de oído externo. Las serpientes carecen de oído medio al igual que algunos saurios, los huesos auriculares se encuentran fijos a la mandíbula. Estos animales son muy sensibles a las vibraciones transmitidas desde el suelo a través de los huesos del cráneo (Hickman *et al.*, 2006).

El olfato está sumamente desarrollado, prueba de ello es el gran tamaño de los lóbulos olfatorios del cerebro. En los órdenes Chelonia, Squamata y Rynchocephala, existe otro órgano olfatorio, el órgano de Jacobson o vomeronasal, formado por dos tubos cilíndricos provistos de células sensoriales olfatorias, este órgano está inervado por una rama del nervio olfatorio y es utilizado para oler la comida que se encuentra ya en la cavidad bucal (Hickman *et al.*, 2006).

Los principales órganos respiratorios de los reptiles son los pulmones. En los órdenes Squamata y Rynchocephala estos órganos tienen forma de saco y paredes alveolares, mientras que en los órdenes Chelonia y Crocodylia están divididos en compartimentos y estructurados de una forma muy similar a los de las aves y mamíferos. El tórax y el abdomen no están separados por un diafragma y la respiración se realiza con la ayuda de músculos de la pared celómica (Hickman *et al.*, 2006).

Los reptiles tienen un sistema circulatorio doble e incompleto. El corazón está formado por tres cámaras: dos aurículas y un ventrículo, salvo en los crocodilianos, donde el ventrículo está casi totalmente dividido en dos por un septo. La sangre venosa retorna al corazón desde la cola y las extremidades traseras, pasando por los riñones, a través de un sistema porta-renal, la sangre procedente de la región abdominal retorna por un sistema porta que atraviesa el hígado (Hickman *et al.*, 2006).

El aparato urinario consta de dos riñones metanéfricos, con uréteres de comunicación al exterior propios, excepto en los chelonios y saurios que poseen vejiga urinaria. Los productos de excreción de los reptiles acuáticos son el amoníaco y la urea, mientras que en los reptiles terrestres los productos de excreción son el ácido úrico y los uratos. Los conductos del aparato excretor, reproductor y digestivo desembocan en una misma estructura, la cloaca, cuya abertura está situada ventralmente, a la altura de la base de la cola (Hickman *et al.*, 2006).

El aparato digestivo es muy similar al de mamíferos y aves. No se ha diversificado para la asimilación de nutrientes especiales, ya que muestra una uniformidad manifiesta que se extiende a casi todas las especies. La boca es siempre grande, llegando hasta la parte posterior de los ojos y carece de labios. Las tortugas carecen de dientes y poseen un pico córneo de crecimiento continuo. Los cocodrilos tienen dientes fuertes implantados en alvéolos poco profundos en ambas mandíbulas y se reemplazan durante toda la vida (Zug, 1993; Johnson y Evans, 1995; Ackerman, 1997; Hickman *et al.*, 2006).

El huevo de los reptiles es de tipo amniótico que permite el desarrollo embrionario en tierra seca. En el huevo amniótico el embrión flota en el líquido amniótico y se desarrolla en un medio acuático. Está provisto de un saco vitelino que contiene su reserva nutritiva. El alantoides, otra membrana, sirve de superficie de intercambio gaseoso a través de la membrana coriácea o calcárea, el alantoides también forma una cámara que almacena residuos tóxicos que se acumulan durante el desarrollo embrionario (Hickman *et al.*, 2006).

1.1.6.- Características fisiológicas y de comportamiento

Los reptiles son poiquiloterms, debido a ello los reptiles hibernan en las regiones frías, donde el invierno es duro, y estivan en las regiones muy cálidas y secas. Todos los reptiles tienen una temperatura corporal óptima que varía según la especie y la estación. Para regular su temperatura aprovechan diferentes fuentes de calor externo, como la luz solar directa o las piedras, los troncos y el suelo calentado por el sol. Mediante el uso equilibrado de estas fuentes, las diferentes especies de reptiles mantienen una temperatura corporal más o menos constante que suele ser superior a la del aire que les rodea. El no alcanzar la temperatura corporal óptima les puede llevar a un fallo fisiológico incluida la inmunosupresión.

Los hábitos alimentarios de los reptiles son muy variados. Los miembros de los órdenes Crocodylia y Rynchocephalia, y de los subórdenes Ophidia y Amphisbaenia son carnívoros (incluyendo los de hábitos insectívoros). El orden Chelonia y el suborden Sauria incluyen especies herbívoras y carnívoras. Los individuos carnívoros consumen productos de origen animal, ya sea en forma de presa viva, huevos o cadáveres. La dieta herbívora incluye productos vegetales tales como frutas, verduras, raíces, tubérculos, algas, etc. dependiendo de la especie y de los recursos que ofrezca el hábitat ([Provet Healthcare Information 2000](#)).

La fecundación es interna y aunque la mayoría de los reptiles son ovíparos, algunas especies son ovovivíparas e incluso vivíparas. Los huevos son eliminados a través de la cloaca y depositados en el suelo, a resguardo, o en pequeños agujeros excavados por la madre en la arena. Éstos suelen ser abandonados a su suerte por los progenitores. El periodo de incubación es variable según la especie y las condiciones climatológicas ([Zug, 1993](#); [Jonson y Evans, 1995](#); [Ackerman, 1997](#); [Hichman *et al.*, 2006](#)).

Como todos los vertebrados, los reptiles poseen sistema inmunitario con respuesta innata y adaptativa. Los tejidos linfoides en reptiles incluyen el timo, el bazo, tejido linfoide asociado a mucosas (en sus siglas en inglés GALT) y la médula ósea. Los tejidos linfoides de reptiles varían estructuralmente con la estación. El timo y la pulpa

blanca del bazo están bien definidas en otoño, atrofiada durante el invierno y empieza a desarrollarse en primavera y verano (Hussein *et al.*, 1978; Hussein *et al.*, 1979; El ridi *et al.*, 1981; Zapata *et al.*, 1992).

El sistema inmunitario innato incluye componentes no específicos tales como leucocitos, proteínas antimicrobianas y sistema del complemento, que responden rápidamente como respuesta no específica, primera línea de defensa. Algunas proteínas inmunológicas se han puesto en evidencia en los últimos años, por ejemplo las lisozimas de los reptiles muestran una fuerte actividad antimicrobiana contra cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella* Typhimurium, demostrado en *Caretta caretta* (Chattopadhyay *et al.*, 2006). Otra molécula inmunitaria aislada en *Emys orbicularis* es la conocida como TBD-1, este péptido demuestra una gran actividad contra *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* meticilin-resistente (Stegemann, 2009). Una proteína pequeña catiónica fue aislada del cocodrilo (*Crocodylus siamensis*), la cual demostró una actividad antimicrobiana contra *S. typhi*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Plesiomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae* (Preecharram *et al.*, 2008). La presencia de la ruta alternativa y clásica del complemento ha sido confirmada en los reptiles (Sunyer y Lambris, 1998). Se cree que el complemento es el responsable de la actividad antivírica contra el virus de West Nile y herpes simplex en el *Alligator mississippiensis*. La actividad del complemento fue significativamente inferior por debajo de los 15°C, lo cual sugiere que los reptiles pueden estar inmunocomprometidos en invierno cuando la temperatura del cuerpo es baja (Merchant *et al.*, 2005).

La fagocitosis por parte de los macrófagos en reptiles también puede estar afectada por la temperatura, en iguana (*Hemidactylus falviviridis*) se han registrado altos niveles de fagocitosis y citotoxicidad en macrófagos esplénicos a 25°C y prácticamente ausente en temperaturas bajas (Mondal y Rai, 2001).

La fiebre es una parte de la respuesta inflamatoria de los vertebrados, en animales homeotermos. Es un proceso fisiológico en el que interaccionan las citoquinas y el sistema nervioso central (Conti *et al.*, 2004). Sin embargo en reptiles que son poiquilotermos, la respuesta febril puede depender de la dosis del pirógeno, en iguanas del desierto (*Dipsosaurus dorsalis*) tras la inoculación de *Aeromonas hydrophila*,

bacteria Gram-negativa, se obtuvo una respuesta febril mientras que tras la inoculación de *Staphylococcus aureus*, bacteria Gram-positiva no se obtuvo respuesta (Merchant *et al.*, 2007). En galápagos (*Terrapene carolina*) con una dosis alta de pirógeno (0,025 mg LPS/g) se produjo una respuesta febril, sin embargo con una dosis baja (0,0025 mg LPS/g) el incremento de temperatura fue insignificante comparado con el grupo control (Amaral *et al.*, 2002).

La respuesta celular de la inmunidad adaptativa también se encuentra en reptiles, se han encontrado linfocitos T funcionales en serpientes, iguanas y galápagos (Burnham *et al.*, 2005). Estudios de la funcionalidad de los linfocitos T revelan una fuerte proliferación en primavera y otoño, con lo cual la temperatura, el ciclo estacional, determina la actividad de las células T (Farang y El Ridi, 1984). Estudios más recientes también confirman que la proliferación de los linfocitos en *Mauremys caspita*, frente a mitogen Con A y phytohemaglutinin (PHA) fue extremadamente fuerte en primavera pero disminuyó en verano, otoño e invierno (Muñoz y De la Fuente, 2001). La contaminación ambiental afecta a la proliferación de los linfocitos, el mercurio afectó negativamente a la respuesta celular, con lo cual los contaminantes ambientales pueden colocar en situaciones de grave riesgo de enfermedad a los reptiles (Keller *et al.*, 2006; Day *et al.*, 2007).

La respuesta humoral mediada por linfocitos B, se encuentra presente en los reptiles con algunas ligeras diferencias. En estudios realizados con *Trachemys scripta* (la tortuga de orejas rojas) se ha demostrado que estas células son capaces de fagocitar (Zimmerman *et al.*, 2009). Las células B de los reptiles son capaces de producir al menos dos tipos de anticuerpos, IgM e IgY (Nataraja y Muthukkaruppan, 1985). La IgM que es común a todos los vertebrados, es también la primera que se produce, ésta se origina en respuesta a infecciones de bacterias Gram-negativa y es un anticuerpo lítico con una vida media de 10 días y muy eficaz activando el complemento (Coico *et al.*, 2003). La IgY tiene una vida media más larga y se produce en gran cantidad y proporciona mayor defensa contra las infecciones. Los galápagos, las tortugas y algunas iguanas producen dos clases de IgY, una de 7,5S y otra de 5,7S, la función de esta última todavía se desconoce (Brown, 2002; Wei *et al.*, 2009). También se ha descubierto un anticuerpo parecido a IgA en el intestino del gecko leopardo (*Eublepharis macularius*), éste podría ser una recombinación entre IgM e IgY (Deza *et*

al., 2007). Los reptiles también pueden producir IgD, pero la función no se conoce todavía aunque se sabe que se expresa en la superficie de las células B, se postula que puede modular la proliferación de los linfocitos B (Geisberger *et al.*, 2006). A pesar de que la respuesta humoral en reptiles es parecida a la de los mamíferos, pero muy lenta y a menudo no aumenta el título de la segunda exposición. En reptiles, los anticuerpos se pueden detectar alrededor de una semana pero en ocasiones no aparecen hasta la sexta u octava semana post-inmunización (Grey, 1963; Marchalonis *et al.*, 1969; Ingram y Molyneux, 1983; Work *et al.*, 2000; Pye *et al.*, 2001; Origgi *et al.*, 2001) y no son detectados hasta las 34 semanas (Orrigi *et al.*, 2001). La lentitud de la respuesta puede ser debida a la temperatura (Grey, 1963; Zimmerman *et al.*, 2009).

1.1.7.- Características de *Trachemys scripta elegans* y *Testudo hermanni hermanni*

1.1.7.1.- *Trachemys scripta elegans* (Wied-Neuwied, 1839)

Trachemys scripta elegans, es conocida como galápago de Florida, o tortuga de orejas rojas, también llamada tortuga japonesa, a pesar de que no es originaria de Japón. Se piensa que se le pudo asignar este nombre debido a que dentro del ojo tiene una pequeña raya horizontal negra, que le da la apariencia de tener los ojos rasgados. Es una subespecie de tortuga semiacuática perteneciente a la familia Emydidae, originaria de la región que comprende el sureste de los Estados Unidos y el noreste de México, aunque en la actualidad se encuentra en muchas otras partes del mundo gracias a su comercio como mascota.

Esta especie se ha convertido en la tortuga más comercializada del mercado y en una de las mascotas más populares en los últimos años en numerosos países, debido entre otros factores a que su cuidado es relativamente sencillo (figura 1).



Figura 1.- *Trachemys scripta elegans*.

1.1.7.1.1.- Clasificación taxonómica

12

Trachemys scripta elegans pertenece al orden Chelonia, el único de la subclase Anapsida, que los forman dos subórdenes Cryptodira y Pleurodira. El primero lo componen tres superfamilias (Testudinoidea, Trionychoidea y Chelonioidea), estos galápagos pertenecen a la familia Emydidae de la superfamilia Testudinoidea.

Trachemys scripta elegans es una de las nueve subespecies de las que se compone la especie *Trachemys scripta*. Antiguamente, estas tortugas eran clasificadas con el nombre de *Chrysemys scripta elegans* (Frank y Ramus, 1995; Ernst y Babour, 1997).

Clase Reptilia
Orden Chelonia
Superfamilia Testudinoidea
Familia Emydidae

1.1.7.1.2.- Características fisiológicas y de comportamiento

Trachemys scripta elegans son animales poiquiloterms, por tanto dependen por completo de la temperatura del ambiente (Boylan, 2003). Necesitan tomar continuamente baños de sol para calentarse y mantener su temperatura interna (figura 2). Si no logran mantenerse por encima de un umbral mínimo de temperatura, posiblemente no puedan realizar la digestión y defecación con normalidad.



Figura 2.- Ejemplares de *Trachemys scripta elegans* tomando un baño de sol.

Estos reptiles presentan actividad diurna, son excelentes nadadores, capturan presas de las cuales se alimentan. Suelen estar alerta de los depredadores naturales y de la gente, cuando se encuentran en peligro suelen huir lanzándose frenéticamente de las rocas o de donde están descansando, aunque también pueden retraer su cabeza y sus miembros dentro del caparazón.

Llegan a vivir entre 20 y 30 años, pero algunos galápagos de esta especie pueden llegar a vivir más de 40 años, en cautiverio su vida suele ser más corta. La calidad del hábitat en el que se encuentren también influye en su esperanza y calidad de vida.

Estos galápagos durante los meses de frío entran en un estado de sopor denominado hibernación, localizándose en el fondo de estanques o lagos poco profundos durante esta época (Rodríguez-Garrido, 2009).

Trachemys scripta elegans son galápagos omnívoros, sin embargo los más jóvenes tienden a ser carnívoros (comen más proteína animal), y cuando crecen se vuelven más herbívoros. Los galápagos menores de 3 años, necesitan recibir muchas proteínas pues están en una etapa crucial de su crecimiento. En la naturaleza suelen alimentarse de grillos, caracoles de agua, peces de pequeño tamaño, lombrices de tierra y otros pequeños animales.

Los machos alcanzan la madurez sexual antes que las hembras, cuando tienen una longitud de plastrón de 9-10 cm y una edad de dos a cinco años, en tanto que las hembras tardan de cuatro a siete años en alcanzar la madurez sexual, cuando tienen entre 15 y 17 cm de longitud del plastrón (Rueda-Almonacid, 2007). El periodo de nidificación es entre abril y julio, con un pico de mayo a junio, aunque puede variar dependiendo de la zona climática. La hembra selecciona para la puesta zonas abiertas no sombrías, donde el suelo no está embarrado y con alguna protección vegetal (Bringsøe, 2006). Cada puesta tiene entre cuatro y treinta huevos, oblongos y con la cáscara suave, flexible, que tardan unos 60-90 días en incubarse. Las hembras de *Trachemys scripta elegans* pueden realizar dos o tres puestas por temporada reproductiva. Un comportamiento interesante en la especie es que los neonatos permanecerán en el nido hasta la próxima primavera cuando entran al agua (Rueda-Almonacid, 2007).

1.1.7.1.3.- Hábitat

Trachemys scripta elegans vive en una amplia variedad de hábitats acuáticos de agua dulce. Prefiere grandes masas de agua tranquilas y templadas con fondos blandos, una abundante flora acuática, ya que los adultos se van alimentar de plantas, y confortables sitios de descanso fuera del agua, ya que tienen que salir a descansar (Carr, 1952; Ernst *et al.*, 1994; Bringsøe, 2002). Los hábitats típicos comprenden ríos, amplios canales, pantanos, lagos y lagunas. No es extraño encontrarlos en pequeñas lagunas de agua dulce asociados con la presencia de grandes hábitats acuáticos en las

inmediaciones, e incluso se ha documentado la presencia de *Trachemys* en riachuelos y pequeñas lagunas estrechamente relacionadas a lagos (Carr, 1952).

También se ha observado que *Trachemys scripta elegans* puede tolerar periodos de progresiva polución (Carr, 1952). Un hecho documentado al respecto, son los ejemplares que se han liberado en lugares visitados frecuentemente por el hombre, lagos y lagunas de parques urbanos o recreativos, donde no sólo sobreviven, se reproducen y aumenta la población (Kordges, 1990; Thiesmeir y Kordges, 1991). La muerte de los galápagos en zonas urbanas probablemente esté relacionado con el escaso número de puntos terrestres de descanso y la falta de condiciones para la hibernación, falta de oxigenación de agua, altas concentraciones de peces y aves acuáticas (Kordges, 1990).

1.1.7.1.4.- Distribución geográfica

Trachemys scripta elegans es originaria geográficamente del área que rodea al río Mississippi (EE.UU), llegando hasta el golfo de México. Se desarrolla en climas cálidos, particularmente en el cuadrante sudeste de los Estados Unidos. Tal área comprende desde el sudeste de Colorado hasta Virginia y Florida. Habita naturalmente en zonas donde haya alguna fuente de agua tranquila y templada. Estas zonas acuáticas pueden ser estanques, lagos, pantanos, riachuelos, arroyos o ríos con corrientes lentas (Bringsøe, 2006).

Al finalizar la Segunda Guerra Mundial la demanda de *Trachemys scripta elegans* como mascota aumentó considerablemente, lo que conllevó una alta presión sobre la población en libertad. Por esta razón se establecieron en el sur de Estados Unidos varias granjas de cría de *Trachemys*, a finales de los años sesenta existían más de 150 granjas. En 1975 la *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos prohibió la venta de galápagos de menos de 10 cm de caparazón porque transmitían salmonelosis. Con ello empezó la mayor exportación de galápagos a países del Viejo Mundo, un mercado de más de diez millones de ejemplares al año, los primeros años. En los años 80 se exportaron alrededor de uno a dos millones, y en la primera mitad de los noventa fueron aproximadamente de tres a cuatro millones. En 1996 Estados Unidos exportó casi ocho millones de tortugas, de las cuales el 28% fueron importadas por Europa (Bringsøe, 2006). El comercio como mascotas y el posterior abandono de

ejemplares por parte de sus dueños han expandido esta especie y se considera invasora fuera de su área de distribución natural. La especie *Trachemys scripta elegans* causa impactos negativos en los ecosistemas que ocupa, desplazando otras especies de galápagos con los que comparten dieta y espacios de cría, como el galápagos leproso (*Mauremys leprosa*) y/o el galápagos europeo (*Emys orbicularis*) en la Península Ibérica. Su voracidad y su carácter omnívoro la convierten en depredador de numerosas especies de invertebrados y pequeños vertebrados, así como plantas acuáticas, sin olvidar la capacidad de transmitir enfermedades la hacen una especie con un potencial invasivo importante (Mingot *et al.*, 2003; Pendlebury *et al.*, 2006).

Trachemys scripta elegans está diseminada por el norte de Europa y la región Báltica, con incidencia en las áreas urbanas o periurbanas. En Alemania se han encontrado poblaciones importantes en el estado de Nordrhein-Westfalen, en el área de Rhine y Ruhr, y en Niedersachsen. Por razones históricas en el este de Alemania, la densidad de *Trachemys scripta elegans* es baja (Laufer, 2007). En Dinamarca se han encontrado individuos aislados, excepto en Hjørring al norte de Jutland. En la década de los noventa, una población de *Trachemys scripta elegans* sobrevivió en Sct. Kunds Klide, en una laguna templada por recibir el agua de una factoría de Nestle, pero en el resto de Dinamarca no era posible la reproducción (Raumussen, 1995; Bringsøe, 2001). En Polonia se han observado esporádicamente en la zona oeste y sudoeste del país, así como en otras partes del mismo (Najbar, 2001; Kopka, 2003). Se han descrito casos de ejemplares que se han aislado en la parte europea de Rusia, en Finlandia en Lituania y en Suecia. Y no se han encontrado en Estonia, las islas Faroe, Groelandia, Islandia, Letonia y Noruega (Bringsøe, 2006).

En España, la presencia de la tortuga de Florida se ha convertido en un hecho bastante habitual, como consecuencia de sueltas incontroladas de esta mascota, encontrándose con frecuencia en cauces de ríos y lagunas (Martínez-Silvestre y Cerradelo, 2000). Se han avistado en Huelva (Pérez-Santigosa *et al.*, 2006), en Badajoz (Silva y Blasco, 1995), y en numerosos parques y jardines urbanos, como por ejemplo los jardines de la Estación de Atocha en Madrid o en lagunas del campus de la Universidad de Vigo, e incluso en el Barranco del Carraixet (Alboraya-Valencia), todo ello debido a la suelta incontrolada de estas mascotas. Pero lo más importante es que se han citado numerosos casos de reproducción en libertad como el de la charca de

Masquefa en Barcelona (De Roa y Roig, 1997), o en diversas charcas de la comarca del Priorat en el Sudoeste de Cataluña (Soler-Massana *et al.*, 2006).

La presencia de *Trachemys scripta elegans* en la Comunidad Valenciana está ligado, al igual que en el resto de la Península Ibérica, a la comercialización de la misma como mascota y posterior liberación indiscriminada en lagunas y marjales. Cabe destacar la evolución de los ejemplares recogidos en los centros de recuperación de fauna de la Comunidad Valenciana, pasando de siete ejemplares en 1991, a 286 en 1999, o 300 ejemplares en 2007 (Bataller *et al.*, 2008).

La primera constancia de la aclimatación de la especie en la Comunidad Valenciana se produce en 1998 en cuatro localidades de Castellón: embalse de Uldecona, Prat de Cabanes, desembocadura del Mijares y el Marjal de Almenara, si bien no es hasta 2004 cuando se documenta la reproducción en el medio natural (Sancho, 2004).

Existen varios humedales en la Comunidad Valenciana donde coexisten poblaciones de galápago europeo (*Emys orbicularis*) con galápagos exóticos, estas son de norte a sur: marjal de Peñíscola, marjal de Nules-Burriana, marjal de Almenara, marjal de los Moros, marjal de Rafalell y Vistabella, y marjal de La Safor-Gandía (Bataller *et al.*, 2008) (figura 3).



Figura 3.- Situación de los marjales en la Comunidad Valenciana (tomado de Bataller *et al.*, 2008).

1.1.7.1.5.- Situación legal de *Trachemys scripta elegans* como especie invasora

El Consell Valencià aprobó el Decreto 213/2009 de 20 noviembre de 2009 por el cual se establece una serie de medidas para el control de especies exóticas invasoras en la Comunitat Valenciana. Este decreto recoge el interés de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) el cual recomienda prestar especial atención a las especies invasoras, ya que son la segunda causa de desaparición de especies en el mundo. También el Decreto 213/2009 recoge las intenciones del Convenio de Biodiversidad Biológica aprobado en 1992 y que España ratificó en 1993, que establece en su artículo 8.h “cada parte contratante, en la medida de sus posibilidades, impedirá que se introduzcan, controlará o erradicará las especies exóticas que aparezcan en los ecosistemas, los hábitats o las especies”. Por otra parte este decreto cumple la voluntad que el Consejo de Europa elaboró y dictó la Estrategia Europea sobre Especies Exóticas Invasoras en 2004, en la que propone la prohibición de introducción de especies no nativas en el medio natural, el establecimiento de medidas preventivas y la puesta en marcha de programas para su control.

La situación concreta de todas las subespecies de *Trachemys scripta* la regula el artículo 4 del Decreto 213/2009, en el cual dice textualmente:

Artículo 4. Actuaciones prohibidas.

“1. Respecto a los ejemplares vivos -incluidas sus larvas, crías o huevos- en el caso de animales, y a los propágulos o fragmentos vivos de ejemplares en el caso de plantas, incluidos en el anexo I, se prohíbe en todo el territorio de la Comunitat Valenciana y en las zonas marinas en las que la Generalitat ejerce competencias medioambientales:

- a. La liberación, en el caso de animales, o la plantación, siembra o dispersión, en el caso de plantas.
- b. El comercio, tráfico o cesión.
- c. Su transporte, excepto el necesario para las tareas de erradicación de estas especies y, en el caso de ejemplares de cangrejo americano (*Procambarus clarkii*) pescados legalmente, el transporte desde las áreas de pesca a los puntos de venta o consumo.”

Con lo cual queda totalmente prohibido la liberación, comercio y transporte de *Trachemys scripta*.

Respecto a los ejemplares que actualmente se hallan en libertad, dicho decreto también lo regula mediante el artículo 6.

Artículo 6. Actuaciones de control.

“1. La Conselleria competente en materia de medio ambiente redactará y aplicará, en función de las disponibilidades presupuestarias, planes de control y, si procede, sustitución de las especies exóticas incluidas en los anexos y los híbridos que éstas podrán formar. Se excluirán de este proceso los especímenes monumentales según la Ley 4/2006, de 19 de mayo, de la Generalitat, de Patrimonio Arbóreo Monumental de la Comunitat Valenciana. Los planes de control contemplaran:

- a. Medidas de detección y eliminación en los estadios iniciales de la invasión.
- b. Actuaciones de contención para frenar el avance de una especie concreta, o de control o mitigación para minimizar sus efectos sobre las especies nativas, o de erradicación si resultase posible. El plan de control deberá considerar el grado de implantación del taxón así como la dificultad que supone su control y sus efectos, tanto sobre el medio como sobre las actividades económicas que éste sustente. Los planes de control podrán establecer áreas en las que las actuaciones difieran en su intensidad.
- c. Un programa de seguimiento de las localidades donde se han llevado a cabo actuaciones de contención o erradicación.
- d. Si fuese necesario, un programa de restauración de los hábitats afectados.

2. No obstante lo anterior, se llevarán a cabo actuaciones urgentes de erradicación, sin necesidad de redacción de planes de control, cuando cualquier especie exótica invasora:

- a. Afecte a especies y a hábitats prioritarios contemplados en la Directiva Europea de Hábitats 92/43/CEE.
- b. Ponga en peligro a taxones amenazados de flora o fauna silvestre incluidos en los catálogos nacionales o autonómicos.
- c. Amenace con dispersarse o muestre un ritmo creciente de dispersión, de modo que el control de la invasión biológica pueda llegar a ser poco viable.

3. De acuerdo con lo establecido en el artículo 53 de la Ley 3/1993, de 9 de diciembre, de la Generalitat, Forestal de la Comunitat Valenciana, la Conselleria competente en materia de medio ambiente podrá delimitar la zona afectada por las especies exóticas invasoras y declarar de utilidad pública su erradicación. Los titulares de los terrenos afectados por la citada declaración de utilidad pública quedan obligados a permitir en sus propiedades la ejecución de los trabajos de erradicación y el establecimiento de las medidas que se consideren oportunas para prevenir la dispersión de las especies exóticas invasoras.”

1.1.7.2.- *Testudo hermanni hermanni* (Gmelin, 1789)

La tortuga mediterránea o tortuga de tierra (*Testudo hermanni hermanni*) es una de las especies de tortuga clasificadas tradicionalmente dentro el género *Testudo*. Se trata de reptiles herbívoros y diurnos que pueden llegar a vivir edades comparables a las de los humanos, y que se distribuyen desde el Levante Español, al oeste, y hasta el límite sur del mar Negro, al este. La destrucción de sus hábitats y su popularidad como animales de compañía han menguado significativamente las poblaciones silvestres y han hecho indispensable la protección para asegurar el futuro de la especie a largo plazo.

La tortuga mediterránea fue probablemente introducida en la península Itálica por los humanos del Neolítico, y desde la antigüedad ha sido capturada y criada como alimento, fuente de materia prima o animal de compañía. Y con estos fines se distribuyó por el sur de Europa (figura 4).



Figura 4.- *Testudo hermanni hermanni*.

1.1.7.2.1.- Clasificación taxonómica

La tortuga mediterránea pertenece al orden Chelonia, el único de la subclase Anapsida, que los forman dos subórdenes, Cryptodira y Pleurodira. El primero lo

componen tres superfamilias (Testudinoidea, Trionychoidea y Chelonioidea), estas tortugas terrestres pertenecen a la familia Testudinidae de la superfamilia Testudinoidea.

Testudo hermanni es una de los nueve especies que forman el género *Testudo*, a su vez esta especie presenta dos subespecie *T. hermanni hermanni* y *T. hermanni boettgeri* (<http://www.catalogueoflife.org>).

Clase Reptilia
Orden Chelonia
Superfamilia Testudinoidea
Familia Testudinidae

1.1.7.2.2.- Características fisiológicas y de comportamiento

Las tortugas mediterráneas son animales poiquiloterms, en primavera dedican las primeras horas del día y las últimas, a tomar el sol. Siendo las horas centrales del día las que dedican a la búsqueda de alimento. Por el contrario, en la época estival dedican las primeras y últimas horas del día a alimentarse. A temperaturas superiores a 27°C, las tortugas se muestran apáticas y excavan pequeños agujeros cubiertos por vegetación baja o se esconden en pequeñas grietas con el objeto de refrescarse. En las zonas más cálidas de nuestra comunidad llegan a practicar una ligera estivación, disminuyendo casi totalmente su actividad durante los días más secos y calurosos (Vetter, 2006).

En otoño, con la bajada de las temperaturas, los reptiles dejan de alimentarse hasta veinte días para poder vaciar completamente el intestino de restos de comida. Se van volviendo más apáticas y en noviembre o diciembre, según la latitud, empiezan a enterrarse o refugiarse en lugares protegidos, entrando en un estado de hibernación. La temperatura ideal para la hibernación es de 5°C. Temperaturas inferiores a 2°C provocan daños cerebrales o la muerte, mientras que si son superiores a 10°C traen la tortuga a un estado de subhibernación, peligroso puesto que el animal consume más rápidamente las reservas de grasa que le deben durar todo el invierno. En estado natural, las tortugas se entierran a profundidades inferiores a veinte centímetros.

Son animales prácticamente vegetarianos, prefiriendo plantas herbáceas, leguminosas y frutos de diferentes especies. También consumen carroña si se presenta la ocasión, y complementan su dieta con invertebrados que puedan capturar, como gusanos, lombrices, caracoles (fuente de calcio), etc.

Alcanzan su madurez sexual cuando miden cerca de 12 cm los machos y unos 15 cm las hembras, no dependiendo tanto de su edad como de la abundancia de alimento en la zona en que viven y estimándose en condiciones naturales entre los siete y diez años el tiempo necesario para alcanzar las medidas mencionadas. El período de celo se inicia poco después del comienzo de su actividad tras la hibernación. Los machos suelen ser territoriales, no alejándose de sus dominios demasiado y tolerando la presencia de otros machos salvo cuando se acerca una hembra receptiva que puede originar un combate. La nidificación es entre los meses de mayo y julio, el número de huevos generalmente son de dos, y las puestas son realizadas con un intervalo de cinco a treinta días. El periodo de incubación oscila entre 60 y 90 días, el sexo de los recién nacidos varían en función de la temperatura ambiental.

1.1.7.2.3.- Hábitat

La tortuga mediterránea se halla en zonas con temperatura por encima de la isoterma de 14 °C y pluviosidad anual por debajo de los 700 mm. Es una especie que se distribuye desde el nivel del mar hasta los 400 m fundamentalmente, aunque en otras poblaciones europeas puede alcanzar altitudes más elevadas (Bertolero, 2002).

Los biotopos ocupados corresponden al dominio del bosque mediterráneo aclarado: encinar, alcornocal, estepa, matorral y muy frecuentemente en la garriga, como sucede en las Baleares. En dichos ambientes, es frecuente encontrarlas en las zonas más abiertas y con moderada pendiente, utilizando como escondrijo la vegetación arbustiva. En los períodos más secos suele trasladarse a los fondos de los valles y/o estar semienterrada. No hay que olvidar que aunque es una tortuga netamente mediterránea, necesita de una cierta humedad ambiental (Bertolero, 2002).

1.1.7.2.4.- Distribución geográfica

El área de distribución de la tortuga mediterránea se extiende desde España hasta Turquía, aunque la subespecie *T. hermanni hermanni* sólo aparece hasta la zona del río Po en Italia, siendo la subespecie *T. hermanni boettgeri* la que se encuentra en Europa oriental (Cheylan, 2001; Bertolero 2002). Aunque las dos subespecies han reducido sus efectivos poblacionales, la más amenazada y que presenta un peor estado de conservación es la subespecie *hermanni*, estando la mayoría de sus poblaciones en fase de desaparición (Bertolero, 2002).

Testudo hermanni hermanni presenta una distribución muy fragmentada, sobretudo en España y el sur de Francia, donde sólo persisten poblaciones aisladas. En cambio, en Italia, en Córcega, Cerdeña y Sicilia ocupa áreas mayores y su distribución es mucho más continua. En España se limita su presencia a la costa mediterránea, situándose la única población de origen natural en la provincia de Girona, en la Sierra de l'Albera (Pleguezuelos *et al.*, 2002). En otras zonas de Cataluña se han ido realizando programas de reintroducción de la especie, como en el Delta de l'Ebre (Bertolero y Martínez-Vilalta, 1994), el Massís del Garraf y en la Sierra del Montsant (Soler-Massana *et al.*, 2005), con resultados bastante positivos. Además existen poblaciones en Mallorca y Menorca, se cree que la especie fue introducida en las islas hace 3000 años (Bertolero, 2006). En Mallorca las poblaciones más importantes se encuentran en el noreste de la isla, en los Montes de Artà, aunque existen otras poblaciones menos importantes en el este de la isla. En Menorca la tortuga mediterránea está presente en todo el territorio insular, aunque no se puede considerar su presencia como continua u homogénea (Bertolero, 2006).

En la Comunidad Valenciana se encuentran citas de la presencia de *Testudo hermanni* en publicaciones paleontológicas y arqueológicas, habiéndose localizado restos de tortuga mediterránea en diferentes abrigos cuaternarios (Jiménez-Fuentes, 1995).

En el año 1994 se inicia el proyecto de reintroducción de la tortuga mediterránea en la Comunitat Valenciana con el objetivo de crear una población estable de esta

especie en varias localidades de la provincia de Castellón, considerada el límite más meridional de su antigua distribución.

En primer lugar se llevó a cabo una introducción en el Parque Natural del Desierto de las Palmas, que parecía disponer de la condiciones necesarias para llevar a cabo este proyecto con ciertas garantías de éxito. Se realizaron varias actuaciones antes de la liberación de ejemplares, ya que era necesario comprobar que los animales se aclimataban bien a la zona, por lo que se construyeron varios cercados de aclimatación en los que se liberaron individuos para su seguimiento. Tras comprobar la supervivencia y reproducción de estas tortugas en el cercado se procedió a la liberación de las tortugas, a los que se realizó un seguimiento con radiotracking para comprobar su supervivencia en libertad, y que dio resultados positivos respecto a la adaptación de las *Testudo hermanni hermanni* en esta sierra de Castellón.

Una vez confirmado el éxito del proyecto en esta localidad, se decidió llevar una segunda fase del proyecto en otra sierra litoral de la misma provincia, situada un poco más al norte, y también protegida como es el Parque Natural de Sierra de Irta. El proyecto en esta localidad se inició en 2005 y los resultados obtenidos tras un año de seguimiento parecían indicar la buena adaptación de las tortugas liberadas, considerando como indicador el aumento de peso de los individuos recuperados así como el número de ejemplares marcados con emisor.

1.1.7.2.5.- Situación legal de *Testudo hermanni hermanni* como especie protegida

Debido a su preocupante estado de conservación, la tortuga mediterránea aparece catalogada como “estrictamente protegida” en el Convenio de Berna de 1979, y está también incluida en el Anexo II y IV de la Directiva Hábitats de la CEE de 1992 (Directiva 92/43/CEE, de 21 de mayo). Esto implica que es necesario designar zonas especiales para su conservación y que son especies que requieren una protección estricta. En la legislación española está incluida en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas en la categoría “de interés especial” (Real Decreto 439/1990, de 30 de marzo).

En la Comunidad Valenciana aparece en el Catálogo Valenciano de Especies Amenazadas en la categoría de “en peligro de extinción” (Decreto 32/2004, de 27 de febrero), lo que supone la prohibición estricta de las conductas de muerte, deterioro, recolección, liberación, comercio, exposición para el comercio, transporte, intercambio, oferta con fines de venta, captura, persecución, molestias, naturalización y tenencia, salvo que estuvieran autorizadas, de los ejemplares, huevos, larvas, crías o restos de esta especie. También queda prohibida la destrucción y alteración de su hábitat y, en particular, la de los lugares de reproducción, reposo, campeo o alimentación.

1.2.- Importancia del estado sanitario en la competencia entre especies autóctonas e invasoras

No existen características que permitan pronosticar de manera definitiva si una especie se va a convertir en invasora o no, pero sí hay una serie de particularidades que, solas o combinadas, favorecen el que un organismo sobreviva, se establezca y reproduzca en un medio diferente al original. Por ejemplo, las especies llamadas generalistas (que no tienen una dieta específica, son adaptables, tienen tolerancia amplia de temperatura, humedad o estacionalidad) y las conocidas como tipo R (estrategias de reproducción temprana, muchas crías por camada, capacidad de tener varias camadas en el año, poco cuidado parental y adaptación a cambios bruscos en el tamaño de las poblaciones) presentan más riesgo que aquellas que tienen necesidades específicas. Estos requerimientos específicos son los que limitan su sobrevivencia (tolerancia a variaciones de temperatura de menos amplitud, dieta específica, relaciones simbióticas, ambiente específico) o su reproducción (estacionalidad, sustrato, disponibilidad de parejas, alimento, etc.). Sin embargo, estas características no necesariamente determinan la “invasividad” de una especie; de la misma manera que ciertas características de una especie van a ser importantes en unos hábitats y en otros no lo son (Kolar y Lodge, 2001).

Cady y Joly (2004) añaden a lo anteriormente citado el aspecto sanitario, en el que las especies autóctonas sean más sensibles a ciertos patógenos que las invasoras. Este planteamiento no es extraño, sólo hay que recordar la incidencia del cangrejo rojo americano (*Procambarus clarki*), como portador de una afanomicosis (agente etiológico

Afanomicosis astaci) sobre el cangrejo ibérico (*Austropotamobius pallipes*) que es más sensible y ello ha llevado a la práctica desaparición de estos cangrejos de río autóctonos.

Existen pocos trabajos que describan la influencia que tiene el estado sanitario de *Trachemys scripta elegans* sobre los galápagos autóctonos. Los estudios realizados por Cadi y Joly (2004), determinaron que las tortugas europeas (*Emys orbicularis*) de su estudio perdieron masa corporal y aumento la mortalidad cuando compartían hábitat con *Trachemys scripta elegans*, estos autores afirmaron que no pudieron determinar la estrategia de competitividad de las tortugas invasoras. Varias son las razones que les llevaron a tales afirmaciones, en primer lugar no existe competencia por el alimento, al tener dietas diferentes. En segundo lugar la competencia por los lugares de solana, tan solo se podría dar en invierno, pero este factor no explica satisfactoriamente los resultados. Otros aspectos que estos autores sugieren que podría afectar, son por una parte la densidad de población, que afectara con mayor medida a las tortugas europeas que a *Trachemys scripta elegans* y por otra parte que las especies de *Emys* sean más sensibles a agentes patógenos que *Trachemys* (Cady y Joly, 2004).

1.3.- Agentes patógenos en quelonios

Existen pocos estudios sobre agentes patógenos de *Trachemys scripta elegans*, y *Testudo hermanni hermanni*, y se centran fundamentalmente en *Salmonella*, que tradicionalmente ha sido el agente más importante por el que se han visto afectadas. En España existen muy pocos estudios en los que se incluyen estos géneros (Tellez, 2003; Hidalgo-Vila *et al.*, 2004, 2007 y 2008a).

Los estudios sobre galápagos autóctonos en libertad marcan la dirección de investigación de búsqueda de agentes patógenos, por una parte en el dominio bacteria, se señala con énfasis las enterobacterias, en concreto *Salmonella* (Mallaret, 1990; Hidalgo-Vila, 2009). En Viridae, los *Herpesvirus* son buenos candidatos a colonizar a estos reptiles (Origgi y Jacobson, 2000; Stacy *et al.*, 2008). Respecto a la fauna parasitaria se describe la presencia de helmintos (*Serpinema microcephalus*, *Aplectana* sp., *Falcastrua* sp., *Spiroxys*, *Spironoura* y Capillariidae (Crespo *et al.*, 2002; Hidalgo-Vila *et al.*, 2004) y la presencia de varias especies de *Eimeria* (Segade *et al.*, 2006). La

presencia de sanguijuelas de la familia *Placobdella* en poblaciones de Madrid y Ourense, especialmente en los meses de verano (Ayres y Alvarez, 2008) parecen tener preferencia por colocarse en el plastrón de los ejemplares, aprovechando las uniones entre placas, o las posibles heridas.

Los estudios sanitarios realizados en *Testudo* spp. son muy escasos y señalan la infección por *Salmonella* en *Testudo graeca* (González *et al.*, 2005; Hidalgo-Vila *et al.*, 2007 y 2008b), *Herpesvirus* (Origi *et al.*, 2001), pero no se conocen estudios específicos en *Testudo hermanni hermanni*. Los estudios epidemiológicos de nematodos que afectan a estos quelonios son prácticamente inexistentes (Traversa *et al.*, 2005).

1.3.1.- Bacterias

La vía más frecuente de transmisión de las bacterias que colonizan el tracto digestivo es la vía fecal-oral, pero también se ha descrito la infección a través de mucosas (conjuntiva, respiratoria, etc.), soluciones de continuidad por ejemplo en el caso de *Salmonella* (Quinn *et al.*, 1994). En el caso de los galápagos el agua de las lagunas hace de elemento dispersante de las bacterias de una manera más eficaz que el medio terrestre. Por tanto el agua es un reservorio de estos microorganismos para la infección tanto de galápagos o personas que puedan entrar en contacto con el agua de estas lagunas. La frecuencia de aislamiento de la bacteria refleja la probabilidad de exposición en el hábitat natural, siendo mayor en peces después en reptiles, mamíferos y por último aves (Bardon, 1999).

Salmonella

El reservorio de *Salmonella* (Salmon y Smith, 1885) es, principalmente, el tracto intestinal de animales homeotermos y poiquilotermos. La mayoría de los animales infectados se comportan como excretores subclínicos y, además, puede aislarse ocasionalmente a partir de la sangre y órganos internos de los individuos afectados. La vía más frecuente de infección es la fecal-oral, pero también se ha descrito la infección a través de mucosas (conjuntiva, respiratoria, etc.), soluciones de continuidad (Quinn *et al.*, 1994) y por inhalación (Adesiyun *et al.*, 1998).

Salmonella spp. son patógenos intracelulares facultativos, y de su capacidad de invadir, sobrevivir y replicarse en el interior de las células eucariotas del hospedador depende el éxito de la infección (Ohl y Miler, 2001). En general, en los animales poiquilotermos la infección por *Salmonella* se limita al tracto gastrointestinal sin invasión del tejido intestinal, la ausencia de invasividad de *Salmonella* en el tejido intestinal se debe a la ausencia de folículos linfoides en el intestino y a la incapacidad de la bacteria para la adhesión e invasión de las células intestinales (Pasmans *et al.*, 2003).

La naturaleza de la acción patógena de *Salmonella* depende de numerosos factores, como el serotipo, la cepa, la dosis infectiva, la vía de penetración, la naturaleza del contaminante (alimento, animal, etc.) y el estatus inmunitario del hospedador (Le Minor, 1992; Quinn *et al.*, 1994; Old y Threlfall, 1998). La temperatura juega un importante papel en la patogenia de la enfermedad, estudios realizados en tortugas del género *Trachemys* infectadas experimentalmente, concluyeron que la persistencia y la invasividad tisular de *Salmonella* resultó ser termodependiente. A baja temperatura (26°C) se promovía la adhesión, pero a temperatura elevada (37°C) se promovía la invasión de las células intestinales (Pasmans *et al.*, 2002, Pasmans *et al.*, 2003). Las tortugas terrestres parecen ser las especies menos sensibles a esta enfermedad (Pasmans *et al.*, 2000).

Salmonella es capaz de sobrevivir nueve meses o más en lugares tales como suelos, agua dulce y salada, heces y piensos animales (sobre todo harinas de hueso y sangre de pescado) (Quinn *et al.*, 1994; D'Aoust, 1997). Asimismo, ha sido aislada de diversos tipos de alimentos, principalmente huevos y otros productos de origen animal (Le Minor, 1992; D'Aoust, 1997), aunque también se ha encontrado en frutas y hortalizas destinados al consumo humano (Rampling, 1990; Report. 1993) y son importantes contaminantes de los suplementos proteicos administrados a los animales de abasto (Old y Threlfall, 1998).

Dependiendo del espectro de hospedadores, los serotipos de *Salmonella* se dividen en tres grupos (Uzzau *et al.*, 2000).

- ✎ Restringidos a un hospedador: son aquellos serotipos que se asocian con una única especie, por ejemplo, Typhi (hombre), Gallinarum (gallina), Thyphissuis (cerdo) y Abortusovis (oveja).

- ✎ Adaptados a un hospedador: aquellos serotipos que son prevalentes en una determinada especie, pero que también pueden causar enfermedad en otras, como por ejemplo, Dublin y Choleraesuis, que se asocian generalmente con enfermedad, sistémica en ganado bovino y porcino, respectivamente, pero que también pueden causar enfermedad menos frecuentemente en otros mamíferos incluido el hombre.
- ✎ Ubicuos: son aquellos que aunque son capaces de causar septicemia en un amplio espectro de hospedadores, normalmente sólo inducen gastroenteritis autolimitante a los animales afectados, como Typhimurium y Enteritidis.

La excreción fecal es la fuente más importante de contaminación ambiental y, por lo tanto, con gran repercusión epidemiológica (Morse y Duncan, 1974; Harwood *et al.*, 1999; Baudart *et al.*, 2000).

En el caso de los animales, la eliminación al medio coincide especialmente con situaciones estresantes, como el transporte, diferentes operaciones de manejo, la mezcla de animales de diferentes edades u orígenes, la coincidencia con otras enfermedades, etc. (Le Minor, 1992; Rodríguez *et al.*, 1999). La eliminación de *Salmonella* spp. por parte de los reptiles es moderada, aunque los valores varíen bastante en las diferentes especies y lugares estudiados.

Varios son los estudios de prevalencia de *Salmonella* en diferentes especies de quelonios, obteniéndose resultados muy dispares. En la colección de reptiles del “National Zoological Park” de Washinton de 63 tortugas, sólo dos (3%) fueron positivas a la presencia de la bacteria (Cambre *et al.*, 1980), sin embargo en Puerto Rico el 100% de las tortugas acuáticas de tiendas de mascotas fueron positivas a *Salmonella* (Tauxe *et al.*, 1985). El 21% de los huevos de tortuga de la especie *Trachemys scripta elegans* importados en Canadá eran portadores (D’Aoust *et al.*, 1990). En un estudio del mismo año en dos granjas de *Trachemys scripta elegans* en el sur de Lossiana (EE.UU) se detectaron un 12,4% (23/185) de crías positivas (Shane *et al.*, 1990). En Francia el 10,5 % de 95 animales estudiados eran portadores (Mallaret, 1990). En las Islas Canarias se aisló *Salmonella* en un 17,6% (6/34) en tortugas de las especies *Testudo graeca terrestris* y *Testudo keimanni* (Monzón *et al.*, 1995). En un estudio en Trinidad en el “Emperador Valley Zoo” el 10% (4/40) de las tortugas eliminaban esta bacteria (Gopee

et al., 2000). El 78,5% (106/135) de las tortugas de las especies *Testudo hermanni* y *Testudo graeca* procedentes del “European Centre for Conservation of Chelonians” en la Toscana Italiana fueron positivas a *Salmonella* (Pasmans *et al.*, 2000). En la región de Oslo (Noruega) la comercialización de tortugas acuáticas está prohibida, pero se estimó que hubo unos 10.000 galápagos como mascotas, de las cuales un 90% eliminaban la bacteria en heces (Torfoss y Abrahamsen, 2000). En 2001, el 25,8% (15/58) de los quelonios comercializados tanto en mercados legales como ilegales de Brasil eliminaban *Salmonella* en heces (Sa y Solari, 2001). En Alemania el porcentaje de detección fue menor, de 38 tortugas examinadas, 14 acuáticas y 24 terrestres, solo una fue positiva a este microorganismo, ésta pertenecía a la especie *Testudo hermanni* (Geue y Löschner, 2002). En tortugas acuáticas pertenecientes a diez núcleos, entre tiendas y colecciones privadas de Italia, se determinó una prevalencia del 11,3% (7/62) (Pasmans *et al.*, 2002). Pflieger *et al.* (2003) determinaron una prevalencia del 14% de *Salmonella* en muestras fecales de reptiles y anfibios aclimatados a terrarios y acuaterrarios, 103 y 35 animales respectivamente. En Francia, se realizó un estudio con 52 quelonios, 5 galápagos y 47 tortugas terrestres y el 44% (23/52) fueron positivas a *Salmonella*, todas ellas fueron tortugas terrestres (Strohl *et al.*, 2004). En Japón el 72,2% (13/18) de las tortugas mascotas eliminaban la bacteria (Nakadi *et al.*, 2005). En un estudio realizado por Saelinger (2006) en Norte América con 94 animales pertenecientes a seis especies, no se detectó presencia de *Salmonella*. En el litoral mediterráneo, mediante el aislamiento a partir de cultivos de bilis obtenidos mediante colecistocentesis percutánea ecoguiada se detectó una prevalencia del 66,6% (22/33) en ejemplares de *Trachemys scripta elegans* (Martorell, 2006). La prevalencia de *Salmonella* spp. en *Mauremys leprosa* en el sureste español fue del 9% (5/55), en *Trachemys scripta elegans* en libertad se determinó el 2,7% (1/36) y en la misma especie pero en cautividad fue del 0% (0/23) (Hidalgo-Vila *et al.*, 2008a).

Otras especies bacterianas

Salmonella es la especie con más referencias de aislamiento en quelonios, sin embargo hay especies bacterianas que se han utilizado para estudio del sistema inmunitario de los quelonios o que por sus hábitats naturales pueden colonizar a estos animales y a los que se debe hacer referencia en este apartado. En el primer caso se encuentra *Staphylococcus* (Stegemann, 2009), *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Klebsiella*, *Plesiomonas*, *Vibrio* (Precharram *et al.*, 2008) o *Aeromonas hydrophila* (Merchant *et al.*, 2007). En el segundo caso, se encuentra *Alcaligenes* (Manage *et al.*, 2000), *Proteus* (Stamm, 1999), *Enterobacter* (Sramová *et al.*, 1992), *Edwardsiella* (Ivenson, 1971; Sechter *et al.*, 1983), *Pasterella* (Biberstein y Dwight, 1999), *Streptococcus* (Bibertein, 1990b), etc. De este segundo grupo no se han podido encontrar referencias de aislamiento de las mismas en los quelonios objeto del presente trabajo.

Alcaligenes (Castellani y Chalmers, 1919) se ha aislado en medios acuáticos (Manage *et al.*, 2000) y está ampliamente distribuida en el medio natural, especialmente en nichos oligotróficos acuáticos. Estas bacterias son nutricionalmente muy versátiles, algunas especies pueden usar agentes quelantes del aminopolicarboxilato (p.ej. EDTA) como fuente de carbono, y otros pueden degradar compuestos hidrocarbonados aromáticos, incluyendo benceno y tolueno (Greene *et al.*, 2000; Reinecke *et al.*, 2000). *Alcaligenes* no se ha citado en la literatura como un agente patológico de quelonios, por otra parte *Alcaligenes* es considerado como un microorganismo oportunista y poco habitual como agente patógeno en humanos, aunque se han descrito distintos procesos, principalmente en pacientes inmunodeprimidos, neoplásicos y afectados por el SIDA (Molla *et al.*, 1996). También se han descrito en la bibliografía casos de meningitis (Decré *et al.*, 1992), neumonía (Gradon *et al.*, 1993), sepsis de origen biliar, peritonitis (Cathebras *et al.*, 1994), infecciones del tracto urinario, queratitis (Siganos *et al.*, 1993), osteomielitis (Barton y Hoddy, 1993), artritis y bacteriemia sin foco aparente (Dupon *et al.*, 1993).

Las especies del género *Aeromonas* (Stanier, 1943) forman parte de la microbiota habitual de ecosistemas (Hazen *et al.*, 1978). Han sido halladas tanto en aguas dulces (Kersters *et al.*, 1996; Miranda y Castillo, 1996; Borrell *et al.*, 1998; Goñi-Urriza *et al.*, 1999; Montes *et al.*, 1999; Obi *et al.*, 2003) como en agua marinas

(Dumontet *et al.*, 1996; Okpokwasili y Akujobi, 1996; Borrell *et al.*, 1998; Sechi *et al.*, 2002), en aguas cloradas como en aguas no cloradas, en todo el mundo (Hazen *et al.*, 1978; Kaper *et al.*, 1981; Van der Kooj *et al.*, 1988), así como en aguas embotelladas (Borrell *et al.*, 1998; Sisti *et al.*, 1998; Croci *et al.*, 2001; Ghenghesh *et al.*, 2001; Massa *et al.*, 2001; Biscardi *et al.*, 2002; Villari *et al.*, 2003). Se han aislado tanto en animales de sangre fría como en animales de sangre caliente (Mathewson y Dupont, 1992). *Aeromonas* es también considerada como agente etiológico de variadas patologías en numerosos tipos de animales: peces (Austin y Wilkins, 1998), conejos (Paniagua *et al.*, 1998), perros y gatos (Ghenghesh *et al.*, 1999) e incluso seres humanos (Janda, 2001), localizándose en el aparato digestivo, causando problemas gastrointestinales en individuos sanos o septicemia en individuos inmunocomprometidos.

Escherichia (Castellani y Chamer, 1919) es considerado el principal microorganismo de la flora bacteriana normal de un individuo sano, pero puede ser causa tanto de enfermedades intestinales como extraintestinales, e incluso septicemia (Tannock, 1995; Hirsh, 1990a).

Las cepas de *E. coli* están presentes habitualmente en el tracto gastrointestinal de animales, incluyendo humanos (Kaper *et al.*, 2004). El recuento de colonias se usa como indicador de contaminación fecal en sistemas de aguas potables. Varias pueden ser las fuentes de *E. coli* que contribuyen a aumentar los recuentos de la bacteria en ríos y playas, se pueden incluir a los humanos, animales de granja, animales silvestres, aves acuáticas, mascotas y reservorios ambientales (Ishii *et al.*, 2006, 2007).

La infección por *E. coli*, parece de carácter universal, aunque irregular, pero su prevalencia solamente se conoce con cierto detalle en Estados Unidos, Canadá, Argentina y Europa Occidental, ya que en el resto de países no ha sido estudiada sistemáticamente (Griffin y Tauxe, 1991; Frías, 1996). Diversos autores han estudiado en España la frecuencia de *E. coli* O157:H7 como causante de diarrea y se ha podido demostrar que ésta es muy baja, probablemente entre 0,1 y el 1% de las diarreas estudiadas. Se ha detectado en casos esporádicos (Prats *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1996) y también en brotes epidémicos aunque su número y extensión ha sido muy limitada, el más importante se detectó en Barcelona en 2000 (Prats, 2001). Las cepas de *E. coli* se pueden dividir en tres grupos, las que provocan enfermedad entérica, las que provocan

septicemia y las que provocan enfermedad localizada no entérica, siendo las primeras las más numerosas. Según su mecanismo de acción se han asignado seis categorías, *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* adherente-difusa (ECAD) y *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) (Quinn, 2002).

El hábitat natural de *Plesiomonas shigelloide* (Habs y Schubert, 1962) es el agua dulce, se han recogido de ríos, lagos, estanques y sedimentos de muchos países (Arai *et al.*, 1980; Kelly y Kain, 1991; Medema y Schets, 1993; Schubert y Pelz, 1993a; Schubert y Pelz, 1993b; Aldova *et al.*, 1999). Se han aislado tanto en países tropicales, como en zonas templadas e incluso en países de clima frío como Suecia (Krovacek *et al.*, 2000). La recopilación de la bacteria y/o el crecimiento en el agua depende de la temperatura (Arai *et al.*, 1980; Miller y Koburger, 1986; Medema y Schets, 1993), la disponibilidad de nutrientes y el nivel de contaminación de las aguas residuales (Medema y Schets, 1993). La incidencia estacional es evidente, se presenta en las estaciones cálidas y puede estar ausente durante la estación fría (Cooper y Brown, 1968; Tsukamoto *et al.*, 1978; Arai *et al.*, 1980; Kelly y Kain, 1991). *Plesiomonas* también se ha aislado en agua del mar, pero la supervivencia está limitada a 22-25 h y a 100 m desde el punto de liberación de las aguas residuales (Zakhariev, 1971).

Plesiomonas shigelloides ha sido aislada de un amplio rango de animales de sangre caliente y animales de sangre fría, e incluso en el hombre. La frecuencia de aislamiento de la bacteria refleja la probabilidad de exposición en el hábitat natural, siendo mayor en peces, después en reptiles, mamíferos y por último aves (Bardon, 1999). Es probable que *P. shigelloides* sea parte de la flora intestinal de peces de agua dulce o de otros organismos de agua como reptiles y anfibios. La presencia esporádica en las heces de animales puede ser debida a la colonización seguida de la ingestión de peces, agua o comida contaminada por agua (Van Damme y Vandepitte, 1984). *P. shigelloides* no es considerada como parte de la flora normal de los hombres. El estatus de la bacteria en otros mamíferos se considera como comensal (Arai *et al.*, 1980).

La infecciones en humanos con *P. shigelloides* es a través del agua, tales infecciones muestran la misma estacionalidad que la recolección de organismos de agua dulce, en ecosistemas contaminados por aguas residuales. La infección puede ser

adquirida a través del agua de bebida (Tarabcak y Porazikova, 1973; Tsukamoto *et al.*, 1978; Krovacek *et al.*, 2000), por contacto con agua contaminada o por consumir comida lavada con agua contaminada (Greenlees *et al.*, 1998). El inadecuado tratamiento del agua de bebida fue la fuente de infección de 978 personas en Japón (Tsukamoto *et al.*, 1978). *P. shigelloides* ha sido implicada en la causa de diarrea de personas que practicaban actividades recreativas en el agua (Cabelli, 1978), en el río Mississippi en EE.UU. se describió el caso de un nadador (Soweid *et al.*, 1995).

El pescado, marisco y crustáceos son una fuente importante de infección (Ueda *et al.*, 1963; Hori y Hayashi, 1966; Anon, 1983; Claesson *et al.*, 1984; Downey y Clark, 1984; Marshall *et al.*, 1996). El estudio de un caso control ha puesto de evidencia la relación entre la ingestión de marisco y la falta de tratamiento del agua (Kain y Kelly, 1989) y el consumo de marisco crudo. La ausencia de crecimiento a 5°C y la destrucción por pasterización (60°C a 22 minutos) sugiere que la refrigeración y el cocinado inadecuado contribuyen a la infección de *Plesiomonas shigelloides* (Miller y Koburger, 1986).

La gastroenteritis asociada con la infección de *P. shigelloides* en el hombre puede presentarse como diarrea acuosa, invasiva y colitis disintérica, de cuadro subagudo o crónico desde dos semanas a tres meses (Clark y Janda, 1991). A menudo los estudios señalan como causa de la enfermedad la producción de la enterotoxina pero las conclusiones clínicas sugieren que la enteroinvasión puede ser más significativa. El potencial patógeno de *P. shigelloides* es bajo, lo que se traduce en una baja incidencia de la enfermedad tanto en humanos como en animales (Holmberg *et al.*, 1986; Kain y Kelly, 1989).

Proteus (Hauser, 1885) está ampliamente distribuido en el agua, en el suelo y ocasionalmente en la comida, y puede formar parte de la flora normal del hombre y de otros animales (Stamm, 1999). *P. mirabilis* y *P. penneri* fueron aisladas con mayor frecuencia en pacientes con diarrea que en pacientes sanos, sin embargo su verdadero rol en la diarrea no se conoce (Müller, 1986).

P. mirabilis ha estado implicada en bacteriemias (Berger, 1985; Watanakunakorn y Perni, 1994), en meningoencefalitis neonatal (Grahquist *et al.*,

1992), empiema (Isenstein y Honig, 1990) y en osteomielitis (Marx *et al.*, 1988). *P. penneri* ha estado implicada en casos de bacteriemia y abscesos subcutáneos en pacientes con leucemia linfocítica aguda (Ewing, 1962) y en urosepsis nosocomial en pacientes diabéticos. También se ha sugerido que *P. mirabilis* juega un papel importante en la artritis reumatoide (Wilson *et al.*, 1997). Una complicación frecuente en la cateterización del tracto urinario es la infección por *P. mirabilis* (Mobley y Warren, 1987; Stickler *et al.*, 1993). El papel de éste como patógeno nosocomial ha sido descrito en varias ocasiones (Luna *et al.*, 2005), existiendo un único caso de infección comunitaria por éste germen (Córdoba *et al.*, 2005).

Las especies del género *Klebsiella* (Trevisan, 1885) se presentan de manera ubicua en la naturaleza, probablemente tiene dos hábitats comunes: el medio ambiente, en el cual se halla en aguas superficiales, residuales, en el suelo, sobre las plantas, y las superficies mucosas de mamíferos. En humanos portadores *K. pneumoniae* se encuentra en las vías respiratorias superiores y en el tracto intestinal. Como patógenos oportunistas que son, las especies del género *Klebsiella* infectan principalmente a individuos inmunocomprometidos que se hallan hospitalizados y padecen severas enfermedades subyacentes, como pueden ser la diabetes mellitus o la obstrucción pulmonar crónica. Las infecciones nosocomiales por *Klebsiella* son causadas principalmente por *Klebsiella pneumoniae*, la especie más importante del género desde el punto de vista médico y están asociadas a una alta morbilidad y mortalidad. Se estima que el género *Klebsiella* es el responsable del 8% de las infecciones nosocomiales bacterianas en los Estados Unidos y en Europa, lo cual la sitúa entre los ocho patógenos infecciosos más importantes en hospitales. *Klebsiella pneumoniae* causa, principalmente, infecciones del tracto urinario y neumonías, y es el segundo agente causal, tras *E. coli*, de septicemias nosocomiales por bacterias Gram-negativo (Podschun y Ullmann, 1998).

Enterobacter (Hormaeche y Edwards, 1960), usualmente, se encuentra formando parte de la microbiota intestinal del hombre y/o animales sin ninguna enfermedad manifiesta, o bien puede colonizar las diferentes mucosas, en especial las del tracto gastrointestinal y urinario, ocasionando por tanto las infecciones a partir de estas localizaciones (neumonía, septicemia, meningitis, abscesos abdominales además de infecciones urinarias) (John *et al.*, 1982). Las infecciones por *Enterobacter* pueden

ser adquiridas tanto de fuentes endógenas como exógenas. Esto no es sorprendente debido a la ubicuidad del microorganismo, se han encontrado en heces humanas, en animales, en agua, en plantas, en insectos y en productos lácteos (Sramová *et al.*, 1992; Shanahan *et al.*, 1993). Informes de la *National Nosocomial Infections Surveillance System* (NNIS) pusieron en evidencia que representantes del género *Enterobacter* causaban el 11,2% de los casos de neumonía de pacientes en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), ocupando el tercer lugar después de *Staphylococcus aureus* (18,1%) y *Pseudomonas aeruginosa* (17%). Las tasas correspondientes en las UCI de los pacientes pediátricos fueron 9,8% para la neumonía, 6,8% de infecciones del torrente sanguíneo, y el 9,5% para las infecciones urinarias (NNIS, 1997, 1999, 2004). Una peculiaridad añadida a las infecciones nosocomiales de *Enterobacter* es la resistencia que presenta a las cefalosporinas, beta-lactámicos, aminoglucósidos, trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SMZ) y las quinolonas entre otros (Mensa, 2004).

El género *Providencia* (Ewing, 1962) está muy relacionado con el género *Proteus*, de hecho la existencia del género como tal fue muy discutida durante las décadas de los cincuenta y sesenta, pero en la actualidad ya se considera un grupo con entidad propia (O'Hara *et al.*, 2000). *Providencia*, en concreto *P. alcaligenes* ha estado relacionado en el pasado con organismos que causan brotes de diarrea (Singer y Bar-Cahy, 1954; Sen, 1962) y más recientemente se ha relacionado como un agente etiológico con la diarrea del viajero. Haynes y Hawkey encontraron una incidencia mayor de esta bacteria en pacientes con diarrea que en pacientes sanos, particularmente en niños (Haynes y Hawkey, 1989). Otras especies de *Providencia*, como *P. stuartii*, se ha puesto de evidencia que son patógenos oportunistas en humanos, en particular en pacientes con catéteres urinarios o en pacientes con quemaduras extensas, pero no se conocen estudios epidemiológicos al respecto (Mino *et al.*, 1997; Arslan *et al.*, 1999).

Edwardsiella tarda (Ewing y McWhorter, 1965) ha sido aislada en aguas (Sechter *et al.*, 1983), así como en serpientes, galápagos (Ivenson, 1971), ranas (Sharma *et al.*, 1974), gaviotas (Berg y Anderson, 1972), leones marinos y aligátores (Wallace *et al.*, 1966) y en suidos (Owens *et al.*, 1974), e implicada en enfermedades humanas: gastroenteritis (Altmann y Racz, 1970), bacteriemia e infecciones de heridas (Jordan y Hadley, 1969), peritonitis (Clarridge *et al.*, 1980), meningitis (Sacks *et al.*, 1974). La

infección por *Edwardsiella* es endémica en el sudeste de Estados Unidos, donde existe una cría intensiva del bagre de canal o peces gatos (orden Siluriformes). Pero también se han descrito algunos brotes en otras regiones, como por ejemplo en el sudeste de Asia. La enfermedad se produce principalmente cuando la temperatura del agua oscila entre 18°C y 28°C. El estrés, por hacinamiento por ejemplo, es a menudo un factor predisponente (Hanson, 2000).

Morganella (Fulton, 1943) forma parte de la flora fecal habitual aunque también se puede encontrar en la tierra y en las aguas residuales. Suele actuar como agente patógeno oportunista siendo responsable de infecciones del tracto urinario, de la vesícula biliar e infecciones de heridas, a menudo se presenta en forma de brotes de infección nosocomial (Eisntein, y Watkins, 1998). Varios son los factores de riesgo asociados a infección por *M. morganii* entre los que destacan la edad avanzada, la presencia de enfermedades graves subyacentes, los antecedentes de hospitalización, el uso reciente de antibióticos y sobre todo enfermos inmunocomprometidos (McDermott y Mylotte, 1984; Kim *et al.*, 2003).

El género ***Vibrio*** (Pacini, 1854) forma parte de la microbiota de los ecosistemas acuáticos, tanto de aguas saladas como de aguas dulces, en las que a menudo se encuentra asociado como comensal a diversos organismos acuáticos. Se ha descrito que puede adherirse a la quitina de los caparazones de algunos crustáceos y puede colonizar las superficies de algas, fitoplancton, copépodos y raíces de plantas acuáticas (Colwell y Huq, 1994; Faruque *et al.* 1998). La adquisición de factores de virulencia por parte de algunas de estas cepas las capacita para colonizar la mucosa del intestino delgado humano, en donde persisten, se multiplican y producen la toxina causante del cólera (Kaper *et al.*, 1995). El hombre es el único hospedador conocido de *V. cholerae*, aunque se postula de la existencia de reservorios ambientales, donde los vibriones permanecerán en estado latente. También se ha postulado que los cambios climáticos marcarían el inicio de una serie de eventos concatenados, como el incremento de la temperatura del agua, de la concentración de nutrientes y de la población de plancton, que se han asociado con el aumento del número de casos de cólera (Colwell, 1996). La forma de contagio de *Vibrio* spp. es por ingestión oral de agua o alimentos contaminados con heces y/o vómitos de enfermos o portadores. Los estudios con voluntarios humanos han sido útiles para definir el porcentaje de bacterias que se debe

de ingerir para padecer la enfermedad. Se ha demostrado que la administración oral de 10^{11} bacterias a voluntarios sanos, rara vez produce signo alguno de infección, pero tras la neutralización del pH ácido del estómago con bicarbonato, se produce la enfermedad con 10^4 bacterias. Por tanto, el pH del estómago es un importante mecanismo de defensa inespecífico contra *V. cholerae* (Farfán, 2002).

Las especies del género *Pseudomonas* (Migula, 1894) se encuentran ampliamente distribuidas por la naturaleza, tanto en medios sólidos como líquidos, dada su capacidad para sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables (Hirsh, 1990b). Las infecciones por *Pseudomonas* spp. tienen gran interés por su alta frecuencia y resistencia antimicrobiana. La mayor parte de estas infecciones están producidas por *Pseudomonas aeruginosa* y afectan fundamentalmente a pacientes inmunodeprimidos y hospitalizados, es un patógeno oportunista (Cuberos *et al.*, 1998). En *Pseudomonas* no existe una correlación entre clones y hábitat, sino que los clones dominantes están distribuidos tanto en hábitat clínicos como en ambientales. Además, los aislados clínicos y ambientales de clones de *P. aeruginosa* no pueden diferenciarse por sus propiedades genotípicas ni quimiotaxonómicas, y son funcionalmente equivalentes en características relevantes para la virulencia y en la capacidad de colonizar, y de vivir en los diversos ambientes. Este hecho podría ser debido a la versatilidad de la especie, que le confiere la capacidad de colonización de múltiples nichos ecológicos, sin especialización. La importancia de *P. aeruginosa* como patógeno nosocomial radica también en su relativa resistencia a los antisépticos y antimicrobianos. Todo esto determina que sea frecuente aislar estas especies formando parte de la flora de pacientes hospitalizados, sobre todo colonizando el tracto respiratorio en pacientes intubados. En la transmisión del microorganismo de un paciente a otro interviene de forma importante el personal sanitario colonizado (Ruíz-Martínez, 2007).

Pasteurella multocida (Trevisan, 1887) coloniza el tracto gastrointestinal y respiratorio de una gran variedad de mamíferos y aves, que constituyen su principal reservorio (Holst *et al.*, 1992). Las mucosas de las especies susceptibles son el reservorio del género *Pasteurella* y puede ser diseminado a otros hospedadores, pudiendo ser un hospedador reservorio para otro hospedador más susceptible (Biberstein y Dwight, 1999). Generalmente, la infección se adquiere por la inoculación directa por contacto con secreciones de animales (Holmes *et al.*, 1999). No se ha

documentado transmisión persona a persona ni transmisión por el agua o los alimentos contaminados (Weber *et al.*, 1984).

Las infecciones de *Staphylococcus aureus* (Rosenbach, 1884) son cada vez más frecuentes en todo el mundo (Laupland, 2003; Grundmann *et al.*, 2006; Lescure, 2006), al igual que las infecciones por *Staphylococcus* coagulasa negativo que han aumentado en las últimas décadas (Molinos, 2009). Las especies coagulasa positiva como *S. aureus* y *S. intermedius* colonizan los conductos nasales distales, las coanas y la piel. Especialmente cerca de los bordes mucocutáneos como la zona perianal, la genitalia externa, también se pueden encontrar de paso por el tracto gastrointestinal (Quinn *et al.*, 2002). Las especies coagulasa negativa, especialmente *S. epidermidis*, son predominantes en la microbiota normal de la piel, pero también colonizan el tracto respiratorio superior (Biberstein, 1990a). Las enfermedades por *Staphylococcus* (p.ej. pioderma, otitis externa, infecciones de heridas y del tracto urinario) surgen a menudo endógenamente. Los estudios en humanos sugieren una amplia colonización pocas horas después del nacimiento. La aparición de las infecciones clínicas está determinada por factores del hospedador. Los individuos proclives a las infecciones estafilocócicas son los recién nacidos, hembras en lactancia, enfermos crónicos, los que presentan afecciones cutáneas o incisiones quirúrgicas y los inmunodeprimidos, ya sea por el uso de corticosteroides, radioterapia, fármacos inmunodepresores o medicaciones anticancerosas. *Staphylococcus* es un importante patógeno tanto nosocomial como comunitario, siendo capaz de infectar distintos tejidos y órganos, causando patologías que a veces son extremadamente graves y en algunos de los cuadros clínicos pueden estar implicados un amplio espectro de factores de virulencia (Dinges *et al.*, 2000; Mandell *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2001; Von Eiff *et al.*, 2001; Peacock *et al.*, 2002).

Las especies del género *Streptococcus* (Rosenbach, 1884) de interés veterinario pueden vivir de forma comensal en la parte superior del aparato respiratorio, en el tracto digestivo y en el trato genital, siendo la transmisión por inhalación, ingestión o por contacto sexual. La transmisión también puede ser de forma congénita o mediante fómites (Biberstein, 1990b). A este microorganismo se le ha identificado como el agente causante de la neumonía, el neumococo es un patógeno humano responsable no sólo de la neumonía, sino de enfermedades como meningitis y bacteriemias, y con altas tasas de mortalidad y morbilidad. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la

neumonía es actualmente la cuarta causa de mortalidad en el mundo y el neumococo, en concreto, es el agente causal de entre el 10 y el 25% de los casos (Sahn, 1990). Además de infecciones invasivas graves, puede producir otitis media y sinusitis. Coloniza las vías altas del sistema respiratorio y, más concretamente, la nasofaringe desde los primeros días de vida. Se considera, por tanto, que cualquier individuo ha estado colonizado por neumococo en alguna etapa de su vida. La frecuencia de portadores puede cambiar de unas zonas geográficas a otras dependiendo de muchos factores (edad, ambiente, estación del año, etc.) y se ha estimado que más del 60% de la población puede ser portadora (Austrian, 1986).

1.3.2.- Virus- *Herpesvirus*

Pocas son las referencias encontradas de virus en quelonios, pero éstas mencionan a los *Herpesvirus*. La familia *Herpesviridae* contiene más de 100 virus, han sido aislados en peces, anfibios, reptiles, aves, mamíferos incluidos el hombre e incluso en invertebrados, en ostras (Ardans, 1990). Los *Herpesvirus* son de especial importancia por su amplia repercusión, su diversidad evolutiva, su implicación en importantes enfermedades de animales domésticos y el hombre.

Los *Herpesvirus* entran dentro de la célula eucariota fusionándose a la membrana citoplasmática y la replicación ocurre en el interior del núcleo de la célula. La envoltura procede de la membrana nuclear de la célula infectada e incorpora al menos ocho glicoproteínas virales. Los viriones se acumulan en el retículo endoplasmático hasta el final del procesado de las glicoproteínas en el complejo de Golgi para posteriormente realizar la exocitosis. La infección activa provoca la muerte de la célula. Las inclusiones intranucleares son características de las infecciones de *Herpesvirus*.

La extensión de la infección viral ocurre a través de puntos de contacto con las células sin estar expuestos a los anticuerpos neutralizantes del virus en sangre o en fluidos intersticiales. La respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos va dirigida a las glicoproteínas de la envuelta.

Los *Herpesvirus* son frágiles y sensibles a detergentes y a solventes lipídicos, por tanto son muy inestables en el medio ambiente (Quinn, 2002).

Los *Herpesvirus* de quelonios están relacionados con la subfamilia *Alphaherpesvirinae* (Quackenbush *et al.*, 2001). Tanto los *Herpesvirus* que infectan a galápagos como los que afectan a tortugas están muy relacionados e incluidos dentro de la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, (*Chelonia Herpesvirus*, ChHV) relacionados evolutiva y genéticamente con *Archosauria* (aves y crocodileos) y *Lepidosauria* (serpientes e iguanas) (McGeoch y Gatherer, 2005). Los *Herpesvirus* de quelonios causan letargia, anorexia, rinitis, conjuntivitis, glositis, estomatitis y presentan una alta morbilidad y mortalidad, siendo *Testudo hermanni* la especie más susceptible comparada con otras especies del género (Hunt, 2006). El 25% (16/63) de tortugas del género *Testudo* con un rinitis-estomatitis de los centros de recuperación de fauna silvestre de Barcelona y Alicante, fueron positivas a *Herpesvirus* (ChHV) (Salinas *et al.*, 2011). Hasta donde hemos sido capaces de conocer no existen referencias respecto a la prevalencia de estos *Herpesvirus* en *Trachemys scripta elegans*.

1.3.3.- Parásitos

1.3.3.1.- Protozoos

Pocas veces se ha denunciado la infección de protozoos en quelonios, y en las ocasiones que se ha realizado han sido las especies del género *Eimeria* (Schneider, 1875). El género *Eimeria*, perteneciente a la familia Eimeriidae, phylum Apicomplexa, infecta frecuentemente a vertebrados, se han descrito más de 120 especies del género que parasitan a reptiles (Barnard y Upton, 1994). Casi todas las infecciones en la naturaleza son autolimitantes aunque la coccidiosis puede causar alta mortalidad en condiciones de cautiverio (Barnard y Upton, 1994). Los ooquistes del género *Eimeria* se caracterizan por ser de pared delgada, esféricos o subsféricos que contienen cuatro esporoquistes con dos esporozoítos cada uno de ellos. Los esporoquistes son débilmente positivos a la tinción de PAS, y los esporozoítos son teñidos fuertemente en la tinción de Zielh-Neelsen y a la tinción de Gram (Helke *et al.*, 2006).

El **ciclo biológico** es directo, con transmisión fecal-oral. Usualmente las especies de *Eimeria* presentan predilección por tejidos específicos, la infección está limitada al epitelio del intestino o al órgano específico (McCully *et al.*, 1970). En la clase Reptilia, las infecciones más frecuentes son en el tracto gastrointestinal, la lámina propia del intestino, seguida de la vejiga, conductos biliares y el hígado (Levine, 1988). Solo ocasionalmente se han registrado infecciones en otros sitios, tales como el bazo o riñones (Levine, 1988; Barnard y Upton, 1994; Helke *et al.*, 2006).

Las especies de coccidios que se han hallado en *Trachemys scripta elegans* son: *Eimeria chrysemydis*, *Eimeria graptemydos*, *Eimeria lutotestudinis*, *Eimeria marginata*, *Eimeria mitraria*, *Eimeria pseudogeographica*, *Eimeria scriptae*, *Eimeria stylosa*, *Eimeria trachemydis* (Duszynski *et al.*, 2008). En la familia Testudinidae, en concreto en *Geochelone* spp. se han hallado ooquistes de las especies *Eimeria amazonensis*, *E. carbonaria*, *E. carajasensis*, *E. wellcomei*, e *Isospora rodriguesae*, pero no constan en la bibliografía trabajos respecto a *Testudo hermanni hermanni* (Laison *et al.*, 2008).

A pesar de ser poco común, la diseminación de coccidiosis en quelonios ha sido descrita en alguna ocasión, por ejemplo *Caryospora cheloniae* ha sido señalada como causa de muerte epizootica, transmitida al manipular recién nacidos y en individuos subadultos de galápagos *Chelonia mydas* (Leibovitz *et al.*, 1978; Gordon *et al.*, 1993).

En España se han descrito especies del género *Eimeria* en el galápagos europeo (*Emys orbicularis*) en Galicia (Segade *et al.*, 2006), pero no se han encontrado citas al respecto de las dos especies que son objeto de estudio en el presente trabajo.

1.3.3.2.- Helmintos

Respecto a helmintos que parasiten a quelonios, en concreto a *Tachemys scripta elegans*, y *Testudo hermanni hermanni*, se postula que siguen el patrón estándar del grupo al cual pertenecen, pero en muchos casos no se conoce con exactitud el ciclo biológico, sobre todo los helmintos de ciclo indirecto con hospedadores intermediarios. Por ejemplo el trematodo *Telorchis* (Lühe, 1899) perteneciente a la familia Telorchidae (orden Plagiorchiida) parásito de *Trachemys* (figura 5), se postula que elimina huevos con un miracidio en el interior, que es ingerido por un molusco acuático donde el

miracidio se convierte en una redia en lugar del esporocisto, y que la cercaria abandona el molusco para enquistarse en larvas de odonatos y hemípteros (Cheng, 1978). Pero existen pocos estudios para corroborar o refutar el ciclo propuesto, uno de ellos es el realizado en moluscos del lago Chicahuapan, en el estado de México, en el cual se han encontrado cinco cercarias de *Telorchis corti*, tres en *Lymnaea stagnalis* y dos en *Physella cubensis*, en más de 1000 gasterópodos estudiados (Barragán-Sáenz *et al.*, 2009).

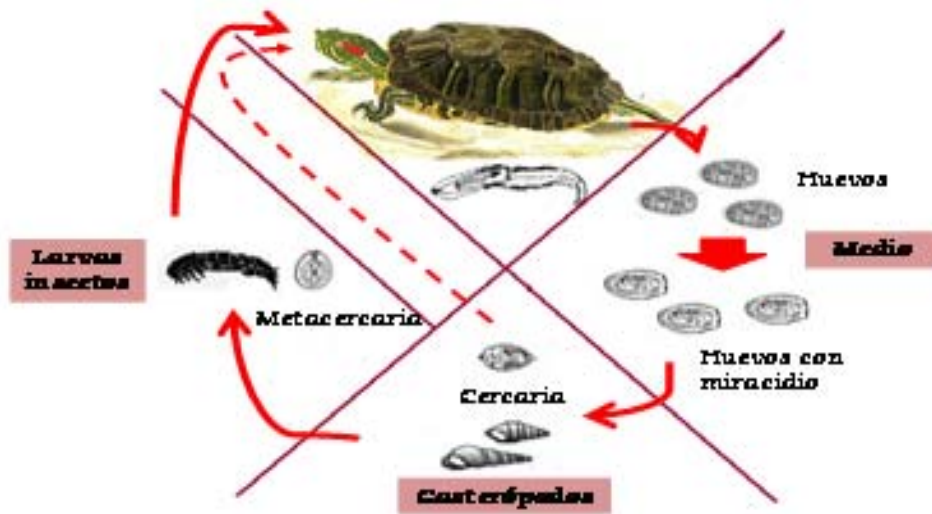


Figura 5.- Ciclo biológico del género *Telorchis* (Lühe, 1899).

El

ciclo biológico de los nematodos que utilizan hospedadores intermediarios, no se conoce con exactitud. Se han localizado larvas de tercer estadio (L_3) (que es la forma infectante) en diferentes invertebrados y vertebrados inferiores (peces y anfibios). Del orden Spirurida se han descrito dos nematodos que parasitan a los galápagos, *Serpinema* (Yeh, 1960; familia Camallaninae; figura 6) y *Physaloptera* (Rudolphi, 1819; familia Spiruroidea; figura 7), del primero se han encontrado L_3 en copépodos que intervienen como hospedadores intermediarios, peces y anuros que intervendrían como hospedadores paraténicos (Moravec *et al.*, 1998a) al igual que en ranas de la familia Hylidae, *Lysapsus limellum* en Sudamérica (González y Hamann, 2007). Del segundo (*Physaloptera*), que libera huevos larvados en lugar de larvas de primer estadio (L_1) como *Serpinema*, se han encontrado L_3 en dermápteros, ortópteros e incluso anfibios aunque no se ha precisado todavía de qué manera se han infectado (Anderson, 2000).

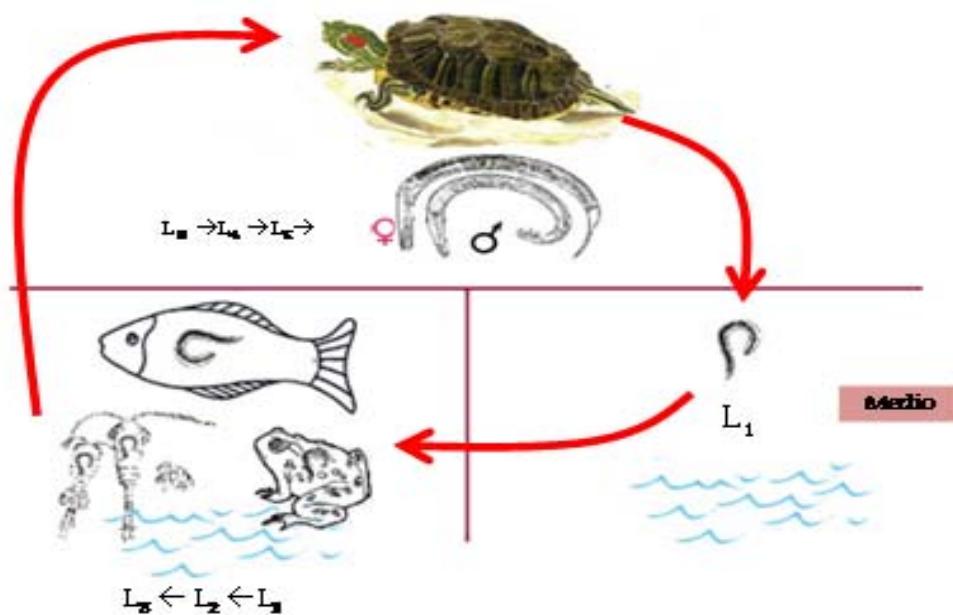


Figura 6.- Ciclo biológico de las especies de *Serpinema* (Yeh, 1960).

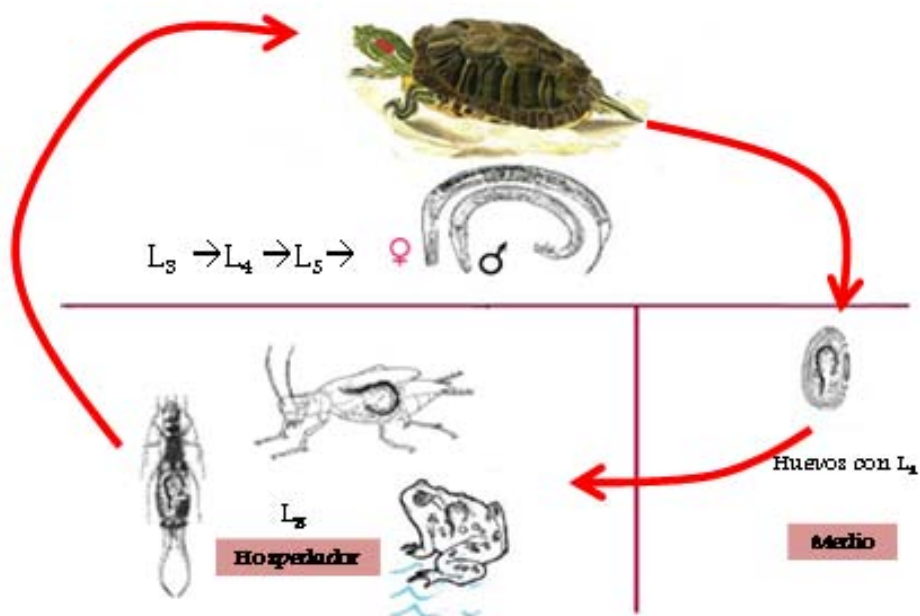


Figura 7.- Ciclo biológico de las especies de *Physolaptera* (Rudolphi, 1819).

La literatura cita dos nematodos más que parasitan a los galápagos, *Falcaustra* (Lane, 1915; familia Kathaniidae; figura 8) y *Aplectana* (Railliet y Henry, 1916; familia Cosmocercida; figura 9), ambos del orden Ascaridida, pero con dos ciclos biológicos diferentes. En Canadá se encontraron L₃ en el caracol *Lymnaea stagnails* (Bartlett y Anderson, 1985), en Vietnam se han encontrado en peces de agua dulce (Sey y Movarec, 1986), así como también en Texas (Moravec *et al.*, 1995a) y en la península del Yucatán en México (Moravec *et al.*, 1995b). Estos peces pertenecen a los órdenes Perciformes, Cypriniformes y Siluriformes. Todos estos hallazgos tienen en común que no se conoce con exactitud el papel de los invertebrados ni de los peces en el ciclo. Para el género *Aplectana* se supone un ciclo biológico directo cuya forma infectante serían los huevos larvados con la L₃ en el interior (Golberg y Bursey, 2002).



Figura 8.- Ciclo biológico de las especies de *Falcaustra* (Lane, 1915).

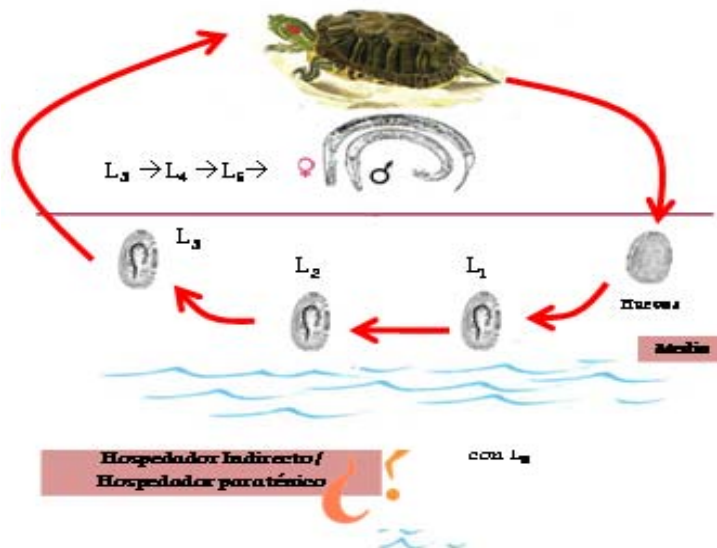


Figura 9.- Ciclo biológico de las especies de *Aplectana* (Railliet y Henry, 1916).

Se han dedicado varios estudios a la sistemática de los oxiúridos de las tortugas paleárticas (Seurat, 1918; Thapar, 1925; Dubinina, 1949; Petter, 1961, 1966). A principios de la década se han citado cuatro géneros de la familia Pharyngodonidae (*Tachygonetria*, *Mehdiella*, *Alaeuris* y *Thaparia*) (Bouamer y Morand 2000, 2002, 2003, 2004, 2005; Boumaer *et al.*, 2001a, 2001b, 2003). La mayoría de los estudios realizados sobre estos oxiúridos son meramente descriptivos y, en comparación con otros grupos, existen pocos datos sobre su biología. Esto puede deberse en parte a la ausencia en el grupo de patógenos importantes para el hombre o los animales domésticos. Por otra parte, la sospecha de los primeros autores como Galeb (1878), confirmada por los trabajos de Dobrovolny y Ackert (1934), de un ciclo biológico directo, ha restado interés frente al estudio de la biología de otros parásitos con ciclos biológicos indirectos (Ruíz-Sánchez, 1996).

Los Oxyurida son nematodos parásitos del intestino posterior de numerosas especies de invertebrados y vertebrados, los parásitos se alimentan de la materia fecal. El ciclo biológico es directo (Anderson 1988) habla de una ‘monoxenia primaria’ ya que no parece que hayan existido hospedadores intermediarios para este grupo en el curso de la evolución. El estadio infectante se encuentra en un huevo que pasa al exterior con las heces o es depositado en la región perianal del hospedador. La transmisión es por contaminación oral, también se produce la autoinfección, los huevos son puestos y eclosionan en la parte final del aparato digestivo (Ruiz-Sánchez, 1996) Al igual que el resto de nematodos, pasan por cinco estados separados por cuatro mudas (Maupas, 1899). Generalmente, las dos primeras mudas ocurren en el huevo antes de la ingestión por el hospedador, pero Adamson (1989) cita algunas excepciones en las que la segunda muda tendría lugar justo después de la ingestión, aunque siempre antes de la eclosión. Las dos últimas mudas se producen fuera del huevo, en el intestino del hospedador. La eclosión de los huevos tiene siempre lugar dentro del hospedador. En el interior del intestino se dan las condiciones adecuadas para estimular la secreción, por parte de la larva, de enzimas que atacan la cubierta, produciéndose una abertura por la que sale.

Los huevos de los oxiúridos son particularmente sensibles a la baja humedad (Geller, 1944; Anya, 1966) y no son tan resistentes a las condiciones adversas como los de otros nematodos. Esto implica una pobre dispersión de los mismos que,

generalmente, depende de la eliminación del hospedador en el tiempo y en el espacio (Adamson, 1989).

1.3.3.3.- Hirudineos

El género *Placobdella* (Blanchard, 1893) es un hirudineo de la familia Glossiphoniidae que consta de diez especies (www.itis.gov). Este hirudineo es un ectoparásito de quelonios y se suele situar entre las placas del plastrón. Nunca se ha encontrado directamente sobre el cuerpo o en el caparazón. La acción parásita es directa, expolia nutrientes del hospedador debilitando al mismo (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). En España se han encontrado en la provincia de Madrid y en Orense parasitando al galápagos europeo (*Emys orbicularis*) pero no sobre *Trachemys scripta elegans* (Ayres y Alvarez, 2008).

1.4.- Implicación del estatus sanitario de quelonios en Salud Pública

Al igual que el estado sanitario de los animales que forman un ecosistema es importante para cada uno de ellos, para la población humana es importante el estado sanitario de los animales que están en su entorno. Desde los animales que forman parte de la dieta hasta los animales de parajes colindantes a poblaciones, pasando por los animales que conviven diariamente con las personas y las mascotas. Los animales objeto del presente estudio pueden formar parte de ecosistemas o ser mascotas, esto último de manera ilegal.

Trachemys scripta esta frecuentemente infectada por bacterias del género *Salmonella*. En Estados Unidos y Canadá se demostraron varios casos de transmisión de salmonelosis a humanos procedentes de ejemplares de *Trachemys scripta elegans* como mascotas, lo que llevó a la prohibición de su venta en el territorio (Bringsøe, 2002). En 2008 los departamentos de Salud Pública de Philadelphia y Pensilvania en Estados Unidos notificaron un brote de salmonelosis asociado a galápagos. El Centro de Control de Enfermedades (CDC) realizó una investigación al respecto, hallando 135 casos en 25 estados. El grupo más afectado era el de los niños de menos de cinco años (CDC, 2010).

Sin embargo en Europa tales casos son extraños. La razón de esta diferencia es desconocida, pero posiblemente los propietarios de estas mascotas tengan diferentes comportamientos con ellas (Bringsøe, 2002).

Es desconocido o prácticamente desconocido lo que ocurre en las tortugas invasoras en libertad en Europa, se cree que pueden transmitir salmonelosis y otros patógenos a humanos, pero sin embargo no se han documentado tales casos (Bringsøe, 2002).

Respecto a *Testudo hermanni hermanni* no conocemos que se haya documentado hasta la fecha ningún caso de salmonelosis en el que esta tortuga fuera la fuente de infección, posiblemente por el escaso número de ejemplares que existen, a lo que se une que su tenencia como mascota está prohibida.

2.- OBJETIVOS

Detección de los agentes zoonóticos de importancia en Salud Pública, presentes en la especie *Trachemys scripta elegans*, de los marjales de la Comunidad Valenciana.

Identificar los agentes patógenos presentes en los galápagos *Trachemys scripta elegans* de los marjales de la Comunidad Valenciana que pudieran representar un peligro para la salud de los galápagos autóctonos y de otras especies protegidas del mismo hábitat.

Identificar los agentes patógenos presentes en las tortugas *Testudo hermanni hermanni* que pudieran hacer peligrar la viabilidad de esta especie protegida en su reintroducción en los marjales de la Comunidad Valenciana.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- *Trachemys scripta elegans*

El presente trabajo se corresponde con un diseño descriptivo en el cual se pretende identificar los agentes microbianos, víricos y parasitarios que se encuentran en el quelonio *Trachemys scripta elegans* en la Comunidad Valenciana.

3.1.1.- Zona de estudio

En el año 2008 la *Conselleria de Medi Ambient, Aigua, Urbanisme i Habitatge*, actuó en diversos parajes de la Comunidad Valenciana para el control de galápagos exóticos: marjal de Peñíscola, marjal de Almenara y Estanque de Nules en la provincia de Castellón, y marjal de Rafalell y Vistabella, marjal de los Moros, marjal de La Safor, y Bassa de S. Llorens en la provincia de Valencia. En estos humedales conviven los galápagos exóticos *Trachemys scripta elegans* con los autóctonos *Emys orbicularis* y *Mauremys leprosa*. El presente trabajo se centrará en los núcleos poblacionales de este territorio.

3.1.2.- Selección de la muestra

Durante el periodo comprendido de julio a octubre de 2008 se tuvo acceso a 105 galápagos de la especie *Trachemys scripta elegans*, gracias a un acuerdo entre la *Conselleria de Medi Ambient Aigua i Habitatge* y la Universidad CEU Cardenal Herrera (UCH-CEU). Noventa y nueve animales procedían de poblaciones en libertad, animales que se habían introducido en hábitats naturales no propios de la especie. De ellos 32 procedían de la población del marjal de Peñíscola en Castellón, 25 del marjal de Almenara, también en Castellón y 42 del marjal de La Safor-Gandía en Valencia. Tan solo seis animales procedían de particulares que los habían depositado en el Centro de Recuperación de Fauna Salvaje “La Granja” en el Saler (Valencia).

Los animales de las poblaciones libres se capturaron por el personal de la *Conselleria*, mediante trampas y fueron transportados individualmente en cajas de plástico con agua de la laguna hasta la sala de necropsias de la Facultad de Veterinaria de la UCH-CEU en menos de 24 horas.

Para la captura de los galápagos se utilizaron nasas de pesca de anguila, que en el territorio se denominan *mornells* (figura 10) y trampas flotantes (figura 11).

Las **nasas** están formadas por una manga de red de 2 m de longitud y 15 mm de luz de malla, ahuecada mediante una serie de anillos de diámetro variable. Estos anillos conforman pequeños embudos también denominados “muerte”, hechos con el mismo tipo de malla, de tal manera que facilitan la entrada de los galápagos, pero dificultan su salida. Asimismo, para aumentar la eficacia de la trampa, en la entrada o boca de la nasa se coloca una red-paradera, o pantalla, de 1 m de longitud.

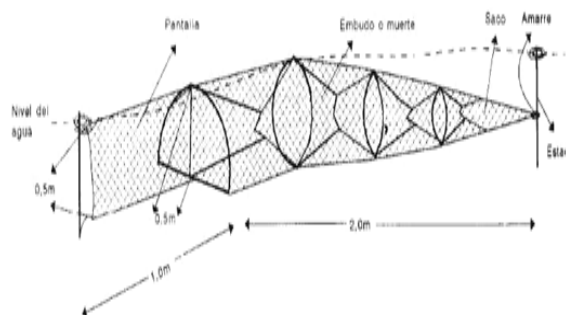


Figura 10.- Nasas de captura.

Para la captura de estos ejemplares, se colocaron las nasas bien tensadas y apoyadas sobre el fondo del humedal. Deben mantener la entrada de la primera muerte totalmente sumergida y la parte superior de las demás por encima del agua para evitar el ahogamiento de los animales con respiración pulmonar que puedan capturarse. Tanto la vela como el extremo final de la última muerte o embudo se ataron firmemente a estacas clavadas en el fondo, de forma que no se hundan o suelten. Si fuera necesario, para asegurar que la parte superior de las muertes o embudos queden por encima de la superficie del agua, se colocaron flotadores dentro de los embudos o las muertes. En este sentido, es conveniente colocar la última muerte orientada hacia las orillas o zona más somera y la vela hacia la zona más profunda de la laguna. Las nasas se situaron en zonas cercanas a manchas de vegetación, o en pasos entre islas o grupos de vegetación y, preferentemente, a una profundidad no menor de 20 cm ni mayor de 50 cm. Se dejaron actuar durante 24 horas en cada punto.

Por otro lado, las **trampas flotantes** se han concebido específicamente para la captura selectiva de galápagos. Este sistema se compone de un cuadro hecho de tubos de PVC que le permite flotar. Éste sostiene una red de pesca, de malla no superior a 15 mm de luz, cerrada por abajo. Por la parte superior lo atraviesa una tabla de madera de un metro de



Figura 11.- Trampas flotantes para galápagos.

longitud y de sus extremos salen dos tablitas de 40 cm a modo de rampas flotando en el agua. Este sistema revela ser selectivo ya que sólo es aprovechado por animales poiquiloterms para los baños de sol. Se suben por las rampas y llegan a la tabla superior, lo más probable es que caigan dentro del marco quedando presas dentro de la red cuando quieran volver al agua.

3.1.3.- Selección de los núcleos

De los marjales que habitan estos galápagos en la Comunidad Valenciana se eligieron tres: el marjal de Peñíscola (Castellón), marjal de Almenara (Castellón) y el marjal de La Safor-Gandía (Valencia), ya que son las poblaciones más numerosas y por tanto con mejor eficiencia de trampeo. También se muestrearon los ejemplares en cautividad que fueron entregados por particulares en el centro de recuperación de fauna salvaje “La Granja” en el Saler (Valencia) (figura 12).



Figura 12.- Situación de los núcleos de captura de *Trachemys scripta elegans*, en el mapa de la Comunidad Valenciana.

Marjal de Peñíscola (Castellón)

Toda la extensión de este humedal está integrada en el término municipal de Peñíscola en Castellón, tiene una extensión de 101,06 ha y está constituida por grupos de pequeñas albuferas y marjales litorales. Se considera que alberga una de las mayores poblaciones mundiales de samaruc (*Valencia hispanica*).

El marjal de Peñíscola está incluido en el catálogo de zonas húmedas de la Comunidad Valenciana de 2000; sus coordenadas geográficas son: 40° 23' Latitud Norte, 0° 24' Longitud Este (figuras 13 y 14).

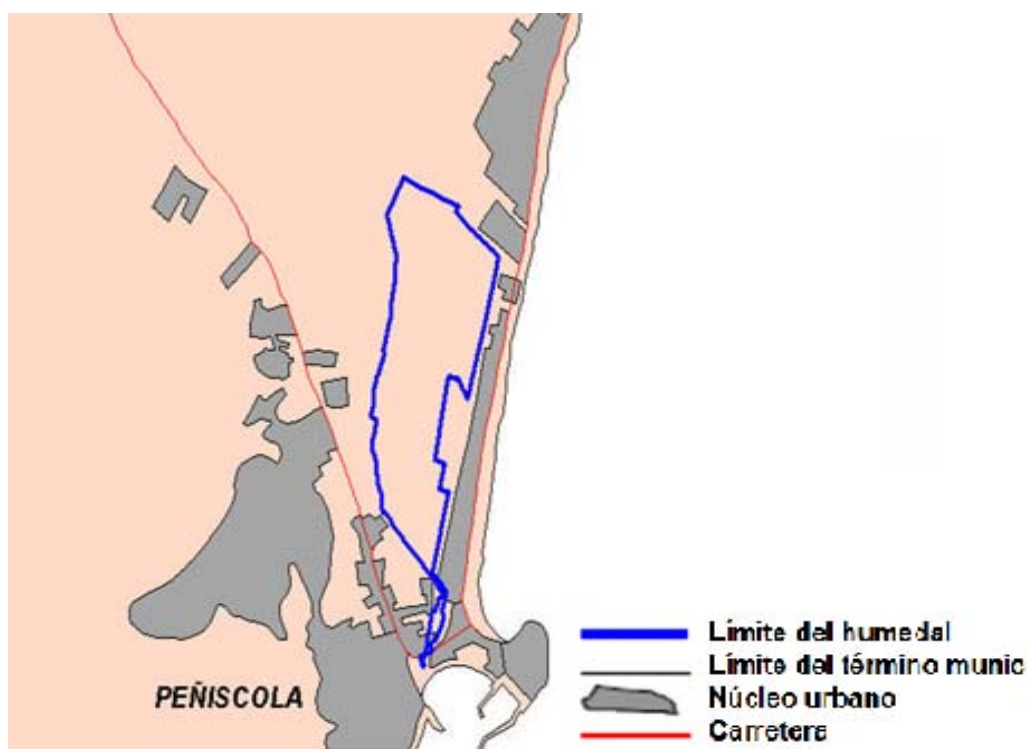


Figura 13.- Situación de la marjal de Peñíscola (Castellón) en el mapa (tomado del catálogo de zonas húmedas de la Comunidad Valenciana, junio 2000).

El aporte hídrico del marjal es de origen subterráneo y la descarga se realiza directamente al mar mediante un canal (la *gola*) y subterráneamente, por filtración. La calidad del agua es considerada buena y apta para uso agrícola.

La vegetación es la típica de estos ecosistemas mediterráneos dominada por el carrizo (*Phragmites australis*) y las cañas (*Arundo donax*).

En esta zona habitan peces ciprinodonidos de gran importancia biológica, como el anteriormente mencionado samaruc, también es el único lugar de Europa donde se ha encontrado el gasterópodo centroafricano *Melanoides tuberculata*. Las especies de galápagos autóctonos comparten hábitat con la especie invasora *T. scripta elegans*.



Figura 14.- Vistas del marjal de Peñíscola (Castellón).

Margal de Almenara (Castellón)

Se sitúa al sur de la provincia de Castellón y al norte de la provincia de Valencia, comprende 1540,83 ha en los términos municipales de Moncofar, Chilches, Almenara, La Llosa, Quartell, Benavites y Sagunto. El uso predominante del suelo es de tipo

hortícola, este hecho constituye una singularidad importante del humedal junto a la gran extensión.

Las coordenadas geográficas del marjal son: 39° 46' Latitud Norte y 0° 8' Longitud Oeste (figuras 15 y 16).

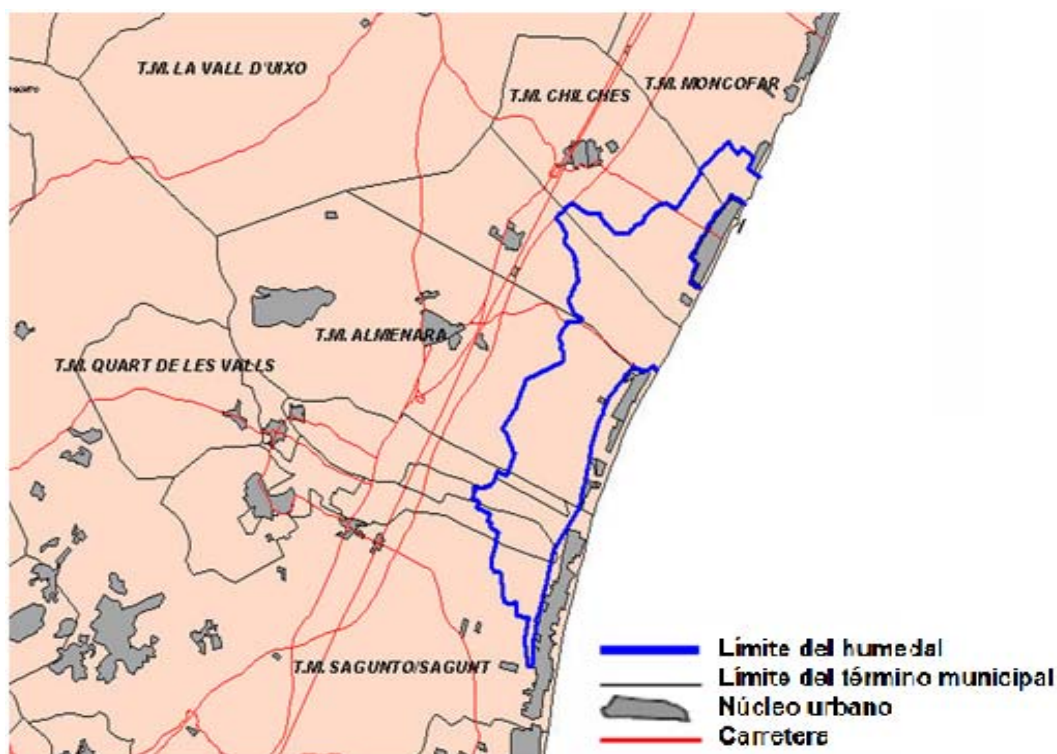


Figura 15.- Situación de la marjal de Almenara (Castellón) en el mapa (tomado del catálogo de zonas húmedas de la Comunidad Valenciana, junio 2000).

La descarga del agua subterránea procedente de la sierra de Espadán constituye uno de los aportes hídricos del humedal, junto a los retornos de los riegos y aguas residuales. La descarga de las lagunas se realiza de forma natural por canales y golas, aparte de forma subterránea.

La vegetación está formada por diferentes poblaciones, cabe destacar entre las especies de ribera distintas especies de juncos (*Schoenoplectus lacustris*, *Schoenoplectus littoralis*, *Scirpus maritimus*), eneas (*Thypha angustifolia*, *Thypha latifolia*), carrizo (*Phragmites australis*), el lirio amarillo (*Iris pseudacorus*), poligonáceas (*Polygonum salicifolium*), tamaris (*Tamarix gallica*, *Tamarix africana*), retama de tintoreros (*Genista tinctoria*) y castañuela (*Cladium mariscus*).

Las poblaciones de gasterópodos son muy variadas, entre las cuales se encuentran las siguientes especies: *Theodoxus fluviatilis*, *Melanopsis dufourei*, *Stagnicola palustris*, *Radix auricularia*, *Planorbis planorbis*, y *Pseudamnicola conovula*. Dentro de los moluscos bivalvos se encuentran tres especies de almejas: *Anodonta cygnea*, *Unio mancus*, y *Potamida littoralis*. Los crustáceos más frecuentes son las gambetas comunes (*Palaemonetes zariguielyi*) y *Dugastella valentina*. Igualmente es rico en peces con una ictiofauna formada por lisas (*Mugil cephalus*), carpas (*Cyprinus carpio*), barbos (*Barbus bocagei*), anguilas (*Anguilla anguilla*), *Cobitis maroccana*, samarucs (Valencia hispánica), fartets (*Aphanius iberus*), y las introducidas gambusias (*Gambusia affinis*) y "black-bass" (*Micropterus salmoides*). Los anfibios están representados por la rana común (*Rana perezi*) y entre los reptiles se encuentran las tortugas de agua europea (*Emys orbicularis*) y leprosa (*Mauremys caspica*) con el añadido de las introducidas tortugas de Florida.



Figura 16.- Vistas del marjal de Almenara (Castellón).

Marjal de La Safor-Gandía (Valencia)

Se sitúa en el sur de la provincia de Valencia, y se extiende por los términos municipales de Tavernes de la Vallidigna, Xeraco, Xeresa y Gandía, con una extensión de 1225,34 ha. Este humedal está rodeado fundamentalmente de cultivos citrícolas, y pese a la presión antrópica conserva comunidades vegetales y animales de gran interés.

Las coordenadas geográficas del marjal son: 39° 1' Latitud Norte, 0° 11' Longitud Oeste (figura 17 y 18).

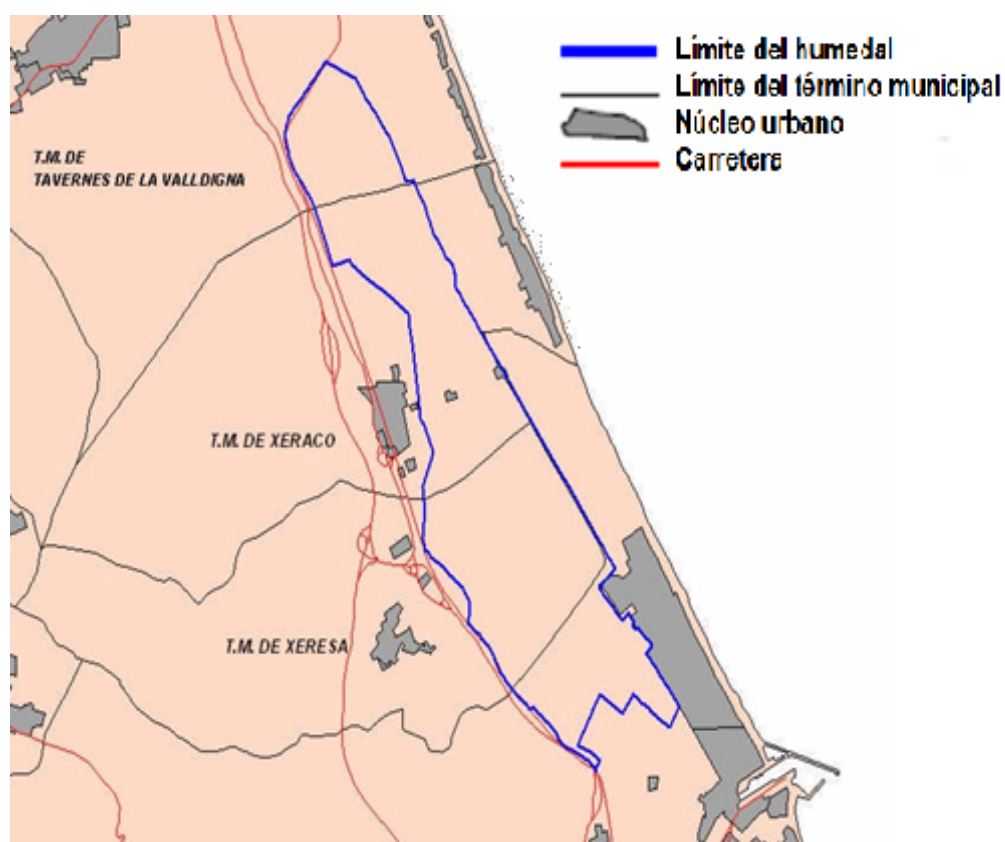


Figura 17.- Situación de la marjal La Safor-Gandía (Valencia) en el mapa, (tomado del catálogo de zonas húmedas de la Comunidad Valenciana, junio 2000).

La alimentación de las lagunas se debe fundamentalmente al agua subterránea, aunque también contribuyen en menor medida el retorno de las aguas de riego y aguas residuales. La descarga de éstas se realiza de forma natural por manantiales, aunque se puede regular de forma directa por canales y golgas así como bombas de drenaje. La calidad del agua es apta para uso agrícola excepto las zonas de intrusión de agua marina.

En las lagunas predomina el carrizo (*Phragmites australis*), y la espadaña o enea (*Thypha angustifolia*, *Thypha latifolia*) en la ribera, en el marjal de Xeresa se encuentran poblaciones de mansiega (*Carex flacca*), que forman unas matas de tallos cilíndricos, la grama de agua, herbácea, que es aprovechada para el ganado, el lirio común con llamativas flores amarillas (*Iris pseudacorus*), y los juncos (*Schoenoplectus lacustris*, *Schoenoplectus littoralis*, *Scirpus maritimus*). También se puede distinguir nenúfares (*Nymphaea* spp.) y lentejas de agua (*Lemna minor*), así como la espiga de agua (*Potamogeton natans*).



Figura 18.- Vistas del marjal La Safor-Gandía (Valencia).

En el agua se pueden encontrar peces como el gambusia (*Gambusia* spp.) y el black-bass (*Micropterus* spp.). El primero (4-6 cm), de origen americano, fue introducido a principios de siglo porque se alimentaba de las larvas del mosquito. También son fáciles de ver las ranas (*Rana* spp.) y hasta alguna culebra de agua (*Natrix natrix*, *Natrix maura*), en el fondo de las lagunas. Se puede distinguir el cangrejo americano, especie invasora de gran voracidad. Aparte de los reptiles acuáticos objeto del presente estudio con sus homólogos autóctonos.

3.1.4.- Toma de muestras

Se transportaron los ejemplares de *Trachemys* a la sala de necropsias mediante cajas individuales con el agua de la laguna. Los animales se sacrificaron mediante una dosis de 5 mL de pentobarbital (Doletal ® Vétoquinol), en el seno venoso postoccipital. Durante el tiempo que transcurre desde la inyección letal hasta que el animal muere, se marcaba al animal con una cinta adhesiva en el caparazón con un código alfanumérico que registraba el lugar de procedencia y el número de captura en ese lugar. El código asignado a cada animal estaba compuesto por tres términos, el primero se correspondía con el lugar de procedencia (B1: marjal de Peñíscola; B2: marjal de Almenara; B3: marjal de Gandía; A: animales de cautividad). El segundo término es un número consecutivo de captura de cada marjal y el tercer término la fecha de captura. Durante ese tiempo también se empezaba a cumplimentar una ficha por ejemplar. Se tomaron los datos de peso, edad, sexo y medidas de cada uno de los individuos (figura 20).

Los animales se clasificaron en tres estratos atendiendo a la edad: menores de cinco años, entre cinco y diez años, y mayores de diez años. Para la medida de longitud del caparazón se tomó la medición del largo recto del caparazón nucal-supracaudal, que mide desde el punto medio anterior (escudo nucal) al extremo posterior de los escudos supracaudales. Y para la medición del ancho del caparazón se utilizó el ancho curvo del caparazón, se midió por el punto más amplio, es decir, la distancia entre los dos puntos más alejados del caparazón, para esta medición no hay referencias anatómicas (Eckert *et al.*, 2000). Durante la medición del caparazón se hizo un examen del mismo en busca de ectoparásitos, al igual que de la piel (figura 19).

El examen parasitológico se dividió en varias etapas. La primera consistía en el filtrado del agua que contenía el recipiente de transporte de cada uno de los animales. Con este protocolo se podría identificar parásitos que hubieran sido arrastrados y liberados por el aparato digestivo.

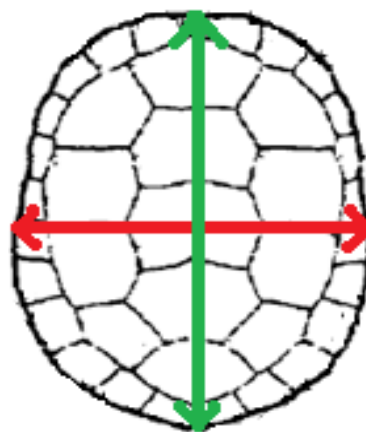


Figura 19.- Referencia para las mediciones caparazón (en verde la longitud del caparazón y en rojo la anchura del caparazón).

CUESTIONARIO RECOGIDA DE INFORMACIÓN DE CADA UNO DE LOS ANIMALES MUESTREADOS- proyecto *Trachemys*

Nº referencia					
Fecha captura			Fecha necropsia		
Especie					
Edad		Sexo	♂	♀	Peso (g)
Longitud (cm)			Anchura (cm)		
Estado de salud y otras observaciones					

MUESTRAS	EXOPOL	CECAV	OBSERVACIONES
Hisopo cloacal			
Heces			
Hígado			
Pulmón			
Riñón			
Bazo			
Intestino			
Piel			

65

Examen de	OBSERVACIONES
Corazón	
Intestino	
Vejiga urinaria	

ANIMAL CON PROPIETARIO	
Nombre de propietario/a	
Dirección	
Teléfono contacto	
Convive con otros animales	
Tipo de alojamiento	
Alimentación	
Tratamiento con antibióticos	

Figura 20.- Cuestionario a cumplimentar de cada ejemplar de *Trachemys scripta elegans*, antes y durante la necropsia.

Tras el sacrificio se tomaba un hisopo cloacal. Se introducía el hisopo por la cloaca dándole pequeños giros durante unos segundos impregnando el mismo de heces para la determinación de *Salmonella*. Posteriormente, mediante una sierra oscilante se separó el plastrón del caparazón. Una vez todas las vísceras de la cavidad torácico-abdominal al descubierto, se aisló el corazón, el aparato respiratorio, el aparato digestivo y el aparato excretor (tabla 1).

El corazón se abrió longitudinalmente para su examen macroscópico y parasitológico.

El aparato respiratorio, se abrió longitudinalmente desde la tráquea hasta los pulmones. Tras realizar un examen macroscópico del mismo se tomaron de forma aséptica muestras de cada uno de los pulmones de la zona más caudal de un centímetro de diámetro. Las muestras se utilizaron para el análisis microbiológico, bacteriano y vírico.

Posteriormente se separó el hígado del aparato digestivo, se realizó un examen macroscópico del mismo y se tomo una muestra, de forma aséptica, de un centímetro de diámetro para el análisis bacteriológico. El hígado sobrante se guardó congelado (-20°C) en una bolsa etiquetada con el código del ejemplar para estudios futuros.

Tras el examen macroscópico del bazo, se recogió entero para su análisis bacteriológico.

A continuación, cada uno de los riñones del aparato excretor fueron inspeccionados macroscópicamente. Se tomaron muestras de un centímetro de diámetro para el examen bacteriológico.

Una vez desbridado el aparato digestivo se abrió longitudinalmente desde el esófago a la cloaca para su estudio macroscópico y parasitológico, dejando los dos últimos centímetros distales sin abrir. Por último el tramo distal del intestino grueso que no se abrió se dividió en dos partes y se ataron los extremos con hilo de seda para que no se derramara el contenido, una de las partes sería para el examen específico de *Salmonella* y la otra muestra se tomó para realizar bacteriología general. También del

extremo más distal del intestino grueso, antes de obtener las muestras para el examen específico de *Salmonella* y bacteriología general, se recogieron heces para el examen parasitológico.

Tabla 1.- Resumen de toma de la toma de muestras y análisis en *Trachemys scripta elegans*.

Órgano o aparato	Muestra recogida	Análisis realizado
Corazón	Entero	Macroscópico Parasitológico
Tráquea	Entera	Macroscópico
Pulmón	Porción caudal	Macroscópico Bacteriología general <i>Herpesvirus</i>
Hígado		Macroscópico Bacteriología general
Bazo		Macroscópico Bacteriología general
Riñones	Enteros	Macroscópico Bacteriología general
Intestino	Entero	Macroscópico Parasitológico
	Centímetro distal	Bacteriología general <i>Salmonella</i>
	Hisopo cloacal	<i>Salmonella</i>
	Heces	Parasitológico

Todas las muestras se recogieron en recipientes estériles.

El análisis parasitológico de las muestras se realizó en los laboratorios de la Universidad UCH-CEU. Para el análisis microbiológico general de las muestras se remitieron en refrigeración a los laboratorios Exopol de Zaragoza. Las muestras para el análisis específico de *Salmonella* se remitieron refrigeradas a los laboratorios del Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana (CECAV) en Castellón.

3.1.5.- Análisis laboratorial

3.1.5.1.- Aislamiento bacteriano general

Para el aislamiento general bacteriano, en primer lugar todas las muestras fueron sembradas en Agar Columbia con 5% de sangre de cordero y Agar MacConkey. A excepción de las muestras de los digestivos que además se sembraron en Agar XLD (agar xilosa, lisina y desoxicolato) y en caldo Rappaport-Vassidialis para el aislamiento de *Salmonella*, en agar Skirrow para el aislamiento de *Campylobacter* y en agar TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa) para aislar *Vibrio* spp.

Para la identificación bioquímica de las colonias se utilizaron tiras API, API 20E (Biomerical, Francia) para enterobacterias y Gram-negativo no fermentadoras, API 20NE (Biomerical, Francia) para Gram-negativo no enterobacterias, ID 32 GN (Biomerical, Francia) para la identificación de bacilos Gram negativo, API 20 strep (Biomerical, Francia) para identificación de *Streptococcus* y *Enterococcus*, ID 32 (Biomerical, Francia) para la identificación de *Staphylococcus*, *Micrococcus* y géneros relacionados, y API 20A (Biomerical, Francia) para identificación de microorganismos anaerobios.

3.1.5.2.- Aislamiento específico de *Salmonella*

Para la detección y aislamiento de *Salmonella* se siguió la norma ISO 6579:2002. En primer lugar, se realizó el preenriquecimiento no selectivo de las muestras en una dilución 1:10 en agua de peptona incubando a 37 ± 1 °C durante 18 ± 2 horas. Se transfirieron 100 µL de la muestra enriquecida, en tres gotas, a una placa de medio Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV) y se incubó a $41,5\pm 1$ °C durante $24/48\pm 3$ horas. Se consideraron muestras sospechosas aquellas que presentaron halo blanquecino en los puntos de inoculación de la muestra. Se transfirieron 100 µL del cultivo enriquecido a un tubo que contenía 10 mL de caldo de Rappaport-Vassiliadis con soja (caldo RVS de enriquecimiento selectivo) y 1 mL a un tubo con 10 mL de caldo de Muller-Kauffmann (caldo MKTTn de enriquecimiento selectivo). El tubo de caldo RVS se incubó a $41,5\pm 1$ °C y el tubo con MKTTn a 37 ± 1 °C, ambos durante 24 ± 3 horas. A partir de los cultivos obtenidos (MSRV, RVS y MKTTn), se sembraron los dos

medios sólidos selectivos: XLD (Xilosa-lisina-desoxicolato) y XLT4 (Xilosa-lisina-tergitol-4), que se incubaron a 37 ± 1 °C durante 24 ± 3 horas. Se seleccionaron cinco colonias sospechosas, que se cultivaron en agar nutritivo a 37 ± 1 °C durante 24 ± 3 horas. Finalmente, la confirmación bioquímica se realizó con tira API 20E (Biomeria, Francia). Todas aquellas colonias de *Salmonella* aisladas fueron serotipadas siguiendo el esquema Kaufman-White-Leminor.

La serotipificación somática (serogrupo O) se realizó a partir de cultivos en agar tripticosa de soya incubado a 37°C de 24 horas, verificándose que el cultivo se encuentra en forma lisa. En primer lugar se realizó la serotipificación somática O sobre una lámina de vidrio se enfrentó una pequeña cantidad del cultivo con una gota de los antiseros polivalentes OS-A y OS-B (dentro de ellos están alrededor del 98% de las serovariedades aisladas del hombre y de los animales). Se homogenizó suavemente la lámina durante dos minutos, como máximo. Si se producía aglutinación con alguno de los dos antiseros polivalentes, se probaban los antiseros de grupo O correspondientes (Herrera *et al.*, 2007).

La serotipificación flagelar (serogrupo H) se realizó a partir de un cultivo en 5 mL de caldo flagelar incubado a 37°C durante 18-24 horas. Del caldo flagelar se separó una alícuota de 0,5 mL en un tubo estéril al cual se le agregaron 5 mL de solución fisiológica formolada al 1% y se dejó una hora a temperatura ambiente. En cuatro tubos de ensayo se colocaron una gota de cada uno de los antiseros flagelares polivalentes (HS-1, HS-A, HS-B y HS-C) y se agregó 0,5 mL del caldo formolado. Se incubó una hora a 50°C en baño de agua y se leyó presencia o ausencia de flóculos con luz indirecta. No se agitaron los tubos luego de la incubación a fin de no disgregar los flóculos. Si el cultivo dio aglutinación positiva con dos antiseros polivalentes se trató de una serovariedad difásica (que son la gran mayoría) y se enfrentó con los antiseros de fase H correspondientes siempre por aglutinación en tubo (Herrera *et al.*, 2007).

Por último, a cada una de las cepas de *Salmonella* aisladas se les realizó el antibiograma, para lo cual se enfrentaron las colonias a los siguientes antibióticos: ampicilina (10µg de carga de disco, OXOID), ácido nalidíxico (30 µg, OXOID), amikacina (30 µg, OXOID), amoxicilina-ácido clavulánico (20+10 µg, OXOID), carbenicilina (100 µg, OXOID), cefotaxima (30 µg, OXOID), ceftazidima (30 µg,

OXOID), ciprofloxacina (5 µg, OXOID), cloranfenicol (30 µg, OXOID), enrofloxacin (5 µg, OXOID), gentamicina (10 µg, BIO-RAD), imipenem (10 µg, OXOID), kanamicina (30 µg, OXOID), piperacilina (100 µg, OXOID), tetraciclina (30 µg, BIO-RAD), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25 + 23,75 µg).

3.1.5.3.- Aislamiento vírico

Preparación de las muestras

Se preparó una suspensión 1:10 con los pulmones, a través de su macerado en morteros estériles (0,5 gramos de cada pulmón con 4,5 mL Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM SIGMA D6429) dispensado en tubos con tapa de rosca y estériles. Se centrifugaron todos los tubos a 1300 xg, durante 10 minutos, y se le añadieron 100 mL de antimicrobiano (SIGMA A5955), posteriormente se incubaron una hora a 4° C y se guardaron a -20° C hasta su inoculación.

Cultivos celulares e infección

70

Se emplearon cultivos primarios y secundarios de riñón de *Trachemys scripta elegans* obtenidos en DMEM modificado y 10% de suero fetal bovino gamma irradiado. Se inocularon cuatro pozos por muestra con 100 µL del inóculo. Las placas fueron incubadas a 37° C en atmósfera de CO₂ durante 10 días. Los cultivos inoculados se revisaron diariamente bajo microscopio invertido, después de tres pases ciegos, se anotó la presencia o ausencia de efecto citopático. Las muestras clasificadas como positivas fueron teñidas con verde metilo pironina G, para la búsqueda de cuerpos de inclusión tipo Cowdry A.

3.1.5.4.- Aislamiento parasitológico

Para recoger cualquier tipo de helminto parasitario eliminado por estrés durante el transporte, se filtró el agua de las cajas de transporte con unos tamices de 0,300 mm de diámetro de poro, el primero, y de 0,150 mm el segundo.

Por otra parte, el aparato digestivo que se extrajo durante la necropsia se abrió con cuidado y se fue examinando el contenido y los tejidos, bajo lupa binocular (Optika LAB2, ventix). Los parásitos encontrados se lavaban con suero fisiológico y se observaban al microscopio para su identificación.

En la última etapa, se realizaba un análisis coprológico por el método cualitativo de sedimentación en formol-acetato de etilo para la detección de helmintos, en estadios de huevo o larva, contenidos en las heces. Se colocó una muestra de heces con 3 mL de formol al 10% en un mortero y se disgregaron las heces con la ayuda de un almirez. La muestra líquida se pasó a un tubo de 10 mL usando un embudo y una gasa que sirvió de filtro para retener material grosero, finalmente se rellenó de formol al 10% hasta la mitad del tubo. Posteriormente se le añadió acetato de etilo hasta llenar el tubo, quedando la solución en dos fases, debido a que los líquidos son poco miscibles. Se cerró el tubo y durante un minuto se agitó de arriba abajo mediante movimientos secos para mezclarlos bien. Posteriormente se centrifugó a 1400 rpm (876,4xg) durante dos minutos, cuando se extrajo el tubo de la centrífuga se aspiró parte de la muestra mediante una pipeta Pasteur y se colocó una gota entre porta y cubre. Después de esperarse un minuto se realizó una búsqueda de huevos y formas larvarias al microscopio con el objetivo de 10X (tabla 2). Los parásitos obtenidos por los diferentes métodos se conservaron en viales con etanol (70%) hasta su identificación al microscopio (Olympus CH30), previo montaje.

Para la determinación de coccidios se utilizó la técnica coprológica de McMaster modificado que determina la presencia de ooquistes. Se pesaron dos gramos de heces y disgregaron en un mortero con la ayuda de un almirez. Posteriormente se introdujeron en un recipiente de plástico con perlas de cristal con 28 mL de agua y se agitaron vigorosamente hasta que quedaron bien disgregadas las heces. La emulsión se filtró con la ayuda de un colador con gasa doble recogiendo el filtrado en un tubo de 10 mL y centrifugándose durante tres minutos a 1500 rpm (939 xg). El sobrenadante se eliminó y se agitó el sedimento con un agitador mecánico y se enrasó hasta el nivel anterior añadiéndose solución salina. Una vez homogenizado el contenido con la ayuda de una pipeta Pasteur se cargaron las dos hemicámaras de una cámara de McMaster (volumen de cada hemicámara: 0,5 mL, volumen de cada retícula: 0,3 mL). Se observaron al

microscopio óptico las dos hemicámaras contabilizando las formas parasitarias en cada retícula para su cuantificación (tabla 2).

Tabla 2.- Análisis coprológicos.

Método cualitativo de sedimentación en formol-acetato de etilo.	Método de McMaster modificado
✍ Se coloca una muestra de heces con formol (10%) en un mortero y se machaca.	✍ Pesar 2 g de heces.
✍ Se pasa la muestra líquida a un tubo de cristal, usando un embudo y una gasa que servirá de filtro. Se añadirá más formol si es necesario hasta completar aproximadamente la mitad del tubo.	✍ Disgregar las heces en mortero.
✍ Se añade acetato de etilo hasta llenar lo que queda del tubo, quedando una solución de dos fases.	✍ Colocar las heces en un recipiente de plástico con perlas de vidrio y añadir 28 mL de agua. → agitar vigorosamente hasta disgregar las heces.
✍ Se tapa el tubo y se mueve durante un minuto, de arriba a abajo con movimientos secos para mezclarlo bien.	✍ Filtrar la emulsión por mallas (400-500 y 150-160 μm) o colador con gasa (doble capa).
✍ Se centrifuga a 1400 rpm (876,4 xg) durante dos minutos.	✍ Recoger el filtrado, homogenizar y llenar un tubo de ensayo 10 mL.
✍ Se aspira con una pipeta parte de la muestra y se pone sobre un portaobjetos.	✍ Centrifugar el tubo durante tres minutos a 1.500 rpm (939 xg).
✍ Se cubre con un cubreobjetos y se espera un minuto.	✍ Eliminar sobrenadante, agitar sedimento (agitador mecánico) y añadir solución salina saturada hasta el nivel anterior (10 mL).
✍ Se realiza una búsqueda al microscopio (10X) de huevos y formas larvianas que se fotografían para su posterior identificación.	✍ Homogenizar el contenido y con ayuda de una pipeta Pasteur cargar las dos hemicámaras de una cámara de McMaster Volumen de cada hemicámara= 0,5 mL (ambas hemicámaras 1 mL) Volumen de cada retícula= 0,15 mL (ambas retículas 0,3 mL).
	✍ Observar las dos retículas de la cámara (0,3 mL) al M.O. (10x) y proceder a la cuantificación de formas parasitarias.
	(Tomado de Hendrix, 1999)

3.2.- Análisis microbiológico del agua de los marjales

Se recogieron muestras de agua de las lagunas donde se capturaron los ejemplares de *Trachemys scripta elegans*, una por laguna y en frascos estériles de 2L. Inmediatamente se remitieron refrigeradas hasta los laboratorios de Biomaro de Madrid, éstas llegaron antes de 24h desde la recogida.

Para el aislamiento de *Escherichia coli* se realizó el método estándar del protocolo de la Norma ISO 9308.1/2000. Una vez filtrada la muestra se cultivó en Agar Lactosa TTC durante 21h a 36 °C. Las colonias sospechosas se cultivaron en Agar Tryptone de soya durante 21h a 36°C y posteriormente se les sometía a la prueba de oxidasa. Si el resultado era negativo a las colonias se les consideraba *E. coli* positivas. Por otro lado, parte de las colonias sospechosas se incubaron a 44°C durante 21h en Caldo de Triptófano para posteriormente someterlas a la prueba del indol, si el resultado era positivo se confirmaba la presencia de *E. coli*.

Para el aislamiento de *Streptococcus* spp. se utilizó el protocolo ISO 7899. Para la realización de este protocolo se filtraron 100 mL de la muestra y se colocó el filtro de membrana sobre el medio de Slanetzy Bartley Agar, posteriormente se incubaron las placas a 37°C durante 48 h. Tras la incubación, se consideran como colonias típicas las que muestren un color rojo, marrón o rosado, en el centro o en toda la colonia, consecuencia de la reducción del TTC (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio, incoloro) a trifenilformazán (de color rojo). Las colonias sospechosas se sembraron sobre una placa con agar bilis-esculina-acida, precalentada a 44°C. Se incubó a 44°C durante dos horas y se lee la placa inmediatamente, dando un color marrón a negro alrededor de la colonia. En este medio, la esculina se hidroliza dando origen a esculetina (6,7-dihidrocumarina) que se combina con los iones Fe^{3+} formando un compuesto de color marrón a negro. Y se confirma mediante las tiras API 20 Strep (Biomeria, Francia).

Para la identificación de *Staphylococcus* se realizó una siembra en profundidad en BP+FC (medio Baird-Parker RPF gelosa+Caldo Fraser completo).

La detección de otras bacterias se realizó mediante filtración de membrana y posteriormente se sembró en superficie de CPS ID2, agar Mac Conkey, Medio Leeds y *Aeromonas* agar. Se seleccionaron las colonias sospechosas y se utilizaron las tiras API 20E (Biomerical, Francia) para la identificación de enterobacterias y especies Gram-negativo no fermentativas. Se utilizaron las tiras API 20 NE (Biomerical, Francia) para Gram-negativo no pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.

3.3.-*Testudo hermanni hermanni*

3.3.1.- Zona de estudio

En la Comunidad Valenciana existen dos núcleos de la tortuga mediterránea (*Testudo hermanni hermanni*), el cercado del Desierto de las Palmas en Castellón donde se introdujeron para su estudio de aclimatación en vistas a una reintroducción de *Testudo hermanni hermanni* en la Comunidad Valenciana tras haberse extinguido, y el del Parque Natural de Sierra de Irta que es y va a ser el lugar donde se va a reintroducir este quelonio en la Comunidad Valenciana.

74

3.3.2.- Selección de la muestra

Entre los meses de abril a octubre de 2009 se muestrearon sesenta y nueve animales de la especie *Testudo hermanni hermanni*, gracias, también, a un acuerdo de colaboración entre *Conselleria de Medi Ambient Aigua i Habitatge* y la Universidad CEU Cardenal Herrera. Estos animales pertenecían a tres núcleos diferentes, 52 animales procedían de un criadero de tortugas mediterráneas en la isla de Mallorca (*Conselleria de Medi Ambient del Govern de les Illes Balears*), 17 animales procedían de poblaciones en libertad, 10 de la reserva de



Figura 21.- Situación de los núcleos de captura de *Testudo hermanni hermanni*, en el mapa de la Comunidad Valenciana.

la Sierra de Irta y 7 del paraje del Desierto de las Palmas, ambos en la provincia de Castellón y propiedad de la *Conselleria de Medi Ambiente, Aigua i Habitatge de la Generalitat Valenciana* (figura 21). Para la captura de estos animales no fue necesario ningún tipo de trampa, ya que se capturaron de forma manual.

3.3.3.- Selección de los núcleos

Los ejemplares en libertad muestreados corresponden a los dos núcleos poblacionales que existen en la Comunidad Valenciana, Desierto de las Palmas y Sierra de Irta. Los animales de criadero procedentes de Mallorca son los que se introducirán en el núcleo de Sierra de Irta para su repoblación.

Desierto de las Palmas (Castellón)

El Parque Natural del Desierto de las Palmas está situado en la provincia de Castellón y ocupa parte de cinco términos municipales: Benicassim, Cabanes, La Poble Ternes, Borriol y Castelló de la Plana, sus coordenadas geográficas son 40° 4' Latitud Norte, 0° 4' Longitud Este. El parque está enclavado en una serranía litoral de la comarca de la Plana Alta, paralela a la costa, con abundantes crestas y roquedos. La superficie protegida ocupa un total de 3.200 ha., alcanzando su cota máxima en el pico del Bartolo con 729 m (figura 22 y 23).

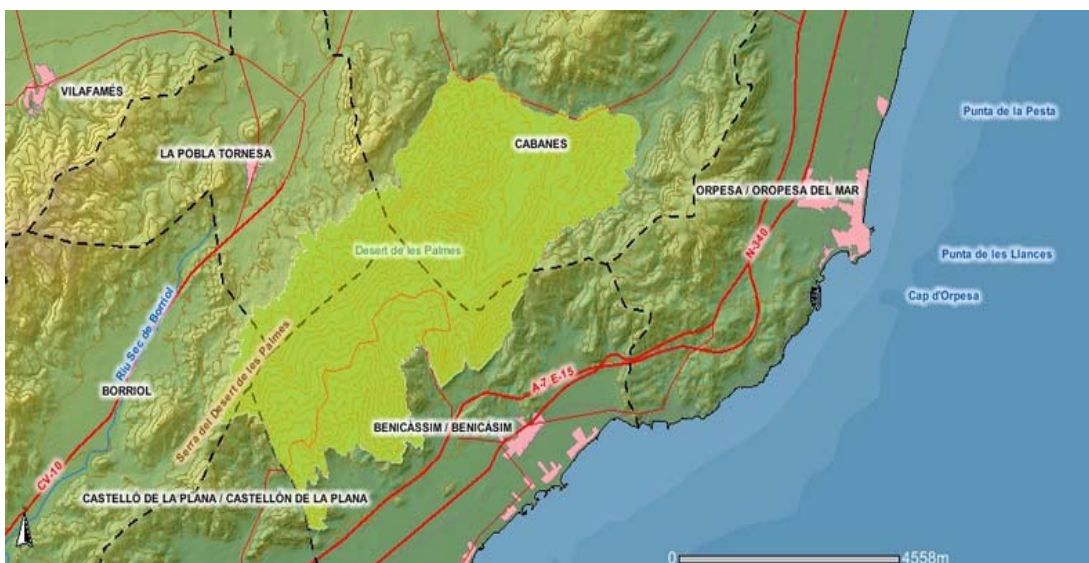


Figura 22.- Situación del Parque Natural del Desierto de las Palmas (Castellón) (tomado de <http://orto.cma.gva.es>).

La mayor parte del territorio está ocupada por diversos tipos de matorral, entre los que cabe destacar especies como: romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*), aliaga (*Ulex parviflorus*), brezo (*Erica multiflora*), albaida (*Anthyllis cytisoides*), jara blanca (*Cistus albidus*) y jara negra (*Cistus monspeliensis*). En menor medida se presentan formaciones de pinares, el pino rodeno (*Pinus pinaster*), que sólo crece en los terrenos silíceos de areniscas rojas, y el pino mediterráneo (*Pinus halepensis*) que habita en cualquier tipo de suelo. Este último, debido a la facilidad para diseminar sus semillas, ha ido invadiendo las zonas agrícolas abandonadas, sustituyendo, de esta forma, los antiguos bosques de carrascas y alcornoques.

La variedad de ambientes, permite la existencia de muy diversas comunidades faunísticas, la variedad de anfibios es muy importante, así como las más de 120 especies de aves que se han catalogado. También es importante citar la variedad de mamíferos, entre los que cabe destacar la gineta (*Genetta genetta*), la garduña (*Martes foina*), la comadreja (*Mustela nivalis*) y el tejón (*Meles meles*), y otros como el jabalí (*Sus scrofa*), el conejo (*Oryctolagus cuniculus*), el zorro (*Vulpes vulpes*), la ardilla (*Sciurus vulgaris*), el erizo (*Erinaceus europaeus*) y varias especies de murciélagos.



Figura 23.- Vistas del paraje del Desierto de las Palmas (Castellón) (tomado de <http://orto.cma.gva.es>).

Las tortugas, *Testudo hermanni hermanni* estaban situadas en un cercado de tela metálica cuyos agujeros tienen unas dimensiones de 3 x 3 cm, y la extensión del cercado alcanza aproximadamente los 4.900 m² en la ladera Este del parque natural.

Sierra de Irta (Castellón)

El Parque Natural de la Sierra de Irta se encuentra situado al noreste de Castellón, en la comarca del Baix Maestrat. Ocupa parte de los términos municipales de Peñíscola, Santa Magdalena de Pulpis y Alcalà de Xivert-Alcossebre.

La superficie protegida ocupa un total de 12.000 ha, sus coordenadas geográficas son 40° 20' Latitud Norte, 0° 21' Longitud Este. Está formada por una sierra que discurre paralela a la línea de costa a lo largo de 15 Km prácticamente inalterados en la que podemos encontrar acantilados, playas y calas. Destaca el acantilado de Torre Badum por ser uno de los más altos de la Comunidad Valenciana (figuras 24 y 25).



Figura 24.- Situación del Parque Natural de Sierra de Irta. (Castellón) (tomado de <http://orto.cma.gva.es>).

No presenta grandes altitudes, el pico más alto de 572 metros es el de Campanilles y la proximidad al mar no permite la formación de grandes barrancos, siendo el de mayor longitud el Barranco de Irta con 6 Km.

El matorral mediterráneo es la formación vegetal dominante y hay especies vegetales de interés que podemos encontrar tanto cerca de la costa como en los barrancos que se adentran hacia el interior de la sierra. Predominan los matorrales dominados por el palmito (*Chamaerops humilis*) y donde las únicas formaciones forestales son pinares de pino blanco (*Pinus halepensis*), que han sustituido a los carrascales, vegetación potencial de la sierra. Los pinares de la sierra son arboledas que están acompañadas de lentisco (*Pistacia lentiscus*) y coscoja (*Quercus coccifera*).

La formación vegetal dominante es la máquia litoral, formada por el lentisco (*Pistacia lentiscus*), el espino negro (*Rhamnus lycioides*) y otros arbustos perennifolios y esclerófilos de hoja pequeña que a menudo dan lugar a una trama de vegetación impenetrable.

De la fauna cabe destacar la presencia de aves marinas, anfibios y mamíferos que suelen ser los más difíciles de observar. La población de mamíferos está caracterizada por la mediterraneidad de la zona, siendo todos los grupos de amplia distribución, destacan la ardilla roja (*Sciurus vulgaris*), el jabalí (*Sus scrofa*), el zorro (*Vulpes vulpes*), la gineta (*Genetta genetta*) y el tejón (*Meles meles*).



Figura 25.- Vistas de la Sierra de Irta (Castellón).

3.3.4.- Toma de muestras

Tras capturar el ejemplar y antes de empezar con la toma de muestras se leyó la identificación del animal que presentaba en el margen del caparazón. Los tres escudos marginales del lado derecho indican los millares, los tres del lado izquierdo indican las centenas. Mientras que del octavo al doceavo del lado derecho indican las decenas y por último, las unidades son indicadas por los del lado izquierdo (figura 26). Los ejemplares no se sacrificaron ya que figuran en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas (Real Decreto 439/1990, de 30 de marzo) y en el Catálogo Valenciano de Especies Amenazadas (Decreto 32/2004, de 27 de febrero).

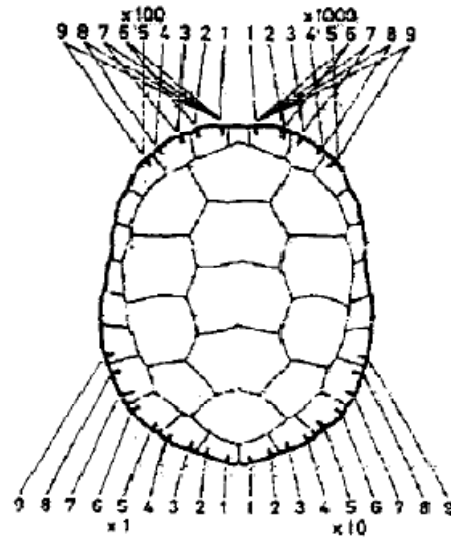


Figura 26.- Código numérico utilizado en el marcaje de los quelonios (tomado de Zuffi y Gariboldi, 1995).

Posteriormente se les pesó, se identificó el sexo y se midió longitudinal y transversalmente, y se tomó nota de la edad de los ejemplares. Todos los datos se registraron en una tabla (figura 27).

Nº ref.	sp	Sexo	Edad en años			fecha	Peso (g)	Medidas (cm)	
			< 1	1-5a	>5			Long	Anch

Figura 27.- Tabla de recogida de datos de *Testudo hermanni hermanni*.

De cada ejemplar de *Testudo* se tomó un hisopo cloacal para la detección microbiológica específica de *Salmonella*, para ello los hisopos se introdujeron en la cloaca del animal dándole pequeños giros durante unos segundos hasta que se impregnaba de heces.

También se les tomó dos muestras orales con hisopos estériles. El hisopo se introdujo en la boca de la tortuga, dando pequeños giros, frotándolo con las paredes internas de la cavidad hasta que quedaba impregnado de saliva. Uno de los hisopos se introducía en un vial en seco y el otro en suero fisiológico. La muestra con suero se remitió para su estudio virológico específico de *Herpesvirus* (ChHV) y la otra se guardó a -40°C para estudios posteriores (tabla 3). Las muestras recogidas para la determinación de *Herpesvirus* (ChHV) se remitieron refrigeradas mediante transporte urgente a los laboratorios del FTÄ Mikrobiologie, ZB Reptilien, Institut für Umwelt- und Tierhygiene, Universidad de Hohenheim en Stuttgart (Alemania). Por otro lado, los hisopos cloacales se remitieron para la determinación específica de *Salmonella* a los laboratorios del CECAV.

También se extrajo sangre de cada animal, en viales sin anticoagulante y tras 8h se centrifugó a 1500 rpm (939xg) durante cinco minutos para la separación del suero. Éste se retiró en otros viales y se congeló a -40°C para estudios futuros.

Durante la manipulación de los animales, el estrés de los mismos favorecía las deposiciones, estas deyecciones se recogieron para el posterior análisis parasitológico.

Tabla 3.- Resumen de la toma de muestras en *Testudo hermanni hermanni*.

Muestra	Análisis
Hisopo cloacal	<i>Salmonella</i>
Hisopo oral	<i>Herpesvirus</i> (ChHV) Futuros estudios
Sangre	Futuros estudios
Heces	Parásitos

Todas las muestras se recogieron en recipientes estériles y libres de DNAsas.

3.3.5.- Análisis laboratorial

3.3.5.1.- Aislamiento específico de *Salmonella*

Para la caracterización de *Salmonella* se utilizaron dos pruebas, el protocolo ISO 6579:2000, explicado anteriormente, y la PCR en tiempo real. Con las muestras positivas al protocolo ISO 6579:2000 se serotiparon y se realizaron antibiogramas con el mismo procedimiento explicado en el apartado 3.1.5.2.

Para la detección del material genético de *Salmonella enterica* se utilizó el Kit de la empresa Applied Biosystems, denominado “TaqMan *Salmonella* entérica Detection Kit”. En primer lugar se realizó una dilución 1/10 en agua de peptona tamponada de la muestra, y se incubó a 37°C 16-20 horas. La extracción del material genético se empezó con la centrifugación de 1 mL del caldo a 10000 rpm (9000 xg) durante dos minutos. Después se retiró el sobrenadante y se suspendió el pellet en 100 µL de PrepMan Ultra, se mantuvo 10 minutos a 100°C en un termobloque, para posteriormente ser centrifugado a 10000 rpm (9000 xg) durante dos minutos y se realizó la dilución 1/10 en agua Milli Q del extraído. Para la amplificación y lectura, se realizó una mezcla de Environmental master mix y Mix *Salmonella* en tubos eppendorff libres de DNAsas y RNAsas, a continuación se agitó durante 10 segundos y se centrifugó a 8000 rpm (7200 xg) durante un minuto. Posteriormente se dispensaron 18 µL de la mezcla en 12 µL de la muestra y se mezclaron con pipeteo. Con ayuda del procedimiento específico de equipo del Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System, se amplificó el fragmento específico de *Salmonella*, siguiendo los ciclos de temperatura de la amplificación marcado 60°C durante cinco minutos, 95°C durante un minuto y 45 ciclos de 95°C 15 segundos y 60°C un minuto. El fragmento amplificado se chequeó usando el equipo Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (Tebbs *et al.*, 2009).

3.3.5.2.- Extracción del ADN vírico

La extracción del ADN se realizó mediante el uso de un Kit (DNeasy tissue Kit, Qiagen, D-40724 Hilden, Alemania). Se centrifugó la muestra durante cinco minutos a 300 xg, se resuspendió el pellet en 200 µL de PBS, posteriormente a la muestra se le

añadió 20 µL de proteinasa K y 200 µL de buffer AL, la muestra fue homogenizada e incubada posteriormente a 70°C durante 10 minutos. Tras la incubación se le añadieron 200 µL de etanol (96-100%) a la muestra y se homogenizó mediante un vórtex. Se extrae la muestra mediante una pipeta incluido el precipitado y se introduce en un tubo de 2 mL (DNeasy spin column) que proporciona el kit, posteriormente se centrifuga a más de 6.000 xg durante un minuto y se desecha el líquido que atraviesa la membrana. Después de la centrifugación se le añaden 500 µL de Buffer AW1 y se centrifuga un minuto a más de 6.000 xg desechando el líquido que atraviesa la membrana. La spin column se coloca en otro tubo de 2 mL y se le añade 500 µL de Buffer AW2 centrifugándolo a la máxima velocidad 14000 xg durante tres minutos, se desecha el líquido y la membrana del spin column se coloca en un nuevo tubo de eppendorff de 1,5 o 2 mL, a esta muestra se le añade 200µL de buffer AE, dejando que se incube un minuto a temperatura ambiente, posteriormente se centrifuga a más de 6.000 xg durante un minuto, obteniéndose el DNA de la muestra.

El “gene targeted” UL39 homólogo con los primers OS (5'-TGCACTTTGATGCGTGGGAT-3') y OAS (5'-TTGATCGATTTCGAATGCCG-3') (MWG biotech GmbH Ebersberg, Alemania) fueron usados para el aislamiento de *Herpesvirus* (ChHV), la reacción de amplificación fue llevada a cabo en un termociclador PTC 100 (MJ Research, Watertown, MA) y consistió en 35 ciclos de amplificación, desnaturalización (un minuto a 94°C), templado (30 segundos a 54 °C), y extensión (30 segundos a 72°C), durante el último ciclo de amplificación, la fase de extensión fue de ocho minutos para extinguir la DNA polimerasa. Los fragmentos de DNA obtenidos fueron separados por electroforesis con gel de agarosa (Origgi *et al.*, 2004; Marschang *et al.*, 2006).

3.3.5.3.- Aislamiento parasitológico

Las muestras de heces fueron inspeccionadas macroscópicamente para detectar la presencia de parásitos gastrointestinales adultos, los cuales serían lavados con suero fisiológico (pH 7,3) y almacenados en etanol 70°. Todas las heces fueron examinadas de forma rutinaria utilizando métodos de flotación con disoluciones de cloruro sódico saturada, con una densidad de 1,2 g/cc. Se utilizó el método de McMaster modificado tal y como se ha descrito anteriormente (tabla 2).

3.4.-Análisis estadístico

Para caracterizar los agentes patógenos (bacterias, virus y parásitos) presentes en la especie invasora de las costas mediterráneas *Trachemys scripta elegans*, y determinar si existen diferencias poblacionales a nivel sanitario entre los núcleos de la Comunidad Valenciana, se realizó un análisis descriptivo de los datos obtenidos con el paquete estadístico Statgraphics (Statgraphics Plus, Version 5.1, STSC Inc., Rockville, MD, USA).

Para conocer la bacteriología del agua de los marjales de la Comunidad Valenciana y estudiar si existe relación con la bacteriología de los galápagos invasores (*Trachemys scripta elegans*), se realizó un análisis descriptivo de los datos obtenidos con el paquete estadístico Statgraphics (Statgraphics Plus, Version 5.1, STSC Inc., Rockville, MD, USA).

Para determinar si la especie autóctona *Testudo hermanni hermanni* presente en las costas mediterráneas están infectadas con *Salmonella* y caracterizar los virus se realizó un Test chi-cuadrado con el paquete estadístico Statgraphics (Statgraphics Plus, Version 5.1, STSC Inc., Rockville, MD, USA). El análisis estadístico de los datos parasitológicos, recuentos de huevos por gramo de heces, se realizó la prueba F, mediante el programa Microsoft Office Excel 2007. Para ello, se compararon dos matrices de resultados (tortugas de vida libre vs tortugas de cautividad). Para determinar si existen diferencias a nivel sanitario entre las poblaciones cautivas (criaderos) y los núcleos poblacionales en libertad en la Comunidad Valenciana (Desierto de las Palmas y Sierra de Irta, en Castellón), se realizó un Test chi-cuadrado con el paquete estadístico Statgraphics (Statgraphics Plus, Version 5.1, STSC Inc., Rockville, MD, USA) y parásitos presentes en esta población.

Las diferencias en la caracterización microbiológica (bacterias, virus y parásitos) en la especie invasora de las costas mediterráneas *Trachemys scripta elegans* y la especie autóctona *Testudo hermanni hermanni*, se determinó mediante un Test chi-cuadrado con el paquete estadístico Statgraphics (Statgraphics Plus, Version 5.1, STSC Inc., Rockville, MD, USA).

4.- RESULTADOS

4.1.- *Trachemys scripta elegans*

En el periodo comprendido entre julio y octubre de 2008 se capturaron, eutanasiaron y analizaron un total de 105 individuos de la especie *Trachemys scripta elegans*, 73 (69,5%) individuos fueron hembras y 32 (30,5%) machos con edades comprendidas entre cinco y diez años (figura 28). De los ejemplares capturados, 99 (94,3%) procedían de poblaciones de vida libre y seis (5,7%) de poblaciones en cautividad. Dentro de las poblaciones en libertad, 32 (32,3%) individuos pertenecían al marjal de Peñíscola, 25 (25,3%) al marjal de Almenara y 42 (42,4%) pertenecían al marjal de La Safor-Gandía.

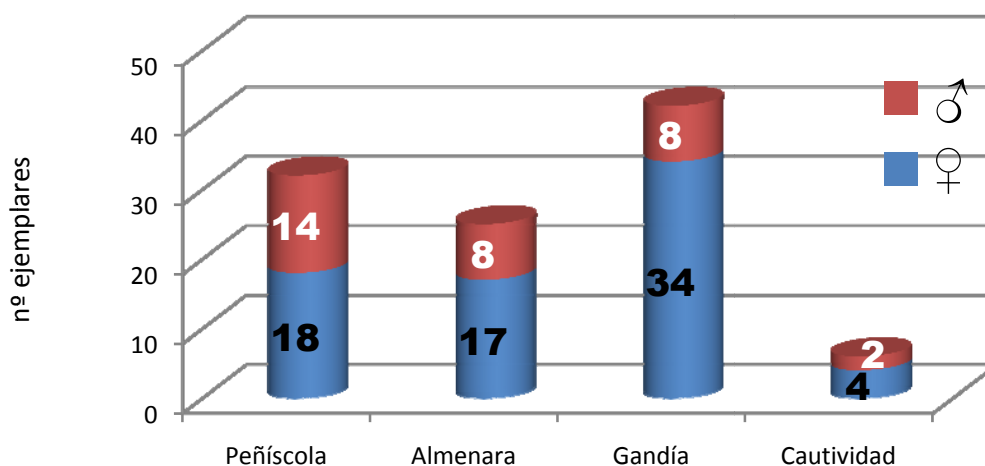


Figura 28.- Relación de ejemplares de *Trachemys scripta elegans*, según procedencia y sexo. Los números dentro de las columnas indican el número de individuos dentro de cada grupo (machos y hembras).

4.1.1.- Estudio macroscópico de los órganos

El estudio macroscópico de los diferentes órganos reveló baja presencia de lesiones. En la inspección del caparazón, piel, corazón, tráquea y pulmón de los 105 ejemplares estudiados no se encontraron parásitos ni lesiones compatibles con agentes infecciosos. El estudio macroscópico del hígado de estos animales, reveló que el 27,6% de ellos presentaban un hígado icterico. Esta lesión sólo se detectó en animales de vida libre, fundamentalmente en el núcleo de Peñíscola, donde el 56,3% de los ejemplares presentaban dicha lesión. En el marjal de Almenara el porcentaje de individuos con el

hígado icterico fue del 36,0%, mientras que en el marjal de La Safor-Gandía fue del 4,7%. Otra lesión macroscópica que se observó en este órgano fue el hígado graso, con una prevalencia del 5,7% de los individuos. Esta lesión no se observó en los animales de cautividad ni en los del marjal de Peñíscola. En el marjal de Almenara se observó en el 8,0% de los ejemplares estudiados y en el de La Safor-Gandía en un 9,5%.

El bazo de ninguno de los ejemplares estudiados presentó lesiones macroscópicas al igual que los riñones de los mismos. En el examen del intestino de los individuos estudiados tampoco se hallaron lesiones macroscópicas.

4.1.2.- Estudio bacteriológico

De los 105 animales necropsiados, se obtuvieron resultados en bacteriología general de 95 animales. Los porcentajes de bacteriología general están realizados sobre 95 ejemplares, mientras que los específicos de *Salmonella* están calculados con 105.

4.1.2.1.- Estudio bacteriología por órganos vs poblaciones

4.1.2.1.1.- Pulmón

El 35,8% de los ejemplares de *Trachemys scripta elegans* examinados presentaban infección por al menos un tipo de bacteria a nivel pulmonar. Los ejemplares de cautividad poseían una infección bacteriana más elevada (66,7%) que los individuos de vida libre (33,7%). El núcleo de vida libre más afectado fue Peñíscola (46,9%), seguida de La Safor-Gandía (28,1%) y Almenara (24,0%) (tabla 4).

Tabla 4.- Distribución microbiológica por poblaciones en pulmón de *Trachemys scripta elegans*.

	Libertad						Cautividad		TOTAL	
	PEÑÍSCOLA		ALMENARA		LA SAFOR - GANDÍA		n	%	n	%
Bacterias aisladas	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Bacterias en general	15	46,9*	6	24*	9	32*	4	66,7*	34	35,8*
<i>Aeromonas hydrophila</i>	3	9,4	6	24,0	4	12,5			13	13,7
<i>Escherichia coli</i>	4	12,5			5	15,6	2	33,3	11	11,6
<i>Staphylococcus coag. negativo</i>	5	15,6	1	4,0			4	66,7	10	10,5
<i>Proteus spp.</i>					2	6,3	2	33,3	4	4,2
<i>Klebsiella sp.</i>	1	3,1			2	6,3			3	3,2
<i>Alcaligenes sp.</i>	2	6,3							2	2,1
<i>Pseudomonas sp.</i>	2	6,3							2	2,1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	3,1							1	1,1
<i>Enterobacter sp.</i>			1	4,0					1	1,1
<i>Pasterella spp.</i>	1	3,1							1	1,1
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	1	3,1							1	1,1
<i>Providencia rettgeri</i>	1	3,1							1	1,1
<i>Streptococcus sp.</i>								16,7	1	1,1
N	32		25		32		6		95	

%; de ejemplares infectados; n: número de infectados; * porcentaje de ejemplares infectados por al menos un tipo de bacteria; N: número de ejemplares de cada una de las poblaciones.

Aeromonas hydrophila fue la bacteria aislada con mayor frecuencia (13,7%), apareció en las poblaciones silvestres, nunca en animales de cautividad. En el marjal de Peñíscola la prevalencia fue de 9,4%, en el de Almenara de 24,0% y en el de La Safor-Gandía de 12,5%.

La presencia de *Escherichia coli* también fue importante, se aisló con una frecuencia de 11,6%. Esta bacteria estuvo presente tanto en poblaciones silvestres (10,1%) como en la de cautividad (33,3%). Los ejemplares de los núcleos de vida libre más afectados fueron los del marjal de La Safor-Gandía con un 15,6% y los de Peñíscola con el 12,5%, mientras que en la población de Almenara no se aisló la bacteria.

Staphylococcus coagulasa negativo fue la tercera especie más prevalente en pulmones (10,5%). Los ejemplares más infectados fueron los de cautividad con el 66,7% frente al 6,7% de los de vida libre (tabla 5). Los ejemplares del marjal de Peñíscola presentaban un porcentaje de infección del 15,6%, frente al 4,0% de los ejemplares de

Almenara, con un solo afectado. En la población de La Safor-Gandía no se evidenció la presencia de esta bacteria (tabla 6).

Tabla 5.- Tabla resumen de la infección de *Staphylococcus coagulasa* negativo en pulmón de los animales del estudio.

Población	n	% positivos
General	10	10,5
Cautividad	4	66,7
Vida libre	6	6,7

n: número de individuos por núcleo. % positivos: porcentaje de individuos positivos.

Tabla 6.- Tabla resumen de la infección de *Staphylococcus coagulasa* negativo en pulmón, en los diferentes núcleos de *Trachemys scripta elegans* en libertad.

Núcleos de vida libre	n	% positivos
Peñíscola	5	15,6
Almenara	1	4,0
La Safor-Gandía	0	0,0

n: número de individuos por núcleo. % positivos: porcentaje de individuos positivos.

El género *Proteus* mostró una prevalencia del 4,2%. Solamente se aisló en individuos de cautividad y en un núcleo de vida libre (La Safor-Gandía). Los ejemplares en cautividad presentaban mayor porcentaje de infección a esta bacteria (33,3%) que los de vida libre (2,2%) (tabla 7).

Tabla 7.- Tabla resumen de la infección de *Proteus* spp. en los animales del estudio.

Población	n	% positivos
General	4	4,2
Cautividad	2	2,2
Vida libre	2	33,3

n: número de individuos por núcleo. % positivos: porcentaje de individuos positivos.

La presencia de *Klebsiella* spp. fue de 3,2%, aislándose solamente en dos poblaciones de vida libre, Peñíscola y La Safor-Gandía con una frecuencia de aislamiento del 3,1% y del 6,3% respectivamente.

Pseudomonas spp. y *Alcaligenes* spp. fueron las siguientes especies en porcentaje de individuos infectados, ambas con el 2,1%. Ambas especies se aislaron sólo en un núcleo, Peñíscola. No se encontró ningún ejemplar en cautividad infectado por dichas bacterias.

El resto de bacterias aisladas fueron *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter* spp., *Pasterella*, *Plesiomonas shigelloides*, *Providencia rettgeri*, *Streptococcus*. Sólo se encontró un ejemplar afectado para cada una de las bacterias. *Streptococcus* solamente se aisló en cautividad (16,7%) y no en el resto de poblaciones de vida libre. En el marjal de Almenara se identificó una especie sin determinar del género *Enterobacter* (4%), que no se aisló en el resto de poblaciones. El resto de las especies únicamente se aislaron en Peñíscola en un porcentaje del 3,1%.

4.1.2.1.2.- Hígado

Los cultivos microbiológicos de las muestras determinaron que el 27,4% presentan al menos algún tipo de microorganismo bacteriano. La población de cautividad presentó mayor porcentaje de infección (33,3%) que la media de las poblaciones de vida libre (26,9%). El núcleo de Peñíscola es el más afectado con un 40,6% de los ejemplares con infecciones hepáticas. Le siguen la Safor-Gandía con un 21,9% y Almenara con 16,0% de los individuos (tabla 8).

Tabla 8.- Distribución microbiológica por poblaciones en hígado de *Trachemys scripta elegans*.

	Libertad						Cautividad		TOTAL	
	PEÑÍSCOLA		ALMENARA		LA SAFOR-GANDIA					
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Bacterias aisladas	13	40,6*	4	16,0*	7	21,9*	2	33,3*	26	27,4*
Bacterias en general	13	40,6*	4	16,0*	7	21,9*	2	33,3*	26	27,4*
<i>Aeromonas hydrophila</i>	5	15,6	3	12,0	2	6,3			10	10,5
<i>Escherichia coli</i>	1	3,1	1	4,0	4	12,5			6	6,3
<i>Staphylococcus coag. negativo</i>	2	6,3	1	4,0	1	3,1	1	16,7	5	5,3
<i>Alcaligenes</i> sp.	4	12,5							4	4,2
<i>Klebsiella</i> sp.	1	3,1			2	6,3			3	3,2
<i>Proteus</i> spp.							2	33,3	2	2,1
<i>Enterobacter</i> sp.			1	4,0					1	1,1
<i>Pasterella</i> sp.	1	3,1							1	1,1
<i>Providencia rettgeri</i>	1	3,1							1	1,1
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	3,1							1	1,1
<i>Streptococcus a hemolítico</i>			1	4,0					1	1,1
<i>Streptococcus β hemolítico</i>	1	3,1							1	1,1
N	32		25		32		6		95	

%. de ejemplares infectados; n: número de infectados; * porcentaje de ejemplares infectados por al menos un tipo de bacteria; N: número de ejemplares de cada una de las poblaciones.

Aeromonas hydrophila se aisló en un 10,5% de las muestras analizadas, la presencia de esta bacteria fue siempre en poblaciones de vida libre (11,2%) y nunca se aisló en ejemplares de cautividad. La frecuencia más elevada se presentó en la población de Peñíscola con un 15,6%, seguida de la de Almenara con un 12,0% y por último la de La Safor-Gandía con el 6,3%.

Escherichia coli se aisló únicamente en poblaciones de vida libre (6,3%). La población de La Safor-Gandía fue la que presentó mayor porcentaje de individuos infectados el 12,5%, sin embargo los otros dos núcleos, Peñíscola y Almenará tan solo presentaron una muestra positiva a *E. coli* cada una de ellas.

Staphylococcus coagulasa negativo se aisló en el 5,3% de las muestras hepáticas analizadas. La población de ejemplares en cautividad presentaba un porcentaje de infección mayor que los de vida libre (16,7% vs. 4,5%, respectivamente). La población de ejemplares de vida libre con mayor porcentaje de infección fue Peñíscola (6,3%), seguida de Almenara (4,0%) y La Safor-Gandía (3,1%), estas dos últimas con sólo un ejemplar infectado cada una de ellas.

El género *Alcaligenes* únicamente se aisló en individuos de vida libre de un único núcleo (marjal de Peñíscola), con un porcentaje del 12,5%.

Las especies del género *Klebsiella* se aislaron en un 3,2% de los ejemplares examinados. No se aislaron en la población en cautividad pero sí en las de vida libre. En el marjal de La Safor-Gandía el porcentaje de individuos infectados fue del 6,3% y en Peñíscola del 3,1%.

El género *Proteus* presentó un porcentaje de infección bajo, 2,1%. No se encontró ningún ejemplar de vida libre infectado con dicha bacteria, únicamente se aisló en la población de cautividad (33,3%).

Enterobacter spp., *Pasterella* spp., *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* α hemolítico y *Streptococcus* β hemolítico, sólo se evidenciaron en casos aislados (1,1%) y siempre en poblaciones de vida libre, nunca en la población de cautividad. En la población de Peñíscola se aisló *Pasterella* spp., *Providencia rettgeri*,

Pseudomonas spp. y *Streptococcus* β hemolítico en un 3,1% de los individuos analizados. En la población de Almenara se aisló *Enterobacter* spp. y *Streptococcus* α hemolítico en un 4,0% de los casos. A pesar que los datos de aislamiento fueron dispares no se evidenciaron diferencias significativas entre las poblaciones para cada uno de los microorganismos.

4.1.3.1.3.- Bazo

Este órgano es el que presentó menor porcentaje de infección entre los estudiados. Un 15,8% de las muestras evidenciaron la presencia de al menos una especie bacteriana. La población de cautividad fue la que presentó mayor porcentaje de infección con un 33,3%, mientras que en las de vida libre el porcentaje de infección fue del 18,0%. Respecto a los núcleos de vida libre, la que presentó mayor presencia de bacterias en este órgano fue la población de Peñíscola con un 18,8%, seguida de la población de La Safor-Gandía con el 15,6%, y por último, la población con menos afección fue la de Almenara con un 8% de los bazos infectados (tabla 9).

Tabla 9.- Distribución microbiológica por poblaciones en bazo de *Trachemys scripta elegans*.

	Libertad						Cautividad		TOTAL	
	PEÑÍSCOLA		ALMENARA		LA SAFOR-GANDIA		n	%	n	%
Bacterias aisladas	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Bacterias en general	6	28,1*	8	8,0*	5	15,6*	2	33,3*	15	18,9*
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	6,3	8	8,0	1	3,1			5	5,2
<i>Escherichia coli</i>	2	6,3			3	9,4			5	5,2
<i>Klebsiella</i> sp.	1	3,1			3	9,4			4	4,2
<i>Staphylococcus. coag. negativo</i>	1	3,1					2	33,3	3	3,2
<i>Alcaligenes</i> sp.	1	3,1			1	3,1			2	2,1
<i>Proteus</i> spp.							2	33,3	2	2,1
<i>Streptococcus a hemolítico</i>					2	6,3			2	2,1
<i>Enterobacter cloacae</i>					1	3,1			1	1,1
<i>Providencia rettgeri</i>	1	3,1							1	1,1
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	3,1							1	1,1
N	32		25		32		6		95	

%. de ejemplares infectados; n: número de infectados; * porcentaje de ejemplares infectados por al menos un tipo de bacteria; N: número de ejemplares de cada una de las poblaciones.

Aeromonas hydrophila y *Escherichia coli*, fueron las especies que se aislaron con mayor frecuencia, un 5,3% en ambos casos. No se aislaron en la población de ejemplares en cautividad. *A. hydrophila* se aisló en las tres poblaciones de vida libre mientras que *E. coli* en dos. *Aeromonas hydrophila* presentó un porcentaje de infección del 6,3% en la población de Peñíscola, del 8,0% en la de Almenara y del 3,1% en la de La Safor-Gandía. *E. coli* presentó un porcentaje de infección del 6,3% en la población de Peñíscola y del 9,4% en la de La Safor-Gandía, no pudiéndose aislar en las otras dos poblaciones del estudio.

El género *Klebsiella* presentó un porcentaje de positivos del 4,2% en el total de los individuos del estudio. No se aisló en la población de cautividad, mientras que en las poblaciones en libertad la frecuencia de aislamiento fue del 4,5%. Sólo se aisló la bacteria en dos poblaciones en libertad, los marjales de Peñíscola y La Safor-Gandía, con una frecuencia del 3,1% y del 9,4%, respectivamente.

Staphylococcus coagulasa negativo se halló en un 3,2% de los bazos analizados. La población de ejemplares de cautividad presentó mayor porcentaje de infectados (33,3%) que las poblaciones de libertad (1,1%). La única población de vida libre en la que se aisló esta bacteria en el bazo fue en la de Peñíscola, con un 3,1% de individuos afectados (tabla 10).

Tabla 10.- Tabla resumen de la infección de *Staphylococcus coagulasa negativo* en los animales del estudio.

Población	n	% positivos
General	3	3,2
Cautividad	2	33,3
Vida libre	1	1,1

n: número de individuos por núcleo. %positivos: porcentaje de individuos positivos

Alcaligenes spp., *Proteus* spp., y *Streptococcus* α hemolítico presentaron una prevalencia del 2,1% cada uno. El primero, *Alcaligenes*, se aisló en las poblaciones de Peñíscola y La Safor-Gandía con una prevalencia del 3,1% en cada una de las

poblaciones. Sin embargo no hubo ningún caso en individuos en cautividad. *Proteus* spp. solamente se aisló en la población de cautividad (33,3%), mientras que *Streptococcus* α hemolítico solamente se aisló en la población de vida libre, La Safor-Gandía, con una prevalencia del 6,3%.

Enterobacter cloacae presentó una incidencia global del 1,1%, no aislándose en la población de cautividad y sí en una población de vida libre, en el marjal de La Safor-Gandía con un porcentaje de infección del 3,1%. *Providencia rettgeri* y *Pseudomonas* spp. se aislaron en Peñíscola con una incidencia poblacional del 3,1% para cada una de ellas.

4.1.2.1.4.- Riñón

Tras los pulmones, los riñones fueron los órganos con mayor porcentaje de infección bacteriana. El 35,8% de las muestras analizadas estaban colonizadas por alguna bacteria. La población de cautividad presentó un porcentaje de infección mayor que las de vida libre (50% y 34,8%, respectivamente). Respecto al estudio poblacional, el núcleo con mayor afección bacteriana en riñón fue Peñíscola (53,1%), seguido de La Safor-Gandía (31,3%) y la población de Almenara (16,0 %) (tabla 11).

Tabla 11.- Distribución microbiológica por poblaciones en riñón de *Trachemys scripta elegans*.

	Libertad						Cautividad		TOTAL	
	PEÑÍSCOLA		ALMENARA		LA SAFOR-GANDIA		n	%	n	%
Bacterias aisladas	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Bacterias en general	17	53,1*	4	16,0*	10	31,3*	3	50,0*	34	35,8*
<i>Aeromonas hydrophila</i>	5	15,6	3	12,0	7	21,89			15	15,8
<i>Streptococcus</i> α hemolítico			1	4,0	3	9,34			8	8,4
<i>Escherichia coli</i>	6	18,8			6	18,8	1	16,7	7	7,4
<i>Alcaligenes</i> sp.	3	9,4	1	4,0					5	5,3
<i>Proteus</i> spp.					1	3,1	2	33,3	3	3,2
<i>Pseudomonas</i> sp.	3	9,4							3	3,2
<i>Staph. coag. negativo</i>							3	50,0	3	3,2
<i>Streptococcus</i> spp.	3	9,4							3	3,2
<i>Providencia rettgeri</i>	2	6,3							2	2,2
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	3,1							1	1,1
<i>Klebsiella</i> sp.					1	3,1			1	1,1
N	32		25		32		6		95	

%: de ejemplares infectados; n: número de infectados; * porcentaje de ejemplares infectados por al menos un tipo de bacteria; N: número de ejemplares de cada una de las poblaciones.

La bacteria aislada con mayor frecuencia fue *Aeromonas hydrophyla*, presentando una prevalencia en conjunto de 15,8%. Dicha bacteria no se aisló en la población de ejemplares cautivos y sí en las poblaciones de vida libre con un porcentaje de infección del 16,8%. Respecto a las poblaciones de vida libre los porcentajes de infección fueron de un 15,6% en la población de Peñíscola, 12,0% en la de Almenara y 21,9% en La Safor-Gandía.

Streptococcus α hemolítico fue el segundo microorganismo aislado con mayor frecuencia (8,4%). No se aisló en la población de ejemplares en cautividad, hallándose únicamente en las poblaciones de Almenara (4,0%) y La Safor-Gandía (9,4%).

Escherichia coli presentó un porcentaje de infección del 7,4%, presentándose tanto en las poblaciones de vida libre (16,7%) como de cautividad (13,5%). El porcentaje de ejemplares positivos de la población de Peñíscola y la de La Safor-Gandía fue el mismo (18,8%) y no se aisló en los ejemplares del marjal de Almenara. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los núcleos.

Alcaligenes fue aislado en el 5,3% de las muestras examinadas. No se aisló de muestras procedentes de la población de ejemplares cautivos. En los únicos núcleos poblacionales que se aisló *Alcaligenes* spp. fueron en las poblaciones de Peñíscola (9,4%) y en Almenara (4,0%).

Con un porcentaje de infección del 3,2% se aislaron *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* coagulasa negativo y *Streptococcus* spp. La primera, *Proteus*, se aisló con mayor frecuencia en la población de ejemplares en cautividad (33,3%). Únicamente se aisló en un núcleo de vida libre, La Safor-Gandía (3,1%). *Pseudomonas* sólo se halló en la población de Peñíscola con una prevalencia del 9,4%. *Staphylococcus* coagulasa negativo se aisló en ejemplares en cautividad (50,0%) mientras que estuvo ausente en el resto de las poblaciones estudiadas. *Streptococcus* spp. se aisló en la población de Peñíscola (9,4%) y no en el resto de las poblaciones.

Providencia rettgeri solo se aisló en Peñíscola (6,3%). Mientras que *Klebsiella* spp. únicamente en La Safor-Gandía (3,1%). Por último, *Acinetobacter* spp. se aisló a partir de un único ejemplar del marjal de Peñíscola (3,1%).

4.1.2.1.5.- Intestino

Se pudo aislar al menos un tipo bacterias en el 65,3% de las muestras examinadas. El intestino de los animales de las poblaciones de vida libre estaba más colonizado por bacterias que los de la población de cautividad (66,3% y 50,0% respectivamente). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos dos tipos de hábitats. Por núcleos poblacionales los ejemplares con mayor presencia bacteriana fueron los del marjal de La Safor-Gandía con un 84,4%, seguida de la población de Almenara con un 80,0%, y por último la población de Peñíscola con el 37,5% (tabla 12).

Tabla 12.- Distribución microbiológica por poblaciones en intestino de *Trachemys scripta elegans*.

	Libertad						Cautividad		TOTAL	
	PEÑÍSCOLA		ALMENARA		LA SAFOR-GANDIA		n	%	n	%
Bacterias en general	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Bacterias aisladas	12	37,5*	20	80,0*	27	84,4*	3	50,0*	62	65,3*
<i>Aeromonas hydrophila</i>	9	28,1	16	64,0	18	56,3	3	50,0	46	48,4
<i>Escherichia coli</i>	14	43,8	7	28,0	18	56,3	2	33,3	41	43,2
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	4	12,5	5	20,0	2	6,3			11	11,6
<i>Proteus</i> sp.	3	9,4	1	4,0	4	12,5			8	8,4
<i>Klebsiella</i>					6	18,8			6	6,3
<i>Vibrio cholerae</i>	2	6,3	3	12,0	1	3,1			6	6,3
<i>Proteus vulgaris</i>			1	4,0	3	9,4	1	16,7	5	5,3
<i>Salmonella</i> sp.					3	7,1♣			3	2,8●
<i>Citrobacter</i> sp.	1	3,1			1	3,1			2	2,1
<i>Edwarsiella tarda</i>			1	4,0	1	3,1			2	2,1
<i>Morganella morganii</i>			1	4,0	1	3,1			2	2,1
<i>Providencia</i> sp.			1	4,0			1	16,7	2	2,1
<i>Streptococcus beta hemolítico</i>	1	3,1			1	3,1			2	2,1
<i>Vibrio mimicus</i>					2	6,3			2	2,1
<i>Vibrio</i> spp.	1	3,1	1	4,0					2	2,1
<i>Alcaligenes</i> sp.					1	3,1			1	1,1
<i>Citrobacter braakii</i>					1	3,1			1	1,1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	3,1							1	1,1
<i>Enterobacter</i> sp.			1	4,0					1	1,1
<i>Escherichia hermannii</i>	1	3,1							1	1,1
<i>Providencia rettgeri</i>	1	3,1							1	1,1
<i>Streptococcus alfa hemolítico</i>	1	3,1							1	1,1
<i>Streptococcus</i> spp.	1	3,1							1	1,1
N	32		25		32		6		95	

%. de ejemplares infectados; n: número de infectados; * porcentaje de ejemplares infectados por al menos un tipo de bacteria; N: número de ejemplares de cada una de las poblaciones; ♣ porcentaje infección sobre 42 ejemplares población; ● porcentaje infección sobre 105 ejemplares totales.

Aeromonas hydrophyla fue la bacteria más frecuentemente aislada (48,4%), se aisló en todas las poblaciones estudiadas. En la población de ejemplares de cautividad y en las poblaciones de vida libre el porcentaje de aislamiento fue semejante (50,0% y 48,3% respectivamente), no se encontraron diferencias significativas entre ambas poblaciones. El núcleo con mayor frecuencia de aislamiento fue el de Almenara con el 64,0%, seguida de La Safor-Gandía con el 56,3%, y por último la población de Peñíscola con el 28,1%. No existieron diferencias significativas entre las poblaciones en cuanto a la infección por *A. hydrophyla*.

Escherichia coli también se aisló en los cuatro grupos poblacionales estudiados con una incidencia global del 43,2%. En la población de ejemplares de cautividad la frecuencia de aislamiento fue del 33,3% frente al 43,8% de las poblaciones de vida libre. Respecto al aislamiento de esta bacteria según poblaciones, los intestinos más colonizados fueron los de la población de La Safor-Gandía con el 56,3%, seguido de los de las poblaciones de Peñíscola con el 43,8%, y por último la población de Almenara con el 28% (tabla 14).

Plesiomonas shigelloides fue aislada en el 11,6% de los individuos. No se aisló en la población de cautividad, pero sí en las tres de vida libre (12,3%). El núcleo más colonizado por *Plesiomonas shigelloides* fue el de Almenara con el 20,0%, seguido de Peñíscola (12,5%) y La Safor-Gandía (6,3%).

El género *Proteus* también fue aislado de la flora intestinal en los cuatro grupos de estudio, en conjunto presentaron una prevalencia del 11,6%. *Proteus vulgaris* se aisló tanto de poblaciones de vida libre como de la de vida en cautividad, con una prevalencia global del 5,3%. La población de cautividad tuvo una incidencia del 16,7% frente al 4,5% que exhibieron las poblaciones de vida libre. Respecto al estudio por poblaciones de vida libre, la que presentó mayor porcentaje de positivos fue La Safor-Gandía con el 9,4% y por último la población de Almenara con el 4,0%. La especie del género *Proteus* que no se pudo identificar, se aisló en poblaciones silvestres (9,0%) y no en la población de ejemplares de cautividad. El núcleo que presentó mayor porcentaje de positivos para esta bacteria fue La Safor-Gandía, seguida de Peñíscola y Almenara, con unos porcentajes del 12,5%, 9,4% y 4,0% respectivamente.

Las especies del género *Vibrio* también se encontraron presentes en la flora intestinal de estos galápagos, siendo la prevalencia de todas ellas en conjunto del 10,5%. Ninguna especie de este género se aisló en la población de cautividad. *V. cholerae* fue la especie más frecuente dentro del género (6,3%). Se aisló en todas las poblaciones de vida libre (6,7%). El porcentaje mayor de aislamiento corresponde a la población del marjal de Almenara con un 12,0% de individuos afectados, seguido del 6,3% de la de Peñíscola y el 3,1% a la del marjal de La Safor-Gandía. La especie *V. mimicus* tan sólo se pudo aislar en la población de La Safor-Gandía con una prevalencia poblacional del 6,3% y del 2,1% global. Se aislaron dos cepas del género *Vibrio* en las que no se pudo determinar la especie, una en la población de Peñíscola (3,1%) y la otra en la de Almenara (4,0%).

El género *Streptococcus* se aisló únicamente en poblaciones de vida libre (4,5%). En la población de Peñíscola se aisló una cepa de *Streptococcus* α hemolítico y una de *Streptococcus* β hemolítico, con una prevalencia para cada uno de ellos del 3,1%. *Streptococcus* β hemolítico también se halló en la población de La Safor-Gandía, con un porcentaje de colonización poblacional del 3,1%.

Citrobacter braakii y *Citrobacter* spp. en conjunto alcanzan un porcentaje de aislamiento del 3,2%. Se aislaron en poblaciones de vida libre y nunca en la población de cautividad. En el marjal de La Safor-Gandía se aislaron los dos tipos de bacterias con la misma frecuencia, el 3,1%. En Peñíscola, también se aisló con la misma frecuencia una especie del género *Citrobacter* que no se logró identificar (3,1%).

Klebsiella spp. se aisló en el 6,3% de las muestras de intestino. No se aisló en la población de ejemplares de cautividad y solamente se aisló en seis ejemplares de la población de La Safor-Gandía (18,8 %).

Edwardsella tarda y *Morganella morgani* se aislaron en el 2,1% de los individuos analizados. Ambas se aislaron en el marjal de Almenara (4,0%) y en La Safor-Gandía (3,1%). Las especies del género *Providencia* se aislaron tanto en la población de cautividad (16,7%) como en la de Almenara, de vida libre (4,0%).

Con un porcentaje global de positivos del 1,1%, se pudieron aislar una sola vez las siguientes bacterias: *Alcaligenes* spp. en la población de La Safor-Gandía (3,1%),

Enterobacter cloacae en el marjal de Peñíscola (3,1%), *Enterobacter* spp. en Almenara (4,0%), *Escherichia hermannii* en la población de Peñíscola (3,1%), *Providencia rettgeri* en los ejemplares de Peñíscola (3,1%).

Salmonella spp. también se aisló del intestino de *Trachemys scripta elegans*. Durante este estudio se han examinado 105 muestras de hisopos cloacales, 99 hisopos cloacales pertenecían a ejemplares de vida libre y 6 de ejemplares de cautividad. No se encontró presencia de *Salmonella* en los ejemplares de cautividad. Sin embargo, el 2,8% de ejemplares en libertad muestreados eliminaban *Salmonella* en el momento del muestreo, éstos pertenecían a la misma población (La Safor-Gandía, 7,1%).

4.1.2.2.- Estudio bacteriología por poblaciones

El estudio del estado sanitario de las diferentes poblaciones de *Trachemys scripta elegans* pone de manifiesto los siguientes datos respecto a los agentes bacterianos. Se estudiaron un total de seis individuos en cautividad y 99 en poblaciones de vida libre, 32 en el marjal de Peñíscola, 25 en Almenara y 42 en La Safor-Gandía (tabla 14).

La población con mayor porcentaje de infección por bacterias fue la de cautividad, el 83,7% frente al 51,6% que presentaban las poblaciones de vida libre. Dentro de las poblaciones libres, el más poblado por bacterias fue el marjal de Peñíscola con una incidencia del 78,1%, seguido por la población de La Safor-Gandía con el 43,8% y por último la de Almenara con tan sólo el 28,0% (tabla 13).

Tabla 13.- Distribución de agentes infectantes por poblaciones de *Trachemys scripta elegans*.

	Libertad						Cautividad		TOTAL	
	PEÑÍSCOLA		ALMENARA		LA SAFOR-GANDIA		n	%	n	%
Bacterias aisladas	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Bacterias en general	25	78,1*	20	80,0*	27	84,4*	5	83,3*	77,0	81,1*
<i>Aeromonas hydrophila</i>	16	50,0	19	76,0	21	65,6	3	50,0	59	62,1
<i>Escherichia coli</i>	19	59,4	8	32,0	21	65,6	3	50,0	50	52,6
<i>Staph. coag. negativo</i>	9	28,1	2	8,0	1	3,1	5	83,3	17	17,9
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	5	15,6	5	20,0	2	6,3			12	12,6
<i>Proteus sp.</i>	3	9,4	1	4,0	4	12,5	2	33,3	10	10,5
<i>Klebsiella</i>	2	6,3			8	25,0			10	10,5
<i>Alcaligenes sp.</i>	5	15,6	1	4,0	2	6,3			8	8,4
<i>Strept. alfa hemoitico</i>	1	3,1	2	8,0	3	9,4			6	6,3
<i>Vibrio cholerae</i>	2	6,3	3	12,0	1	3,1			6	6,3
<i>Proteus vulgaris</i>			1	4,0	3	9,4	1	16,7	5	5,3
<i>Streptococcus</i>	4	12,5					1	16,7	5	5,3
<i>Pseudomonas</i>	4	12,5							4	4,2
<i>Providencia rettgeri</i>	3	9,4							3	3,2
<i>Salmonella sp.</i>					3	7,1♣			3	2,8◆
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	6,3			1	3,1			3	3,2
<i>Citrobacter sp.</i>	1	3,1			1	3,1			2	2,1
<i>Edwardsiella tarda</i>			1	4,0	1	3,1			2	2,1
<i>Enterobacter sp.</i>			2	8,0					2	2,1
<i>Morganella morganii</i>			1	4,0	1	3,1			2	2,1
<i>Pasterella</i>	2	6,3							2	2,1
<i>Providencia sp.</i>			1	4,0			1	16,7	2	2,1
<i>Vibrio mimicus</i>					2	6,3			2	2,1
<i>Vibrio sp.</i>	1	3,1	1	4,0					2	2,1
<i>Actinobacter</i>	1	3,1							1	1,1
<i>Citrobacter braakii</i>					1	3,1			1	1,1
<i>Escherichia hermannii</i>	1	3,1							1	1,1
<i>Strept. beta hemolítico</i>	1	3,13							1	1,1
N	32		25		32		6		95	

%: de ejemplares infectados; n: número de infectados; * porcentaje de ejemplares infectados por al menos un tipo de bacteria; N: número de ejemplares de cada una de las poblaciones; ♣ porcentaje infección sobre 42 ejemplares población; ◆ porcentaje infección sobre 105 ejemplares totales.

4.1.2.2.1.- *Salmonella*

Salmonella se ha aislado únicamente en tres ejemplares de la población en libertad de La Safor-Gandía con una prevalencia del 2,8%.

De los tres ejemplares *Trachemys scripta elegans* infectados por *Salmonella* uno presentó el serotipo *S. Rissen* y los otros dos *S. Typhimurium*.

Comportamiento de *Salmonella* frente a los antibióticos, cepas asiladas de *Trachemys scripta elegans*

Los antibiogramas de las colonias de *Salmonella* obtenidas exhiben gran resistencia a una amplia gama de antibióticos. El 100% de las cepas fueron resistentes a ampicilina, ácido nalidíxico, amikacina, cabernicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, enrofloxacin, tetraciclina imipenem y gentamicina. Dos de las cepas presentaron resistencia total a amoxicilina-ácido clavulánico y cefotaxima, y una demostró una resistencia intermedia a estos antibióticos. Una cepa presentó resistencia total a ceftazidima, a kanamicina, y trimetoprim-sulfametoxazol y dos una resistencia intermedia. Al único antibiótico que evidenciaron sensibilidad las cepas de *Salmonella* aisladas fue a piperacilina, una cepa sensible, otra con sensibilidad intermedia y la otra resistencia total al antibiótico (tabla 14).

Tabla 14.- Resumen del resultado de los antibiogramas realizado a cepas de *Salmonella* procedentes de muestras de *Trachemys scripta elegans*.

Antibiótico	Resistencia total		Resistencia Intermedia		Sensible	
	n	% de cepas	n	% de cepas	n	% de cepas
Ampicilina	3	100				
Ácido nalidíxico	3	100				
Amikacina	3	100				
Amoxicilina-Ác. clavulánico	2	66,7	1	33,3		
Cabernicilina	3	100				
Cefotaxima	2	66,7	1	33,3		
Ceftazidima	1	33,3	2	66,7		
Ciprofloxacina	3	100				
Cloranfenicol	3	100				
Enrofloxacin	3	100				
Gentamicina	3	100				
Imipenem	3	100				
Kanamicina	1	33,3	2	66,7		
Piperacilina	1	33,3	1	33,3	1	33,3
Tetraciclina	3	100				
Trimetoprim-sulfametoxazol	1	33,3	2	66,7		

n: número de cepas que presentan diferente grado de resistencia frente a cada uno de los antibióticos.

El antibiograma realizado a las colonias de *S. Rissen* aisladas determinó que era sensible a la piperacilina, presentó resistencia intermedia a tres antibióticos: cefotaxima, kanamicina y trimetoprim-sulfmetoxazol. Y fue resistente a los nueve restantes utilizados (ampicilina, ácido nalidixico, amikacina, amoxicilina-ác.clavulánico, cabernicilina, ceftazidima, ciprofloxacina, cloranfenicol, enrofloxacina, gentamicina, imipenem y tetraciclina).

Las cepas de *Salmonella enterica* subsp *enterica* serotipo Typhimurium, presentaron resultados diferentes en los antibiogramas según del animal del que fueron aislados. La cepa aislada del animal B3/28/240708 presentó una resistencia total a los antibióticos amoxicilina-ác. clavulánico, kanamicina, piperacilina y trimetoprim-sulfmetoxazol, y la cepa aislada de la muestra B3/29/240708 presentó una resistencia intermedia a esos antibióticos. Para el resto de los antibióticos utilizados en el antibiograma el comportamiento fue semejante, resistencia intermedia a la ceftazidima y resistencia total al resto (ampicilina, ácido nalidixico, amikacina, cabernicilina, cefotaxima, ciprofloxacina, cloranfenicol, enrofloxacina, gentamicina, imipenem y tetraciclina).

4.1.2.2.2.- Otras especies bacterianas

Aeromonas

Aeromonas hydrophila presentó un porcentaje de infección del 62,1%. Se aisló tanto en la población de ejemplares cautivos (50,0%) como en las poblaciones de vida libre (62,9%). Respecto al estudio por núcleos de vida libre, la población con mayor prevalencia fue Almenara con el 76,0%, seguida de la población de La Safor-Gandía con el 65,6% y Peñíscola que presentó el 50,0 %.

Escherichia

Escherichia coli se aisló en el 52,6% de los individuos analizados, tanto en la población de ejemplares cautivos (50%), como en las poblaciones de vida libre (53,9%). De las poblaciones libres, el núcleo con mayor presencia de esta bacteria fue la de La

Safor-Gandía (65,6%), seguida de la de Peñíscola (59,4%) y por último la de Almenara (32,0%).

Staphylococcus

Staphylococcus coagulasa negativo presentó una prevalencia global del 17,9%. La población de ejemplares en cautividad presentaba mayor porcentaje que los ejemplares de vida libre, 83,3% y 13,4%, respectivamente (tabla 15). De las poblaciones libres, la que presentó mayor tasa de infección fue la población de Peñíscola (28,1%), seguida por la de Almenara (8,0%) y por último la de La Safor-Gandía (3,1%) (tabla 16).

Tabla 15.- Tabla resumen de la infección de *Staphylococcus coagulasa* negativo en los animales del estudio.

Población	n	% positivos
General	17	17,9
Cautividad	5	83,3
Vida libre	11	13,4

n: número de individuos por núcleo. % de positivos: porcentaje de individuos positivos

Tabla 16.- Tabla resumen de la infección de *Staphylococcus coagulasa* negativo en los diferentes núcleos de *Trachemys scripta elegans* en libertad.

Núcleos de vida libre	n	% positivos
Peñíscola	9	28,1
Almenara	2	8,0
La Safor-Gandía	1	3,1

n: número de individuos por núcleo. % de positivos: porcentaje de individuos positivos

Plesiomonas

Plesiomonas shigelloides se aisló con una prevalencia del 12,6%, siempre se encontró en poblaciones en libertad. La población de Almenara presentó un 20% de los animales infectados, seguida de la población de Peñíscola con un 15,6%, y por último la población de La Safor-Gandía con una prevalencia del 6,3%.

Proteus

Proteus sp. se encontró tanto en poblaciones en libertad como en la población de cautividad, el porcentaje de animales infectados por esta bacteria fue del 10,5%, siendo la población de cautividad la que presentó mayor porcentaje 33,3%, seguida de las poblaciones de La Safor-Gandía (12,5%) y Peñíscola (9,4%), y por último la de Almenara con un único animal infectado (4%). Sin embargo *Proteus vulgaris* se aisló tanto en poblaciones de vida libre como en las de cautividad (5,3%), la población con mayor

prevalencia correspondía a la población de vida en cautividad (16,7%), aunque correspondía a un único ejemplar. Respecto a las poblaciones de vida libre la de mayor prevalencia correspondía a la de La Safor-Gandía (9,4%), seguida de la de Almenara (4%), en la de Peñíscola no se aisló esta especie.

Klebsiella

Klebsiella spp. se aisló en el 10,5% de los individuos. No se encontró en la población de ejemplares en cautividad, pero sí en los de vida libre (11,2%). Aun así, solamente se pudo aislar en los ejemplares de Peñíscola (25%) y La Safor Gandía (6,3%).

Alcaligenes

Alcaligenes se ha aislado exclusivamente en las poblaciones de libertad, la prevalencia en el presente trabajo de dicha bacteria es del 8,4%. La población con mayor presencia fue la de Peñíscola con el 15,6% de los animales infectados, en las otras dos poblaciones la prevalencia fue menor, La Safor-Gandía con el 6,3% y Almenara con el 4%.

Streptococcus

Streptococcus spp. se aisló en el marjal de Peñíscola y también en los ejemplares en cautividad (12,5% y 16,7%, respectivamente). *Streptococcus* α hemolítico se aisló en exclusiva en poblaciones de vida libre, la población con mayor prevalencia fue la de La Safor-Gandía con un 9,4%, seguida por la de Almenara con un 12% y por último la de Peñíscola con un 3,1%. *Streptococcus* β hemolítico sólo se pudo aislar en un ejemplar de la población de Peñíscola.

Vibrio

Varias han sido las especies de *Vibrio* que se han podido aislar en el presente estudio. La especie que mayor presencia ha tenido ha sido *Vibrio cholerae* (6,3%), que se ha podido aislar en todas las poblaciones en libertad, *Vibrio mimicus* y otra especie de *Vibrio* que no se pudo determinar se aislaron con el mismo porcentaje (2,1%) y también

en poblaciones en libertad. *Vibrio cholerae* se pudo aislar en todas las poblaciones en libertad, siendo la población de Almenara la que presentaba mayor prevalencia (12,0%), seguida de las poblaciones de Peñíscola y La Safor-Gandía con unas prevalencias de 6,3% y 3,1%, respectivamente.

Pseudomonas

Pseudomonas spp. se aisló en cuatro ejemplares de la población de Peñíscola (12,5%).

Providencia

Dos han sido las especies de *Providencia* que se han podido aislar, por una parte *Providencia rettgeri* (3,2%) en la población de Peñíscola y otra especie del género que no se pudo identificar, que se aisló en el marjal de Almenara (4,0%), de vida libre, y en los ejemplares de cautividad (16,7%).

Enterobacter

Dos especies diferentes de *Enterobacter* se pudieron aislar en las poblaciones en libertad. *Enterobacter cloacae* en las poblaciones de Peñíscola (6,3%) y en la de La Safor-Gandía (3,1%), siendo la prevalencia total del 3,2%. *Enterobacter* sp. se aisló únicamente en la población de Almenara.

Pasterella

Pasterella sp. se ha aislado en exclusiva en la población de Peñíscola (2,1%).

Citrobacter

Dos especies de *Citrobacter* se han aislado en poblaciones en libertad, *Citrobacter braakii* (1,1% en la población de La Safor-Gandía) y otra especie del género que no se ha podido identificar en las poblaciones de Peñíscola y La Safor-Gandía, con una prevalencia total del 2,1%.

Edwarsiella

Edwarsiella tarda se ha encontrado en el intestino de dos ejemplares, uno del marjal de Almenara y otro en el de Gandía.

Morganella

Morganella sólo se determinó en un 2,1%, en un ejemplar de la población de almenara y en otro de La Safor-Gandía, por tanto podemos indicar que su presencia es testimonial.

En conclusión, dentro del estudio de la caracterización de la bacteriología de *Trachemys scripta elegans* en la Comunidad Valenciana, se ha observado que esta especie el hospedador de *Vibrio cholerae*, *Alcaligenes* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp., *Edwarsiella tarda*, *Plesiomonas shigelloide*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Pasterella* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp y *Salmonella* spp. Por otro lado, todas estas especies bacterianas aisladas en los galápagos de la Comunidad Valenciana se han encontrado en las muestras de agua de los marjales, excepto *Staphylococcus* y *Plesiomonas*.

La población con mayor biodiversidad microbiana es la de Peñíscola con 19 especies bacterianas diferentes. En general se puede comprobar que en las poblaciones libres la biodiversidad es mucho mayor que en la población de cautividad con 17 especies diferentes en la población de La Safor-Gandía y 14 especies diferentes en la población de Almenara, frente a las 7 especies aisladas de los ejemplares en cautividad (tabla 17).

Tabla 17.- Número de especies bacterianas identificadas según núcleo estudiado en *Trachemys scripta elegans*.

Núcleo	n
Libre (Peñíscola)	19
Libre (Almenara)	14
Libre (La Safor-Gandía)	17
Cautividad	7

n: número de individuos por núcleo.

4.1.3.- Estudio de portadores de *Herpesvirus* (ChHV) en *Trachemys scripta elegans*

Se estudiaron 95 muestras de pulmón para la identificación vírica. Se aislaron 23 muestras sospechosas de infección, de las cuales sólo 11 se confirmaron y correspondieron a *Herpesvirus* (ChHV) (figura 29). El porcentaje de infección fue del 11,6%.

En los animales de la población de cautividad no se aisló el virus, solamente se aisló en individuos de vida libre, el porcentaje de infección en este tipo de hábitat fue del 12,3%. El núcleo poblacional con más presencia de virus fue el del marjal de La Safor-Gandía con un porcentaje de portadores del 25,0%, seguido de la población de Almenara con un porcentaje del 8,0% y de la población del marjal de Peñíscola con una presencia del 3,13% (tabla 18).

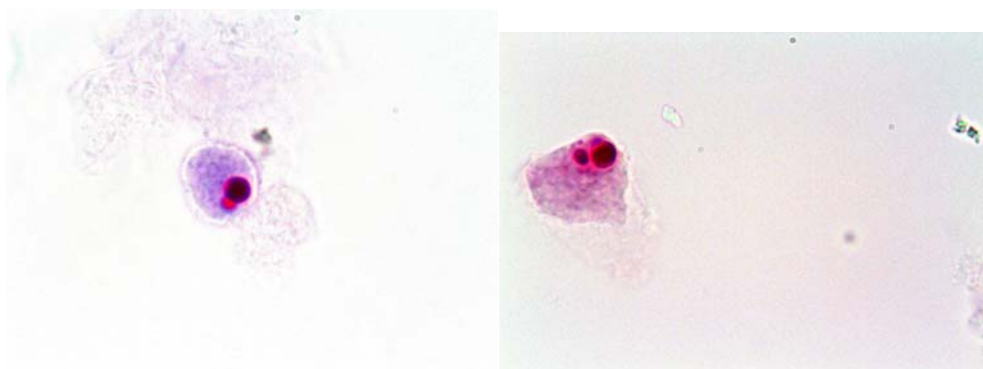


Figura 29.- Imagen de células con cuerpo de inclusión intranuclear tipo Cowdry A. Tinción verdemetilo pironina G 1000x.

Tabla 18.- Porcentaje de infección de *Herpesvirus* (ChHV) en función del núcleo poblacional.

Núcleo	n	% de infección
Libre (Peñíscola)	1	3,1 ^a
Libre (Almenara)	2	8,0 ^{a,b,c}
Libre (La Safor-Gandía)	8	25,0 ^{b,c}
Cautividad	0	0,0 ^{a,b,c}

n: número de individuos por núcleo. % de positivos: porcentaje de individuos positivos. Los superíndices a,b y c indican diferencias significativas entre las distintas poblaciones.

4.1.4.- Estudio parasitológico en *Trachemys scripta elegans*

Un total de 105 ejemplares fueron examinados para su estudio parasitológico, de los cuales el 7,6% (8/105) resultaron positivos a la presencia de parásitos.

Tras realizar el filtrado del agua contenida en las cajas de transporte no se observó ninguna forma parasitaria. Asimismo, la técnica coprológica de McMaster modificada tampoco mostró la presencia de ooquistes en las heces.

La inspección macroscópica del caparazón y la piel reveló la ausencia de ectoparásitos. Los órganos internos como pulmón, corazón, bazo e hígado se encontraban asimismo libres de endoparásitos, tanto en el caso de animales de vida libre como en el de los mantenidos en cautividad.

Al realizar el examen del contenido digestivo tras la apertura del intestino, se encontraron ejemplares adultos de una única especie de trematodo, identificado como *Telorchis attenuata*, Goldberg, 1911 (Digenea, Telorchiidae) (figura 30). La prevalencia de parasitación por este trematodo fue del 7,6% (8/105). Todos los animales en que se hallaron trematodos tras la necropsia contenían además huevos en sus heces tras procesarlas mediante el método cualitativo de sedimentación en formol-acetato de etilo (figura 31).



Figura 30.- *Telorchis attenuata*, Goldberg, 1911 (Digenea, Telorchiidae).

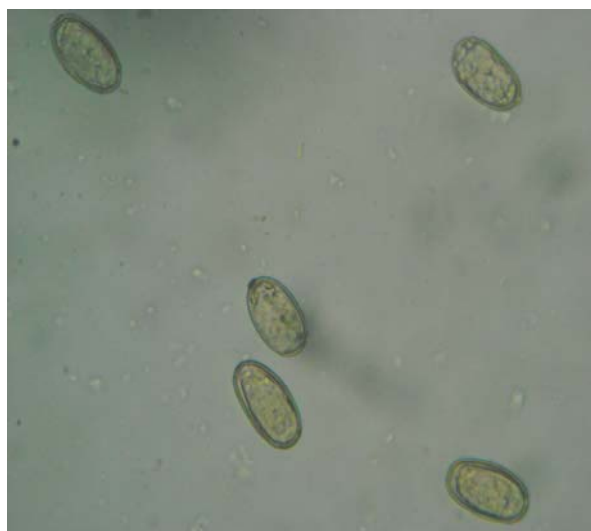


Figura 31.- Huevos de *Telorchis attenuata*, Goldberg, 1911 (Digenea, Telorchiidae).

De los ocho animales positivos, siete procedían del marjal de Almenara, y uno del marjal de La Safor-Gandía. La intensidad media de parasitación fue de 11,3, y el rango de carga parasitaria se encontró entre 1 y 33 trematodos adultos por galápagos. Por último, la abundancia o densidad relativa fue de 0,86.

4.1.5.- Estudio microbiológico del agua de los marjales

Al finalizar la captura y análisis de los individuos se tomó una muestra de agua de cada una de los marjales estudiados. En las aguas del marjal de Peñíscola se han aislado cepas de las bacterias *Aeromonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Citrobacter breakii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella* spp., *Streptococcus fecales*, *Vibrio cholerae*, *Serratia marcensis* y *Stenoprophomonas maltophilia*. De las bacterias aisladas en este marjal, no se encontró ninguna especie de *Serratia marcensis* y *Stenoprophomonas maltophilia* en los galápagos capturados en sus aguas (tabla 19).

Tabla 19.- Resultado del análisis microbiológico de las aguas de los marjales.

	Peñíscola	Almenara	Gandía		Peñíscola	Almenara	Gandía
<i>Aeromonas</i> sp.	+	+	+	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	-	-
<i>Alcaligenes</i> sp.	+	-	-	<i>Proteus</i> sp.	-	+	+
<i>Citrobacter breakii</i>	-	-	-	<i>Providencia</i> sp.	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	-	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	+
<i>Citrobacter</i> sp.	-	-	-	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	+	-	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	-	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>	+	+	-
<i>Enterobacter</i> sp.	-	-	+	<i>Salmonella</i> sp.	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Klebsiella</i> sp.	+	+	+	<i>Streptococcus fecales</i>	+	+	+
<i>Morganella morganii</i>	-	-	-	<i>Vibrio cholerae</i>	+	-	-
<i>Pasteurella</i> sp.	-	+	-	<i>Vibrio</i> sp.	-	+	+
Bacterias no encontradas en los galápagos a pesar de su presencia en aguas.							
					Peñíscola	Almenara	Gandía
<i>Burkholderia</i>					-	+	+
<i>Rauvolfia</i> sp.					-	+	+
<i>Serratia</i> sp.					-	-	+
<i>Serratia marcensis</i>					+	+	-
<i>Stenoprophomonas maltophilia</i>					+	-	-

+: presencia de la bacteria en la muestra de agua del marjal, -: ausencia de la bacteria en la muestra de agua del marjal.

En las lagunas del marjal de Almenara se han aislado cepas de *Aeromonas* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pasterella* sp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella* spp., *Streptococcus* fecales, *Vibrio* spp., *Burkholderia* spp., *Rauoltella* spp., y *Serratia marcescens*. De las bacterias aisladas en este marjal, no se encontró ninguna especie de *Burkholderia burkholderia*, *Rauoltella* sp. y *Serratia marcescens* en las tortugas capturadas en sus aguas (tabla 19).

En los humedales del marjal de La Safor-Gandía se aislaron cepas de las especies: *Aeromonas* spp., *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Streptococcus fecales*, *Vibrio* spp., *Burkholderia* spp., *Rauoltella* spp., y *Serratia* spp. De las bacterias aisladas en este marjal, no se encontró ninguna especie de *Burkholderia Burkholderia*, *Rauoltella* sp. y *Serratia* sp. en los galápagos capturados en sus aguas (tabla 19).

Existen cuatro especies bacterianas comunes en las diferentes marjales estudiadas: *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp., *Streptococcus* fecales (tabla 19). Las cuatro especies fueron aisladas a partir de los galápagos capturados de sus aguas.

El estudio de las aguas de los marjales pone de manifiesto que no existen diferencias entre las especies bacterianas presentes en el agua y aquellas aisladas de las muestras de *Trachemys scripta elegans*, a excepción de *Burkholderia*, *Rauoltella*, *Serratia* y *Stenoprophomonas* que nunca se aislaron a partir de muestras de galápagos.

4.2.- *Testudo hermanni hermanni*

Desde el mes de abril a octubre de 2009 se tuvo acceso a 69 ejemplares de la especie *Testudo hermanni hermanni*, 38 (55,1%) individuos fueron hembras y 31 (44,9%) machos, con edades comprendidas entre cinco y diez años (figura 32). De los ejemplares capturados 52 (75,4%) procedían del Criadero de Mallorca, 10 (14,5%) de la Sierra de Irta y siete (10,1%) del Desierto de las Palmas.

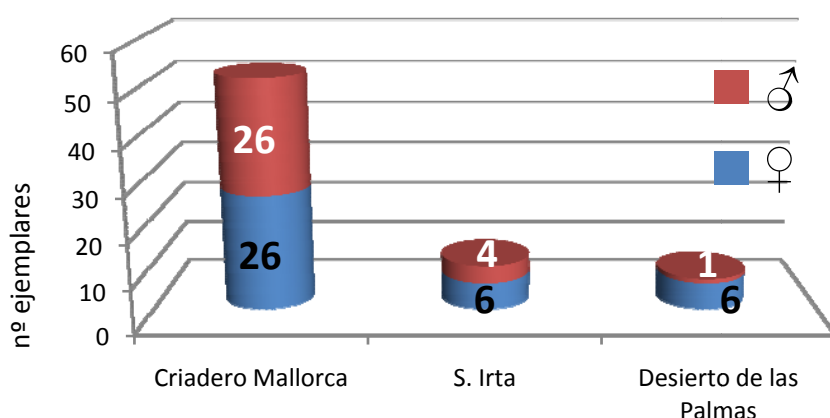


Figura 32.- Relación de ejemplares de *Testudo hermanni hermanni* muestreados, según procedencia y sexo. Los números dentro de las columnas indican el número de individuos dentro de cada grupo (machos y hembras).

4.2.1.- Determinación de *Salmonella* en *Testudo hermanni hermanni*

Se examinaron 69 muestras de hisopos cloacales. 52 (75,4%) muestras procedieron de criaderos y presentaron una incidencia para *Salmonella* del $59,6 \pm 6,9\%$. Mientras que las muestras de los 17 (24,6%) animales de vida libre presentaban una prevalencia del $11,8 \pm 9,5\%$. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a la presencia de *Salmonella* en animales de cautividad y los de vida libre ($p < 0,05$) siendo los primeros los más afectados por la bacteria.

Las técnicas utilizadas para el diagnóstico de *Salmonella* fueron PCR a tiempo real y la Norma ISO 6579:2002 (anexo D). Se encontraron diferencias significativas entre

las dos técnicas ($p < 0,05$), los resultados revelaron que el 47,8% ($n=33$) de las muestras fueron positivas al método de PCR a tiempo real, sin embargo solo el 14,5% ($n=10$) de las muestras fueron positivas mediante el método de la Norma ISO 6579:2002, todas las muestras positivas a este método lo fueron a la prueba molecular utilizada.

Los serotipos aislados a partir de muestras de *Testudo hermanni hermanni* son *S. Abony* ($n=5$), *S. Hermannsweder* ($n=1$), *S. Kottbus* ($n=1$) y *S. Salamae* ($n=3$). En los ejemplares de vida libre positivos del cercado del Desierto de las Palmas (Castellón) presentaron el serotipo *S. Salamae* ($n=2$).

Comportamiento de *Salmonella* frente a los antibióticos, cepas aisladas de *Testudo hermanni hermanni*

Los antibiogramas realizados a partir de las colonias de *Salmonella* aisladas, muestran gran resistencia a una amplia gama de antibióticos testados. La ampicilina, amikacina, amoxicilina-ácido clavulánico, cabernicilina, gentamicina, kanamicina, piperacilina y tetraciclina presentaron resistencia total en el 100% de las cepas testadas. El 70% fueron totalmente resistentes a la ceftazidima, mientras que el 30% presentaron resistencia intermedia a este antibiótico. El 50% de las cepas, presentaron resistencia total al ácido nalidíxico, el otro 50% de las cepas presentaron resistencia intermedia. El 40% de las cepas testadas para la enrofloxacin y la ciprofloxacina presentaron resistencia total, y el 60% de las cepas una resistencia intermedia. El 30% de las cepas presentaron resistencia total a cefotaxima y clorafenicol, mientras que el 70% de ellas presentaron resistencia intermedia a dichos antibióticos. El 40% de las cepas exhibieron resistencia intermedia a imipenem, el 20% de las cepas resistencia total y el 40% restante fueron sensibles. El 10% de las cepas presentaron resistencia total al trimetoprim-sulfametoxazol, mientras que el resto de las cepas (90%) mostraron resistencia intermedia (tabla 20).

Tabla 20.- Resumen del resultado de los antibiogramas realizados a cepas de *Salmonella* procedentes de muestras de *Testudo hermanni hermanni*.

Antibiótico	Resistencia total		Resistencia Intermedia		Sensible	
	n	% de cepas	n	% de cepas	n	% de cepas
Ampicilina	10	100				
Ácido nalidíxico	5	50	5	50		
Amikacina	10	100				
Amoxicilina-Ác. Clavulánico	10	100				
Cabernicilina	10	100				
Cefotaxima	3	30	7	70		
Ceftazidima	7	70	3	30		
Ciprofloxacina	4	40	6	60		
Cloranfenicol	3	30	7	70		
Enrofloxacina	4	40	6	60		
Gentamicina	10	100				
Imipenem	2	20	4	40	4	40
Kanamicina	10	100				
Piperacilina	10	100				
Tetraciclina	10	100				
Trimetoprim-sulfametoxazol	1	10	9	90		

n: número de cepas que presentan diferente grado de resistencia frente a cada uno de los antibióticos.

Las cinco cepas aisladas del serotipo *S. Abony* a partir de ejemplares de criadero presenta diferente patrón de resistencia según la muestra, sin embargo las cepas del serotipo *S. Salamae* procedentes tanto de animales de criadero como de animales de libertad presentan el mismo comportamiento (tabla 21).

114

Tabla 21.- Resumen del resultado de los antibiogramas realizados a cepas de *Salmonella* procedentes de muestras de *Testudo hermanni hermanni*, según el serotipo.

Antibiótico	<i>S. Abony</i>			<i>S. Salamae</i>			<i>S. Hermannswerder</i>			<i>S. Kottbus</i>		
	RT	RI	S	RT	RI	S	RT	RI	S	RT	RI	S
	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Ampicilina	5			3			1			1		
Ácido nalidíxico	3	2			3		1			1		
Amikacina	5			3			1			1		
Amoxicilina-Ác. Clavulánico	5			3			1			1		
Cabernicilina	5			3			1			1		
Cefotaxima	3	2			3			1			1	
Ceftazidima	5				3		1			1		
Ciprofloxacina	3	2			3		1				1	
Cloranfenicol	3	2			3			1			1	
Enrofloxacina	4	1			3			1			1	
Gentamicina	5			3			1			1		
Imipenem	2	3				3		1				1
Kanamicina	5			3			1			1		
Piperacilina	5			3			1			1		
Tetraciclina	5			3			1			1		
Trimetoprim-sulfametoxazol	1	4			3			1			1	

RT: Resistencia total; RI: Resistencia intermedia; S: sensible; n: número de cepas

4.2.2.- Estudio de portadores de *Herpesvirus* (ChHV) en *Testudo hermanni hermanni*

Las 69 muestras de hisopos orales de *Testudo hermanni hermanni*, se estudiaron mediante pruebas moleculares (reacción en cadena de la polimerasa, PCR) para *Herpesvirus* (ChHV) y en todos los casos fueron negativas.

4.2.3.- Estudio parasitológico en *Testudo hermanni hermanni*

El estudio de parásitos gastrointestinales se pudo realizar en 58 de los ejemplares que forman el estudio, debido a la imposibilidad de obtener heces en el momento de la toma de muestras del resto de ejemplares.

El 98,3% (57/58) de las muestras de heces analizadas de las tortugas *Testudo hermanni hermanni* presentaron formas parasitarias, huevos de oxiúridos. No se pudo conocer la especie que parasita a las tortugas examinadas por varias razones, por un lado, porque las tortugas no eliminaron ninguna forma adulta, y por otro, por la imposibilidad de realizar necropsias para obtener adultos, ya que son especies protegidas. Pero a pesar de ello, por la morfología de los huevos se puede afirmar que los nematodos pertenecen a la familia Pharyngodonidae, pudiendo ser *Alaeuris numidica*, *Mehdiella microstoma*, *Mehdiella uncinata*, *Tachygonetria longicollis*, *Tachygonetria conica* o *Tachygonetria palearcticus* (figura 33).

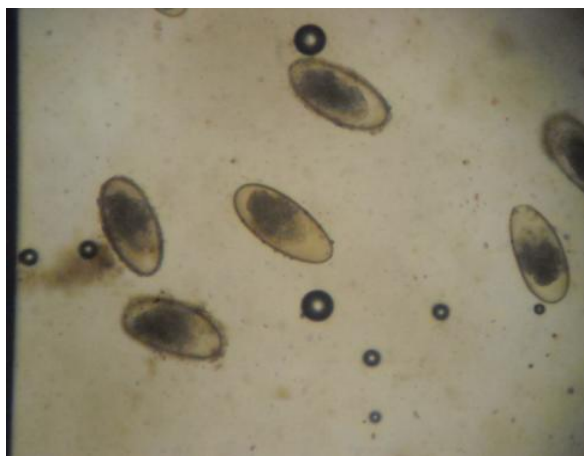


Figura 33.- Huevos de oxiúridos (Familia Pharyngodonidae) en heces de *Testudo hermanni hermanni*.

La intensidad media de huevos por gramo de heces (hpg) de nematodos fue de 5532. La eliminación de huevos por gramo de heces fue mayor en los ejemplares

procedentes de criaderos que en los procedentes de los cercados de vida libre (tabla 22). Existiendo diferencias significativas entre ambos grupos (prueba F: $9,9016 \cdot 10^{-5}$).

Tabla 22.- Huevos de oxiúridos por gramo de heces.

	Criaderos Mallorca hpg (huevos por gramo)	Vida libre hpg (huevos por gramo)
Intensidad media	5828	4397
Intensidad (rango)	(67-29497)	(0-4033)
ES (estándar)	$\pm 6631,46$	$\pm 2633,45$

4.3.- Diferencias en la identificación de agentes patógenos entre la especie invasora de las costas mediterráneas *Trachemys scripta elegans* y la especie autóctona *Testudo hermanni hermanni*

Al comparar los resultados obtenidos en *Trachemys scripta elegans* y *Testudo hermanni hermanni* en cuanto a la presencia de *Salmonella*, existen diferencias significativas entre ambas poblaciones ($p < 0,05$). Por otro lado, solo se han aislado *Herpesvirus* (ChHV) en quelonios de la especie *Trachemys scripta elegans* (10,5%) y no en *Testudo hermanni hermanni*. Por último, en relación a las helmintosis parasitarias que afectan a los quelonios de este estudio, la especie *Testudo hermanni hermanni* presenta una porcentaje de parasitación mayor que *Trachemys scripta elegans* (98,3% y 7,6% respectivamente) existiendo diferencias significativas entre ambas poblaciones ($p < 0,05$).

5.- DISCUSIÓN

5.1.- *Trachemys scripta elegans*

Al igual que el estado sanitario de cada ser vivo que forma un ecosistema es importante para cada componente del mismo, en la población humana es importante el estado sanitario de los animales que están en su entorno, en este grupo estarían contemplados desde los animales que forman parte de la dieta hasta los animales de parajes colindantes a poblaciones, pasando por los animales que conviven diariamente con las personas, como son las mascotas. Los animales objeto del presente estudio pueden formar parte de ecosistemas o ser mascotas, en el primer caso se consideran especies invasoras y en el segundo caso la legislación actual no lo permite. Las enfermedades zoonóticas son un hecho muy estudiado desde la antigüedad siempre unido al factor de compartir ecosistema del hombre y los animales, aumentando la posibilidad de infección conforme se estrecha la relación entre animal-hombre, sin olvidar las características propias del agente patógeno. La transmisión de microorganismos de *Trachemys* al hombre se ha puesto en evidencia en algunas infecciones importantes en Salud Pública, sobretodo la salmonelosis (CDC 2005; CDC 2007; CDC 2008; CDC 2010).

5.1.1.- Estudio macroscópico de los órganos

El hígado de los ejemplares de *Trachemys* del presente estudio ha sido el órgano que presentaba mayor número de lesiones macroscópicas, pero no se ha podido comparar con otros estudios de la misma especie, ya que no se han encontrado referencias bibliográficas al respecto por el escaso número de trabajos publicados sobre el estado sanitario de esta especie de galápagos.

5.1.2.- Estudio bacteriología

5.1.2.1.- Estudio bacteriología por órganos vs poblaciones

Dentro de lo que se podría esperar, el intestino fue el órgano con mayor prevalencia de bacterias (65,8%), debido a que es un órgano con población

microbiótica. Sin embargo en órganos como el hígado, bazo o riñón donde no se esperaría una presencia de bacterias, la prevalencia fue importante 27,8%, 18,9% y 15,8% respectivamente, al igual que en el pulmón que presentó una prevalencia del 35,8%. La especie de bacteria más prevalente en todos los órganos fue *Aeromonas hydrophyla*, bacteria que se ha aislado en reptiles, anfibios, peces (Mathewson y Dupont, 1992). Pero no se han podido comparar los hallazgos del presente trabajo con otros similares ya que no se han encontrado referencias bibliográficas por el escaso número de trabajos publicados sobre la microbiota general en diferentes órganos en esta especie de galápagos.

5.1.2.2.- Estudio bacteriología por poblaciones

En el presente estudio se han aislado gran número de especies bacterianas potencialmente patógenas para el hombre y otros animales de interés ecológico que comparten hábitat con estos galápagos. Por su importancia zoonótica destacan *Salmonella* y *Herpesvirus*.

5.1.2.2.1.- *Salmonella*

El estudio de la infección de *Salmonella* en galápagos ha sido el objetivo de las autoridades de todo el mundo durante años, por el uso extendido de estos animales como mascotas, de hecho a *Trachemys* frecuentemente se les ha responsabilizado de la salmonelosis en humanos, especialmente en niños (Feeley y Treger, 1969; Mermin *et al.*, 1997; Woodward *et al.*, 1997, Lynch *et al.*, 1999; Torfoss y Abrahamsen, 2000; Rodgers *et al.*, 2002; CDC 2005; CDC 2007; CDC 2008; CDC 2010). En un estudio realizado en Canadá se ha estimado que entre el 3 y 5% de todos los casos de salmonelosis en humanos están asociados a la exposición de animales exóticos. El 55% de estos casos estaban asociados a galápagos (Woodward *et al.*, 1997). Por otro lado, en Puerto Rico se ha detectado que alrededor del 85% de los casos de salmonelosis humana está ligado a los galápagos exóticos (Tauxe *et al.*, 1985). En Europa, en concreto en Alemania y Austria tras estudiar dos ejemplares de *Trachemys* no se consiguió aislar la bacteria en las heces (Geue y Loschner, 2002). Este estudio pone de

manifiesto que la prevalencia de *Salmonella* en los galápagos capturados en el litoral de la Comunidad Valenciana es del 2,8%. Este porcentaje de infección es aproximadamente igual al de otros ejemplares de la misma especie capturados del Parque Nacional de Doñana (4,5%, [Hidalgo-Vila et al., 2008a](#)) e inferior a otras especies de galápagos como *Mauremys leprosa* (12,0%) y *Emys orbicularis* (15,4%, [Hidalgo-Vila et al., 2007](#)). En relación a las condiciones de vida de los individuos estudiados (cautividad vs. libertad), no se ha detectado la presencia de *Salmonella* en aquellos ejemplares utilizados como mascotas. [Hidalgo-Vila et al. \(2008a\)](#), obtuvo el mismo resultado al analizar ejemplares en cautividad de *Trachemys scripta elegans*, sin embargo, el mismo estudio para otras especies puso en evidencia la infección por *Salmonella* en un porcentaje del 5,1 % en *Trachemys emolli* y *Pseudemys nelsoni*. Respecto a nuestro estudio hay que tener presente que solamente se analizaron seis ejemplares en cautividad, por lo que hay que tener especial cuidado al valorar estos datos. Sólo se detectó *Salmonella* en tres ejemplares de vida libre (2,8%), de nuevo un número inferior al obtenido por [Hidalgo-Vila et al. \(2008a\)](#) para este tipo de galápagos en libertad (5,7%).

El estudio de la EFSA (2010) pone de manifiesto que los principales serotipos implicados en Salud Pública son *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Thyphimurium, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Infantis. En reptiles son numerosos los serotipos de *Salmonella* hallados en todo el mundo. En Canadá se han aislado los serotipos *S. Java*, *S. Stanley*, *S. Poona*, *S. Jangwani*, *S. Tilene*, *S. Litchfield*, *S. Manhattan*, *S. Pomona*, *S. Miami*, *S. Rubislaw*, *S. Marina*, *S. Wassenaar* ([Woodward et al., 1997](#)). En Puerto Rico se aisló *S. Pomona* ([Tauxe et al., 1985](#)). En Europa, en concreto en el zoológico de Roma se identificaron 22 serotipos diferentes, siete pertenecientes a *Salmonella enterica* subsp. I, 4a la subespecie IIIa y uno que no se pudo tipificar ([Corrente et al., 2004](#)). En nuestras poblaciones de estudio en el levante español se han encontrado únicamente tres ejemplares infectados, uno por *S. Rissen* y dos por *S. Thyphimurium*. Sin embargo, en el Parque Nacional de Doñana se aislaron únicamente los serotipo *Salmonella* Postdam, y 9,12:1,v:z₃₉ ([Hidalgo-Vila et al., 2007](#)). Un estudio realizado por la misma autora en las lagunas de Acebuche y Portíl, suroeste de España, también puso de manifiesto la presencia de *S. Thyphimurium*, además de otros serotipos como *S. Postdam*, *S. Bredeney*, 4,12,27:b:[e,n,x] y *S. Anatum* ([Hidalgo-Vila et al., 2008a](#)). Por otro lado, son muchos los autores que han descrito el serotipo *S.*

Newport como un serotipo ampliamente distribuido en reptiles (Greenberg *et al.*, 1976, Abalem de Sá y Solari, 2001; Geue y Löschner, 2002; Corrente *et al.*, 2004) y en medios acuáticos (Polo *et al.*, 1999; Baudart *et al.*, 2000), sin embargo, no se conoce ninguna referencia bibliográfica en la cual indique que se ha aislado en España.

Comportamiento de *Salmonella* frente a los antibióticos, cepas asiladas de *Trachemys scripta elegans*

En los últimos años la OMS ha denunciado el aumento de bacterias resistentes a los antibióticos, disminuyendo las posibilidades de éxito en el tratamiento de infecciones por microorganismos. En el presente estudio, únicamente se realizaron tres antibiogramas, debido a la escasa prevalencia de *Salmonella*. Por lo tanto, se debe tener especial precaución a la hora de interpretar los datos obtenidos, se deben valorar los resultados para contribuir al conocimiento de las resistencias de las cepas de *Salmonella* obtenidas a partir de galápagos. La resistencia a los antibióticos de las cepas aisladas es más elevada que en otros estudios. Todas las cepas de *Salmonella* fueron resistentes a la ampicilina, a diferencia de las cepas asiladas por Tellez (2003), en las que sólo el 1,6% de las cepas presentaban una resistencia total. Corrente *et al.* (2004), observó que únicamente un 17,4% de las cepas aisladas fueron resistentes a dicho antibiótico. Todas las cepas del presente estudio fueron resistentes al ácido nalidíxico a diferencia de los resultados de los antibiogramas realizados por Tellez (2003) que revelan un 5,3% de cepas resistentes. Corrente *et al.* (2004) observó que únicamente un 13,1% de las cepas aisladas fueron resistentes a dicho antibiótico. La tetraciclina que en nuestro estudio presenta una resistencia del 100%, en el estudio de Tellez (2003) tan sólo fueron resistentes a este antibiótico el 2,5% de las cepas, y en el de Corrente *et al.* (2004) el 19,6% de las cepas. Los antibióticos como la amikacina, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina e imipenem que mostraron una resistencia total en todas las cepas del presente trabajo, en el trabajo de Tellez (2003) presentaban alta sensibilidad a ellos. Todas las cepas exhibieron una resistencia total a la carbenicilina y a la enrofloxacin, mientras que sólo presentaron resistencia el 1,2% y del 0,41% en el trabajo de Tellez (2003) y Corrente *et al.*, (2004), respectivamente. Las cepas testadas presentaron una resistencia importante a la ceftazidima (33,3% resistencia total y 66,7% resistencia intermedia) mientras que en el trabajo de Tellez (2003) todas las cepas fueron sensibles a este antibiótico. Los mismos datos se obtuvieron con la cefotaxina (66,7% de

resistencia total) y el trimetoprim-sulfametoxazol (33,3%) que en el trabajo de Tellez (2003) todas las cepas son sensibles a estos antibióticos. La piperacilina es el único antibiótico al cual las cepas del presente estudio muestran sensibilidad (33,3%) pero muy inferior al trabajo de Tellez (2003) en el cual el 99,2% de las cepas de *Salmonella* fueron sensibles.

5.1.2.2.2.- Otras especies bacterianas

Aeromonas

Aeromonas hydrophila es una bacteria muy ubicua de los ecosistemas acuáticos, tanto de agua dulce como de agua salada (Dumontet *et al.*, 1996; Kersters *et al.*, 1996; Miranda y Castillo, 1996; Okpokwasili y Akujobi, 1996; Borrell *et al.*, 1998; Goñi-Urriza *et al.*, 1999; Montes *et al.*, 1999; Sechi *et al.*, 2002; Obi *et al.*, 2003). Se han aislado tanto en reptiles, anfibios, peces como en animales de sangre caliente, incluso en humanos (Mathewson y Dupont, 1992). En humanos puede producir infecciones gastrointestinales con sintomatología diarreica (Janda, 2001) e infecciones extraintestinales desarrollando sepsia a través del tracto gastrointestinal (Janda y Abbot, 1998). En el presente estudio ha sido el microorganismo más prevalente presente en todas las poblaciones de vida libre y en las de cautividad. Además, se ha aislado a partir de todos los órganos en los animales de vida libre, y en los intestinos de los individuos en cautividad. Los galápagos son por tanto un reservorio importante de contaminación para los peces que conviven en los marjales, como por ejemplo para la población de samaruc (*Valencia hispanica*), que es una especie protegida. También pueden ser foco de infección para humanos, ya que del ecosistema de agua dulce de los marjales puede pasar fácilmente a las playas, frecuentadas por numerosos bañistas sobre todo en la época estival.

Escherichia

Escherichia coli se puede confirmar como un microorganismos habitual de la microbiota intestinal de estos quelonios, al igual que en los animales de sangre caliente (Kaper *et al.*, 2004). Se ha encontrado tanto en las tres poblaciones de vida libre como en los ejemplares de cautividad, además en las aguas de los tres marjales. El agua de los

tres marjales podría estar contaminada tanto por las aguas residuales que abastecen las lagunas como por las excreciones de los animales que viven en estos humedales. Todo ello contribuye a aumentar los recuentos de esta bacteria y corrobora los estudios de Ishii y colaboradores en 2006 y 2007, en los cuales enumera las fuentes que contribuyen a aumentar los recuentos de estas bacterias en ríos y playas.

Staphylococcus

En el presente estudio, *Staphylococcus* es el patógeno más abundante de los galápagos en cautividad, debido a su estrecho contacto con los humanos. Las especies coagulasa negativos, como son los *Staphylococcus* encontrados en este estudio, son predominantes en la flora bacteriana de la piel, pero también es capaz de colonizar el tracto respiratorio (Biberstein, 1990). La prevalencia de *Staphylococcus* coagulasa negativo en este estudio es mayor en la población de cautividad, seguramente por un contacto más estrecho con humanos. El órgano más colonizado por estas bacterias son los pulmones, aunque puede colonizar otros órganos, como es el caso de dos ejemplares de la población en cautividad en que la bacteria se encontró en todos los órganos examinados menos en el intestino. Estos resultados indican que en esos individuos se había llegado al estado de septicemia e incluso se podría llegar a una toxemia como muestran algunos estudios en otros hospedadores (Mandell *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2001; Peacock *et al.*, 2002).

Plesiomonas

El hábitat natural de *Plesiomonas shigelloides* es el agua dulce, se han aislado de ríos, lagos, estanques y sedimentos de muchos países (Arai *et al.*, 1980; Kelly y Kain, 1991; Medema y Schets, 1993; Schubert y Pelz 1993a; Schubert y Pelz 1993b; Aldova *et al.*, 1999). En el hombre la infección se puede presentar como una diarrea acuosa y colitis disintérica, de cuadro agudo a crónico desde dos semanas a tres meses (Clark y Janda, 1991). A pesar que no se ha encontrado en el agua de los tres marjales, se aisló a partir de muestras del intestino de los animales de los tres marjales. En el presente estudio es el quinto microorganismo más abundante a nivel global y el tercero a nivel intestinal. Por tanto, en la línea de los estudios de Bardon (1999), se puede indicar que estos galápagos presentan de forma habitual este microorganismo.

Proteus

Proteus exhibe un mecanismo uropatógeno que culmina su acción patógena con episodios de pielonefritis y septicemia (Kunin, 1997). Dos de los ejemplares de cautividad presentaban *Proteus* en todos los órganos, por tanto se puede considerar que era una septicemia y además estos dos ejemplares eran del mismo propietario y compartían estanque, con lo cual podía haber existido una contaminación horizontal entre ellos. Una hipótesis sería que los ejemplares de *Trachemys* de cautividad se infectaran por el manejo de los propietarios, ya que *Proteus* es un residente habitual del tracto intestinal humano (Sabbuba, 2003), y los de vida libre se infectaran a través del medio en el que habitaban, ya que es una bacteria ampliamente distribuida en el agua y en el suelo (Stamm, 1999), hipótesis que es corroborada por las analíticas de agua del presente estudio.

Klebsiella

Este género es muy ubicuo en la naturaleza, se considera que tiene dos hábitats comunes: el medio ambiente y los animales, incluido el hombre. En el primero se localiza tanto en aguas superficiales y residuales como en el suelo (Podschun y Ullmann, 1998). *Klebsiella* causa infecciones del tracto urinario y neumonías, y es el segundo agente causal en importancia, tras *E. coli*, de septicemias nosocomiales (Podschun y Ullmann, 1998). El presente estudio puede corroborar lo anteriormente expuesto, ya que se ha detectado en el agua de los tres marjales, pero solo en dos de las poblaciones de galápagos. Se ha encontrado en casi todos los órganos, aunque con una prevalencia baja, en humanos se considera que es la segunda causa de septicemia, después de *E. coli* (Podschun y Ullmann, 1998). Su poder de penetración, multiplicación en el hospedador y resistencia al sistema inmunitario tiene gran importancia en su patogenicidad (Williams y Tomas, 1990).

Alcaligenes

Alcaligenes es un germen oportunista y poco habitual como agente patógeno humano, describiéndose principalmente en individuos inmunodeprimidos, neoplásicos y

afectados de SIDA (Molla *et al.*, 1996). En los años noventa se le asocio cómo agente patógeno, entre otros, de la fibrosis quística (Gilligan, 1991). Esta bacteria está presente principalmente en nichos oligotróficos acuáticos. En el presente estudio se ha encontrado formando parte de la microbiota de los órganos de los galápagos, principalmente en aquellos de los ejemplares del marjal de Peñíscola y también se aisló en el agua de esta marjal. Por otro lado, en el agua de los marjales de Almenara y de La Safor-Gandía no se identificó la bacteria, y el número de animales portadores es también mucho menor. Estos resultados nos hacen pensar que existe una interrelación animales-medio, contaminando el mismo, siendo ellos un reservorio de estos agentes. Hasta el momento en la literatura científica no se ha descrito la presencia de ninguna especie de *Alcaligenes* en *Trachemys scripta elegans*.

Streptococcus

Son muy pocos los *Streptococcus* encontrados en este estudio. Dicha bacteria se localiza de forma habitual en el tracto respiratorio, digestivo, genital, pudiendo vivir de forma comensal hasta que un factor estresante desencadenará la acción patógena del microorganismo (Biberstein, 2000). *Streptococcus* es un patógeno humano responsable no solo de la neumonía, sino de enfermedades como meningitis y bacteriemias (Sahn, 1990). No se han podido encontrar referencias de esta bacteria en *Trachemys*. En el presente estudio, este microorganismo es de los pocos que se han hallado en los galápagos procedentes de cautividad. La vía de infección de los galápagos de vida libre infectados, se debe a la presencia de *Streptococcus* fecales en el agua, procedente de aguas residuales. Debido a la baja presencia de este microorganismo en los animales y la identificación de este microorganismo en el agua de los tres marjales estudiados, se puede indicar que estos animales no son reservorios principales de este género bacteriano, de hecho no se conoce ninguna referencia bibliográfica que relacione este microorganismo y los galápagos.

Vibrio

Varias han sido las especies de *Vibrio* que se han podido aislar en el presente estudio. *V. cholerae* presenta un ciclo de vida libre, formando parte de la microbiota de los ecosistemas acuáticos, tanto de aguas saladas como de aguas dulces, en las que a

menudo se encuentra asociada como comensal a diversos organismos acuáticos (Colwell y Huq, 1994; Faruque *et al.*, 1998). La adquisición de factores de virulencia por parte de algunas de las cepas las capacita para colonizar la mucosa del intestino delgado humano, en donde persisten, se multiplican y producen la toxina causante del cólera (Kaper *et al.*, 1995). El hombre es el único hospedador conocido de *V. cholerae*, aunque se postula de la existencia de reservorios ambientales, donde los vibriones permanecerán en estado latente, también se ha postulado que los cambios climáticos, influirían en la aparición de nuevos brotes de cólera. Estos cambios marcarían el inicio de una serie de eventos concatenados, como el incremento de la temperatura del agua, de la concentración de nutrientes y de la población de plancton, que se han asociado con el aumento del número de casos de cólera (Colwell, 1996).

Pseudomonas

Las infecciones por *Pseudomonas* spp. tienen gran interés dada su alta frecuencia y resistencia a los antibióticos (Cuberos *et al.*, 1998). A parte no existe una correlación entre clones y hábitats, los clones dominantes están distribuidos tanto en hábitats clínicos como en ambientales, sin poderse distinguir sus propiedades genotípicas ni quimiotaxonómicas y son funcionalmente equivalentes en características virulentas y de colonización (Ruíz-Martínez, 2007). La mayoría de las infecciones están asociadas a una alteración de las defensas locales o sistémicas del animal y pueden afectar a múltiples órganos y sistemas (Ruíz-Martínez, 2007). En el presente estudio se han detectado varias especies de *Pseudomonas* en las aguas de los tres marjales, pero solo en la población de Peñíscola se ha evidenciado la infección de los galápagos por este microorganismo. Las aguas de estas marjales pueden ser reservorios de *Pseudomonas* para infecciones tanto de humanos como de otros animales, esto sería posible por la gran versatilidad del género para colonizar múltiples nichos ecológicos (Ruíz-Martínez, 2007).

Providencia

Providencia es un patógeno oportunista con manifestaciones clínicas diferentes, principalmente infecciones urinarias y gastroentéricas con o sin diarrea (Eberspacher *et al.*, 1990; O'Hara *et al.*, 2000). Se encuentran ampliamente distribuidas en el agua y en

el suelo (O'Hara *et al.*, 2000). Sin embargo en el presente trabajo no se pudo aislar del agua de las lagunas y la prevalencia de la bacteria en los galápagos de vida libre fue muy baja.

Enterobacter

El género *Enterobacter* se encuentra formando parte de la flora intestinal del hombre y/o animales sin provocar ninguna patología. Sin embargo, también pueden colonizar las diferentes mucosas en especial las del tracto gastrointestinal y urinario, ocasionando infecciones como neumonía, septicemia, meningitis, abscesos abdominales además de infecciones urinarias (John *et al.*, 1982). Hasta donde se ha podido averiguar no se ha encontrado referencia de esta bacteria en el hospedador estudiado, por lo cual se puede suponer que *Enterobacter* no suele ser habitante habitual del intestino de *Trachemys*. En el presente estudio, solo se ha aislado en dos individuos, y de diferente población (Peñíscola y Almenara). Se ha determinado la presencia de una especie de *Enterobacter* sin determinar, en pulmón y en el hígado, del mismo ejemplar, lo que evidencia la capacidad invasiva de *Enterobacter* en estos galápagos. Sin embargo no se evidenciaron lesiones durante la necropsia. Estos animales podrían haberse infectado a partir de las aguas residuales que abastecen los marjales. En el marjal de Almenara no se aisló la bacteria, aunque sí que se aisló a partir de uno de los animales de esta población. El hecho, podría deberse a que sus aguas sufren aporte muy irregular, que podría diluir o concentrar la microbiota, junto al azar que se da en la toma de muestras.

Pasterella

Pasterella sp. coloniza el tracto gastrointestinal y respiratorio de una gran variedad de animales, mamíferos y aves constituyen su principal reservorio (Holst *et al.*, 1992). Generalmente el hombre adquiere la infección por inoculación directa, al entrar en contacto con secreciones de animales infectados (Holmes *et al.*, 1999). En nuestro estudio tan sólo se detectó en dos individuos del marjal de Peñíscola y en el agua del marjal de Almenara. Una hipótesis que podría explicar su baja prevalencia sería su escasa supervivencia en el ambiente (Quinn, 2002).

Citrobacter

El género *Citrobacter* se puede encontrar con frecuencia en el suelo, agua, comida y en el tracto intestinal de animales. Estos microorganismos pueden causar infecciones importantes, especialmente en hospedadores inmunocomprometidos como enfermos del SIDA, pacientes con quimioterapia, etc. (Lipsky *et al.* 1980; Samonis *et al.*, 1991; Flaherty *et al.*, 1993). En el presente estudio se ha encontrado tan sólo en el agua del marjal de Peñíscola, y en tres ejemplares de *Trachemys*, dos del marjal de Gandía y uno en el de Peñíscola, en los tres casos en el intestino de los animales.

Edwarsiella

La presencia de *Edwarsiella tarda* en galápagos ha sido descrita también en otros estudios (Ivenson, 1971). En peces produce petequias y hemorragias en diversas localizaciones, e incluso meningoencefalitis (Hanson, 2000). *E. tarda* se ha encontrado en dos ejemplares, uno del marjal de Almenara y otro del de Gandía. Este hecho, puede suponer un riesgo para los peces de las lagunas que cohabitan con los galápagos del presente estudio, en concreto con el samaruc (*Valencia hispanica*) que es una especie autóctona en los humedales de la Comunidad Valenciana y protegida de acuerdo con la legislación valenciana.

Morganella

Morganella produce infecciones de diferente grado de gravedad en diversos órganos, se han descrito en el tracto urinario, vesícula biliar, etc. (Smithson *et al.* 2004). Y al igual que *Providencia*, especie muy similar, se encuentra ampliamente distribuida en el agua y en el suelo (O'Hara *et al.*, 2000). Sin embargo en el presente trabajo tan solo un ejemplar presentaba infección dicha bacteria.

En conclusión, dentro del estudio de la identificación de la bacteriología de *Trachemys scripta elegans* en la Comunidad Valenciana, se ha observado que esta especie es el hospedador de *Vibrio cholerae*, *Alcaligenes* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp., *Edwarsiella tarda*, *Plesiomonas shigelloide*, *Klebsiella* spp.,

Pseudomonas spp., *Pasterella* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp y *Salmonella* spp. Por otro lado, todas estas especies bacterianas aisladas en los galápagos de la Comunidad Valenciana se han encontrado en las muestras de agua de los marjales, excepto *Staphylococcus* y *Plesiomonas*.

5.1.3.- Estudio vírico en *Trachemys scripta elegans*

Los *Herpesvirus* son de especial importancia por su amplia repercusión y su diversidad evolutiva, estando ligada a importantes enfermedades de animales domésticos y el hombre. Los *Herpesvirus* establecen infecciones de larga duración con periodos de reactivación, produciendo la fase clínica de la enfermedad. La eliminación o transmisión de los virus puede ser intermitente o continua. En el presente estudio se pone de evidencia la presencia de *Herpesvirus* (ChHV) en un 10,5% (11/95) de la población estudiada, sin embargo, no se ha encontrado ningún estudio que describa la presencia de *Herpesvirus* (ChHV) en este tipo de galápagos (*Trachemys scripta elegans*). En el presente estudio, se pone de manifiesto que uno de cada diez galápagos está infectado y como consecuencia son un foco de infección para otros animales. La población del marjal de La Safor-Gandía es la que presenta mayor número de individuos infectados. En la actualidad se desconoce cómo se transmite dicho virus de un individuo a otro, lo que sí se conoce es que estos virus son muy inestables en el medio, son muy sensibles a detergentes y a disolventes orgánicos (Quinn *et al.*, 2002). Es poco probable y aventurado, con un 10% aproximadamente de positivos, citar que estos galápagos pueden ser reservorio de *Herpesvirus* (ChHV) para infecciones humanas por varias razones. La primera es el salto de especie, y por lo que se sabe, estos virus son bastante específicos de especie (Quinn *et al.*, 2002) sin olvidar que los reptiles están evolutivamente bastante separados de los mamíferos. Y en segundo lugar aunque estos reptiles eliminen *Herpesvirus* (ChHV) al medio, es poco probable que estos entren en contacto con humanos, ya que como se ha citado anteriormente son muy inestables en el medio, y en este viaje hasta el ser humano deben atravesar diferentes ecosistemas uno de agua dulce y otro marino.

5.1.4. Estudio parasitológico en *Trachemys scripta elegans*

En el presente estudio no se han encontrado evidencias de parasitación por coccidios en *Trachemys scripta elegans*, en España el índice-catálogo de zooparásitos tampoco recoge ninguna evidencia de ello (Cordero del Campillo *et al.*, 1994). En 2004 se describió *Eimeria mitraria* en *Emys orbicularis* en Galicia (Segade *et al.*, 2004). La literatura internacional a la que se ha tenido acceso tampoco recoge ningún caso de coccidiosis en estas especies, aunque sí existen evidencias de coccidiosis en *Heosemys depressa*, perteneciente a la familia Geoemydidae (Siroky y Modry, 2006) o en *Lissemys punctata andersonii* (Helke *et al.*, 2006). Por lo tanto se podría aventurar que la presencia de estos protozoos en galápagos en España es muy baja, a pesar de los escasos estudios que existen. *Telorchis attenuata* ha sido el único parásito que se ha encontrado en los galápagos exóticos (*Trachemys scripta elegans*), este trematodo se ha descrito en alguna ocasión como parásito de esta especie hospedadora en Yucatán México, distribución natural de la especie (Moravec y Vargas-Vázquez, 1998). En el presente estudio el 7,6% de *Trachemys* presentaba el trematodo, todos los galápagos parasitados excepto uno, pertenecen a la marjal de Almenara, lo cual pone de evidencia que se dan mejores condiciones en el marjal de Almenara que en el de La Safor-Gandía para que se cierre el ciclo biológico de *Telorchis*. La única especie de *Telorchis* encontrada en España fue *T. solivagus* en Granada y estaba parasitando al Galápago Leproso (*Mauremys caspica*) (Cordero del Campillo *et al.*, 1994). La falta de citas de *T. attenuata* en España a lo largo de la historia de la parasitología de este país y las citas existentes de esta especie de *Telorchis* en su distribución natural, a pesar de los escasos estudios al respecto, nos pueden llevar a pensar que esta especie parásita ha sido importada junto a los ejemplares de *Trachemys* que se importaron y que ha ido perdurando a lo largo del tiempo. Tampoco hay que olvidar la gran confusión que existe en la clasificación de estos trematodos a nivel de especie y la antigüedad de la literatura al respecto. En el presente trabajo no se han aislado nematodos parasitando a estos galápagos, a diferencia de otros estudios de helmintofauna realizados en España, por ejemplo el realizado en el Parque Nacional de Doñana (Huelva) donde sí que se aislaron estos nematodos (Hidalgo-Vila *et al.*, 2009).

5.1.5.- Estudio microbiológico del agua de los marjales

En referencia a la identificación bacteriana de los marjales donde habitaban los individuos estudiados, cabe destacar la especie *Vibrio cholerae* por su importancia en Salud Pública y que se ha aisló de los tres marjales estudiadas. Esta especie de *Vibrio* se considera que forma parte de la microflora de los ecosistemas acuáticos y que se encuentra asociada como comensal a organismos acuáticos (Colwell y Hull, 1994; Faruque *et al.*, 1998). *V. cholerae* produce un aumento de la pérdida de iones y de agua a la luz del tracto intestinal, asociado a la secreción de cloro y bicarbonato, además de la inhibición de la absorción intestinal de cloruro sódico conduce a cambios en los movimientos de los líquidos y dan como resultado una diarrea acuosa (Robles *et al.*, 1999). Esta especie, causa importantes epidemias, la primera referencia es debido al cambio de estilo de vida del hombre hacia el sedentarismo, creándose los primeros poblados, hace 10.000 años y actualmente sigue en curso la séptima pandemia, principalmente en países en vías de desarrollo con casos esporádicos en países desarrollados (Byun *et al.*, 1999; Farfán 2002). No es difícil que las bacterias de *Vibrio* entren en contacto con el hombre, aunque en los marjales no es frecuente el baño, éstas descargan directamente al mar mediante golas y los tres marjales están enclavadas en playas importantes de la Comunidad Valenciana, pudiendo sobrevivir en aguas saladas. Por otra parte hay que tener en consideración que la dosis infectante tiene que ser bastante elevada a no ser que el pH del estómago este neutralizado. Por tanto, para que *Vibrio cholerae* produzca la enfermedad se tienen que dar varios factores concatenados, que siendo poco probable, pueden suceder.

5.2.- *Testudo hermanni hermanni*

La tortuga mediterránea denominada *Testudo hermanni hermanni* es una de las especies de tortuga clasificadas tradicionalmente dentro el género *Testudo*. Se trata de reptiles herbívoros y diurnos protegidos que pueden llegar a vivir edades comparables a los humanos, y que se distribuyen ampliamente por el levante español. Sin embargo, nunca se le ha relacionado como fuente de alguna infección en humanos, posiblemente por la legislación vigente que prohíbe su tenencia como mascota.

5.2.1.- *Salmonella* en *Testudo hermanni hermanni*

Son muy pocos los estudios de la prevalencia de *Salmonella* en quelonios en libertad. En Marruecos, se examinaron un total de 28 ejemplares de *Testudo graeca* y la prevalencia fue del 89,4% (Hidalgo-Vila *et al.*, 2008b). Los estudios de *Testudo hermanni hermanni* que se han realizado en la cuenca del mediterráneo, hábitat de la tortuga, y *Salmonella* son escasos, pero para Italia se ha publicado una prevalencia del 70% en tortugas en cautividad (Pasmans *et al.*, 2000). En la zona central de España el 41,5% de los reptiles examinados eliminaban *Salmonella* (Briones *et al.*, 2004). En Italia se detectó un 34,5% de portadores en quelonios procedentes de tiendas, parques zoológicos y propietarios privados (Pasotto *et al.*, 2002).

Los resultados de nuestro estudio para *Testudo* se diferencian con los del trabajo de Hidalgo-Vila en el Parque Nacional de Doñana (Hidalgo-Vila, 2007), donde el 100% (16/16) de las tortugas *Testudo graeca* estudiadas eran portadoras de *Salmonella*. En nuestro estudio la prevalencia alcanzó el 47,8 % (33/69). Resultados similares a los nuestros se obtuvieron de otro estudio realizado en mascotas de la especie *Testudo graeca*, en el cual se recogían las muestras cuando el propietario llevaba el animal al veterinario. Se reveló una prevalencia de *Salmonella* del 31% en 20 ejemplares (Tellez, 2003). Existen diferentes hipótesis que pueden explicar las diferencias entre estudios realizados en el mismo país. En primer lugar a nivel de especie, aunque los dos quelonios pertenecen al mismo género, puede existir una diferencia de sensibilidad a la infección por *Salmonella* basada en la especie, aunque no conocemos ningún estudio que corrobore esta hipótesis. En segundo lugar no se tiene constancia si los ejemplares

examinados pertenecían a la misma población o a diferentes. Si pertenecieran a la misma población la infección horizontal (entre congéneres de la misma edad) y la transmisión vertical (fundamentalmente madre-hijos) sería mayor que si pertenecieran a diferentes poblaciones como es el caso del presente estudio. En tercer lugar en el presente trabajo se ha podido estudiar más del cuádruplo de la población del estudio de Hidalgo-Vila (Hidalgo-Vila *et al.*, 2007), o más del triple del trabajo de Tellez (2003), y conforme se aumenta la población la prevalencia se acota mejor. Otra razón podría ser debido a que la eliminación de la bacteria no es continua y que en el presente estudio sólo se tomó una muestra y no tres de tres días consecutivos como en los estudios mencionados anteriormente.

Muchas son las dudas que se plantean respecto a la presencia de *Salmonella*, en individuos de vida libre respecto a los que viven en cautividad. La prevalencia en tortugas en cautividad es mucho más elevada. En Europa, el porcentaje de tortugas positivas a *Salmonella* procedentes de centros de cautividad italianos superaba el 70% (Pasmans *et al.*, 2000). En nuestro trabajo el porcentaje de infección de las tortugas objeto de este estudio era mayor del 50%. Sin embargo este resultado es inferior al de Pasmans (70%) para las colecciones de tortugas pero superior a la prevalencia del 31% que se indica en un estudio español de *Testudo graeca* en cautividad (Briones *et al.*, 2004). No obstante, en el estudio de Hidalgo-Vila *et al.* (2007) todas las tortugas (*Testudo graeca*) capturadas en el Parque Nacional de Doñana fueron positivas a la presencia de *Salmonella*, a diferencia de nuestro estudio en que las tortugas (*Testudo hermanni hermanni*) de vida libre presentaban un rango de infección inferior, 12%.

Esta gran variabilidad de datos entre los diferentes estudios, puede deberse, además de las razones citadas en el apartado anterior, a la técnica laboratorial utilizada para el diagnóstico de *Salmonella*. Muchas son las dudas que existen hoy en día respecto a la efectividad de las técnicas que se utilizan para el diagnóstico de *Salmonella* dentro de una población animal. Christensen *et al.* (2002) publicó que las técnicas serológicas son técnicas poco prácticas para trabajar a nivel de campo, además de no poder diferenciar entre individuos que habían entrado en contacto con la bacteria de aquellos que la portaban (Lo fo Wong *et al.*, 2003). Por lo tanto es muy importante que aquellos estudios que realizan programas de prevalencia o de control de patógenos se basen en la recogida de muestras adecuadas y el uso de técnicas lo suficientemente

sensibles como para determinar el estatus sanitario de una población (Heyndrickx *et al.*, 2002). Dos son los métodos que se han llevado a cabo para detectar la presencia de *Salmonella* a partir de las muestras recogidas en las tortugas analizadas, el método ISO 6579:2002 (anexo D) y la técnica de PCR a tiempo real. Todas las muestras que se identificaron como *Salmonella* positivas por el método ISO también lo fueron por la técnica de PCR. Sin embargo, fueron muchas las muestras diagnosticadas como positivas por PCR y que por la técnica ISO fueron negativas. No se conoce ningún estudio que compare las dos técnicas utilizadas con muestras de tortugas, pero sí que existen estudios parecidos en aves. Recientemente Temelli *et al.* (2010) obtuvo un porcentaje de positivos mediante la técnica ISO 6579 del 55,6% y del 61,0% en el PCR en hisopos cloacales de pollos, los porcentajes que obtuvieron en las dos técnicas son muy similares entre ellos, a diferencia de nuestro estudio, en que sí que existen diferencias estadísticamente significativas entre estas dos técnicas. Autores como Hadjinicolaou *et al.* (2009) o Hwa-Lee *et al.* (2009), demostraron una especificidad y sensibilidad del 100% en la técnica de PCR. Sin embargo otros estudios obtuvieron unos resultados de sensibilidad para *Salmonella* a través de hisopos cloacales algo menor, un 84% (Temelli *et al.*, 2010). Por otro lado, hay estudios que indican una precisión y sensibilidad del 65% y 56% respectivamente para la técnica ISO 6579:2002, bastante menor que la PCR, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas con otros medios de identificación mediante cultivos (NMKL71, *Nordic Committee on Food Analysis*; MSRV, *Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis*) (Koyuncu y Haggblom, 2009).

Los principales serotipos implicados en Salud Pública son *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Thyphymurium, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Infantis (EFSA, 2010). En *Testudo graeca* en Marruecos los serotipos aislados de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* fueron *S.* Abony, *S.* Richmond, *S.* Kibusi, *S.* Potsdam, *S.* Pretoria, y para *Salmonella enterica* subespecie *salamae* fueron 9,12:z₂₉:1,5, 42:b:e,n,x,z₁₅, 13,22:z₂₉:1,5, 17:g,t:z₃₉ (Hidalgo-Vila *et al.*, 2008b). En Europa, en concreto en el zoológico de Roma se identificaron 22 serotipos diferentes, siete pertenecientes a *Salmonella enterica* subsp. I, 4a la subespecie IIIa y uno que no se pudo tipificar (Corrente *et al.*, 2004). De los cuatro serotipos diferentes de *Salmonella* que se han aislado en *Testudo hermanni hermanni* en el presente estudio (*S.* Abony, *S.* Hermannsweder, *S.* Kottbus y *S.* Salamae), sólo hay uno en común con los

obtenidos por Hidalgo-Vila *et al.* (2007) para *Testudo graeca*, éste es *S. Abony*. La frecuencia de aislamiento de *S. Abony* fue mucho mayor que en el trabajo del Parque Nacional de Doñana, 45,5% (5/11) y 12,5% (2/15) respectivamente. No hay coincidencia entre los serotipos que se aislaron por Tellez (2003) en *Testudo graeca* (*S. Postdam* y *S. Canastel*) con los aislados en nuestro trabajo. El serotipo *S. Newport*, que según numerosos autores, está ampliamente distribuido en reptiles (Greenberg *et al.*, 1976; Abalem de Sá y Solari, 2001; Geue y Löschner, 2002; Corrente *et al.*, 2004), no se ha aislado en el presente estudio ni tampoco en el trabajo de Briones *et al.* (2004) pero sí en el de Hidalgo-Vila *et al.* (2007). Por otro lado, hay que destacar que en este estudio se ha aislado el serotipo *S. Thyphimurim*, uno de los cinco que señala el reglamento de la Unión Europea como de interés para Salud Pública (n.º 2160/2003), y que junto al estudio de Hidalgo-Vila *et al.* (2008a) son los únicos trabajos a los cuales se ha tenido acceso, relacionados con quelonios en España donde se haya aislado, siendo por tanto un serotipo de riesgo para la transmisión de la infección a humanos.

Comportamiento de *Salmonella* frente a los antibióticos, cepas aisladas de *Testudo hermanni hermanni*

136

La resistencia a antibióticos en los últimos años ha sido un hecho preocupante para la OMS debido al aumento del número de bacterias resistentes a antibióticos. Disminuyendo, por tanto, las posibilidades de éxito en el tratamiento de infecciones por microorganismos en el ser humano. Debido al bajo número de colonias de *Salmonella* aisladas a partir de las muestras de quelonios, muy pocos son los antibiogramas realizados. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio ponen de manifiesto que las cepas de *Salmonella* aisladas presentan una resistencia a los antibióticos más elevada que otros trabajos publicados. Por ejemplo, todas las cepas de *Salmonella* de nuestro estudio fueron resistentes a la ampicilina, a diferencia de las cepas aisladas por Tellez (2003), donde solo el 1,6% de las cepas presentaban una resistencia total a este antibiótico. También existen diferentes porcentajes de resistencia a este antibiótico en el estudio de Corrente *et al.* (2004), un 17,4%. El porcentaje de cepas resistentes al ácido nalidixico en este estudio (62,5%) es muy superior a los resultados de los antibiogramas realizados por Tellez (2003), que revelan un 5,3%, siendo el antibiótico que más cepas resistentes presenta. Nuestro resultado es todavía muy superior al obtenido por Corrente *et al.* (2004) en su trabajo (13,1%). La

tetraciclina en nuestro estudio presenta una resistencia del 100%, mientras que en el estudio de Tellez (2003) tan solo son resistentes a este antibiótico el 2,5% de las cepas, y en el de Corrente *et al.* (2004) el 19,6% de las cepas. Las cepas aisladas en este estudio presentan una resistencia total a la gentamicina, kanamicina o la amikacina, mientras que en el trabajo de Tellez (2003) son sensibles. Otros antibióticos utilizados en el presente estudio en el que las cepas de *Salmonella* presentan una alta resistencia son: (de mayor a menor resistencia) ceftazidima (87,5%), ciprofloxacina (50,0%), clorafenicol (37,5%), cefotaxima (37,5%), imipenem (25,0%), trimetoprim-sulfametoxazol (12,5%). Cabe destacar estos resultados, ya que hasta el momento no se habían encontrado cepas de *Salmonella* resistentes a los mismos (Tellez, 2003). Muy alejado de nuestros resultados, encontramos el estudio de Geue y Löschner (2002), en el cual todas las cepas de *Salmonella* fueron sensibles a todos los antibióticos testados. Con lo cual se podría indicar que los perfiles de resistencia a los antibióticos son representativos de una población sometida a la presión antibiótica.

5.2.2.- Estudio de portadores de *Herpesvirus* (ChHV) en *Testudo hermanni hermanni*

Todas las muestras de *Testudo hermanni hermanni* fueron negativas a *Herpesvirus*, (ChHV). En 2004, se publicó un estudio similar con otras especies del género *Testudo* que habitaban en zoológicos en Reino Unido y que presentaban una prevalencia del 8,2% (Soares *et al.*, 2004). Sí que existen estudios en Europa en los que se ha aislado ChHV, siempre a partir de animales con síntomas respiratorios. En España, en concreto en Gerona se ha aislado ChHV a partir de individuos enfermos, en poblaciones cautivas de *Testudo graeca graeca* (Muro *et al.*, 1998). En el Sur de Alemania se aisló ChHV en una colección de tortugas mediterráneas, (21 de ellas de la especie *Testudo hermanni hermanni*), que presentaban síntomas complejos de rinitis y estomatitis (Marschang *et al.*, 1997). Con los resultados del presente estudio y hasta la fecha se podría afirmar que las poblaciones de *Testudo hermanni hermanni* que habitan en la Comunidad Valenciana están libres de ChHV. Dos hipótesis dan validez a esta afirmación, por un lado la elevada sensibilidad de la técnica de diagnóstico utilizada (PCR) y por otro, porque según se ha descrito, los animales que se infectan por ChHV siempre presentan síntomas e incluso mueren (Hunt, 2006).

5.2.3.- Estudio parasitológico en *Testudo hermanni hermanni*

En las muestras de heces de *Testudo hermanni hermanni* examinadas en el presente estudio no se diagnosticó parasitación por coccidios. En el índice-catálogo de zooparásitos de España tampoco se recoge ninguna cita de ello (Cordero del Campillo *et al.*, 1994). La literatura internacional a la que se ha tenido acceso no recoge ningún caso de coccidiosis en esta especie, aunque sí que existen evidencias de coccidiosis en *Heosemys depressa*, perteneciente a la familia Geoemydidae (Siroky y Modry, 2006) o en *Lissemys punctata andersonii* (Helke *et al.*, 2006).

La helmintofauna que parasita a los ejemplares de *Testudo hermanni hermanni*, es muy frecuente, siendo la intensidad muy elevada, tal y como refleja la cantidad de huevos por gramo de heces obtenidos en este estudio. Estos datos son más elevados que los obtenidos en 2005 en Italia (Traversa *et al.*, 2005). En dicho estudio los huevos por gramo de heces en 37 ejemplares de *Testudo hermanni hermanni*, relevaba una media de 1003 hpg (SD 1253,0), frente a los 5532 hpg (SD 6033,1) determinados en nuestro trabajo. Las tortugas de vida libre presentan una tasa de parasitación del 25% inferior a las que proceden de criadero. Este hecho puede venir explicado por dos factores. El primero y más importante, es que se trata de un ciclo biológico directo, por tanto la transmisión es de congénere a congénere y la segunda razón es que las tortugas de criadero viven más hacinadas que las de vida libre, por tanto, la probabilidad de contacto entre ellas y transmisión de las formas parásitas es más eficaz. Por otro lado, existen estudios que demuestran que el alto porcentaje de parasitación por miembros de la familia Pharyngodonidae puede ser explicado por la baja patogenicidad del parásito, la capacidad de supervivencia a los periodos de hibernación, por las características de un ciclo biológico directo y el comportamiento y la ecología del hospedador (Petter, 1966; Capelli *et al.*, 1998).

5.3.- Diferencias en la identificación de agentes infecciosos entre la especie invasora de las costas mediterráneas *Trachemys scripta elegans* y la especie autóctona *Testudo hermanni hermanni*

Como se demuestra en el presente trabajo existen diferencias estadísticamente significativas entre la prevalencia de *Salmonella* presente en individuos de la especie *Trachemys scripta elegans* y los de la especie *Testudo hermanni hermanni*. Resultado que se corresponde al obtenido en un estudio en el Parque Nacional de Doñana, llevado a cabo por Hidalgo-Vila *et al.*, (2007). Entre las diferentes hipótesis que explican este hecho, encontramos que los individuos de *Trachemys* eliminan *Salmonella* al medio acuático donde habitan, facilitando la epidemiología de la infección entre los individuos que coexisten en dicho hábitat. Por otro lado, los individuos *Testudo*, al ser terrestres y de hábitos alimenticios herbívoros, es más difícil que se contaminen por ingestión de las heces de los animales infectados (Andreu *et al.*, 2000). Se considera que la alta prevalencia de *Salmonella* en tortugas no debe de ser únicamente por la ingestión de heces, posiblemente existe transmisión cloacal durante la copula en la estación de apareamiento (Roques *et al.*, 2004). En general, el medio acuático se considera favorable para la transmisión de *Salmonella* por muchos investigadores (Polo *et al.*, 1999; Baudart *et al.*, 2000). Sin embargo, hay otros estudios que afirman que los reptiles terrestres presentan una tasa de infección superior a los acuáticos (Greenberg *et al.*, 1976; Burnham *et al.*, 1998).

En el presente trabajo se han encontrado *Herpesvirus* (ChHV) en quelonios de la especie *Trachemys scripta elegans* y no en *Testudo hermanni hermanni*, en la literatura no se han podido encontrar referencias de este virus en *Trachemys*, pero sí en especies del género *Testudo* (Marschang *et al.*, 1997; Origgi y Jacobson, 2000; Origgi *et al.*, 2001; Origgi *et al.*, 2004; Hunt, 2006; Marschang *et al.*, 2009). Sin embargo, a pesar de ello no existen diferencias estadísticamente significativas de la presencia de este virus entre los dos hospedadores estudiados, posiblemente, este resultado se deba al bajo número de individuos infectados.

Independientemente de la especie helmíntica parásita que afecta a los reptiles de este estudio, los quelonios de la especie *Testudo hermanni hermanni* presentan un

porcentaje de parasitación mayor que *Trachemys scripta elegans* (98,3% y 7,6% respectivamente) existiendo diferencias significativas entre ambas. Estas diferencias pueden ser debidas a múltiples factores, desde el tipo de ciclo biológico del parásito hasta las condiciones de vida de los hospedadores. Los helmintos que se han encontrado en *Testudo* en el presente estudio son de ciclo biológico directo y los encontrados en *Trachemys* son de ciclo biológico indirecto, por lo cual en este segundo caso se necesita una mayor concurrencia de causas para la infección. Y en segundo lugar, las *Testudo* son en su mayoría de criadero mientras que las *Trachemys*, en su mayoría son de vida libre.

Los ejemplares de *Trachemys scripta elegans* y *Testudo hermanni hermanni* del presente estudio son reservorios de importantes agentes zoonóticos como *Salmonella* spp. Además, los ejemplares de *Trachemys scripta elegans*, también son reservorio de otros agentes zoonóticos importantes como *Vibrio cholerae*, y de numerosos agentes nosocomiales. Cabe citar entre ellos *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Pasterella multocida*, *Staphylococcus* spp. Solo se han aislado *Herpesvirus* de la especie *Trachemys*, sin embargo el grado de parasitación era mucho mayor en la especie *Testudo*.

6.- CONCLUSIONES

PRIMERA

Los agentes patógenos de importancia en Salud Pública que se han identificado en los galápagos fueron *Herpesvirus* (11,6%), *Vibrio cholerae* (6,3%), *Salmonella* (2,8%), el 66,6% de las cepas aisladas de *Salmonella* pertenecían al serotipo *S. Typhimurium*, implicado en Salud Pública. También se identificaron diversas especies de bacterias que pueden causar patologías en humanos en condiciones de inmunodepresión como son: *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. *Escherichia coli*, *Alcaligenes* spp., *Plesiomonas shigelloide*, *Proteus* spp. *Klebsiella* spp., *Pseudomonas*, *Providencia* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. y *Morganella* spp.

SEGUNDA

Los agentes patógenos que se han identificado en los galápagos *Trachemys scripta elegans* en los marjales de la Comunidad Valenciana que pueden representar un peligro potencial para otros habitantes de las marjales son por un lado, las especies bacterianas *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda*. También se encontraron individuos positivos a *Herpesvirus* (ChHV) y portadores del género del trematodo *Telorchis*.

TERCERA

El agente patógeno aislado con mayor frecuencia en las tortugas *Testudo hermanni hermanni* fueron nematodos de la familia Pharyngodonidae (98,2%). Destacar que *Salmonella* se identificó en el 47,8% de las muestras recogidas.

7.- RESUMEN /SUMMARY

RESUMEN

Cada vez es mayor la exigencia de conocer el estatus sanitario de aquellas especies que conviven con el ser humano. Al igual que el estado sanitario de los animales que forman un ecosistema es importante para cada uno de ellos, para la población humana es importante el estado sanitario de los animales que están en su entorno. Es desconocida o prácticamente desconocida la epidemiología de los microorganismos que colonizan las tortugas en Europa. Sin embargo, estos reptiles pueden suponer una importante fuente de infecciones para los propietarios de las mismas, especialmente los niños (CDC, 2010). *Trachemys scripta elegans*, y *Testudo hermanni hermanni*, son las principales especies de tortugas que habitan el territorio de la Comunidad Valenciana. Sin embargo, existen pocos estudios sobre los agentes patógenos que las colonizan y si estos son capaces o no de afectar al ser humano. En España existen pocos estudios en los que se incluyen estos géneros (Tellez, 2003; Hidalgo-Vila *et al.*, 2004, 2007, 2008a y 2008b).

Trachemys scripta elegans, conocida como galápago de Florida, o tortuga de orejas rojas, es una subespecie de tortuga semiacuática perteneciente a la familia Emydidae, originaria de la región que comprende el sureste de los Estados Unidos y el noreste de México, aunque en la actualidad se encuentra en muchas otras partes del mundo debido a su comercio como mascota. El Consell Valencià aprobó el Decreto 213/20009 de 20 noviembre de 2009 por el cual se establecen una serie de medidas para el control de especies exóticas invasoras en la Comunitat Valenciana. Este decreto recoge el interés de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) que recomienda prestar especial atención a las especies invasoras, ya que son la segunda causa de desaparición de especies en el mundo.

Por otro lado, la tortuga mediterránea o tortuga de tierra (*Testudo hermanni hermanni*) es una tortuga que se distribuye desde el Levante español y hasta el límite Sur del mar Negro. La destrucción de su hábitat y su popularidad como animal de compañía ha diezclado significativamente las poblaciones silvestres y ha hecho indispensable la protección de la especie para asegurar su futuro a largo plazo. Debido a su preocupante estado de conservación, la tortuga mediterránea aparece catalogada como “estrictamente protegida” en el Convenio de Berna de 1979, y está también incluida en el Anexo II y IV de la Directiva Hábitats de la CEE de 1992 (Directiva 92/43/CEE, de 21 de mayo).

En este contexto los objetivos de este estudio son (i) Caracterizar los agentes patógenos (bacterias, virus y parásitos) presentes en la especie invasora del litoral mediterráneo, *Trachemys scripta elegans* y determinar, si existen diferencias poblacionales a nivel sanitario entre los núcleos de la Comunidad Valenciana, (ii) Determinar la bacteriología del agua de las marjales de la Comunidad Valenciana y estudiar si existe relación con la bacteriología de los galápagos invasores (*Trachemys scripta elegans*), (iii) Determinar si la especie autóctona *Testudo hermanni hermanni* presente en la Comunidad Valenciana está infectada con *Salmonella*, y caracterizar los virus y parásitos presentes en esta población. Además de determinar, si existen diferencias a nivel sanitario entre las poblaciones cautivas (criaderos) y los núcleos poblacionales en libertad en la Comunidad Valenciana (Desierto de las Palmas y Sierra de Irtá, en Castellón) y (iv) Caracterizar los agentes patógenos presentes en *Trachemys scripta elegans* y *Testudo hermanni hermanni* de la Comunidad Valenciana que pueden actuar como agentes zoonóticos de importancia relevante en Salud Pública.

En la primera parte de este estudio, año 2008, se identificaron los microorganismos presentes en 99 tortugas de la especie *Trachemys scripta elegans* que procedían del Marjal de Peñíscola en Castellón, del marjal de Almenara y del marjal de La Safor-Gandía. También se estudiaron seis animales que procedían de particulares que los habían depositado en el Centro de Recuperación de Fauna Salvaje “La Granja” en el Saler (Valencia). A su vez se analizaron muestras de agua de las marjales donde habitaban las tortugas. Los resultados ponen de manifiesto que esta especie es hospedadora de bacterias como *Vibrio cholerae*, *Alcaligenes* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp., *Edwardsiella tarda*, *Plesiomonas shigelloide*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas*, *Pasterella* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp y *Salmonella* spp. Respecto al estudio de *Herpesvirus*, destacar que un 10,5% (11/95) de la población estudiada estaba infectada. Por último, el único parásito aislado de esta especie fue *Telorchis attenuata*, con una prevalencia del 7,6% (8/105). El estudio de la bacteriología de las marjales pone de manifiesto que en las aguas del marjal de Peñíscola se ha aislado cepas de las bacterias *Aeromonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Citrobacter breakii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella* spp., *Streptococcus faecales*, *Vibrio cholerae*, *Serratia marcescens* y *Stenoprophomonas maltophilia*. De las bacterias aisladas en este marjal, no

se encontró ninguna colonia de las especie de *Serratia marcescens* y *Stenoprophomonas maltophilia*. En las lagunas del marjal de Almenara se han aislado cepas de *Aeromonas* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pasterella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella* spp., *Streptococcus* fecales, *Vibrio* spp., *Burkholderia* spp, *Rauoltella* spp., y *Serratia marcescens*. De las bacterias aisladas en este marjal, no se encontró ninguna colonia perteneciente a las especies *Burkholderia burkholderia*, *Rauoltella* sp. y *Serratia marcescens*. Por último, en los humedales del marjal de La Safor-Gandía se aislaron cepas de las especies: *Aeromonas* spp., *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Streptococcus* fecales, *Vibrio* spp., *Burkholderia* spp., *Rauoltella* spp., y *Serratia* spp. De las bacterias aisladas en este marjal, no se encontró ninguna colonia de las especies de *Burkholderia burkholderia*, *Rauoltella* sp. y *Serratia* sp.

Durante el año 2009, se muestrearon 69 animales de la especie *Testudo hermanni hermanni*. Estos animales pertenecían a tres núcleos diferentes, isla de Mallorca (*Conselleria de Medi Ambient del Govern de les Illes Balears*), de la reserva de la Sierra de Irta y del paraje del Desierto de Las Palmas. Los resultados pusieron de manifiesto que *Salmonella* spp. fue aislada únicamente en el 14,4% (10/69) de los ejemplares de *Testudo hermanni hermanni* en la Comunidad Valenciana mediante el procedimiento de la norma ISO 6579:2002, mientras que fueron diagnosticadas como positivas por la prueba de PCR el 47,8% (33/69). El 33,3% (23/69) fueron positivas a *Salmonella* mediante la prueba de PCR y negativas al aislamiento mediante el procedimiento de la norma ISO 6579:2002. Los animales de vida libre presentaban una prevalencia a *Salmonella* del 11,8 % (2/17), mientras que en los animales de cautividad la prevalencia era del 59,6% (31/52). Los individuos examinados en el presente estudio no presentaron infección por *Herpesvirus* (ChHV). Sin embargo, el 98,2 % de *Testudo hermanni hermanni* analizadas estaban parasitadas por nematodos del grupo de los oxiúridos de la familia Pharyngodonidae.

Los ejemplares de *Trachemys scripta elegans* y *Testudo hermanni hermanni* del presente estudio son reservorios de importantes agentes zoonóticos como *Salmonella* spp. Además, los ejemplares de *Trachemys scripta elegans*, también son reservorio de otros agentes zoonóticos importantes como *Vibrio cholerae*, y de numerosos agentes

nosocomiales entre las que cabe citar *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus* spp., *Morganella morgani*, *Providencia* spp., *Pasterella* spp. y *Staphylococcus* spp. Solo se han aislado *Herpesvirus* de la especie *Trachemys scripta elegans*, sin embargo el grado de parasitación era mucho mayor en la especie *Testudo hermanni hermanni*.

SUMARY

Every day is grater the needing to know the health status of those species that coexist with humans. As sanitary condition of the animals that form an ecosystem is important for each of them, for the human population there is important the sanitary condition of the animals that are in their environment. These day is not clear the epidemiology of the microorganism that colonize the tortoises present in Europe. Nevertheless, these reptiles can suppose an important source of infections for the owners, specially for children (MMWR, 2010). *Trachemys scripta elegans* and *Testudo hermanni hermanni*, are the principal tortoise species that live in the Valencian Region. Nevertheless, few studies exist about the microorganisms that colonize them and if these are capable or not of affecting the human being. In Spain, there is not many studies addressed with this issue (Tellez, 2003; Hidalgo-Vila *et al.*, 2004, 2007 y 2008).

Trachemys scripta elegans or tortoise of Florida is a subspecie of semiaquatic tortoise belonging to the family Emydidae and is original of the region of south-east of the United States and the North-East of Mexico. However, today this specie is present in many other parts of the world due to his trade as pet. The Valencian Consell approved the Decree on November 2009 (213/20009), stablishing a series of measures related with the control of exotic invading species in the Valencian Region. This decree gathers the interest of the International Union for the Conservation of the Nature (UICN) which recommends to pay particular attention to the invading species, since they are the second reason of disappearance of species in the world.

On the other hand, the mediterranean tortoise or tortoise of land (*Testudo hermanni hermanni*) is a tortoise that is distributed from the Spanish east, in the western part and up to the limit South of the Black sea. Because of the destruction of their habitat and his popularity like pet the wild populations. This fact have decimated significantly the population and have made the protection of the species indispensable to assure his long-term future. Due to his worrying condition of conservation, the Mediterranean tortoise turns out to be catalogued like " strictly protected " in Berna's Agreement of 1979, and is included also in the Attached II and IV of the Board Habitats of the CEE of 1992 (Board 92/43/CEE, of May 21).

In this context the aims of this study are (i) to identify the pathogenic agents (bacteria, virus and parasites) presents in the invading species of the Mediterranean littoral, *Trachemys scripta elegans*, (ii) to determine the bacteriology of the water of the lagoon of the Valencian Community where this tortoises are present and to study if exists relation between the bacteriology of the invading tortoises and the water of the lagoon where they live, (iii) To determine if the autochthonous species present in the Valencian Region (*Testudo hermanni hermanni*) are infected with *Salmonella* and to identify the virus and parasites present in this population. Beside determining, if differences exist to sanitary level between the captive populations (breeding-places) and the population cores at liberty in the Valencian Community (Desert of the Palms and Irta's Saw, in Castellón) and (iv) compare the pathogenic agents present in *Trachemys scripta elegans* and *Testudo hermanni hermanni* of the Valencian Community that can act as agents zoonotics of relevant importance in Public Health.

During year 2008, ninety nine tortoises of the species *Trachemys scripta elegans* coming from Marsh of Peñíscola in Castellón, the marsh of Almenara and of the marsh of The Safor-Gandía were analyzed. Also, six tortoises from owners who had deposited them in the Center of Recovery of Wild Fauna "The farm" in the Saler (Valencia). Moreover, water samples of the marshes reported above were also analyzed. The results of this study showed that this specie of tortoise is host of bacteria as *Vibrio cholerae*, *Alcaligenes* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp., *Edwardsiella tarda*, *Plesiomonas shigelloide*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas*, *Pasterella* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp and *Salmonella* spp. According with Herpesvirus's study, is important to emphasize that in 10,5% (11/95) of the studied population were infected with the virus. Finally, the parasitic study showed that only *Telorchis attenuate* was isolated from tortoises in the 7,4% of the cases. The study of the bacteriology of the marsh reveals that in the water of Peñíscola's are present bacterias as *Aeromonas* spp., *Alcaligenes* spp, *Citrobacter breakii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella* spp., *Streptococcus faecales*, *Vibrio cholerae*, *Serratia marcensis* and *Stenoprophomonas maltophilia*. However, non-species of *Serratia marcensis* and *Stenoprophomonas maltophilia* were isolated despite their were present in the tortoises captured in its water. In the lagoons of the marsh of Almenara *Aeromonas* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pasterella*, *Proteus* spp.,

Pseudomonas aeruginosa, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella* spp., fecal *Streptococcus*, *Vibrio* spp., *Burkholderia* spp, *Rauoltella* spp., and *Serratia marcescens* were isolated. However, non-species of *Burkholderia burkholderia*, *Rauoltella* sp. and *Serratia marcescens* were isolated. Finally, in the wetlands of the marsh of The Safor-Gandía species as *Aeromonas* spp., *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., fecal *Streptococcus*, *Vibrio* spp., *Burkholderia* spp., *Rauoltella* spp. and *Serratia* spp. were isolate. Non-species of *Burkholderia burkholderia*, *Rauoltella* sp. and *Serratia* sp. were isolated.

During year 2009, sixty nine animals of the species *Testudo hermanni Hermannii* were analyzed. These animals concerned to three different cores, island of Majorca (*Conselleria de Medi Ambient del Govern of them Illes Balears*), the Saw of Irta and from Desert of Las Palmas. The results revealed that *Salmonella* spp. was isolated only in 5 species of *Testudo hermanni hermanni* analyzed. *Salmonella* isolated in the species raised in captivity, whereas this bacteria has not been isolated in those animals living at liberty. The individuals examined in the present study did not present infection for *Herpesvirus* (ChHV). Nevertheless, 98,2% of analyzed *Testudo hermanni hermanni* was parasitized for nematodes of the group of the oxiurides of the family Pharyngodonidae.

In conclusion, *Trachemys scripta elegans* and *Testudo hermanni hermanni* of the present study are reservoirs of important agents zoonotics as *Salmonella* spp. In addition, *Trachemys scripta elegans* were reservoir of other important agents as *Vibrio cholerae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Pasterella* spp. and *Staphylococcus* spp. Only there has been isolated *Herpesvirus* of the species *Trachemys scripta elegans*, nevertheless the degree of parasitism was very much major in the species *Testudo hermanni hermanni*.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- Abalem de Sá, I.V., Solari, C.A.** (2001). *Salmonella* in Brazilian and imported pet reptiles. *Brazilian Journal of Biology*. 32: 293–297.
- Ackerman, L.** (1997). The biology husbandry and health care of reptiles (Vol. I, II, III). TFH publications.
- Adamson, M.L.** (1989). Evolutionary biology of the Oxyurida (Nematoda): Biofacies of a haplodiploid taxon. *Advances in Parasitology*. 28: 175-228.
- Adesiyun, A.A., Caesar, K., Inder, L.** (1998). Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* species in animals at Emperor Valley zoo, Trinidad. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 29 (2): 237-239.
- Aldova, E., Melter, O., Chyle, P., Slosarek, M., Kodym, P.** (1999). *Plesiomonas shigelloides* in water and fish. *Central European Journal of Public Health*. 7(4): 172-175.
- Altmann, G., Racz J.** (1970). *Edwardsiella tarda*, a new member of the enterobacteria. *Public Health (Jerusalem)*. 13: 58-60.
- Amaral, J.P.S., Marvin, G.A., Hutchison, V.H.** (2002). The influence of bacterial lipopolysaccharide on the thermoregulation of the box turtle *Terrapen carolina*. *Physiological and Biochemical Zoology*. 75, 273-282.
- Anderson, R.C.** (1988). Nematode transmission patterns. *The Journal of Parasitology*. 74 (1): 30-45.
- Anderson, R.C.** (2000). Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission. 2nd edition. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, Oxon, U.K. 650 pp.
- Andreu, A.C., Díaz-Paniagua, C., Keller, C.** (2000). La tortuga mora (*Testudo graeca* L.) en Doñana. *Monografías de Herpetología*, vol. 5. Asociación Herpetológica Española, Barcelona.
- Anon** (1983). Outbreak of shellfish associated gastroenteritis. *Dept. of Health and Rehabilitative Services*, Tallahassee, Florida. En: Jagger, T.D. (2000). *Plesiomonas shigelloides*- a veterinary perspective. *The Infectious Disease Review*. 2(4):199-210.
- Anya, A.O.** (1966). Studies on the biology of some Oxyurid nematodes. 1. Factors in the development of eggs of *Asoiculus tetraptera* Schulz. *Journal of helminthology*, 40: 253-260. En: Ruiz-Sanchez, S.L. (1996). Estudio de nematodos parásitos de lacertidos de la provincia de Tenerife. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Arai, T., Ikejima, N., Itoh, T., Sakai, S., Shimada, T., Sakazaki, R.** (1980). A survey of *Plesiomonas shigelloides* from aquatic environments, domestic animals, pets and humans. *The Journal of Hygiene (London)*. 84(2): 203-211.
- Ardans, A.A.** (1990). Herpesviridae. En: Biberstein, E.L., Zee, Y.C. (ed.). Review of veterinary microbiology. Blackwell scientific publications. Boston.
- Arslan, E., Dalay, C., Yavuz, M., Göcenler, L., Acartürk, S.** (1999). Gram-negative bacteria surveillance in burn patients. *Annals of Burns and Fire Disasters* 2: 84.
- Austin, C.C., Wilkins, M.J.** (1998). Reptile-associated salmonellosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 212: 866-867.
- Austrian, R.** (1986). Some aspects of the pneumococcal carrier state. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 18: 35-45.
- Ayres, C., Alvarez, A.** (2008). On the presence of *Placobdella* sp. leeches on *Emys orbicularis*. *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis*. 8 (1): 53-55.
- Bardon, J.** (1999). *Plesiomonas shigelloides* and its serovars in animals in the Czech Republic—region Moravia. *Central European Journal of Public Health*. 7(1): 47-49.
- Barnard, S.M., Upton, S.J.** (1994). A veterinary guide to the parasites of reptiles, Vol. I. Protozoa Kreiger, Malabar, Florida, 154 pp.
- Barragán-Sáenz, F.A., Sánchez-Nava, P., Hernández-Gallegos, O., Salgado-Maldonado, G.** (2009). Larval stages of trematodes in gasteropods from Lake Chicahuapan, state of Mexico, Mexico. *Parasitology Research*. 105: 1163-1167.
- Bartlett, C.M., Anderson, R.C.** (1985). Larval nematodes (*Ascaridida* and *Spirurida*) in the aquatic snail, *Lymnaea stagnails*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 46: 153-159.
- Barton, L.L., Hoddy, D.M.** (1993). Osteomyelitis due to *Achromobacter xyloisidans*. *Clinical Infectious Diseases*. 17: 296-297.
- Bataller, J.V., Barolomé, M.A., Pradillo, A., Sarzo, B., Vilalta, M., Cervera, F., Monsalve, M.A.** (2008). Control de poblaciones de galápagos exóticos en humedales de la Comunidad Valenciana. Informe de actividades del equipo técnico de seguimiento de fauna amenazada. Generalitat Valenciana, Conselleria

- de Medi Ambient, Aigua, Urbanisme i Habitatge.
- Baudart, J., Lemarchand, K., Brisabois, A., Lebaron, P.** (2000). Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1544-1552.
- Berg, R.W., Anderson, A.W.** (1972). Salmonellae and Edwardsiella tarda in gull feces: a source of contamination in fish processing plants. *Journal of Applied Microbiology*. 24: 501-503.
- Berger, S.A.** (1985). *Proteus* bacteremia in a general hospital. *The Journal of Hospital Infection*. 6: 293-298.
- Bertolero, A.** (2002): Biología de la tortuga mediterránea *Testudo hermanni* aplicada a su conservación. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, España.
- Bertolero, A.** (2006). La Tortue d'Hermann *Testudo hermanni* sur les îles de Majorque et de Minorque. *Chéloniens* 1: 12-18.
- Bertolero, A., Martínez-Vilalta, A.** (1994): Presencia histórica de *Testudo hermanni* en las comarcas del Baix Ebre y Montsià (sur de Cataluña). *Boletín de la Asociación de Herpetología Española*. 5: 2-3.
- Biberstein, E.L.** (1990a). *Staphylococci*. pp. 150-156. En: Biberstein, E.L., Zee, Y.C., (eds). Review of veterinary microbiology. Blackwell scientific publications.
- Biberstein, E.L.** (1990b). *Streptococci*. pp. 157-164. En: Biberstein, E.L., Zee, Y.C., (eds). Review of veterinary microbiology. Blackwell scientific publications.
- Biberstein, E.L., Dwight, C.H.** (1999). *Pasterella*. En Dwight, C. H., Zee, Y.C. (eds). Veterinary microbiology. Blackwell Science Inc. USA. 135-140.
- Biscardi, D., Castaldo, A., Gualillo, O., de Fusco, R.** (2002). The occurrence of cytotoxic *Aeromonas hydrophila* strains in Italian mineral and thermal waters. *Science of the Total Environment*. 292(3): 255-263.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Blanco, J., González, E.A., Alonso, M.P., Maas, H.** (1996). Prevalence and characteristics of human and bovin verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Galicia (north-western Spain). *European Journal Epidemiology*. 12: 13-19.
- Borrell, N., Figueras, M.J., Guarro, J.** (1998) Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources. *Canadian Journal of Microbiology*. 44: 103-108.
- Bouamer, S., Morand, S.** (2000). Oxyuroids of Palearctic Testudinidae: new definition of the genus *Thaparia* Ortlepp, 1933 (Nematoda: Pharyngodonidae), redescription of *T. thapari thapari*, and descriptions of two new species. *Comparative Parasitology*. 67: 169-180.
- Bouamer, S., Morand, S.** (2002). Description of *T. combesi* n. sp., and redescriptions of four species of the genus *Tachygonetria* Wedl, 1862 (Nematoda: Pharyngodonidae), with a new diagnosis of the genus. *Systematic Parasitology*. 53(2): 121-139.
- Bouamer, S., Morand, S.** (2003). Phylogeny of Palearctic Pharyngodonidae parasite species of Testudinidae: a morphological approach. *Canadian Journal of Zoology*. 81: 1885-1893.
- Bouamer, S., Morand, S.** (2004). Descriptions of *Tachygonetria africana* n. sp. and *T. pretoriensis* n. sp., and redescriptions of two species of *Tachygonetria* Wedl, 1862 (Nematoda: Pharyngodonidae) parasite of *Geochelone pardalis* (Testudinidae) from South Africa. *Systematic Parasitology*. 58: 199-208.
- Bouamer, S., Morand, S.** (2005). Two new species of the genus *Tachygonetria* Wedl, 1862 (Nematoda - Pharyngodonidae) and redescriptions of five species parasite of Palearctic Testudinidae. *Zoosystema* 27(2): 193-209.
- Bouamer, S., Morand, S., Bourgat, R.** (2001a). Oxyuroids of Palearctic Testudinidae — new definition of the genus *Alaeuris* Seurat, 1918 (Nematoda: Pharyngodonidae), redescription of *Alaeuris numidica* (Seurat, 1918). *The Journal of Parasitology*. 87(1): 128-133.
- Bouamer, S., Morand, S., Bourgat, R.** (2001b). Redescription of *Mehdiella microstoma* and description of *Mehdiella petterae* sp., with a new definition of the genus *Mehdiella* Seurat, 1918 (Nematoda: Pharyngodonidae). *Folia Parasitologica*. 48: 132-138.
- Bouamer, S., Morand, S., Karat, M.** (2003). Redescription of four species of *Mehdiella* from Testudinidae with a key to the species of the genus. *Parasite*. 10: 333-342.
- Boylan, E.** (2003). Las Tortugas. Ed. Antártida. México D.F., México.
- Bringsøe, H.** (2001). *Trachemys scripta* (Schoepff, 1792)-Buchstaben-Schmuckschildkröte. En: Bringsøe, H. (2006). Invasive alien species fact

- sheet- *Trachemys scripta*- from: Online Database of the North European and Baltic Network on invasive Alien species- NOBANIS www.nobanis.org. (consultado el 11 de noviembre de 2009).
- Bringsøe, H.** (2002). Review of the status of *Trachemys scripta elegans* en European Union. En: Adrados, L. C. 5 Briggs, L. (eds.): Study of application of EU wildlife trade regulations in relation to species which form an ecological threat to EU fauna and flora, with case studies of American bullfrog (*Rana catesbeiana*) and red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*). – Unpubl. study report to the European Commission. Ref. no. B4-3040/2001/326066/MAR/E.3. Pp. II27-II40.
- Bringsøe, H.** (2006). Invasive alien species fact sheet- *Trachemys scripta*- from: Online Database of the North European and Baltic Network on invasive Alien species- NOBANIS www.nobanis.org. (consultado el 11 de noviembre de 2009).
- Briones, V., Téllez, S., Goyache, J., Ballesteros, C., del Pilar-Lanzarot, M., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F.** (2004). *Salmonella* diversity associated with wild reptiles and amphibians in Spain. *Environmental Microbiology*. 6(8): 868-871.
- Brown, D.R.** (2002). Mycoplasmosis and immunity of fish and reptiles. *Frontiers in Bioscience*. 7: 1338-1346.
- Burnham, B.R., Atchley, D.H., DeFusco, R.P., Ferris, K.E., Zicarelli, J.C., Lee, J.H., Angulo, F.J.** (1998). Prevalence of faecal shedding of *Salmonella* organisms among captive green iguanas and potential public health implications. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 213: 48-50.
- Burnham, D.K., Keall, S.N., Nelson, N.J., Daugherty, C.H.** (2005). T cell function in tuatara (*Sphenodon punctatus*). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 28: 213-222.
- Byun, R., Elbourne, L.D., Lan, R., Reeves, P.R.** (1999). Evolutionary relationships of pathogenic clones of *Vibrio cholera* by sequence analysis of four housekeeping genes. *Infection and Immunity*. 67: 1116-1124.
- Cabelli, V.J.** (1978). Swimming-associated disease outbreaks. *The Federal Water Pollution Control*. 50: 1374-1377.
- Cadi, A., Joly, P.** (2004). Impact of the introduction of the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) on survival rates of the European pond turtle (*Emys orbicularis*). *Biodiversity and Conservation*, 13: 2511-2518.
- Cambre, R.C., Earl Gree, D., Smith, E.E., Montali, R.J., Bus, M.** (1980). Salmonellosis and Arizonosis in the reptile collection at the National Zoological Park. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 177: 800-803.
- Capelli, G., Borsato, E., Stancampiano, L., Bozzolan, G., Pietrobelli, M.** (1998). Epidemiology of gastrointestinal parasites of tortoises (*Testudo hermanni boettgeri*) in captivity. *Parassitologia* 40: 29.
- Carr, A.** (1952). Handbook of Turtles: The Turtles of the United States, Canada, and Baja California. En Bringsøe, H. (2006). NOBANIS- Invasive alien species fact sheet- *Trachemys scripta*- from online database of the North European and Baltic network on invasive alien species- www.nobanis.org.
- Catalogo de zonas húmedas de la Comunidad Valenciana.** (2000). Fichas coordinadas. Conselleria de Medi Ambient. Generalitat Valenciana.
- Cathebras, P., Thibaudin, D., Burgard, G., Gouilloud, B., Bouchou, K., Rousset, H.** (1994). Recurrent *Alcaligenes xylosoxidans* intra- and retroperitoneal abscess following celioscopic cholecystectomy. *La Revue de Medicine Interne*. (Francia) 15: 432.
- CDC** (2005). Salmonellosis Associated with Pet Turtles --- Wisconsin and Wyoming, 2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. Vol. 54 (9): 223-226.
- CDC** (2007). Turtle-associated salmonellosis in humans—United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. Vol. 56 (26): 649-652.
- CDC** (2008). Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Infections Associated with Exposure to Turtles -United States, 2007-2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. Vol. 57(03): 69-72.
- CDC** (2010). Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Typhimurium Infections Associated with Pet Turtle Exposure — United States, 2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. Vol. 59 (7): 191-196.
- Christensen, J., Baggesen, D.L., Nielsen, B., Stryhn, H.** (2002). Herd prevalence of *Salmonella* spp. in Danish pig herds after implementation of the Danish *Salmonella* Control Program with reference to a preimplementation study. *Veterinary*

- Microbiology*. 88: 175–188.
- Claesson, B.E., Holmlund, D.E., Lindhagen, C.A., Mätzsch, T.W.** (1984). *Plesiomonas shigelloides* in acute cholecystitis: a case report. *Journal of Clinical Microbiology*. 20(5): 985-987.
- Clark, R.B., Janda, J.** (1991). *Plesiomonas* and human disease. *Clinical Microbiology Newsletter*. 13(7): 49-52
- Clarridge, J.E., Musher, D.M., Fainstein, V., Wallace, R.J.** (1980). Extraintestinal human infection caused by *Edwardsiella tarda*. *Journal of Clinical Microbiology*. 11(5): 511-514.
- Coico, R., Sunshine, G., Benjamini, E.** (2003). Immunology, A Short Course. Hoboken, NJ: Wiley-Liss Publications.
- Colwell, R.R.** (1996). Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science* 274: 2025-2031.
- Colwell, R.R., Huq, A.** (1994). Vibrios in the environment: viable but nonculturable *Vibrio cholerae*. In *Vibrio cholerae* and Cholera: Molecular to Global Perspectives, pp. 117-133. Edited by I.K. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olsvik. Washington, D.C. American Society for Microbiology.
- Conti, B., Tabarean, I., Andrei, C., Bartfai, T.** (2004). Cytokines and fever. *Frontiers in Bioscience*. 9: 1433-1449.
- Cooper, R.G., Brown, G.W.** (1968). *Plesiomonas shigelloides* in South Australia. *Journal of Clinical Pathology*. 21:715-718. En: Jagger, T.D. (2000). *Plesiomonas shigelloides*- a veterinary perspective. *The Infectious Disease Reviews*. 2(4): 199-210.
- Cordero del Campillo, M., Catañón, L., Reguera, A.** (1994). Índice-Catálogo de zooparásitos ibéricos. 2ª ed. Universidad de León.
- Cordero del Campillo, M., Rojo-Vazquez, F.A., Martínez, A., Sánchez, C., Hernández, S., Navarrete, I., Diez, P., Quiroz, H., Carvallo, M.** (1999). Parasitología Veterinaria. Editorial McGraw-Hill. Interamericana. Madrid.
- Córdoba, A., Monterrubio, J., Bueno, I., Corcho, G.** (2005). Neumonía comunitaria grave por *Proteus mirabilis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2005; 23: 247-50.
- Corrente, M., Madio, A., Friedrich, K.G., Greco, G., Desario, C., Tagliabue, S., D'Incau, M., Campolo, M., Buonavoglia, C.** (2004). Isolation of *Salmonella* strains from reptile faeces and comparison of different culture media. *Journal of Applied Microbiology*. 96, 709–715.
- Crespo, C., Ayres, C., Cordero, A., García, J. M.** (2002). Estudio preliminar sobre la presencia de formas parasitarias en las heces del galápago europeo en Galicia. Libro de resúmenes del VII congreso Luso-Español de Herpetología, Evora p.109.
- Croci, L., Di Pasquale, S., Cozzi, L., Toti, L.** (2001). Behavior of *Aeromonas hydrophila* in bottled mineral waters. *Journal of Food Protection*. 64(11):1836-1840.
- Cuberos, L., Cordero, E., Garcia-Curiel, A., Pachón, J.** (1998) Infecciones por *Pseudomonas* spp. *Medicine*. 7(78): 3629-3633.
- Chattopadhyay, S., Sinha, N.K., Banerjee, S., Roy, D., Chattopadhyay, D.D., Roy, S.** (2006). Small cationic protein from a marine turtle has β -defensin-like fold and antibacterial and antiviral activity. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 64: 524-531.
- Cheng, T.** (1978). Parasitología general. Ed. AC. Madrid. España.
- Cheyilan, M.** (2001): *Testudo hermanni* Gmelin, 1789-Griechische Landschildkröte. En: Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Fritz, U. Ed, p. 179-289. AULA, Verlag.
- D'Aoust, J.Y.** (1997). *Salmonella* species. En food microbiology: fundamentals and frontiers. Ed. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. Washington D. C.
- 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: 233-238.
- Day, R.D., Segars, A.L., Arendt, M.D., Lee, A. M., Peden-Adams, M.M.** (2007). Relationship of blood mercury levels to health parameters in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Environmental Health Perspectives*. 115: 1421-1428.
- De Roa, E., Roig, J.M.** (1997). Puesta en hábitat natural de la tortuga de Florida (*Trachemys scripta elegans*) en España. Boletín de la Asociación Española de Herpetología. 9: 48-50.
- Decré D., Arlet G., Danglot C., Lucet J.C., Fournier G., Bergogne-Bérézin, E.** (1992). A beta-lactamase-overproducing strain of *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans* isolated from a case of meningitis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 30: 769-779.
- Decreto 213/2009**, de 20 noviembre, del Consell de la Generalitat, por el que se aprueban medidas para el control de especies exóticas invasoras

- en la Comunitat Valenciana. [DOGV núm. 6151, de 24 de noviembre].
- Decreto 32/2004**, de 27 de febrero, del Consell de la Generalitat, por el que se crea y regula el Catálogo Valenciano de Especies de Fauna Amenazadas, y se establecen categorías y normas para su protección. [DOGV núm. 4.705, de 4 de marzo].
- Deza, F.G., Espinel, C.S., Beneitez, J.V.** (2007). A novel IgA-like immunoglobulin in the reptile *Eublepharis macularius*. *Developmental and comparative Immunology*. 31: 596-605.
- Directiva 92/43/CEE del Consejo de las Comunidades Europeas**, de 21 de mayo de 1992 relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, M.** (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*. 13: 16-34.
- Downey, D.J., Clark, J.N.T.** (1984). A case of diarrhoea associated with *Plesiomonas shigelloides*. *The New Zealand Medical Journal*. 97: 92-93.
- Dubinina, M.H.** (1949). [Ecological studies on the parasite fauna of *Testudo horsfieldii* Gray from Tadzhikistan]. *Parazitologicheskii Sbornik Zoologicheskogo Muzeia Akademii Nauk SSSR* 11: 61-97. En: Bouamer, S., Morand, S. (2005). Two new species of the genus *Tachygonetria* Wedl, 1862 (Nematoda-Pharyngodonidae) and redescrptions of five species parasite of Palaearctic Testudinidae. *Zoosystema*. 27(2): 193-209.
- Dumontet, S., Krovacek, K., Baloda, S.B., Grottoli, R., Pasquale, V., Vanucci, S.** (1996). Ecological relationship between *Aeromonas* and *Vibrio* spp. and planktonic copepods in the coastal marine environment in southern Italy. *Comparative Immunology, Microbiology Infectious and Diseases*. 19: 245-254
- Dupon, M., Winnock, S., Rogues, A.M., Janvier, G., Barbeyrac, B., Saric, J.** (1993). *Achromobacter xylosoxidans* (*Alcaligenes xylosoxidans* subspecies *xylosoxidans*) bacteremia after liver transplantation. *International Medical Care*. 19: 481.
- Duszynski, D.W., Upton, S.T., Couch, L.** (2008). Coccidia (*Eimeria* and *Isospora*) of Chelonia <http://biology.unm.edu/biology/coccidia/chlonia.html> (consultado el 5 enero de 2010).
- Eberspacher, B., Hugo, F., Pohl, M., Bhakdi, S.** (1990). Functional similarity between the haemolysins of *Escherichia coli* and *Morganella morganii*. *Medical Microbiology*. 33: 165-170.
- Eckert, K.L., Bjorndal, K.A., Abreu-Grobois, F.A., Donnelly, M.** (2000). Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas. UICN/CSE Publicación nº 4. www.iucn_mtsg.org (Consultado el 1 de julio de 2008).
- EFSA (European Food Safety Authority)**. (2010). Quantitative risk assessment of *Salmonella* Enteritidis in shell eggs in Europe. *The EFSA Journal*. 8(4): 1588- 1631.
- Einstein, B., Watkins, V.** (1998). Enfermedades producidas por bacilos entéricos gram-negativos. En: Isselbacher, K.J., Braunwald, E., Wilson, J.D., Martin, J.B., Fauci, A.S. (1998). (Ed) Principios de medicina interna. 14.a Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, p. 1070-1071.
- El Ridi, R., Badir, N., El Rouby, S.** (1981). Effect of seasonal variations on the immune system of the snake, *Psammophis schokari*. *Journal of Experimental Zoology*. 216: 357-365.
- Ernst, C.H., Lovich, J.E., Barbour, R.W.** (1994). Turtles of the United States and Canada. – Smiths. Inst. Press, Washington, D.C. & London. xxxviii + 578 pp.
- Ernst, C.H., Babour, R.W.** (1997). Turtles of the world Smithsonian Institution Press, Washington D.C. London
- Ewing, W.H.** (1962). The tribe *Proteeae*: its nomenclature and taxonomy. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*. 12: 93-102.
- Farag, M.A., El Ridi, R.** (1984). Mixed leucocyte reaction (MLR) in the snake *Psammophis sibilans*. *Immunology*. 55: 173-181.
- Farfán, M.** (2002): Estudio de la estructura genética de las poblaciones de *Vibrio cholerae*. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona.
- Faruque, S.M., Albert, M.J., Mekalanos, J.J.** (1998). Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholera*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 1301-1314.
- Feeley, J.C., Treger, M.D.** (1969). Penetration of turtle eggs by *Salmonella braenderup*. *Public Health Reports*. 84: 156-158.
- Flaherty, J.P., García-Houchins, S., Chudy, R., Arnow, P.M.** (1993). An outbreak of gram-negative bacteremia traced to contaminated o-rings in reprocessed dialyzers. *Annals of*

Internal Medicine. 119: 1072–1078

- Frank, N., Ramus, E.** (1995). A complete guide to scientific and common names of reptiles and amphibians of the world. Edited by Ramus/NG Publishing, Pottsville.
- Frías, C.** (1996). Estudio de los factores de patogenicidad de *Escherichia coli* enterohemorrágica. Tesis doctoral. Universidad Autónoma. Barcelona.
- Geisberger, R., Lamers, M., Achatz, G.** (2006). The riddle of the dual expression of IgM and IgD. *Immunology* **118**, 429-437.
- Geller, E.R.** (1944) Epidemiology of enterobiasis. *Meditisinskaia Parazitologija Parazitarnve Bolezni*. 5: 16-23. En: Ruiz-Sanchez, S.L. (1996). Estudio de nematodos parásitos de lacertidos de la provincia de Tenerife. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Geue, L., Loschner, U.** (2002). *Salmonella enterica* in reptiles of German and Austrian origin. *Veterinary Microbiology*. 84 (1-2): 79-91.
- Ghengahesh, K.S., Abeid, S.S., Jaber, M.M., Ben-Taher, S.A.** (1999). Isolation and haemolytic activity of *Aeromonas* species from domestic dogs and cats. *Comparative Immunology, Microbiology Infectious and Diseases*. 22: 175-179.
- Ghengahesh, K.S., El-Ghodban, A., Dkakni, R., Abeid, S., Altomi, A., Abdussalam, T., Marialigeti, K.** (2001). Prevalence, species differentiation, haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of aeromonads in untreated well water. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 96: 169-173.
- Gilligan, P.H.** (1991). Microbiology of airways disease in patients with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 4: 35-51.
- Goldberg S.R., Bursey, C.R.** (2002). Helminth parasites of seven anuran species from northwestern Mexico. *Western North American Naturalist*. 62(2): 160–169.
- González, C.E., Hamann, M.I.** (2007). The first record of amphibians as paratenic host of *Serpinema* larvae (Nematoda: Camallanidae). *Brazilian Journal of Biology*. 67(3): 579-580.
- 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*). *The Veterinary Record*. 157: 236-237.
- Goñi-Urriza, M., Capdepuy, M., Raymond, N., Quentin, C., Caumette, P.** (1999). Impact of an urban effluent on the bacterial community structure in the Arga River (Spain), with special reference to culturable gram-negative rods. *Canadian Journal of Microbiology*. 45(10):826-32.
- Gopee, N.V., Adesiyun, A.A., Caesar, K.** (2000). Retrospective and longitudinal study of salmonellosis in captive wildlife in Trinidad. *Journal of Wildlife Disease*. 36: 284-293.
- Gordon, A.N., Kelly, W.R., Lester, R.J.G.** (1993). Coccidiosis: A Fatal Disease of Free-Living Green Turtles, *Chelonia Mydas*. *Marine Turtle Newsletter*. 61:2-3.
- Gradon, J.D., Mayer, A.R., Hayes, J.** (1993). Pulmonary abscess associated with *Alcaligenes xylosoxidans* in a patient with AIDS. *Clinical Infectious Diseases*. 17: 1071-1072.
- Grahnquist, L., Lundberg, B., Tullus, K.** (1992). Neonatal *Proteus* meningoencephalitis. Case report. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology*. 100: 734–736.
- Greenberg, Z., Sklut, O., Bergner-Rabinowitz, S., Sechter, I., Cahan, D., Richter, C.B.** (1976). *Salmonella* and *Arizona* from snakes in the Judean desert (1974-1975). *Annals of Microbiology*. 127(3): 383-390.
- Greene, A.E., Kay, K., Jaber, J.G., Stehmeier, L.G., Voordouw, G.** (2000). Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Applied Environmental Microbiology*. 66: 5282–5289.
- Greenlees, K.J., Machado, J., Bell, T., Sundlof, S.F.** (1998). Food borne pathogens of cultured aquatic species. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 14(1): 101-112.
- Grey, H.** (1963). Phylogeny of the immune response: Studies on some physical, chemical, and serologic characteristics of antibody produced in the turtle. *Journal of Immunology*. 91: 819-825.
- Griffin, P.M., Tauxe, R.V.** (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiologic Reviews*. 13: 60-98.
- Grundmann, H., Aires-de-Sousa, M., Boyce, J., Tiemersma, E.** (2006). Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *The Lancet* 368: 874-885.
- Hadjinicolaou, A.V., Demetriou, V.L., Emmanuel, M.A., Kakoyiannis, C.K., Kostrikis, L.G.**

- (2009). Molecular beacon-based real-time PCR detection of primary isolates of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis in environmental and clinical samples. *BioMed Central Veterinary Research*. 9(97). <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/976> (consultado el 15 enero de 2010)
- Hanson, L.** (2000). Septicemia entérica del bagre (*Edwardsiella ictaluri*). *Oficina Internacional de Epizootias*. www.oie.int. (consultado el 20 diciembre de 2009).
- Harwood, V.J., Butler, J., Parrish, D., Wagner, V.** (1999). Isolation of fecal coliform bacteria from the diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin centrata*). *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 865-867.
- Haynes, J., Hawkey, P.M.** (1989). *Providencia alcalifaciens* and travellers' diarrhoea. *The British Medical Journal*. 299: 94-95.
- Hazen, T.C., Esch, G.W., Raker, M.L.,** (1978). Agglutinating Antibody to *Aeromonas hydrophila* in Wild Largemouth Bass. *Transactions of the American Fisheries Society*. 110, (4) : 514-518.
- Helke, K.L., Cooper, T.K., Mankowski, J.L. Poynton, S.L.** (2006). Disseminated visceral coccidiosis in indo-gangetic flap-shelled turtles, *Lissemuys punctata andersoni*. *Journal of Wildlife Disease*. 42: 788-796.
- Hendrix, C.M.** (1999). *Diagnostico Parasitologico Veterinario*. Harcourt Brace España. Madrid.
- Heyndrickx, M., Vandekerchove, D., Herman, L., Rollier, I., Grijspeerdt, K., Zutter, L.** (2002). Routes for *Salmonella* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiology and Infection*. 129: 53-265.
- Hickman, C.P., Roberts, L.S., Larson, A., I'Anson, H.** (2006). *Principios integrales de zoología*. 13 ed. McGraw-Hill. Madrid, España.
- Hidalgo-Vila, J., Martínez-Silvestre, A., Pérez-Santigosa, N., Díaz-Paniagua, C., Andreu, A.C., Ruiz, X., De Frutos, C., León, L.** (2004). Primeros resultados del estado sanitario de poblaciones de galápagos autóctonos y exóticos en el SO de la Península Ibérica. Libro de resúmenes del VIII congreso Luso-Español de Herpetología, Málaga, 97-98.
- Hidalgo-Vila, J., Díaz-Paniagua, C., Frutos-Escobar, C., Jiménez-Martínez, C., Pérez-Santigosa, N.** (2007). *Salmonella* in free living terrestrial and aquatic turtles. *Veterinary Microbiology*. 119: 311-315
- Hidalgo-Vila, J., Díaz-Paniagua, C., Pérez-Santigosa, N., Frutos-Escobar, C., Herrero, A.** (2008a). *Salmonella* in free-living exotic and native turtles and in pet exotic turtles from SW Spain. *Research in Veterinary Science*. 85: 449-452.
- Hidalgo-Vila, J., Díaz-Paniagua, C., Ruiz, X., Porthault, A., El Mouden, H., Slimani, T., De Frutos, C., De Caso, M.S.** (2008b). *Salmonella* species in free-living spur-thighed tortoises (*Testudo graeca*) in central western Morocco. *Veterinary Record*. 162: 218-219.
- Hidalgo-Vila J, Díaz-Paniagua C, Ribas A, Florencio M, Pérez-Santigosa N, Casanova J.C.** (2009). Helminth communities of the exotic introduced turtle, *Trachemys scripta elegans* in southwestern Spain: Transmission from native turtles. *Research in Veterinary Science*. 86(3): 463-465.
- Hirsh, D.C.** (1990a). Escherichia. Part II Bacteria and Fungi. In *Review of Veterinary Microbiology*. Ed. Blackwell Scientific Publications Boston. USA pp. 103-110
- Hirsh, D.C.** (1990b). *Pseudomonas*. En: Biberstein, E.L., Zee, Y.C. (ed.). *Review of veterinary microbiology*. Blackwell scientific publications. Boston.
- Holmberg, S.D., Wachsmuth, I.K., Hickman-Brenner, F.W., Blake, P.A., Farmer, J.J.** (1986). Plesiomonas enteric infections in the United States. *Annals of Internal Medicine*. 105(5):690-694.
- Holmes, B., Pickett, M.J., Hollis, D.G.** (1999). *Pasteurella*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 7ª ed. Washington: ASM Press, 632-637.
- Holst, E., Rollof, J., Larsson, L., Nielsen, J.P.** (1992). Characterization and distribution of *Pasteurella* species recovered from infected humans. *Journal of Clinical Microbiology*. 30: 2984-2987.
- Hori, M., Hayashi, K.** (1966). Food poisoning caused by *Aeromonas shigelloides* with an antigen common to *Shigella dysenteriae*. *Journal of the Japanese Association of Infectious Disease*. 39:433-441. En: Jagger, T.D. (2000). *Plesiomonas shigelloides*- a veterinary perspective. *The Infectious Disease Review*. 2(4):199-210.
- <http://orto.cma.gva.es> Servicio cartográfico de la Conselleria de Medi ambient, aigua, urbanisme i habitatge de la Generalitat Valenciana. (consultado el 14 mayo de 2010).

- <http://www.catalogueoflife.org>. Catalogue of Life: 2010 Annual Checklist indexing the world's Known species. (consultado el 15 enero de 2010)
- Hunt, C.J.** (2006). Herpesvirus outbreak in a group of Mediterranean Tortoises (*Testudo* spp.). *Veterinary Clinics of North America-Exotic Animal Practice*. 9(3): 569-574.
- Hussein, M.F., Badir, N., El Ridi, R., Akef, M.** (1978). Effect of seasonal variation on lymphoid tissues of the lizards, *Mabuya Quinquetaeniata* Licht and *Uromastix aegyptia* forsk. *Developmental and Comparative Immunology*. 2: 469-478.
- Hussein, M. F., Badir, N., El Ridi, R., El Deeb, S.** (1979). Effect of seasonal variation on immune system of the lizard, *Scincus scincus*. *Journal of Experimental Zoology*. 209: 91-96.
- Hwa-Lee, S., Jung, B.Y., Rayamahji, N., Lee, H.S., Jeon, W.J., Choi, K.S., Kweon, C.H., Yoo, H.S.** (2009). A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritis meats. *Journal of Veterinary Science*. 10(1): 43-51.
- Ingram, G.A., Molyneux, D.H.** (1983). The humoral immune response of the spiny-tailed agamid lizard (*Agama Caudospinosum*) to injection with *Leishmania agamae* promastigotes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 4: 479-491.
- Isenstein, D., Honig, E.** (1990). *Proteus vulgaris* empyema and increased pleural fluid pH. *Chest*. 97: 511.
- Ishii, S., Yan, T., Shively, D.A., Byappanahalli, M.N., Whitman, R.L., Sadowsky, M.J.** (2006). *Cladophora*, (*Chlorophyta*) spp. Harbor human bacterial pathogens in nearshore water of Lake Michigan. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 4545-4553.
- Ishii, S., Hansen, D.L., Hicks, R.E., Sadowsky, M.J.** (2007). Beach sand and sediments are temporal sinks and sources of *Escherichia coli* in Lake Superior. *Environmental Science and Technology*. 41: 2203-2209.
- Iveson, J.B.** (1971). Strontium chloride B and EE broth media for the isolation of *Edwardsiella*, *Salmonella* and *Arizona* species from tiger snakes. *The Journal of Hygiene*. 69: 323-330.
- Janda, J.M.** (2001). *Aeromonas* and *Plesiomonas* p. 1237-1270. en M. Sussman (ed.), *Molecular Medical Microbiology*. Academic Press, San Diego, USA.
- Janda, J.M.** (2005). Family I. *Enterobacteriaceae*, genus XXVII. *Plesiomonas* Habs, H. and Schubert. R.H.W. (1962), p. 740-744. In D. J. Brenner, N. R. Krieg, and J. T. Staley (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., vol. 2. Springer, New York, NY.
- Janda, J.M., Abbott, S.L.** (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clinical Infectious Diseases*. 27: 332-344.
- Jiménez-Fuentes, E., Gil, S., Pollos, S.** (1995). Quelonios del Pleistoceno Medio de Las Grajas (Archidona: Málaga). *Studia Geológica Salmanticensia*. 31: 55-62.
- John, J.F.J., Sharbaugh, R.J., Bannister, E.R.** (1982). *Enterobacter cloacae*: bacteremia, epidemiology, and antibiotic resistance. *Reviews of Infectious Diseases*. 4: 13-28.
- Johnson, T., Evans, C.A.** (1995). Care of captive reptiles and amphibians, Missouri Conservation Commission.
- Jordan, J.W., Hadley, W.K.** (1969). Human infection with *Edwardsiella tarda*. *Annals of Internal Medicine*. 70: 283-288. En: Clarridge, J.E., Musher, D.M., Fainstein, V., Wallace, R.J. (1980). Extraintestinal human infection caused by *Edwardsiella tarda*. *Journal of Clinical Microbiology* 11(5): 511-514.
- Kain, K.C., Kelly, M.T.** (1989). Clinical features, epidemiology and treatment of *Plesiomonas shigelloides* diarrhoea. *Journal of Clinical Microbiology*. 27: 998-1000.
- Kaper, J.B., Lockman H., Colwell, R.R., Joseph, S.W.** (1981). *Aeromonas hydrophila*: Ecology and Toxicity of Isolates from an Estuary. *Journal of Applied Bacteriology*. 50(2):359-77.
- Kaper, J.B., Morris, J.G., Levine, M.M.** (1995). Cholera. *Clinical Microbiology Reviews*. 8:48-86.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.** (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2: 123-140.
- Keller, J.M., McClellan-Green, P.D., Kucklick, J.R., Keil, D.E., Peden-Adams, M.M.** (2006). Effects of organochlorine contaminants on loggerhead sea turtle immunity: comparison of a correlative field study and in vitro exposure experiments. *Environmental Health Perspectives*. 114: 70-76.
- Kelly, M.T., Kain, K.C.** (1991). Biochemical characteristics and plasmids of clinical and environmental *Plesiomonas shigelloides*. *Experientia*. 47: 439-441.
- Kerstens, I., Huys, G., Van Duffel, H.,**

- Vancanneyt, M., Kersters, K., Verstraete, W.** (1996). Survival potential of *Aeromonas hydrophila* in freshwaters and nutrient-poor waters in comparison with other bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. 80(3): 266-276.
- Kim, B.N., Kim, N.J., Kim, M.N., Kim, Y.S., Woo, J.H., Ryu, J.** (2003). Bacteremia due to tribe Proteaceae: a review of 132 cases during a decade (1991-2000). *Scandinavian Journal of Infectious*. 35: 98-103.
- Kolar, C.S., Lodge, D.M.** (2001). Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 199-204.
- Kopka, M.** (2003). Red-eared terrapin (*Chrysemys scripta elans*) in water reservoirs of Wrocław. *En: Bringsøe, H.* (2006). Invasive alien species fact sheet- *Trachemys scripta*- from: Online Database of the North European and Baltic Network on invasive Alien species- NOBANIS www.nobais.org. (consultado el 11 de noviembre de 2009).
- Kordges, T.** (1990). Faunenverfälschung im Ballungsraum, dargestellt am Beispiel nordamerikanischer Rotwangen-Schmuckschildkröten (*Chrysemys scripta elegans*). – NZ NRW Seminarber. *Recklinghausen*. 9: 36-41.
- Koyuncu, S., Haggblom, P.** (2009). A comparative study of cultural methods for the detection of *Salmonella* in feed and feed ingredients. *BioMed Central Veterinary Research*. 5(6). <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/5/6> (consultado el 15 enero de 2010)
- Krovacek, K., Eriksson, L.M., González-Rey, C., Rosinsky, J., Ciznar, I.** (2000). Isolation, biochemical and serological characterization of *Plesiomonas shigelloides* from freshwater in northern Europe. *Comparative Immunology, Microbiology Infectious and Diseases*. 23: 45-51.
- Kunin, C.M.** (1997). Urinary tract infections: detection, prevention and management, 5th ed., p. 226–278. Williams and Wilkins, Baltimore, Md.
- Laison, R., Da Silva, F.M., Franco, C.M., De Souza, M.C.** (2008). New species of *Eimeria* and *Isospora* (Protozoa: Eimeriidae) in *Geochelone* spp. (Chelonia: Testudinidae) from Amazonian Brazil. *Parasite*. 15(4) 531-538.
- Laufer, H.** (2007). Buchstaben-Schmuckschildkröte *Trachemys scripta* (Schoepff, 1792). *En: Bringsøe, H.* (2006). Invasive alien species fact sheet- *Trachemys scripta*- from: Online Database of the North European and Baltic Network on invasive Alien species- NOBANIS www.nobais.org. (consultado el 11 de noviembre de 2009).
- Laupland, K.B., Church, D.L., Mucenski, M., Sutherland, L.R., Davies, H.D.** (2003). Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections. *The Journal Infectious Diseases*. 187: 1452-1459.
- Le Minor, L.** (1992). The genus *Salmonella*. In *The prokariotes*. Vol. III Edited by Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.H. New York.
- Leibovitz, L., Rebell, G., Boucher, G.C.** (1978). *Caryospora cheloniae* sp. n.: A coccidial pathogen of mariculture-reared green sea turtles (*Chelonia mydas mydas*). *Journal of Wildlife Diseases*. 14: 269–275.
- Lescure, F.X., Biendo, M., Douadi, Y., Schmit, J.L., Eveillard, M.** (2006). Changing epidemiology of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52: 2974-2976.
- Levine, N.D.** (1988). The protozoan phylum Apicomplexa, Vol. I. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 203. Lom, J., Arthur, J.R. A guideline for the preparation of species descriptions in *Myxosporea*. *Journal of Fish Diseases*. 12: 151–156.
- Lipsky, B.A., Hook, E.W., Smith, A.A., Plorde, J.J.** (1980). *Citrobacter* infections in humans: experience at the Seattle Veterans Administration Medical Center and a review of the literature. *Reviews of Infectious Diseases*. 2: 746-760.
- Lo Fo Wong, D.M., Dahl, J., van der Wolf, P.J., Wingstrand, A., Leontides, L., von Altröck, A.** (2003). Recovery of *Salmonella enterica* from seropositive finishing pig herds. *Veterinary Microbiology*. 97(3-4):201-214.
- Luna, C.M., Monteverde, A., Rodríguez, C., Apezteguia, C., Zabert, G., Iutovich, S., Menga, G.** (2005). Neumonía intrahospitalaria: guía clínica aplicable a Latinoamérica preparada en común por diferentes especialistas. *Archivos de Bronconeumología*. 41: 439-456.
- Lynch, M., Daly, M., O'Brien, B., Morrison, F., Cryan, B., Fanning, S.** (1999). *Salmonella* *tel-el-kebir* and terrapins. *The Journal of Infection*. 38: 182-184.
- Mallaret, M.R., Turquand, O., Blatier, J.F.,**

- Croize, J., Gledel, J., Micoud, M., Bertaudiere, L., Jouet, B., Corbion, B.** (1990). Human salmonellosis and turtles in France. *Revue d'épidémiologie et de santé publique*. 38(1):71-75.
- Manage, P.M., Kawabata, Z., Nakano, S.** (2000). Algicidal effect of the bacterium *Alcaligenes denitrificans* on *Microcystis* spp. *Aquatic Microbial Ecology*. 22: 111-117.
- Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R.** (2000). Bennett's-Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Churchill Livingstone (Philadelphia, Pennsylvania). USA.
- Mandell, W.F., Garvey, G.J., Neu, H.C.** (1987). *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia. *Reviews of Infectious Diseases*. 9: 1001-1005.
- Marchalonis, J.J., Ealey, E.H.M., Diener, E.** (1969). Immune response of the tuatara, *Sphenodon punctatum*. *Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science*. 47: 367-380.
- Marschang, R.E., Gravendyck, M., Kaleta, E.F.** (1997). Herpesviruses in tortoises: investigations into virus isolation and the treatment of viral stomatitis in *Testudo hermanni* and *T. graeca*. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine*. Series B 44(7): 385-394.
- Marschang, R.E., Gleiser, C.B., Papp, T., Pfitzner, A.J., Böhm, R., Roth, B.N.** (2006). Comparison of 11 herpesvirus isolates from tortoises using partial sequences from three conserved genes. *Veterinary Microbiology*. 117: 258-266.
- Marschang, R.E., Papp, T., Ferretti, L., Hochscheid, S., Bentivegna, F.** (2009). Detection and partial characterization of herpesviruses from Egyptian tortoises (*Testudo kleinmanni*) imported into Italy from Libya. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 40(1): 211-213.
- Marshall, D.L., Kim, J.J., Donnelly, S.P.** (1996). Antimicrobial susceptibility and plasmid-related streptomycin resistance of *Plesiomonas shigelloides* isolated from a blue crab. *Journal of Applied Bacteriology*. 81:195-200.
- Martínez-Silvestre, A., Cerradelo, S.** (2000). Galápagos de Florida. *Quercus*. 169: 16-19.
- Martorell, J.M.** (2006). Aislamiento de bacterias del género *Salmonella* a partir de cutivos de bilis obtenida mediante colecistocentesis percutánea ecoguiada en tortugas de la especie *Trachemys scripta*. Tesis. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Marx, A.C., Hartshorne, M.F., Stull, M.A., Truwit, C.L.** (1988). Case report 496: intraosseous gas in *Proteus mirabilis* osteomyelitis complicating bone infarcts in sickle cell disease. *Skeletal Radiology*. 17: 510-513.
- Massa, S., Altieri, C., D'Angela, A.** (2001). The occurrence of *Aeromonas* spp. in natural mineral water and well water. *International Journal of Food Microbiology*. 63(1-2):169-173.
- Mathewson, J.J., Dupont, H.L.** (1992). *Aeromonas* species: role as human pathogens. *Current Clinical Topics in Infectious Diseases*. 12: 26-36.
- Maupas, E.** (1899). La mue et l'enkystement chez les Nematodes. *Archives de Zoologie experimentale et generale*, 3: 563-628. En: Ruiz-Sanchez, S.L. (1996). Estudio de nematodos parásitos de lacertidos de la provincia de Tenerife. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- McCully, R.M., Basson, P.A., De Vos, V., De Vos, A.J.** (1970). Uterine coccidiosis of the impala caused by *Eimeria neitzi* spec. nov. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 37: 45-58.
- McDermott, C., Mylotte, J.M.** (1984). *Morganella morganii*: epidemiology of bacteremic disease. *Infection Control*. 5: 131-137.
- McGeoch, D.J., Gatherer, D.** (2005). Integrating reptilian Herpesvirus into the family *Herpesviridae*. *Journal of virology*. 79(2): 725-731.
- Medema, G., Schets, C.** (1993). Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in surface water; relationship with faecal pollution and trophic state. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin*. 194: 398-404.
- Mensa, J., Gatell, J.M., Jiménez de Anta, M.T., Prats, G., Domínguez-Gil, A.** (2004). *Enterobacter*. Guía de terapéutica antimicrobiana 2004. Mensa J, Gatell JM, Jiménez de Anta MT, Prat G, Domínguez-Gil A. Editorial MASSON. Barcelona.
- Merchant, M., Pallansch, M., Paulman, R.L., Wells, J.B., Nalca, A., Ptak, R.** (2005). Antiviral activity of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Antiviral Research*. 66: 35-38.
- Merchant, M., Williams, S., Trosclair, P.L., Elsey, R.M., Mills, K.** (2007). Febrile response to infection in the American alligator (*Alligator*

- mississippiensis*). *Comparative Physiology and Biochemistry A*. 148: 921-925.
- Mermin, J., Hoar, B., Angulo, F.J.** (1997). Iguanas and *Salmonella* marina infection in children: a reflection of the increasing incidence of reptile-associated salmonellosis in the United States. *Pediatrics*. 99: 399-402.
- Miller, M.L., Koburger, J.A.** (1986). Tolerance of *Plesiomonas shigelloides* to pH, sodium chloride and temperature. *Journal of Food Protection*. 49: 877-879.
- Mingot, D., López-Rodrigo, J., Oroñez-rivas, C., Robrino, E.** (2003). Reproducción en libertad del galápago de florida (*Trachemys scripta elegans*) en el centro de la península ibérica. *Boletín de la asociación Herpetología Española*. 14: 39-43.
- Mino, Y., Kitano, S., Morimoto, S., Ogihara, R.** (1997). Urinary bacteria in elderly patients with urinary incontinence and low levels of daily activity. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi*. 34: 1004-1008.
- Miranda, C., Castillo, G.** (1996). Isolation and characterization of motile aeromonads from Chilean freshwater and their potential use as water quality indicators. *Environmental Toxicology and Water Quality. An International Journal*. 2: 91-98.
- Mobley, H.L.T., Warren, J.W.** (1987). Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters. *Journal of Clinical Microbiology*. 25:2216-2217.
- Molinos, S., Giménez-Pérez, M.** (2009). Características clínicas-microbiológicas de las infecciones por *Staphylococcus schleiferi* y otros estafilococos coagulasa negativos. <http://www.seimc.org> (consultado en 20 de diciembre 2009)
- Molla, M., Miret, C., Sarsa, B., Cervera, R.** (1996). Bacteremia por *Achromobacter xylosoxidans*. *Medicina clínica*. 106: 38.
- Mondal, S., Rai, U.** (2001). In vitro effect of temperature on phagocytic and cytotoxic activities of splenic phagocytes of the wall lizard, *Hemidactylus flaviviridis*. *Comparative Physiology and Biochemistry A*. 129: 391-398.
- Montes, M., Pérez, M.J., Nieto, T.P.** (1999). Numerical taxonomy of gram-negative, facultative anaerobic bacteria isolated from skin of turbot (*Scophthalmus maximus*) and surrounding water. *Systematic and Applied Microbiology*. 22(4): 604-618.
- Monzón, C., Ojeda, M.M., Echeta, A., Usera, M.A.** (1995). Occurrence of *Salmonella* in cold-blooded animals in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 68: 191-194.
- Moravec, F., Huffman, D.G., Swim, D.J.** (1995a). The first record of fish as paratenic hosts of *Falcaustra* spp. (Nematoda: Kathlaniidae). *The Journal of Parasitology*. 81(5): 809-812.
- Moravec, F., Vargas-Vázquez, J.** (1998). Some endohelminths from the freshwater turtle *Trachemys scripta* from Yucatan, Mexico. *Journal of Natural History*. 32:455-468.
- Moravec, F., Vivas-Rodríguez, C., Sholz, T., Vargas-Vázquez, J., Mendoza-Franco, E., Schmitter-Soto, J.J., González-Solis, D.** (1995b). Nematodes parasitic in fishes of cenotes (=sinkholes) of the Peninsula of Yucatan, Mexico. Part 2. Larvae. *Folia Parasitologica*. 42: 199-210.
- Moravec, F., Mendoza-Franco, E., Vivas-Rodríguez, C.** (1998). Fish a paratenic hosts of *Serpinema trispinosum* (Leidy, 1852) (Nematoda: Camallanidae). *The Journal of Parasitology*. 84(2): 454-456.
- Morse, E.V., Duncan, M.A.** (1974). Salmonellosis an environmental health problem. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 165 (11):1015-1019.
- Müller, H.E.** (1986). Occurrence and pathogenic role of *Morganella-Proteus-Providencia* group bacteria in human feces. *Journal of Clinical Microbiology*. 23:404-405.
- Muñoz, F.J., De la Fuente, M.** (2001). The effect of the seasonal cycle on the splenic leukocyte functions in the turtle *Mauremys caspica*. *Physiological and Biochemical Zoology*. 74: 660-667.
- Muro, J., Ramis, A., Pastor, J., Velarde, R., Tarres, J., Lavin, S.** (1998) Chronic rinitis associated with herpesviral infection in captive spur-thighed tortoises from Spain. *Journal of Wildlife Diseases*. 34(3): 487-495.
- Najbar, B.** (2001). The red-eared terrapin *Trachemys scripta elegans* (Wied, 1939) in the Lubuskie Province (western Poland). En: Bringsøe, H. (2006). Invasive alien species fact sheet- *Trachemys scripta*- from: Online Database of the North European and Baltic Network on invasive Alien species- NOBANIS www.nobais.org. (consultado el 11 de noviembre de 2009).
- Nakadi, A., Kuroki, T., Kato, Y., Rieko, S., Yamai, S., Yaginuma, C., Shiotani, R., Yamanouchi, A., Hayashidani, H.** (2005). Prevalence of *Salmonella* spp. In pet reptiles in

Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*. 67: 97-101.

- Natarajan, K., Muthukkaruppan, V.R.** (1985). Distribution and ontogeny of B cells in the garden lizard, *Calotes versicolor*. *Developmental and Comparative Immunology*. 9: 301-310.
- National Nosocomial Infections Surveillance System** (1997). National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) report, data summary from October 1986-April 1997, issued May 1997. A report from the NNIS System. *American Journal of Infection Control*. 25(6): 477-487.
- National Nosocomial Infections Surveillance System** (1999). National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. *American Journal of Infection Control*. 27(6): 520-532.
- National Nosocomial Infections Surveillance System.** (2004). National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *American Journal of Infection Control*. 32(8): 470-485.
- 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: 534-546.
- Obi, C.L., Potgieter, N., Bessong, P.O., Matsaung, G.** (2003). Scope of potential bacterial agents of 168editerr and microbial assessment of quality of river water sources in rural Venda communities in South Africa. *Water Science and Technology*. 47(3): 59-64.
- Ohl, M.E., Miler, S.L.** (2001). *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annual Review of Medicine*. 52: 259-274.
- Okpokwasili, G.C., Akujobi, T.C.** (1996). Bacteriological indicators of tropical water quality. *Environmental Toxicology and Water Quality*. 11: 77-81.
- Old, D.C., Threlfall, E.J.** (1998). *Salmonella*. En *Microbiology and microbial infections*. Vol. 2. Nith edition. Edited by Balows, A. and Duerden, B.I.
- Origi, F.C., Jacobson, E.R.** (2000). Diseases of the respiratory tract of chelonians. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. 3(2): 537-549.
- Origi, F.C., Klein, P.A., Mathes, K., Blahak, S., Marschang, R.E., Tucker, S.J., Jacobson, E.R.** (2001). Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting Herpesvirus exposure in 168editerranean tortoise (spur-Thighed tortoise (*Testudo graeca*) and Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*). *Journal of Clinical Microbiology*. 39 (9): 3156-3163.
- Orrigi, F.C., Romero, C.H., Bloom, D.C., Klein, P.A., Gaskin, J.M., Tucker, S.J., Jaconsen, E.R.** (2004). Experimental transmission of a herpesvirus in greek tortoises (*Testudo graeca*). *Veterinary Pathology*. 41: 50-61.
- Owens, D.R., Nelson, S.L., Addison, J.B.** (1974). Isolation of *Edwardsiella tarda* from swine. *Appl. Environ. Microbiology*. 27:703-705. En: Clarridge, J.E., Musher, D.M., Fainstein, V., Wallace, R.J. (1980). Extraintestinal human infection caused by *Edwardsiella tarda*. *Journal of Clinical Microbiology*. 11(5): 511-514.
- Paniagua, C., Argüello-Villares, J.L., Arias, M.A., Herreros, M.** (1998). *Aeromonas hydrophila* associated with a severe outbreak of infection in farmed rabbits. *Zentralblatt fuer Hygiene und Umweltmedizin*. 201: 423-430.
- Pasmans, F., De Herdt, P., Chasseur-Libotte, M.L., Ballasina, D.L., Haesebrouck, F.** (2000). Occurrence of *Salmonella* in tortoises in a rescue centre in Italy. *The Veterinary Record*. 146: 256-258.
- Pasmans, F., De Herdt, P., Dewulf, J., Haesebrouck, F.** (2002). Pathogenesis of infections with *Salmonella enteric* subsp. *Enteric* serovar Muenchen in the turtle *Trachemys scripta scripta*. *Veterinary Microbiology* 87: 315-325.
- Pasmans, F., Van Immerseel, F., Van den Broeck, W., 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: 119-126.
- Pasotto, D., Menandro, M.L., Lauzi, S., Bielli, M., Martini, M., Mondin, A., Minorello, C., Zavagnin, P., Bonizzi, L.** (2002). An epidemiological study on *Salmonella* infection in reptiles from Northern Italy. *International Symposium Salmonella and Salmonellosis*.
- Peacock, S.J., Moore, C.E., Justice, A., Kantzanou, M., Story, L., Mackie, K., O'Neill, G., Day, N.P.** (2002). Virulent combinations of adhesion and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*. 70: 4987-4996.
- Pendlebury, P., Bringsøe, H.** (2006). «NOBANIS –

- Invasive Alien Species Fact Sheet –*Trachemys scripta*». *Global Invasive Species Database*. IUCN/SSC Invasive Species Specialist Group (ISSG). (Consultado el 17 de agosto de 2009).
- Pérez-Santigosa, N., Díaz-Paniagua, C., Hidalgo-Vila, J., Marco, A., Andreu, A., Porthault, A.** (2006). Características de dos poblaciones reproductoras del galápagos de Florida, *Trachemys scripta elegans*, en el suroeste de España. *Revista Española de Herpetología*. 20: 5-16.
- Petter, A.J.** (1961). Redescription et analyse critique de quelques espèces d'Oxyures de la tortue grecque (*Testudo graeca* L.) Diversité des structures céphaliques. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 10: 648–671. En: Bouamer, S., Morand, S. (2005). Two new species of the genus *Tachygonetria* Wedl, 1862 (Nematoda – Pharyngodonidae) and redescription of five species parasite of Palearctic Testudinidae. *Zoosystema*. 27(2): 193-209.
- Petter, A.J.** (1966). Équilibre des espèces dans les populations de nématodes parasites du colon des tortues terrestres. Mémoires du Muséum National d'histoire Naturelle Paris (serie A. Zoologie). Editions du museum. Paris, France. En: Traversa, D., Capelli, G., Iorio, R., Bouamer, S., Cameli, A., Giangaspero, A. (2005). Epidemiology and biology of nematodofauna affecting *Testudo hermanni*, *Testudo graeca* and *Testudo marginata* in Italy. *Parasitology Research*. 98: 14-20.
- Pfleger, S., Benyr, G., Sommer, R., Hassl, A.** (2003). Pattern of *Salmonella* excretion in amphibians and reptiles in a vivarium. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 206: 53-59.
- Pleguezuelos, J.M., Marquez, R., Lizana, M.** (2002). *Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza - Asociación Herpetológica Española (2ª impresión). Madrid.
- Podschn, R., Ullmann, U.** (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*. 11: 589-603.
- Polo, F., Figueras, M.J., Inza, I., Sala, J., Fleisher, J.M., Guarro, J.** (1999). Prevalence of *Salmonella* serotypes in environmental waters and their relationships with indicator organisms. *Antonie van Leeuwenhoek*. 75, 285-292.
- Prats, G.** (2001). Guia per a la prevenció i el control de la infecció per *Escherichia coli* O157:H7 i altres *Escherichia coli* verotoxigenes. Barcelona: Direcció General de Salut Pública.
- Prats, G., Frías, C., Margall, N., Llovet, T., Gaztelurrutia, T., Elcuaz, R.** (1996). Presentación de nueve casos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 14: 7-15.
- Preecharram, S., Daduang, S., Bunyaratatchata, W., Araki, T., Thammasirirak, S.** (2008). Antibacterial activity from Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum. *African Journal of Biotechnology*. 7: 3121-3128.
- Provet Healthcare Information** (2000). Feeding reptiles (<http://provet.co.uk>) (consultado el 15 enero de 2010).
- Pye, G.W., Brown, D.R., Nogueira, M.F., Vliet, K.A., Schoeb, T.R., Bennett, R.A.** (2001). Experimental inoculation of broad-nosed caimans (*Caiman latirostris*) and Siamese crocodiles (*Crocodyllus siamensis*) with *Mycoplasma alligatoris*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 32: 196-201.
- Quackenbush, S.L., Casey, R.N., Murcek, R.J., Paul, T.A., Work, T.M., Limpus, C.J., Chaves, A., du Toit, L., Perez, J.V., Aguirre, A.A., Spraker, T.R., Horrocks, J.A., Vermeer, L.A., Balazs, G.H., Casey, J.W.** (2001). Quantitative analysis of herpesvirus sequences from normal tissue and fibropapillomas of marine turtle with real-time PCR. *Virology*. 287: 105-111.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. Carter, G.R.** (1994). *Salmonella*. En *Clinical Veterinary Microbiology* Wolfe Publishing, pp. 226-234.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J., Leonard, F.C.** (2002). *Veterinary microbiology and microbial disease*. Ed. Blackwell Science Ltd. Gran Bretaña. pp. 109-113.
- Ramplig, A.** (1990). Microbiological consequences of healthy eating. *Reviews in Medical Microbiology*. 1: 125-132.
- Raumussen, J.B.** (1995). Hjørings Skildpadder- et arsstudie- interaktion med omgivende miljø. En: Bringsøe, H. (2006). Invasive alien species fact sheet- *Trachemys scripta*- from: Online Database of the North European and Baltic Network on invasive Alien species- NOBANIS www.nobais.org. (consultado el 11 de noviembre de 2009).
- Readel, A.M., Phillips, C.A., Goldberg, T.L.**

- (2008). Absence of cloacal of *Salmonella* in wild red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*). *Herpetological Review*. 39(4): 427-430.
- Real Decreto 439/1990**, de 30 de marzo, por el que se regula el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas. BOE nº 82-8432: 9468-9471.
- Reinecke, F., Groth, T., Heise, K.P., Joentgen, W., Muller, N., Steinbuchel, A.** (2000). Isolation and characterization of an *Achromobacter xylosoxidans* strain B3 and other bacteria capable to degrade the synthetic chelating agent iminodisuccinate. *FEMS Microbiology Letters*. 188:41-46.
- Report** (1993) Advisory Committee for the Microbiological Safety of food Report on *Salmonella* in eggs. Edited by HMSO. London.
- Tellez, S.** (2003). Estudio de la frecuencia de detección y caracterización de aislados de *Salmonella* spp. obtenidos de reptiles y anfibios. Tesis doctoral. Universidad Complutense Madrid.
- Robles, LA, García, RM, Torres, J.** (1999), Toxinas de *Vibrio cholerae*. Revista Mexicana de Patología clínica, Vol 46, Núm. 4: 255-259.
- Rodgers, G.L., Long, S.S., Smergel, E., Dampier, C.** (2002). *Salmonella* infection associated with a pet lizard in siblings with sickle cell anemia: an avoidable risk. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 24: 75-76.
- Rodríguez, E.F., Gutiérrez, C.B., de la Fuente, V.A.** (1999). *Salmonella* y salmonelosis. Caja España, León.
- Rodríguez-Garrido, M.C.** (2009). Tortugas en Estanques de jardín. www.elestanque.com. (Consultado el 20 de octubre de 2009).
- Roques, S., Díaz-Paniagua, C., Andreu, A.C.** (2004). Microsatellite markers reveal multiple paternity and sperm storage in the Mediterranean spur-thighed tortoise, *Testudo graeca*. *Canadian Journal of Zoology*. 82: 153-159.
- Rueda-Almonacid, J.V., Carr, J.L., Mittermeier, R.A., Rodríguez-Mahecha, J.V., Mast, R.B., Vogt, R.C., Rhodin, A.G.J., Ossa-Velásquez, J. Rueda, J.N., Mittermeier, C.G.** (2007). Las tortugas y cocodrilianos de los países andinos del trópico. Serie de guías tropicales de campo N° 5. Conservación Internacional. Editorial Panamericana, Formas e Impresos. Bogota, Colombia.
- Ruiz-Martínez, L.** (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Universidad de Barcelona
- Ruiz-Sanchez, S.L.** (1996). Estudio de nematodos parásitos de lacertidos de la provincia de Tenerife. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Sa I.V.A., Solari, C.A.** (2001). *Salmonella* in Brazilian and imported pet reptiles. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32: 293-297.
- Sabbuba, N.A., Mahenthalingam, E., Stickler, D.J.** (2003). Molecular epidemiology of *Proteus mirabilis* infections of the catheterized urinary tract. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (11): 4961-4965.
- Sacks, J.M., Pacin, M., Counts, G.W.** (1974). Sickie hemoglobinopathy and *Edwardsiella tarda* meningitis. *American Journal of Diseases of Children*. 128: 387-388.
- Saelinger, C.A., Lewbart, G.A., Christian, L.S., Lemons, C. L.** (2006). Prevalence of *Salmonella* spp in cloacal, fecal, and gastrointestinal mucosal samples from wild North American turtles. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 229:266-268.
- Sahn, P.** (1990). Pneumococcus and influenza. *The Lancet*. 335: 898-901.
- Samonis, G., Anaissie, E., Elting, L., Bodey, G.P.** (1991). Review of Citrobacter Bacteremia in Cancer Patients over a Sixteen-Year Period. *Eur Journal of Clinical Microbiology. The Journal of Infectious Diseases*. 10: 479-485.
- Sancho, V.** (2004). Mejora del hábitat de las poblaciones de galápagos europeo (*Emys orbicularis*) en la Comunidad Valenciana. Memoria de actuaciones 2003. Dirección General de Gestión del Medio Ambiente. Conselleria de Medi Ambient, Aigüa, Urbanisme i Habitatge. Generalitat Valenciana.
- Schubert, R.H.W., Pelz, E.** (1993a); The influence of treated sewage effluents on the number of *Plesiomonas shigelloides* isolated from river waters. *Hygiene and Medizin*. 18: 57-59.
- Schubert, R.H.W., Pelz, E.** (1993b). The occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in the water and mud of ponds. *Hygiene and Medizin*. 18: 148-152.
- Sechi, L.A., Deriu, A., Falchi, M.P., Fadda, G., Zanetti, S.** (2002). Distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. isolated from Sardinian waters and from patients with diarrhoea. *Journal of Applied Microbiology*. 92(2): 221-227.
- Sechter, I., Shmilovitz, M., Altmann, G.,**

- Seligmann, R., Kretzer, B., Braunstein, I., Gerichter, C.B.** (1983). *Edwardsiella tarda* isolated in Israel between 1961 and 1980. *Journal of Clinical Microbiology*. 17(4): 669–671.
- Segade, P., Crespo, C., Ayres, C., Cordero, A., Arias, M.C., García-Estévez, J.M., Blanco, R.I.** (2006). *Eimeria* species from the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Reptilia: Testudines), in Galicia (NW Spain), with description of two new species. *Journal of Parasitology*. 92 (1): 69-72.
- Sen, R.** (1962). Isolation of strains of *Providencia* group from cases with diarrhoea in Ibadam, Nigeria, West Africa. *The Indian Journal of Medical Research*. 50: 622-626. En: Albert, M.J., Alam, K., Ansaruzzaman, M., Islam, M.M., Rahman, M.H., Haider, K., Bhuiyan, N.A., Nahar, S., Ryan, N., Montanaro, J. Mathan, M.M. (1992). Pathogenesis of *Providencia alcalifaciens*-induced diarrhea. *Infection and Immunity*. 60 (12): 5017-5024.
- Seurat, L.G.** (1918) Contribución à l'étude de la faune parasitaire de la Tunisie. Nématodes. En Bouamer, S., Morand, S. (2003). Phylogeny of Palaearctic Pharyngodonidae parasite species of Testudinidae: a morphological approach. *Canadian Journal of Zoology*. 81: 1885–1893.
- Sey, O., Moravec, F.** (1986). An interesting case of hyperparasitism of the nematode *Spironoura babei* Ha Ky, 1971 (Nematoda: Kalthlaniidae). *Helminthologia*. 23: 173-177.
- Shanahan, P.M.A., Wylie, B.A., Adrian, P.V., Koornhof, H. J., Thomson, C.J., Amyes, S.G.B.** (1993). The prevalence of antimicrobial resistance in human faecal flora in South Africa. *Epidemiology and Infection*. 111: 221–228.
- Shane, S.M. Gilbert, R., Harrington, K.S.** (1990). *Salmonella* colonization in commercial pet turtles (*Pseudemys scripta elegans*). *Epidemiology and Infection* 105: 307-316.
- Sharma, V.K., Kaura, Y.K., Singh, I.P.** (1974). Frogs as carriers of *Salmonella* and *Edwardsiella*. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 40:171-175. En: Sechter, I., Shmilovitz, M., Altmann, G., Seligmann, R., Kretzer, B., Braunstein, I., Gerichter, C.B. (1983). *Edwardsiella tarda* isolated in Israel between 1961 and 1980. *Journal of Clinical Microbiology*. 17(4): 669–671.
- Siganos, D.S., Tselentis, I.G., Papatzanaki, M.E., Tsilimbaris, M.K., Pallikaris, I.G.** (1993). *Achromobacter xylosoxidans* keratitis following penetrating keratoplasty. *Refractive Corneal Surgery*. 9: 71-73.
- Silva, E., Blasco, M.** (1995). *Trachemys scripta elegans* in Southwestern Spain. *Herpetological Review* 26(3):133-134.
- Singer, J., Bar-Cahy, J.** (1954). Biochemical investigation of providence strains and their relationship to the *Proteus* group. *The Journal of Hygiene* 52:1-8. En: Albert, M.J., Alam, K., Ansaruzzaman, M., Islam, M.M., Rahman, M.H., Haider, K., Bhuiyan, N.A., Nahar, S., Ryan, N., Montanaro, J. Mathan, M.M. (1992). Pathogenesis of *Providencia alcalifaciens*-induced diarrhea. *Infection and Immunity*. 60 (12): 5017-5024.
- Siroký, P., Modrý, D.** (2006). Two new species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from Asian geoemydid turtles *Kachuga tentoria* and *Melanochelys trijuga* (Testudines: Geoemydidae). *Parasite*, 12(1): 9-13.
- Sisti, M., Albano, A., Brandi, G.** (1998). Bactericidal effect of chlorine on motile *Aeromonas* spp. in drinking water supplies and influence of temperature on disinfection efficacy. *Letters in Applied Microbiology*. 26(5): 347-351.
- Smithson, A., Perelló, R., Arenillas, L., Soriano, A.** (2004). Osteomielitis costal por *Morganella morganii*. *Anales de Medicina Interna*. 21 (9): 464.
- Soares, J.F., Chalker, V.J., Erles, K., Holtby, S., Waters, M., McArthur, S.** (2004). Prevalence of *Mycoplasma agassizii* and Chelonian herpesvirus in captive tortoises (*Testudo* sp.) in United Kingdom. *Journal of Zoo and Wildlife medicine*. 35(1): 25-33.
- Soler-Massana, J., Martínez-Silvestre, A.** (2005). *La tortuga mediterrània a Catalunya*. Ed. La Aguja (El Mèdol).
- Soler-Massana, J., Amill, I., Martínez-Silvestre, A., Barrull, J., Mate, I.** (2006). Nuevos datos de distribución para 9 especies de reptiles en la comarca del Priorat (sudeste de Cataluña). *Boletín de la Asociación de Herpetología Española*. 17 (2): 66-73.
- Soweid, A.M., Clarkston, W.K.** (1995). *Plesiomonas shigelloides*: an unusual cause of diarrhea. *The American Journal of Gastroenterology*. 90(12): 2235-2236.
- Sramová, H., Daniel, M., Absolonová, V., Dedicova, D., Jedlickova, Z., Lhotova, H., Petras P., Subertova, V.** (1992). Epidemiological role of arthropods detectable

in health facilities. *The Journal of Hospital Infection*. 20: 281–292.

- Stacy, B.A., Wellehan, J.F., Foley, A.M., Coberley, S.S., Herbst, L.H., Manire, C.A., Garner, M.M., Brookins, M.D., Childress, A.L., Jacobson, E.R.** (2008). Two herpesviruses associated with disease in wild Atlantic loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Veterinary Microbiology*. 126(1): 63–73.
- Stamm, W.E.** (1999). Urinary tract infections, p. 649–656. En: Root R.K. (ed.), *Clinical infectious diseases: a practical approach*. Oxford University Press, Inc., New York, N.Y.
- Stegemann, C., Kolobov, A., Leonova, Y.F., Knappe, D., Shamova, O., Ovchinnikova, T.V., Kokryakov, V.N., Hoffmann, R.** (2009). Isolation, purification and de novo sequencing of TBD-1, the first beta-defensin from leukocytes of reptiles. *Proteomics*. 9: 1364–1373.
- Stickler, D. J., Ganderton, L., King, J., Nettleton, J., Winters C.** (1993). *Proteus mirabilis* biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Urological Research* 21: 407–411.
- Strohl, P., Tilly, B., Frémy, S., Brisabois, A., Guérin-Faubleé, V.** (2004). Prevalence of *Salmonella* shedding in a faeces by captive chelonians. *Veterinary Record*. 10: 56–58.
- Sunyer, J.O., Lambris, J.D.** (1998). Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. *Immunological Reviews*. 166: 39–57.
- Tannock, G.W.** (1995). *Normal Microflora*. London: Chapman and Hall
- Tarabcak, T., Porazikova, T.** (1973). The occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in stools, drinking, surface and sewage water. *Folia Microbiol* 18:176. En: Jagger, T.D. (2000). *Plesiomonas shigelloides*- a veterinary perspective. *The Infectious Disease Review*. 2(4): 199–210.
- Tauxe, R.V., Rigau-Pérez, J.G., Wells, J.G., Blake, P.A.** (1985). Turtle-associated salmonellosis in Puerto Rico. Hazards of the global turtle trade. *The Journal American Medical Association*. 254: 237–239.
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L.** (2007). *Veterinary Parasitology*. 3rd.Ed. Blackwell Publishing, Oxford U.K.
- Tellez, S.** (2003). Estudio de la frecuencia de detección y caracterización de aislados de *Salmonella* spp. obtenidos de reptiles y anfibios. Tesis doctoral. Universidad Complutense Madrid.
- Temelli, S., Kahya, S., Eyigor, A., Carli, K.T.** (2010). Incidence of *Salmonella* Enteritidis in chicken layer flocks in Turkey: Results by real-time polymerase chain reaction and International Organization for Standardization culture methods. *Poultry Science*. 87(7): 1406–1410.
- Thapar, G.S.** (1925). Studies on the oxyurid parasites of reptiles. *J. Helminthol*. 3: 83–150.
- En: Bouamer, S., Morand, S. (2005). Two new species of the genus *Tachygonetria* Wedl, 1862 (Nematoda–Pharyngodonidae) and redescrptions of five species parasite of Palaearctic Testudinidae. *Zoosystema*. 27(2): 193–209.
- Thiesmeir, B., Kordges, T.** (1991). Leitlinien zur ökologischen Verbesserung städtischer Teiche Park- und Grünanlagen unter besonderer Berücksichtigung der Amphibienfauna. En: Bringsøe, H. (2006). Invasive alien species fact sheet- *Trachemys scripta*- from: Online Database of the North European and Baltic Network on invasive Alien species- NOBANIS www.nobais.org. (consultado el 11 de diciembre de 2009).
- Torfoss, D., Abrahamsen, T.G.** (2000). *Salmonella* infection from turtles. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 120: 3670–3671.
- Torres, B.A., Kominsky, S., Perrin, G.Q., Hobeika, A.C., Johnson, H.M.** (2001). Superantigens: the good, the bad, and the ugly. *Experimental Biology and Medicine*. 226: 164–176.
- Traversa, D., Capelli, G., Iorio, R., Bouamer, S., Cameli, A., Giangaspero, A.** (2005). Epidemiology and biology of nematodofauna affecting *Testudo hermanni*, *Testudo graeca* and *Testudo marginata* in Italy. *Parasitology Research*. 98: 14–20.
- Tsukamoto, T., Kinoshita, Y., Shimada, T., Sakazaki, R.** (1978). Two epidemics of diarrhoeal disease possibly caused by *Plesiomonas shigelloides*. *J Hyg Camb* 80: 275–280. En: Jagger, T.D. (2000). *Plesiomonas shigelloides*- a veterinary perspective. *The Infectious Disease Review*. 2(4): 199–210.
- Ueda, S., Yamasaki, S., Hori, M.** (1963). The isolation of paracolon C27 and pathogenic halophile organisms from an outbreak of food poisoning, *Jap J Publ Hlth* 10:67–70. En: Jagger, T.D. (2000). *Plesiomonas shigelloides*- a veterinary perspective. *The Infectious Disease*

- Review*. 2(4): 199-210.
- Uzzau, S., Brown, D.J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesús, J., Platt, D.J., Olsen, J.E.** (2000). Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology and Infection*. 125: 229-255.
- Van Damme, L.R., Vandepitte, J.** (1984). Isolation of *Edwardsiella tarda* and *Plesiomonas shigelloides* from mammals and birds in Zaire. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*. 37(2): 145- 151.
- Van der Kooj, D.** (1988). Properties of Aeromonads and their occurrence and hygienic significance in drinking water. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*. 187: 1-17.
- Vetter, H.** (2006). Hermann's Tortoise - Testudo hermanni. Edition Chimaira, Frankfurt.
- Villari P, Crispino M, Montuori P, Boccia S.** (2003). Molecular typing of *Aeromonas* isolates in natural mineral waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(1): 697-701.
- Von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H., Peters, G.** (2001). Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *New England Journal of Medicine*. 344: 11-16.
- Wallace, L.J., White, F.H., Gore, H.L.** (1966). Isolation of *Edwardsiella tarda* from a sea lion and two alligators. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 149: 881-883.
- Watanakunakorn, C., Perni, S.C.** (1994). *Proteus mirabilis* bacteremia: a review of 176 cases during 1980-1992. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 26: 361-367.
- Weber, D.J., Wolfson, J.S., Swartz, M.N., Hooper, D.C.** (1984). *Pasteurella multocida* infections. Report of 34 cases and review of the literature. *Medicine*. 63: 133-154.
- Wei, Z., Wu, Q., Ren, L., Hu, X., Guo, Y., Warr, G.W., Hammarström, L., Li, N., Zhao, Y.** (2009). Expression of IgM, IgD, and IgY in a reptile, *Anolis carolinensis*. *Journal of Immunology*. 183: 3858-3864.
- Wilson, C., Thakore, A., Isenberg, D., Ebringe A.** (1997). Correlation between anti-*Proteus* antibodies and isolation rates of *P. mirabilis* i rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*. 16:187-189.
- Williams, P., Tomás, J.M.** (1990). The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. *Reviews in Medical Microbiology*. 1: 196-204.
- Woodward, D.L., Khakhria, R., Johnson, W.N** (1997). Human salmonellosis associated with exotic pets. *Journal Clinical Microbiology*. 35: 2786-2790.
- Work, T.M., Balazs, G.H., Rameyer, R.A., Chang, S.P., Berestecky, J.** (2000). Assessing humoral and cell-mediated immune response in Hawaiian green turtles, *Chelonia mydas*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 74: 179-194.
- Wuthe, H.H., Rohde, R., Aleksić, S., Schubert, C., Wuthe, S.** (1979). *Salmonella* in free living snakes of Northern Germany. *Zentralblatt für Bakteriologie Originale A*. 243(2-3): 412-418.
- www.itis.gov** *Placobdella*, Blanchard, 1893 (consultado el 15 marzo de 2010).
- Zakhariev, Z.A.** (1971). *Plesiomonas shigelloides* isolated from sea water. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol (Prague)* 15: 402-404. En: Jagger, T.D. (2000). *Plesiomonas shigelloides*- a veterinary perspective. *The Infectious Disease Review*. 2(4): 199-210.
- Zapata, A.G., Varas, A., Torroba, M.** (1992). Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. *Immunology Today*. 13: 142-147.
- Zimmerman, L.M., Vogel, L.A., Edwards, K.A., Bowden, R.M.** (2009). Phagocytic B cells in a reptile. *Biology Letters*. doi:10.1098/rsbl.2009.0692.
- Zuffi, M.A.L., Gariboldi, A.** (1995). Geographical patterns of Italian *Emys orbicularis*. a biometrical analysis. In: G. A. Llorente, A. Montori, X. Santos & M. A. Carretero (eds), *Sci. Herpetologica*.(Bare), pp. 120-123.
- Zug, G.R.** (1993) *Herpetology*, Academic Press.

11.- COMUNICACIÓN A CONGRESOS

Is it necessary to implement more suitable methods for *Salmonella* detection from faeces samples?

Jesús Cardells^{1*}, Clara Marin¹, Juan Jiménez², José Miguel Gil³, Santiago Vega¹.

¹ Universidad CEU-Cardenal Herrera, Facultad de Veterinaria, Moncada-Valencia, Spain. *e-mail: jcardells@telefonica.net

² Conselleria de Medi ambient, Aigua, Urbanisme i Habitatge. Servicio de Conservación de la Biodiversidad. Valencia-Spain

³ Conselleria de Medi ambient, Aigua, Urbanisme i Habitatge. Centro de Recuperación de Fauna "La Granja" de El Saler-Valencia, Spain.

Introduction

Traditional methods for *Salmonella* isolation, confirmation and serotyping are too laborious and time consuming (Van de Giessen, 1996). In recent years, several advances in diagnostic technology have been developed and mean an important advance in infectious disease studies. These molecular techniques are based on the Polymerase Chain Reaction and are characterized by being simple, rapid and discriminative (Fernandez-Cuenca, 2004).

The aim

The aim of this study was to compare the method ISO 6579:2002 (Annex D) with PCR techniques.

Material and methods

During spring and summer of 2009, 69 *Testudo hermanni hermanni* tortoises samples were taken for *Salmonella* isolation. 17 tortoises were free-living tortoises and 52 were collected from rearing farms. Faeces samples were collected with sterilized swabs and after sampling, tortoises were returned to their ecological niche. All samples were analyzed according with the ISO 6579:2002 and PCR techniques.

PCR methodology. First a sample dilution 1/10 in peptone water (1.5%) was done. Then, samples were incubated to 37°C 16-20 hours.

The extraction of the genetic material was done in different steps. Firstly, a centrifugation of 1 mL of the diluted sample was done (10000rpm, 2 minutes). Then, the pellet was mixed in 100 µL from PrepMan Ultra. The culture was incubated 10 minutes to 100°C in a termobloque. Then, the incubated culture was centrifugated again (10000rpm during 2 minutes).

For the amplification of *Salmonella*, a mixture of the sample with a *Salmonella* Mix was done. The reagents were mixed in DNasas and RNasas free eppendorff. Then the mix was centrifugated 8000 rpm during 1 minute. Finally, the Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System amplified a specific fragment of *Salmonella*. The amplification cycles were 60°C during 5 minutes, 95°C during 1 minute and 45 cycles of 95°C 15 seconds and 60°C 1 minute.

Statistical analyses were performed using a commercially available statistics package (Statgraphics Plus, Version 5.1, STSC Inc., Rockville, MD, USA)

Results

Results showed that 48% of samples collected were positive for *Salmonella* isolation. With PCR procedures, 48% (S.E ± 6,0) of samples were determined positive for *Salmonella*. On the other hand, only 13% (S.E ± 4,0) of the samples analyzed according with ISO were determined positive for *Salmonella* (figure 1). **The difference between both techniques were significant (p=0,0008).**

ISO 6579:2002. First, the samples were pre-enriched in 1:10 vol/vol Buffered Peptone Water (BPW, Scharlau®, Barcelona, Spain) and then incubated at 37±1 °C for 18±2 h. The pre-enriched samples were transferred onto Semi-Solid Modification Rappaport Vassiliadis (MSRV, Difco®, Valencia, Spain) agar plate (0.1 mL) and incubated at 41.5±1 °C for 24-48 h. The culture obtained in MSRV was inoculated onto Xylose-Lysine-Desoxycholate (XLD, Liofilchem®, Valencia, Spain) and Xylose-Lysine-Tergitol-4 (XLT4, Biokar Diagnostics®, Pantin Cedex, France) and incubated at 37±1 °C for 24-48 h. After incubation, 5 colonies of *Salmonella* were streaked onto the surface of pre-dried nutrient agar plates (Scharlab®, Barcelona, Spain) 37±1 °C for 24±3 h. Then, a biochemical test API (API-20®, bioMerieux, Madrid, Spain) was done to confirm *Salmonella* spp (Figure 14). Moreover, *Salmonella* strains isolated were serotyped by the Ministry of Environment and Rural and Marine Affairs Reference Laboratory (Algete, Madrid, Spain) in accordance with Kauffman-White-Le-Minor technique. According to this technique, each strain has to be mixed with polyvalent and monovalent antisera until the antigenic formula is determined. One drop of antisera has to be mixed with the strain in circular movements. If an agglutination reaction was observed, the reaction was considered positive. If agglutination was not observed, the reaction was considered negative.

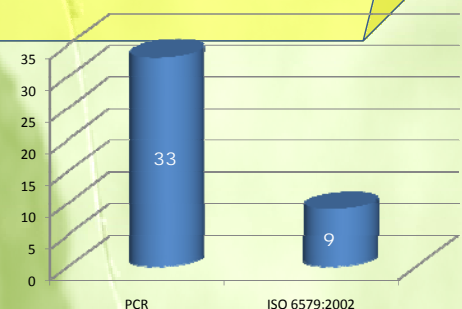


Figure 1.-number of positive tortoises *Salmonella* according to the method of diagnosis

Discussion and conclusion

The results of this preliminary study showed that PCR could detect more positive samples than the ISO method. The main problem of ISO analyses is the time necessary to determine a positive sample. Consequently, more modern, practical, cost-effective and suitable techniques for routine diagnosis should be developed to determine the status of the flocks in a short period of time and with the highest sensitivity (Heyndrickx *et al.*, 2002).

Salmonella isolation from free-living and farming tortoises in East Spain: preliminary results.



Facultad de Veterinaria

Jesús Cardells^{1*}, Clara Marin¹, Juan Jiménez², José Miguel Gil³, Santiago Vega¹.



¹ Universidad CEU-Cardenal Herrera, Facultad de Veterinaria, Moncada-Valencia, Spain. *e-mail: cardells@telefonica.net

² Conselleria de Medi ambient, Aigua, Urbanisme i Habitatge. Servicio de Conservación de la Biodiversidad. Valencia-Spain

³ Conselleria de Medi ambient, Aigua, Urbanisme i Habitatge. Centro de Recuperación de Fauna "La Granja" de El Saler-Valencia, Spain.

Introduction

Salmonella has long been recognized as an important zoonotic pathogen of economic significance in animals and humans. Turtles and other reptiles have long been recognized as source of human *Salmonella* infections (CDC, 2010). Detection of *Salmonella* in pet turtles has been the focus of extensive research, however non several studies were available regarding the *Salmonella* situation in free living turtles in East Spain.

The aim

The aim of this study was to determine the prevalence of *Salmonella* in wild and farming *Testudo hermanni hermanni* tortoises collected from East coast of Spain.

Material and methods

During spring and summer of 2009, 69 *Testudo hermanni hermanni* tortoises were caught and analyzed form *Salmonella*. 17 animals were free-living tortoises and 52 were collected from rearing farms. (figure 1) Free-living tortoises were caught in Castellón (Spain). 10 tortoises were caught in Sierra de Irta and 7 in Desierto de las Palmas (Spain) (figure 2, 3).



Figure 1.- tortoises farm.



Figure 2.- Desierto de las Palmas (Castellón-Spain)



Figure 3.- geographical situation of free-living of tortoises.

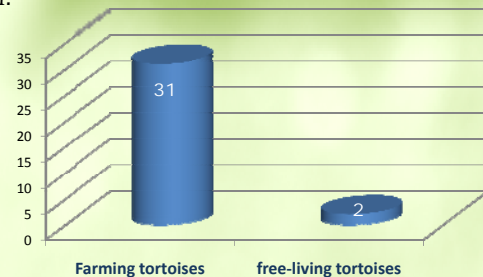
Firstly, faeces samples were collected with sterilized swabs and analyzed according with ISO 6579:2002 (figure 4). Then all tortoises were returned to their ecological niche.

Statistical analyses were performed using a commercially available statistics package (Statgraphics Plus, Version 5.1, STSC Inc., Rockville, MD, USA).

Figure 4- sewer of *Testudo hermanni hermanni*.

Results

During spring and summer of 2009, 69 *Testudo hermanni hermanni* were trapped. 52 animals were farming tortoises and 17 were free-living tortoises. Results showed that 60% (S.E \pm 6.9) of *Testudo hermanni* tortoises from farms were positive for *Salmonella*. On the other hand, 18 % (S.E \pm 9.5) of free-living *Testudo hermanni* were positive for *Salmonella* isolation.

Figure 4.- number of tortoises positive for *Salmonella*

The main serotype isolated from the tortoises was *S. Abony* (50% of cases). Moreover, *S. Salamae* was isolated in 30% of cases. Finally, *S. Kottbus* and *S. Hermannsweder* were both isolated in 10% of samples collected.

Regarding *Salmonella* resistance to antibiotics all strains isolated from free-living tortoise were resistant against most common antibiotics (ampicilin, clavuramic-acid, amikacin, cabernicillin, cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacin, cloranfenicol, enrofloxacin, gentamicine, imipenem, kanamicin, peneracilin, tetraciline and trimetoprim-sulfametoxazol)

Discussion

Pasmans *et al.* (2000) published that tortoises from european farms showed a prevalence nearly to 70% of animals trapped (Pasmans *et al.*, 2000). Our results showed that spanish farms have tortoises with a *Salmonella* prevalence around 60%. Nevertheless, the results from free-living *Testudo hermanni hermanni* were so different.

Different results were obtained in the National Park of Doñana, Huelva (Spain) where 100% of the animals analyzed were contaminated with the bacteria (Hidalgo-Vila *et al.*, 2007). Briones *et al.* (2004) showed that free-living tortoises from spanish coasts were totally negative for *Salmonella* isolation.

According with the serotypes isolated *S. Abony* was the most prevalent *Salmonella* strain isolated. This serotype was also isolated in Doñana's park, but at a lower percentage 12.5% (Hidalgo-Vila *et al.*, 2007).

Conclusion

These results are preliminary and we cannot conclude. Nevertheless, the fact that free-living tortoises from the East Spain were less contaminated with *Salmonella* than those from farms could be related with a minor contact with congeners and minor stress. More studies are necessary.

Acknowledgements

We want to give thanks to Conselleria de Medi Ambient, Aigua, Habitatge i Urbanisme for financing the project and to the CECAV for his help in the diagnosis.

References

- Briones, V., Téllez, S., Goyache, J., Ballesteros, C., Lanzarot, M. P., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J. (2004). *Salmonella* diversity associated with wild reptiles and amphibians in Spain. *Environmental Microbiology*. 6: 868-871
- CDC (2010). Centers for Disease Control and Prevention. MMWR, Morbidity and Mortality Weekly Report. 59(7): 185-199.
- Hidalgo-Vila, J., Díaz-Paniagua, C., De Frutos-Escobar, C., Jiménez-Martínez, C., Pérez-Santigosa, N. (2007) *Salmonella* in free living terrestrial and aquatic turtles. *Veterinary Microbiology*. 119: 311-315.
- ISO 6579:2002 (Annex D). 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization. Genève, Switzerland.
- Pasmans, F., De Herdt, P., Chasseur-Libotte, M. L., Ballasina, D.L., Haesebrouck, F. (2000) Occurrence of *Salmonella* in tortoises in a rescue centre in Italy. *Veterinary Record*. 146: 256-258.