Artículos

Microbiología de tortugas amarillas (*Caretta caretta*) del Golfo de Ulloa, Baja California Sur, México

Eduardo Reséndiz [1,2,3,*], Helena Fernández Sanz[2,3,4], Dulce Sofía Barrientos Torres[2,3,4], María Mónica Lara Uc[1,2,3] & Juan Manuel López Vivas[1,5]

Resumen

Existen reportes de aislamientos de diversos géneros y especies bacterianas en tortugas marinas que han sido identificadas como oportunistas y como potencialmente patógenas para las tortugas y para los humanos. *El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de agentes infecciosos, potencialmente patógenos y zoonóticos mediante estudios microbiológicos en tortugas Caretta caretta en el Golfo de Ulloa y realizar antibiogramas probando cuatro fármacos para conocer su eficacia clínica. Durante los meses de septiembre a diciembre de 2016 se capturaron 56 ejemplares, se realizó un examen físico específico y raspados orales, en lesiones corporales y cloaca con hisopos estériles. En laboratorio, las muestras fueron procesadas e identificadas; se realizaron antibiogramas con la técnica "disco-placa" con Ceftriaxona, Ceftazidima, Amikacina y Gentamicina. En total, se obtuvieron 77 aislamientos de enterobacterias gram negativas de 10 géneros distintos. Los géneros aislados más abundantes fueron Citrobacter freundii en la boca de las tortugas, Enterobacter spp. y Proteus mirabilis en las aletas anteriores y en la cloaca. Todos los géneros bacterianos fueron sensibles a Ceftriaxona, Ceftazidima, Amikacina y Gentamicina, excepto Burkholderia cepacea, Stenotrophomonas mailophilia y Vibrio fluvialis. Estos últimos fueron resistentes a Ceftriaxona, Ceftazidima y sensibles a Amikacina y Gentamicina. La Amikacina y Gentamicina mostraron la mayor eficacia clí-*

Abstract

Isolation reports have identified different bacterial genuses and species in marine turtles as opportunistic and potentially pathogenic for turtles and humans. *The objective of this study was to determine the presence of infectious, potentially pathogenic and zoonotic agents through microbiological studies in Caretta caretta in the Gulf of Ulloa and to test four different antibiotics to determine their clinical efficacy. From September to December 2016, 56 C. caretta were captured by hand in the Gulf of Ulloa; the turtles were physically examined, and scrapings of the oral cavity, skin lesions and cloacae were made with sterile swabs. The samples were processed and identified in a laboratory, then antibiograms were made with the "disc-plate" technique for Ceftriaxone, Ceftazidime, Amikacin and Gentamicin. A total of 77 isolations of gram-negative enterobacteria were obtained from 10 different genuses. The most abundant isolations were Citrobacter freundii in the oral cavity, Enterobacer spp. and Proteus mirabilis in the anterior flippers and Proteus mirabilis in the cloacae. All the genuses were sensitive to Ceftriaxone, Ceftazidime, Amikacin and Gentamicin, except Burkholderia cepacea, Stenotrophomonas mailophilia and Vibrio fluvialis. These three were resistant to Ceftriaxone and Ceftazidime, and sensitive to Amikacin and Gentamicin. Amikacin and Gentamicin showed the highest clinical and therapeutic efficacy, so we propose using them as treatment in clinical cases*

[1] *Departamento Académico de Ciencias Marinas y Costeras, Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS). Carretera al Sur Km 5.5., Apartado Postal 19-B, C.P. 23080, La Paz B.C.S. México*

[2] *Proyecto Salud de Tortugas Marinas – UABCS, Edif. CMT-24, Carretera al Sur Km 5.5., Apartado Postal 19-B, C.P. 23080, La Paz B.C.S. México*

[3] *Alianza Keloni A.C. Antonio Rosales 698, col. Centro, C.P. 23000, La Paz B.C.S. México*

[4] *Posgrado en Ciencias Marinas y Costeras (CIMACO) UABCS, Carretera al Sur Km 5.5., Apartado Postal 19-B, C.P. 23080, La Paz B.C.S. México*

[5] *Laboratorio de Botánica marina – UABCS, Edif. CMT-24, Carretera al Sur Km 5.5., Apartado Postal 19-B, C.P. 23080, La Paz B.C.S. México*

* **Autor de correspondencia:** *jresendiz@uabcs.mx (ER)*

nica y terapéutica, por lo que se propone su uso como tratamiento en casos clínicos asociados a estos géneros bacterianos. El conocimiento de la microbiota de animales silvestres es imperativo para entender los riesgos potenciales zoonóticos y antropozoonóticos.

Palabras clave: Antibiograma, antibiótico, bacteriología, eficiencia clínica, microbiota, tortugas marinas, zoonosis.

Recibido: 13 de mayo de 2019

associated to these bacterial genuses. Obtaining knowledge of wild animal microbiota is necessary to understand the potential zoonotic and anthropozoonotic risks.

Key words: Antibiogram, antibiotic, bacteriology, clinical efficacy, microbiota, marine turtles, zoonosis.

Aceptado: 13 de junio de 2019

Introducción

Las tortugas marinas son organismos altamente migratorios que ocupan nichos con diferentes ambientes y regiones geográficas durante cada una de las etapas de su ciclo de vida. Debido a su comportamiento migratorio, estos organismos pueden ser susceptibles a amenazas propias de su ambiente y de tipo antropogénico en aguas abiertas y ambientes costeros (Bolten 2003) que pueden causarles lesiones, ocasionar enfermedades y en casos graves la muerte (Reséndiz *et al*. 2018). Cinco de las siete especies de tortugas marinas visitan las aguas marinas y lagunas costeras de la península de Baja California, lo que confiere a esta región un importante valor desde el punto de vista biológico, ecológico y económico. Particularmente, en el Golfo de Ulloa (GU), cuyas características oceanográficas y climatológicas proporcionan un hábitat con una alta riqueza y productividad biológica (Lluch-Belda 2000), es posible encontrar tortugas negras (*Chelonia mydas*), tortugas laúd (*Dermochelys coriacea*), tortugas golfinas (*Lepidochelys olivacea*), tortugas carey (*Eretmochelys imbricata*) y tortugas amarillas (*Caretta caretta*) en sus etapas juvenil y adulto (Reséndiz & Lara-Uc 2017), además de ser un sitio importante para la alimentación de *C. caretta*, que se alimenta principalmente de peces (*Prionotus* spp., *Diplectrum* spp. y *Synodus* spp.) y crustáceos (*Pleuroncodes planipes*, *Platimera gaudichaudii* y *Hemisquilla ensiguera*) en la zona (Peckam *et al*. 2011).

Durante las últimas décadas, las actividades antropogénicas han impactado los océanos de todo el mundo, fragmentando ecosistemas y ocasionando el declive de poblaciones de especies vegetales y animales (Aguirre & Lutz 2004). Sumado a esto, los diversos agentes zoonóticos presentes en el medio marino se han extendido, pudiendo afectar a los organismos de los diferentes ecosistemas. A nivel internacional, en tortugas marinas existen reportes de aislamientos de géneros y especies bacterianas, incluyendo *Salmonella*, *Mycobacterium*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii, Edwarsiella* spp., *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnisii, Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas* o *Plesiomonas*, *Morganella* o *Proteus*, entre otras, que han sido identificadas como oportunistas y como potencialmente patógenas para las tortugas y los humanos (Raidal *et al*. 1998, O'grady & Krause 1999, Orós *et al*. 2005, Lu *et al*. 2006, Zavala-Norzagaray *et al*. 2015). De esta forma, el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de agentes infecciosos y potencialmente patógenos y zoonóticos mediante estudios microbiológicos en tortugas *C. caretta* en el GU y realizar antibiogramas probando cuatro fármacos para conocer su eficacia clínica.

Material y métodos

El GU se ubica en la costa Pacífica de Baja California Sur y comprende desde el sur de Punta Abreojos hasta Cabo San Lázaro (Funes-Rodríguez *et al*. 2000). En esta área y durante los meses de septiembre a diciembre de 2016, se capturaron a mano (Rodeo) especímenes de *C. caretta* modificando la técnica propuesta por Limpus (1978). A cada ejemplar se le realizó un

examen físico específico de acuerdo a la metodología de Reséndiz *et al*. (2018). En seguida, se hicieron raspados con hisopos estériles con medio de cultivo Stuart gel COPAN®, con movimientos circulares y girando el hisopo en la superficie interior de la boca, lesiones corporales observadas y superficie interna de la cloaca. Posteriormente, siguiendo la metodología de Bolten (2000), se registró el largo curvo del caparazón (LCC) de los organismos con una cinta métrica flexible. Las tortugas se clasificaron por clase de edad de acuerdo a la propuesta de Peckham *et al.* (2008) y por sexo de acuerdo a los criterios de dimorfismo sexual indicados por Wyneken (2001). Acto seguido, se pesaron con una balanza de 100 kg y se liberaron.

Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4ºC y se remitieron al laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), donde fueron procesadas con el kit BD sistemas BBL crystal de identificación de patógenos entéricos/no fermentantes BD Bioxon®. A continuación, se realizaron antibiogramas con la técnica "disco-placa", siguiendo la metodología de Bauer *et al*. (1966), de la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS por sus siglas en ingles; 2000) y el Clinical and Laboratory Standards Institute (CSLI por sus siglas en Ingles; 2011). Se inocularon los microorganismos en agar MacConkey dentro de placas petri, en las que se depositaron discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Transcurridas 18-24 horas de incubación, los discos presentaron una zona de inhibición a su alrededor (Cantón 2010). Para cuantificar la concentración mínima inhibitoria (CMI), se contrastó previamente el sistema disco-placa con cientos de cepas de CMI conocidas previamente, determinadas por el método de sensibilidad a los antimicrobianos. Posteriormente, se midió el diámetro de la zona de inhibición de cada una de las cepas y se graficó frente a la CMI, obteniendo la línea de regresión (Cornaglia *et al*. 2004, Cantón 2010). La lectura de inhibición se interpretó según las categorías establecidas por la NCCLS (2000) y se clasificaron en: Sensible, Intermedia y Resistente. Para los antibiogramas, los antibióticos seleccionados fueron Ceftriaxona (30 µg), Ceftazidima (30 µg), Amikacina (10 µg) y Gentamicina (10 µg) (Mensura 2000) por su mecanismo de acción para tratar infecciones ocasionadas por bacterias en piel, tracto respiratorio, tracto digestivo y reproductor, así como por su uso común en tratamientos de tortugas marinas enfermas (Wyneken *et al*. 2006).

Resultados

Un total de 56 ejemplares de *C. caretta* fueron capturadas, con un promedio 63.49 ± 8.06 cm de LCC y 36.14 ± 22.14 kg de peso. Dichos ejemplares fueron clasificados como juveniles y agrupados en 32 hembras, 18 indefinidos y 6 machos (Tabla I). El examen físico no mostró evidencia de signos clínicos, lesiones graves o enfermedades que comprometieran la función de los órganos y sistemas de las tortugas; no obstante, cuatro tortugas mostraron lesiones leves producidas por balanos incrustantes en la parte frontal de las aletas anteriores (3 tortugas en aleta anterior derecha y 1 en aleta anterior izquierda). Estas lesiones se consideraron leves de acuerdo a la evaluación específica debido a que no comprometían su función ni estructura, no ponían en riesgo las actividades normales de los organismos ni amenazaban su integridad.

Un total de 77 aislamientos fueron obtenidos y asociados a enterobacterias gram negativas de 10 géneros distintos (Tabla II). Los géneros y especies aislados más abundantes fueron *Citrobacter freundii* en la cavidad oral, *Enterobacter* spp. y *Proteus mirabilis* en las aletas anteriores y también en la cavidad cloacal. En la Tabla II, se presenta la abundancia de los géneros bacterianos aislados en orden anatómico (craneal – caudal).

Antibiogramas

Todos los géneros y especies bacterianas fueron sensibles a Ceftriaxona, Ceftazidima, Amikacina y Gentamicina excepto *Burkholderia cepacea*, *Stenotrophomonas mailophilia* y *Vibrio fluvialis*. Estos últimos fueron resistentes

Tabla I. Morfometría de los especímenes de *Caretta caretta* capturados en el Golfo de Ulloa, México (n=56).

Tortugas amarillas (*Caretta caretta*)			
Variable	Media	Desviación estándar	Min-Max
LCC (cm)	63.49	8.06	46.00 – 80.70
Peso (kg)	36.14	22.51	12.00 – 110
Sexo	32 (Hembras)	18 (Indefinidos)	6 (Machos)

Min: valor mínimo; Max: valor máximo; LCC: largo curvo del caparazón.

Tabla II. Géneros y especies bacterianas aislados de boca, lesiones corporales y cloaca de los especímenes de *Caretta caretta* capturados en el Golfo de Ulloa, México (n=56).

Género	**No. de aislamientos**	**Zona anatómica**	**Total de aislamientos**	**%**
Citrobacter freundii	10	Boca		17.85
	2	Lesión de aletas		3.57
	6	Cloaca	18	10.71
Kleibsiella spp.	9	Boca		16.07
	2	Lesión de aletas	11	3.57
Enterobacer spp.	6	Boca		10.71
	3	Lesión de aletas	9	5.35
Pseudomonas aeruginosa	5	Boca		8.92
	5	Cloaca	10	8.92
Proteus mirabilis	3	Lesión de aletas		5.35
	9	Cloaca	12	16.07
Proteus vulgaris	4	Cloaca	4	7.14
Proteus rettgeri	5	Cloaca	5	8.92
Burkholderia cepacea	1	Boca		1.78
	4	Cloaca	5	7.14
Stenotrophomonas mailophilia	1	Boca	1	1.78
Vibrio fluvialis	2	Cloaca	2	3.57

a Ceftriaxona, Ceftazidima y sensibles a Amikacina y Gentamicina (Tabla III).

Discusión

La especie bacteriana más abundante observada en la boca de las tortugas fue *C. freundii*, representando el 17.85% en la boca, el 3.57% en las aletas anteriores y el 10.71% en la cloaca. Esta bacteria gram negativa anaeróbica móvil ha sido reportada previamente en tortugas marinas a nivel internacional (Glazebrook & Campbell 1990a, Santoro *et al*. 2006) y en México, se reportó en *C. mydas* (Zavala-Norzagaray *et al*. 2015) en una zona cercana a la del presente estudio. Esta especie es considerada un patógeno oportunista asociado a infecciones en animales juveniles y a infecciones secundarias en animales inmunocomprometidos (Lauckner 1985). No se conoce la dosis infecciosa ni su periodo de incubación; no obstante, diversos autores indican que su transmisión es vía fecal-oral por ingesta de alimento contaminado o bien por contacto directo entre organismos portadores y susceptibles (Johnson-Delaney 1996). Utiliza como reservorio el agua (dulce o salobre) y aguas residuales; también se encuentra en el tracto intestinal de los animales y puede sobrevivir durante unas horas en superficies secas (Glazebrook & Campbell 1990b). Esta bacteria no es zoonótica (Johnson-Delaney 1996) y su resistencia a los antimicrobianos es cada vez más generalizada (Turnidge *et al*. 2006).

Kleibsiella spp. fue aislada de la boca y de las aletas anteriores de las tortugas, representando el 16.07% y el 3.57% respectivamente. Este patógeno también ha sido reportado en tortugas marinas a nivel internacional (Glazebrook *et al.* 1993) y en México no se conocen reportes previos en tortugas marinas. Pertenece a la familia Enterobacteriaceae gram negativas y desempeña un importante papel como causa de enfermedades infecciosas oportunistas principalmente en organismos con alteraciones de las defensas orgánicas y frecuentemente en animales juveniles (Warwick *et al*. 2013). Ha sido asociada a bacteriemias, sepsis, infecciones en heridas, e infecciones respiratorias y urinarias; aunque no se conoce la dosis infecciosa ni su periodo de incubación, se ha descrito que su modo de transmisión más frecuente es por medio de las heces (Vatopolous 2008, Nordmann *et al.* 2009). Se puede aislar del suelo, agua (dulce o salobre), piel, exudados nasofaringeos y tracto intestinal de animales portadores (Jacobson

Tabla III. Interpretación de los antibiogramas de aislamientos bacterianos de *Caretta caretta*.

		Ceftriaxona					Ceftazidima				
		PC					PC				
Especies	**n**	**CD**	**DI**	**CMI**	**Intervalo**	**Resultado**	**CD**	**DI**	**CMI**	**Intervalo**	**Resultado**
C. freundii	18	30	≥ 21	≤8	29-35	Sensible	30	≥ 18	≤8	25-32	Sensible
Kleibsiella spp.	11	30	≥ 15	≤4	19-26	Sensible	30	≥ 18	≤8	23-29	Sensible
Enterobacer spp.	9	30	≥ 8	≤8	29-35	Sensible	30	≥ 18	≤8	25-32	Sensible
P. aeruginosa	10	30	≥ 21	≤8	17-23	Sensible	30	≥ 18	≤8	22-29	Sensible
P. mirabilis	11	30	≥ 15	≤4	16-21	Sensible	30	≥ 18	≤8	24-30	Sensible
P. vulgaris	4	30	≥ 18	≤8	22-29	Sensible	30	≥ 22	≤8	23-29	Sensible
P. rettgeri	5	30	≥ 18	≤8	-	Sensible	30	≥ 23	≤8	18-22	Sensible
B. cepacea	1	30	≤ 13	≥64	29-35	Resistente	30	≤ 14	≥32	25-32	Resistente
S. mailophilia	1	30	≤ 15	≥32	28-36	Resistente	30	≤ 13	≥25	17-25	Resistente
V. fluvialis	2	30	≤ 14	≥32	23-29	Resistente	30	≤ 12	≥32	21-27	Resistente

PC: punto de corte equivalente a la CMI; CD: carga del disco (µg); DI: diámetro del halo de inhibición (mm); CMI: concentración mínima inhibitoria (mg/ml).

Tabla III. Interpretación de los antibiogramas de aislamientos bacterianos de *Caretta caretta* (Continuación).

		Amikacina					Gentamicina				
		PC					PC				
Especies	n	CD	DI	CMI	Intervalo	Resultado	CD	DI	CMI	Intervalo	Resultado
C. freundii	18	30	≥ 17	≤16	18-26	Sensible	30	≥ 14	≤8	22-29	Sensible
Kleibsiella spp.	11	30	≥ 19	≤4	24-30	Sensible	30	≥ 15	≤4	19-27	Sensible
Enterobacer spp.	9	30	≥ 17	≤16	19-26	Sensible	30	≥ 15	≤4	16-21	Sensible
P. aeruginosa	10	30	≥17	≤ 16	18-26	Sensible	30	≥15	≤ 4	16-21	Sensible
P. mirabilis	11	30	≥17	≤ 16	18-26	Sensible	30	≥15	≤ 4	19-26	Sensible
P. vulgaris	4	30	≥17	≤ 16	18-22	Sensible	30	≥15	≤ 4	16-23	Sensible
P. rettgeri	5	30	≥17	≤ 16	18-24	Sensible	30	≥ 15	≤4	19-27	Sensible
B. cepacea	1	30	≥18	≤ 17	19-27	Sensible	30	≥ 15	≤4	21-26	Sensible
S. mailophilia	1	30	≥19	≤ 18	20-25	Sensible	30	≥ 15	≤4	20-27	Sensible
V. fluvialis	2	30	≥18	≤ 17	20-26	Sensible	30	≥ 15	≤4	19-25	Sensible

PC: punto de corte equivalente a la CMI; CD: carga del disco (µg); DI: diámetro del halo de inhibición (mm); CMI: concentración mínima inhibitoria (mg/ml).

2007, Tan *et al*. 2009). No es zoonótica y no se conocen vectores (Nordmann *et al*. 2009). Este género muestra susceptibilidad a los aminoglucósidos y cefalosporinas y es resistente a la ampicilina y quinolonas (Shah & Stille 1983); puede sobrevivir en ambientes marinos hasta por 4 h o bien en animales clínicamente sanos por periodos prolongados (Jacobson 2007).

Enterobacer spp. fue aislado de la boca y de las aletas anteriores, y representó el 10.71% y 5.35% respectivamente. Esta enterobacteria gram negativa se reportó en tortugas marinas a nivel internacional por Glazebrook *et al*. (1993) y Work *et al.* (2003), considerándose un patógeno oportunista que ha sido asociado con brotes infecciosos como fibropapilomatosis (FP) en tortugas juveniles (Work *et al.* 2003). Puede causar numerosas infecciones, entre ellas, neumonía, septicemia en heridas, en tracto intestinal y en tracto urinario, pudiendo desencadenar en bacteriemias (Work *et al*. 2003, Buller 2004). No se conoce su periodo de incubación, ni la dosis infecciosa. Su transmisión es por contacto directo o indirecto de las superficies de la mucosa con un agente infeccioso y también pueden diseminarse por la vía fecal-oral (Johnson-Delaney 1996). Esta bacteria, es principalmente colonizadora del tracto gastrointestinal inferior de humanos y animales (Orós *et al.* 2004). También se puede encontrar en plantas, suelo, agua (dulce o salobre) y aguas residuales, y es capaz de sobrevivir con una fuente de energía mínima (Buller 2004). No es considerada zoonótica ni se conoce ningún vector de trasmisión (Glazebrook & Campbell 1990b, Warwick *et al*. 2013). Es susceptible a los aminoglucósidos y fluoroquinolonas y muestra resistencia a algunos antibióticos de primera y segunda generación (Jorgensen & Ferraro 2009).

Pseudomona aeruginosa se aisló de la boca y cloaca de las tortugas y representó el 8.92% en ambos casos. Estos bacilos gram negativos pertenecen a la familia Pseudomonadaceae (Jacobson 2007) y han sido estudiados en tortugas marinas a nivel internacional por Work *et al.* (2003) y Santoro *et al*. (2006), entre otros. Son patógenos oportunistas que sugieren mayor riesgo de enfermedad en tortugas juveniles, inmunocomprometidas y con FP (Work *et al.* 2003); la mayoría de sus afecciones surgen de la colonización en las vías respiratorias y urinarias o debido a infecciones de diseminación profunda que pueden conducir a neumonía, bacteriemia e infecciones respiratorias crónicas (Work *et al.* 2003, Orós *et al.* 2004). Utilizan como hospederos a los humanos, animales y plantas; la dosis infecciosa es desconocida y su periodo de incubación varía de acuerdo a la infección (Orós *et al*. 2004, Buller 2004). Su modo de transmisión es por contacto directo con agua contaminada, aerosoles o aspiraciones por contacto de membranas mucosas con

descargas de conjuntivas infectadas o tracto respiratorio superior de organismos infectados, incluso puede transmitirse durante el curso de una infección activa. Son saprófitos, no son considerados zoonóticos y no tienen vectores de trasmisión (Lauckner 1985, Glazebrook & Campbell 1990b). Son susceptibles a las penicilinas y aminoglucósidos principalmente, no obstante, las cepas resistentes a múltiples fármacos aumentan pudiendo además sobrevivir durante varios meses en el medio marino con un mínimo de nutrientes (Jorgensen & Ferraro 2009).

Pseudomona mirabilis se aisló de aletas y cloaca representando el 5.35% y el 16.07% respectivamente, mientras que *P. vulgaris* (7.14%) y *P. retgeri* (8.92%) solo se encontraron en la cloaca de los organismos. Estos bacilos gram negativos aeróbicos han sido reportados también en otras especies de tortugas marinas sanas y enfermas a nivel internacional (Glazebrook & Campbell 1990a, Santoro *et al.* 2006) y en tortugas verdes del Pacífico Oriental aparentemente sanas (Zavala-Norzagaray *et al*. 2015). Son considerados parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal de los animales; no obstante, pueden generar infecciones crónicas del tracto urinario tales como bacteriemias, neumonía y lesiones focales en organismos debilitados y emaciados (Lauckner 1985). Utilizan como hospedero a los humanos y animales; se desconoce la dosis infecciosa y su periodo de incubación no está bien establecido (Hoff *et al*. 1984), aunque se sabe que produce infecciones después de dejar su hábitat normal en el tracto gastrointestinal (Orós *et al*. 2004). Es importante señalar que no se transmite por contacto directo entre organismos y que se puede encontrar en el suelo, agua (dulce o salobre) y aguas residuales (Jacobson 2007). No son considerados zoonóticos y no se conocen vectores de trasmisión. Sobreviven con facilidad fuera del huésped, especialmente en áreas donde la proteína animal se está descomponiendo (Buller 2004, Jacobson 2007). Muestran sensibilidad a concentraciones muy altas de penicilina y a los aminoglucósidos principalmente (Jorgensen & Ferraro 2009).

Burkholderia cepacea obtenida de boca y cloaca representaron el 1.78% y el 7.14% respectivamente. Este género gram negativo aeróbico se reportó previamente en tortugas marinas con y sin FP por Work *et al.* (2003) y Santoro *et al*. (2006) respectivamente y aunque se considera controlado puede aparecer en tres formas: 1) una forma pulmonar crónica con descarga mucopurulenta; 2) una forma caracterizada por múltiples abscesos en la piel, tejidos subcutáneos y linfáticos; y 3) una forma septicémica aguda con muerte en 7-10 días (Orós *et al.* 2004, Jacobson 2007). Se ha reportado también en animales mamíferos, peces y humanos, considerando estos últimos como huéspedes accidentales (Hoff *et al*. 1984, Buller 2004). Se desconoce la dosis infecciosa y su periodo de incubación va de 1 a 14 días; su modo de transmisión es por contacto directo con secreciones nasales contaminada e inhalación de aerosoles (Johnson-Delaney 1996). Se pueden encontrar en suelo, agua (dulce o salobre) y zonas cercanas a actividades de granja con desechos de animales domésticos en producción, en donde puede sobrevivir hasta por 30 días a temperatura ambiente (Buller 2004, Jacobson 2007). Es considerada zoonótica por contacto directo o indirecto de la membrana mucosa con descargas de lesiones de animales infectados (Johnson-Delaney 1996, Warwick *et al.* 2013). Es sensible a los betalactámicos y resistente a las tetraciclinas (Jorgensen & Ferraro 2009).

Respecto al aislamiento de *S. mailophilia* en la boca de una tortuga (1.78%), este bacilo gram negativo aeróbico ya ha sido reportado en tortugas marinas previamente (Work *et al*. 2003). Es considerado un patógeno oportunista de baja patogenicidad con mayor riesgo de generar enfermedad en organismos inmunocomprometidos por colonización de patógenos en vías respiratorias y urinarias (Work *et al*. 2003; Jacobson 2007), y en casos de infecciones de diseminación profunda que en casos graves conducen a neumonía y bacteriemia (Work *et al*. 2003, Warwick *et al*. 2013). Se ha reportado en humanos, animales mamíferos y plantas, no se conoce la dosis infecciosa y su periodo de incubación es variable de 1 a 3 días. Se transmite por contacto directo con

agua contaminada, aerosoles o aspiraciones, por contacto de membranas mucosas con descargas infectadas o tracto respiratorio superior de organismos infectados (Warwick *et al*. 2013); es importante señalar que puede transmitirse durante el curso de una infección activa como FP (Work *et al*. 2003, Orós *et al*. 2004). Se puede encontrar en el suelo, agua (dulce o salobre), materia en descomposición, animales y humanos infectados y prospera en condiciones húmedas. No es considerado zoonótico y no se conocen vectores de trasmisión (Jacobson 2007). Es susceptible a las penicilinas y aminoglucósidos principalmente y las cepas han creado resistencia a múltiples fármacos (Jorgensen & Ferraro 2009). Sobrevive durante varios meses en agua y el medio marino con un mínimo de nutrientes, puesto que es su hábitat natural (Buller 2004).

Finalmente, los dos aislamientos de *V. fluvialis* obtenidos de la cloaca de dos tortugas, representaron el 3.57%. Este bacilo gram negativo (Lee *et al*. 1981) se encuentra ampliamente distribuido en el medio acuático, principalmente en estuarios y aguas salobres; algunos reportes señalan que también ha sido aislado de aguas residuales, heces de animales y de humanos y productos del mar, principalmente en moluscos bivalvos (Alton *et al*. 2006, Igbinosa & Okoh 2010, Franco-Monsreal *et al.* 2014). Ha sido reportado en tortugas marinas enfermas y sanas a nivel internacional y nacional (Zavala-Norzagaray *et al*. 2015) y es considerado un patógeno emergente transmitido por la ingesta de alimentos contaminados (Ahsan *et al*. 1988, Alton *et al*. 2006, Franco-Monsreal *et al.* 2014). En reptiles se desconocen todas sus consecuencias, pero en mamíferos es causante de diarrea tipo cólera, infecciones de piel asociadas a la exposición a ambientes acuáticos e incluso septicemia en individuos inmunocomprometidos (Ahsan *et al.* 1988, Alton *et al.* 2006). No se conoce su periodo de incubación ni la dosis infecciosa, pero se sabe que es zoonótico (Johnson-Delaney 1996) y que puede sobrevivir por largos periodos de tiempo en el medio marino (Igbinosa & Okoh 2010, Franco-Monsreal *et al.* 2014). Muestra resistencia a las penicilinas y betalactámicos principalmente (Ahsan *et al.* 1988).

Antibiogramas

Los antibiogramas permitieron evaluar la respuesta de los microorganismos aislados frente a los cuatro antibióticos (Ceftriaxona, Ceftazidima, Amikacina y Gentamicina) comúnmente usados en tratamientos de tortugas marinas enfermas o lesionadas en cautiverio o rehabilitación (Norton 2005, Wyneken *et al*. 2006). Además, para el caso de la Amikacina y Gentamicina permitió traducir en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de eficacia clínica. Estas pruebas de sensibilidad basadas en la difusión o en el cálculo de la CMI permiten identificar múltiples variables que pueden afectar a los resultados obtenidos, y permite establecer normas sobre las condiciones en las que deben realizarse los antibiogramas con el objetivo de asegurar su reproducibilidad (ECAST 2010).

Los resultados obtenidos de los antibiogramas hacen referencia al análisis de los géneros bacterianos aislados en función de los valores de la CMI de los antimicrobianos, su relación con los mecanismos de resistencia, la farmacocinética y la farmacodinamia del antimicrobiano, en particular en el compartimento sérico, y la correlación entre el valor de la CMI y el posible éxito o fracaso terapéutico (MENSURA 2000, Ferraro 2001). Los resultados permitieron definir los puntos de corte y diferenciar las categorías clínicas de los tratamientos (en 7 de 10 géneros de microorganismos Sensibles para Ceftriaxona, Ceftazidima, y 3 Resistentes) además de confirmar la eficiencia clínica y definir el éxito terapéutico para Amikacina y Gentamicina (10 géneros de microorganismos Sensibles) para juveniles de *C. caretta*.

Los puntos de corte y los valores CMI están reportados a nivel internacional para los diferentes fármacos y microorganismos (Ferraro 2001, Turnidge *et al*. 2006, ECAST 2010); en estos casos, los valores obtenidos para sensibilidad y resistencia de los 10 géneros bacterianos aislados con respecto a Ceftriaxona, Ceftazidima Amikacina y Gentamicina, coinciden contundentemente y se encuentran dentro de los valores de referencia propuestos por la MENSURA (2000), Kahlmeter

et al. (2003), Jorgensen & Ferraro (2009) y la ECAST (2010). La lectura del antibiograma no debe confundirse con la interpretación de los resultados de las pruebas de sensibilidad. Este último, consiste en la categorización clínica de los resultados, es decir, en la traducción por medio de los puntos de corte clínicos, los halos de inhibición o los valores de CMI en las categorías clínicas Sensible, Intermedio o Resistente (Cornaglia *et al*. 2004). Por el contrario, la lectura interpretada realiza un análisis fenotípico de los resultados de las pruebas de sensibilidad y se fundamenta en el conocimiento de los mecanismos de resistencia y en su expresión fenotípica contra los 4 antibioticos usados. De esta forma, se determina el posible fracaso o éxito terapéutico derivado del uso de los antimicrobianos cuando se expresan estos mecanismos de resistencia en las bacterias estudiadas en los antibiogramas (Courvalin 1992, Livermore *et al.* 2001, Cantón 2010), además de complementar la categorización clínica. Es importante señalar que durante el proceso de lectura del antibiograma, puede inferirse la sensibilidad de antibióticos no incluidos en el mismo. Esta práctica atiende esencialmente a la posible resistencia de clase, como es el caso de la resistencia a los betalactamicos o aminoglucósidos, por ejemplo (Chambers *et al*. 1990, Davidson *et al.* 2002, Page 2006). La información microbiológica generada con el antibiograma en este estudio, facilita la posibilidad de establecer la epidemiología con independencia de la propia caracterización fenotípica de los mecanismos de resistencia (Cornnaglia *et al.* 2004). Esto, redunda en una correcta utilización dirigida y empírica de los antimicrobianos, lo que puede derivar en un mejor control de la resistencia, trascendiendo incluso a un valor microbilógico de salud pública (Baquero *et al*. 2010).

Antibióticos

De los 10 géneros bacterianos, 7 presentaron sensibilidad a Ceftriaxona y Ceftazidima, ambos bactericidas de amplio espectro y con acción prolongada. La sensibilidad presentada se debe al mecanismo de acción de los fármacos, el cual trata de inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana (Krützfeldt & González 2000, Durán 2006). Estos fármacos son utilizados normalmente en bacteremias, sepsis, meningitis, peritonitis e infecciónes biliares, gastrointestinales y óseas. Su uso también es común en lesiones e infecciones articulares, de piel y de tejidos blandos, clasificadas como leves o complicadas (Durán 2006), en tratamientos de heridas superficiales e internas, así como en procedimientos de infecciones urinarias y genitales, respiratorias, casos de neumonía, infecciones con mecanismo defensivo disminuido y profilaxis perioperatorias (Sumano & Ocampo 2006), principalmente en tortugas en cautiverio o en centros de atención y rehabilitación (Norton 2005). *B. cepacea, S. mailophilia* y *V. fluvialis* presentaron resistencia a Ceftriaxona y Ceftazidima; ésta, se conoce como "farmacorresitencia" y puede deberse a diversos factores tales como: 1) La selección natural a través de mutaciones en un gen cromosómico producidas al azar (Sumano & Ocampo 2006). En esta resistencia mutacional o cromosómica el fenotipo resistente puede atribuirse a mutaciones en varios componentes de la célula; al entrar en contacto con una población bacteriana, el antibiótico permite solo la proliferación de las bacterias que presentan la mutación natural que anula la acción del antibiótico (Jacobson 2000). Este factor se conoce como la formación de un blanco alterado; de manera específica, las bacterias utilizan un blanco para cambiar su estructura y función, por ejemplo el caso de la mutación de enzimas para incorporar análogos estructurales del ácido aminobenzoico (PABA), o bien, la mutación de una proteína ribosomal (Sumano & Ocampo 2006); 2) Disminución del acceso al blanco por la alteración de permeabilidad de la membrana externa o interna de la bacteria. Ésta, puede deberse a la pérdida de proteínas esenciales para el transporte transmembrana (porinas) o a mutaciones que disminuyen el potencial de la membrana (Duran 2006, Sumano & Ocampo 2006); y 3) Incremento del nivel de una enzima. Puede deberse a una mutación en el mecanismo de su regulación (ej. en la formación de betalactamasa) o por amplificación del número de copias de su gen (Krützfeldt & González 2000). La resistencia

fenotípica inducida aparece cuando se usan concentraciones subinhibitorias de un antibiótico, produciendo enzimas que aumentan la resistencia (Duran 2006). También puede deberse al mecanismo de resistencia por infección de la bacteria por un plásmido (este mecanismo presenta un problema más serio, porque es más prevalente, es transmisible y altamente estable). Esta última, involucra resistencia a varios agentes, incluyendo algunos que no seleccionan para mutaciones cromosómicas y no disminuyen la tasa de crecimiento (Jacobson 2000). El plásmido le confiere a la célula propiedades adicionales, como la capacidad para inactivar antibióticos (elementos designados inicialmente como Factores de Resistencia). Esas propiedades pueden fluctuar en relación con la adquisición o pérdida del plásmido (Sumano & Ocampo 2006). Actualmente los plásmidos representan la causa más común de resistencia adquirida a los antibióticos; su amplia y constante diseminación implica una amenaza para la quimioterapia antimicrobiana (Jacobson 2000). Se presume que los plásmidos de resistencia han sido seleccionados en la evolución por inhibidores presentes en el ambiente, en el caso de los antibióticos, posiblemente por la presencia de antibióticos naturales (Sumano & Ocampo 2006). Sin embargo, su amplia difusión en los últimos años está estrechamente relacionada con un uso indebido y de forma incontrolada, mal indicada y en dosis subterapeuticas. En organismos en vida libre es poco factible que se dé este tipo de resistencia, sin embargo, puede ser probable en animales en cautiverio, en centros de rehabilitación o acuarios donde se han realizado tratamientos previos y continuos.

En el presente estudio, la resistencia de *B. cepacea, S. mailophilia* y *V. fluvialis* observada a la Ceftriaxona y Ceftazidima se debió a la inactivación de una gran variedad de enzimas llamadas betalactamasas, las cuales eliminan las proteínas de la membrana externa que son las que normalmente favorecen la entrada de dichos antibióticos a la célula (Jacobson 2000, Sumano & Ocampo 2006). Ningún género ni especie bacterianos presentó resistencia a la Amikacina ni a Gentamicina, no obstante, consideramos importante señalar que en otros casos, la resistencia a estos antibióticos se debe a la participación de las enzimas que destruyen el antibiótico en el sitio de entrada en la membrana citoplásmica (Durán 2006). Como este grupo de antibióticos se difunde lentamente hacia el interior de la célula, son fácilmente inactivados por estas enzimas y se desarrolla resistencia de alto nivel (Krützfeldt & González 2000). Con base en los resultados obtenidos, y de acuerdo a los procedimientos terapéuticos utilizados en rehabilitación y cautiverio (Norton 2005, Phelan & Eckert 2006, Wyneken *et al*. 2006) proponemos el uso de Amikacina y Gentamicina como tratamientos contra infecciones de origen bacteriano en tortugas marinas. El primero, es un bactericida que inhibe la síntesis proteica bacteriana (Durán 2006); su uso, ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de diferentes infecciones bacterianas de las articulaciones, neumonía, sepsis e infecciones del tracto urinario a corto plazo de infecciones graves producidas por gram negativas, *Pseudomonas, E. coli, Proteus, Enterobacter, Serratia* y *Acinetobacter* principalmente (Krützfeldt & González 2000). Su eficacia también ha sido indicada en el tratamiento de corta duración de infecciones graves causadas por cepas de microorganismos sensibles como: septicemias, infecciones severas del tracto respiratorio; infecciones complicadas y recidivantes del aparato urinario, cuyo tratamiento no sea posible con otros antibióticos de menor toxicidad; infecciones de la piel, huesos, tejidos blandos y articulaciones e infecciones post quirúrgicas (Sumano & Ocampo 2006). Por otro lado, la Gentamicina actúa penetrando en la bacteria y uniéndose a las subunidades ribosomales 30S y 50S inhibiendo la síntesis proteica (Durán 2006); este antimicrobiano ha demostrado eficacia principalmente en infecciones genitourinarias, óseas e infecciones respiratorias, septicemia (incluyendo bacteriemias), infecciones de la piel y tejidos blandos (Jacobson 2000, Sumano & Ocampo 2006). A pesar de que se encontraron especies bacterianas potencialmente causantes de infecciones y en dos casos zoonosis (*B. cepacea* y *V. fluvialis*), las tortugas marinas fueron consideradas clínicamente sanas

con base en la integración del examen físico. En este estudio no se demostró la capacidad infecciosa de estos agentes; no obstante, no se debe descartar su participación en el desarrollo de infecciones secundarias o bien por su asociación a lesiones, pues presentan comportamientos de patógenos oportunistas.

Conclusiones

Los estudios microbiológicos en tortugas marinas en vida libre son fundamentales; estos permiten conocer el papel que juegan los microorganismos en las enfermedades infecciosas y su relación con la supervivencia de las poblaciones de tortugas en condiciones naturales. El conocimiento de la microbiota de animales silvestres es imperativo para entender los riesgos potenciales zoonóticos y antropozoonóticos. Los quelonios con estado de salud cuestionable presentan un mayor número de microorganismos, este aspecto puede utilizarse como índice para identificar grupos de animales inmunodeprimidos o enfermos, evaluando la microbiota bacteriana de una población de forma secuencial. Se reportaron géneros y especies bacterianos infecciosos en tortugas aparentemente sanas y dos de tipo zoonótico; no obstante, estos no se pueden definir como causantes de enfermedad. Es necesario el desarrollo de estudios específicos y evidencia clínica contundente para definir si pertenecen a la microbiota normal de las tortugas, si estas actúan como vectores, o si bien son derivados de actividades antropogénicas o producto de una infección antropozoonótica. La Amikacina y la Gentamicina mostraron la mayor eficacia clínica y terapéutica, por lo que se propone su uso como tratamiento en casos clínicos asociados a estos géneros bacterianos. Es importante complementar este tipo de estudios caracterizando las serovariedades y sus genes de virulencia con el uso de técnicas más sensibles. Este estudio es la línea base de microbiología para *C. caretta* en GU y sirve como referencia para futuras investigaciones, permitiendo complementar las evaluaciones de salud en la zona y los planes de manejo y conservación para los organismos y sus ecosistemas en el área, en conjunto con las autoridades pertinentes.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Proyecto Procer 2016 "Condición y Distribución de las tortugas marinas del Golfo de Ulloa y Playa San Lázaro BCS" (OFICIO. E.No.F00.DRPBCPN / 696/2016) del Programa de Conservación de Especies en Riesgo (PROCER) de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP), por financiar esta investigación y por su asistencia durante el trabajo de campo. También agradecemos a Jorge Armando Vega-Bravo, Yoalli Hernández Gil y Ana Sofía Merino-Zavala de la UABCS por su ayuda durante el trabajo de campo. Finalmente, gracias a los capitanes Fernando Romero Romero y Aarón Romero Romero de Puerto Adolfo López Mateos; a Miguel Ángel Ramírez Mercado, Daniel Porras y Rogelio Ojeda Pimentel de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA - SEMARNAT) por su asistencia y apoyo en el trabajo de campo. Esta investigación se realizó con los permisos: SGPA / DGVS / 05533/16 y SGPA / DGVS / 07915/16.

Referencias

Aguirre, A.A. & P. Lutz. 2004. Marine turtles as sentinels of ecosystem health: is fibropapillomatosis an indicator? EcoHealth 1(3):275–283.

Ahsan, C.R., S.C. Sanyal, A. Zaman, P.K.B. Neogy & M.I. Huq. 1988. Immunobiological relationships between *Vibrio fluvialis* and *Vibrio cholerae* enterotoxins. Immunology and Cell Biology 66(3): 251-2.

Allton, D., M. Forgione & S. Gros. 2006. Cholera-like presentation in *Vibrio fluvialis* enteritis. Southern medical journal 99(7): 765-768.

Baquero, F., R. Cantón & G. Cornaglia. 2010. Public-health microbiology, a challenge for Europe. Clinical Microbioly and Infection 9:492–5.

Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris & M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology 45: 493- 496.

Bolten, A. 2000. Técnicas para la Medición de Tortugas Marinas, en Eckert, K., K. Bjorndal, A. Abreu-Grobois & M. Donnelly (eds). Técnicas de investigación y

manejo para la conservación de las tortugas marinas. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication 4: 126-131.

Bolten, A. 2003. Variation in sea turtle life history patterns: neritic vs. oceanic developmental stages, in The Biology of Sea Turtles Vol. II, eds Lutz, P.L., J. Musick & J. Wyneken (Boca Raton, FL: CRC Press), 243–257.

Buller, N. 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual. London: CABI, 361 p.

Cantón, R. 2010. Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica 28(6): 375-385.

Chambers, H.F., M. Sachdeva & S. Kennedy. 1990. Binding affinity for penicillin-binding protein 2a correlates with in vivo activity of beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Infectious Diseases 162:705-710.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011. "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing," in Twenty-First Informational Suplement, Vol. 31, (Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute), M02-A10 and M07-A08.

Cornaglia, G., W. Hryniewicz, V. Jarlier, G. Kahlmeter, H. Mittermayer, L. Stratchounski & F. Baquero. 2004. European recommendations for antimicrobial resistance surveillance. Clinical Microbiology and Infection 10:349-383.

Courvalin, P. 1992. Interpretive reading of antimicrobial susceptibility test. ASM News, 58, 368-375p.

Davidson, R., R. Cavalcanti, J.L. Brunton, D.J. Bast, J.C. De Azavedo, P. Kibsey, C. Fleming & D.E. Low. 2002. Resistance to levofloxacin and failure of treatment of pneumococcal pneumonia. New England Journal of Medicine 346:747-750.

Duran, F. 2006. Vademécum veterinario diccionario. Colombia: Grupo latino Ltda, 45p.

European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (ECAST). 2010. Consultado: 14/03/2019. Disponible en: URL: http://www.eucast.org.

Ferraro, M.J. 2001. Should we reevaluate antibiotic breakpoints?. Clinical Infectious Diseases 33:240-244.

Funes-Rodríguez, R., M.E. Hernández-Rivas, R.J. Saldierna-Martínez, A.T. Hinojosa-Medina, R. Avendaño-Ibarra & S.P.A. Jiménez-Rosenberg. 2000. Composición y abundancia del ictioplancton del Golfo de Ulloa, Baja California Sur, un Centro de Actividad Biológica. BAC, Centros de Actividad Biológica del Pacífico Mexicano. CIB–Nor, SC México,185-197p.

Franco-Monsreal, J., E.B. Lara-Zaragoza, N. Villa-Ruano, L. Mota-Magaña, L. E.S. Serralta-Peraza, V.B. Cuevas-Albarrán & F. Sosa-Castilla. 2014. Especies de importancia clínica del Genero *Vibrio* en alimentos marinos de origen animal de establecimientos de Puerto Ángel, Oaxaca, México. Ciencia y Mar XX 52: 3-30.

Glazebrook, J., R. Campbell & A. Thomas. 1993. Studies on an ulcerative stomatitis, obstructive rhinitis pneumonia disease complex in hatchling and juvenile sea turtles *Chelonia mydas* and *Caretta caretta*. Diseases of Aquatic Organisms 16:133–147. doi: 10.3354/dao016133.

Glazebrook, J.S. & R.S.F. Campbell. 1990a. A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. I. Farmed turtles. Diseases of Aquatic Organisms 9: 83-95.

Glazebrook, J.S. & R.S.F. Campbell. 1990b. A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. II. Oceanarium-reared and wild turtles. Diseases of Aquatic Organisms 9: 97-104.

Hoff, G.L., F.L. Frye & E.R. Jacobson. 1984. Diseases of amphibians and reptiles. Plenum, New York. 784 p.

Igbinosa, E. & A. Okoh. 2010. *Vibrio fluvialis*: un patógeno entérico inusual de creciente preocupación de salud pública. International Journal of Environmental Research and Public Health 10: 3628-3643.

Jacobson, E.R. 2000. Antimicrobial drug use in reptile. En: Prescott JF, Baggot JD, Walker RD (eds.) Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine 3rd edn. State University Press, Ames, 315-338p.

Jacobson ER. 2007. Bacterial diseases of reptiles. In: Jacobson ER (ed). Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text. Boca Raton, USA: CRC Press. 461-527p.

Johnson-Delaney, C. A. 1996. Reptile zoonoses and threats to public health. Reptile medicine and surgery 20-33.

Jorgensen, H. & M.J. Ferraro. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. Clinical Infectious Diseases 49:1749-1755.

Kahlmeter, G., D.F.J. Brown, F.W. Goldstein, A.P. MacGowan, J.W. Mouton, A.Ö. Sterland, A. Rodloff, M. Steinbakk, P. Urbaskova & A. Vatopoulos. 2003. European harmonisation of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 52:145-148.

Krützfeldt Willcock, W. & J.L. González Hernández. 2000. Vademécum veterinario IPE (No. C SF 961.5. V33 2000).

Lauckner, G. 1985. Diseases of Reptilia. In O. Kinne (ed.). Diseases of marine animals, Vol. IV, part. 2. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, 561-566p.

Lee, J.V., P. Shread, A.L. Furniss & T.N. Bryant. 1981. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. nov. (Synonym Group F Vibrios, Group EF6). Journal of Applied Microbiology 50(1): 73-94.

Limpus, C.J. 1978 The reef: Uncertain land of plenty. In: Lavery HJ (ed) Exploration north—A natural history

of Queensland, Lloyd O'Neill Pty Ltd., Sydney, New South Wales, Australia, 243 p.

Livermore, D.M., T.G. Winstanley & K.P. Shannon. 2001. Interpretative reading: Recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48: 87-102.

Lluch-Belda, D. 2000. Centros de Actividad Biológica en la Costa Occidental de Baja California. En Lluch Belda, D., G.J. Elourdy, S. Lluch-Cota, D.G. Ponce (eds.). BAC. Centros de Actividad Biológica del Pacífico Mexicano. CIB–Nor, México, 367p.

Lu, H.K., E.F. Chen, S.Y. Xie, C.L. Chai, Y.D. Wei, S.T. Mo, J.L. Ye & Y. Luo. 2006. Investigation on *Vibrio cholera* carried in aquatic products of littoral areas, Zhejiang Province. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi 40, 336–338.

Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos (MENSURA). 2000. Recomendaciones del grupo MENSURA para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios de interpretación del antibiograma. Revista Española de Quimioterapia 13: 73-86.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2000. Peformance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard, M2-A7. Wayne, Pa.

Nordmann, P., G. Cuzon & T. Naas. 2009. The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase producing bacteria. Lancet Infectious Diseases 9:228–36.

Norton, T. 2005. Chelonian emergency and critical care. Topics in medicine and surgery. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine 14(2):106–130.

O'grady, K. A. & V. Krause. 1999. An outbreak of salmonellosis linked to a marine turtle. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 30: 324–327.

Orós, J., P. Calabuig & S. Déniz. 2004. Digestive pathology of sea turtles stranded in the Canary Islands between 1993 and 2001. Veterinary Record 155: 169–174. doi: 10.1136/vr.155.6.169.

Orós, J., A. Torrent, P. Calabuig & S. Déniz. 2005. Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain(1998-2001). Diseases of Aquatic Organisms 63: 13–24. doi: 10.3354/dao063013.

Page, M.G. 2006. Anti-MRSA beta-lactams in development. Current Opinion in Pharmacology 5: 480-485.

Peckham, S. H., D. Maldonado-Diaz, V. Koch, A. Mancini, A. Gaos, M.T. Tinker & W.J. Nichols. 2008. High mortality of loggerhead turtles due to bycatch, human consumption and strandings at Baja California Sur, Mexico, 2003 to 2007. Endangered Species Research 5(2-3): 171-183.

Peckham, S. H., D. Maldonado-Diaz, Y. Tremblay, R. Ochoa, J. Polovina, G. Balazs, P.H. Dutton & W.J. Nichols. 2011. Demographic implications of alternative foraging strategies in juvenile loggerhead turtles Caretta caretta of the North Pacific Ocean. Marine Ecology Progress Series 425: 269-280.

Phelan, S.M. & K.L. Eckert. 2006. Procedimientos para Atender Traumas en Tortugas Marinas. Red de Conservación de Tortugas Marinas del Gran Caribe (WIDECAST) Informe Técnico No. 4. Beaufort, North Carolina USA. 71p.

Raidal, S., M. Ohara, R. Hobbs & R. Prince. 1998. Gram−negative bacterial infections and cardiovascular parasitism in green sea turtles (*Chelonia mydas*). Australian Veterinary Journal 76: 415–417. doi: 10.1111/j.1751-0813.1998. tb12392.x.

Reséndiz, E., H. Fernández-Sanz & M.M. Lara-Uc. 2018 Baseline health indicators of Eastern Pacific Green Turtles (*Chelonia mydas*) from Baja California Sur, Mexico. Comparative Clinical Pathology 27(5):1309–1320.

Reséndiz, E. & M.M. Lara-Uc. 2017. Analysis of post mortem changes in sea turtles from the Pacific Coast of Baja California Sur using forensic techniques. Revista Bio Ciencias 4(4): 1-22.

Santoro, M., C.M. Orrego & G.H. Gómez. 2006. Flora bacteriana cloacal y nasal de *Lepdochelys olivacea* (Testudines: Chelonidae) en el pacífico norte de Costa Rica. Revista de Biologia Tropical 54(1): 43-49.

Shah, P.M. & W. Stille. 1983. Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae strains more susceptible to cefoxitin than third generation cephalosporins. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 11:597–601.

Sumano López, H. S. & L. Ocampo Camberos. 2006. Farmacología veterinaria 3ra. Edicion Mcgraw Hill, México.

Tan, T.Y., L.S. Ng, J. He, T.H. Koh & L.Y. Hsu. 2009. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 53:146–149.

Turnidge, J., G. Kahlmeter & G. Kronvall. 2006. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. Clinical Microbiology and Infection 12: 418-442.

Vatopoulos, A. 2008. High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece–a review of the current evidence. Euro Surveill 24:13.

Warwick, C., P.C. Arena & C. Steedman. 2013. Health implications associated with exposure to farmed and wild sea turtles. JRSM Short Reports 4:8. doi: 10.1177/2042533313475574.

Work, T.M., G.H. Balazs, M. Wolcott & R. Morris. 2003. Bacteraemia in free-ranging Hawaiian green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis. Diseases of

Aquatic Organisms 53(1): 41-46.

Wyneken, J. 2001. The anatomy of sea turtles. U.S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFS.

Wyneken, J., D.R. Mader, E.S. Weber & C. Merigo. 2006. Medical care of sea turtles. In: Mader DM (ed) Reptile medicine and surgery, 2nd edn. Saunders Elsevier, St. Louis, pp 972–1007.

Zavala-Norzagaray, A.A., A.A. Aguirre, J. Velazquez-Roman, H. Flores-Villaseñor, N. León-Sicairos, C.P. Ley-Quiñonez, L.D.J. Hernández-Díaz & A. Canizalez-Roman. 2015. Isolation, characterization, and antibiotic resistance of Vibrio spp. in sea turtles from Northwestern Mexico. Frontiers in Microbiology 6:635. doi: 10.3389/fmicb.2015.00635.