

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE MEDICINA PREVENTIVA VETERINARIA

**DETECCIÓN DE *Salmonella spp.* EN TORTUGAS DE OREJAS ROJAS
(*Trachemys scripta elegans*) EN LA CIUDAD DE VALDIVIA**

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO.

FELIPE FERNANDO TOLEDO MONTOYA

VALDIVIA – CHILE

2009

PROFESOR PATROCINANTE

Dra. Carla Rosenfeld Firma

COPATROCINANTE

TM. Mónica Sáez Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Ricardo Enríquez Firma

Dr. Julio Thibaut Firma

FECHA DE APROBACIÓN:

28 de Septiembre 2009

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS	9
5. RESULTADOS	11
6. DISCUSIÓN	17
7. REFERENCIAS	24
8. ANEXOS	31
9. AGRADECIMIENTOS	37

1. RESUMEN

El principal objetivo de este estudio fue evaluar, a través de análisis microbiológicos, la prevalencia de *Salmonella spp.* en tortugas de orejas rojas (*Trachemys scripta elegans*). Para esto se tomaron muestras cloacales de 23 tortugas, procedentes de 2 tiendas de mascotas y de 8 propietarios privados, todos pertenecientes a la ciudad de Valdivia. Además, en el momento de tomar las muestras se aplicó una encuesta para evaluar la implementación, el mantenimiento y las medidas higiénicas realizadas por los dueños, así como el largo y las condiciones sanitarias de las tortugas.

La prevalencia de *Salmonella spp.* fue de 13% en las cloacas de las tortugas examinadas. Además se destaca que en Chile la venta de tortugas de orejas rojas se realiza sin restricciones, mientras que en Estados Unidos está prohibida la venta de tortugas menores a 4 pulgadas (10 cms), no así su exportación y en la Unión Europea esta totalmente prohibida su importación.

Al analizar las encuestas realizadas, se determinó la falta de implementación adecuada, los propietarios tenían escaso conocimiento de la mantención y falta de procedimientos higiénicos necesarios.

Palabras clave: *Salmonella*, tortuga de orejas rojas, *Trachemys scripta elegans*.

2. SUMMARY

***Salmonella* spp. DETECTION IN RED EARED SLIDERS (*Trachemys scripta elegans*) IN VALDIVIA CITY.**

The aim of this study was to evaluate, through microbiological assays, the prevalence of *Salmonella* spp. in red eared sliders (*Trachemys scripta elegans*). For this purpose cloacal swabs were taken from 23 turtles, which belong to 2 pet shops and 8 private owners, all of them from the city of Valdivia, Chile. Besides, at the moment of sample taking, a survey was completed to evaluate the implementation, the maintenance and the hygienic procedures given by the owners, as well as the length and the sanitary conditions of the turtles.

A 13% of *Salmonella* spp. prevalence rate was determined in the cloaca of the turtles. Also it is noteworthy that in Chile the red eared sliders are sold without restrictions, while in the United States the sale of red eared sliders, below 4 inches (10 cms.) is forbidden, but its exportation isn't and the importation to the European Union is prohibited.

By analysing the surveys, it was determined that the correct implementation was lacking, the owners didn't have knowledge of the maintenance and lack of hygienic procedures.

Key words: *Salmonella*, red-eared slider, *Trachemys scripta elegans*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. *Salmonella* spp; CARACTERÍSTICAS GENERALES Y DENOMINACIÓN

El género *Salmonella* spp. se ubica dentro del Orden *Enterobacteriales* y la familia *Enterobacteriaceae* (Le Minor 1984). Las bacterias pertenecientes a este género son bacilos Gram negativos de 0,7-1,5 x 2,0-5 µm, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados, no encapsulados, con alta resistencia a las condiciones ambientales (Le Minor 1984, Mitscherlich y Marth 1984, INN 2002).

Actualmente las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* spp. se dividen taxonómicamente en especies, luego subespecies y por último en serotipos o serovares. Por convención se debe preferir el término serovar a serotipo (Lin-Hui y Cheng-Hsun 2007).

En el año 2007 se reconocían 2579 serovares en el género *Salmonella*, pertenecientes a dos especies *bongori* y *entérica*, esta última está dividida en seis subespecies, presentadas en el cuadro 1 (WHO 2007).

Cuadro 1. Número de serovares de *Salmonella*, por especie y subespecie.

Género	Especie	Subespecie	Nº serovares
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i> I	1531
		<i>salamae</i> II	505
		<i>arizonae</i> IIIa	99
		<i>diarizonae</i> IIIb	336
		<i>houtenae</i> IV	73
		<i>indica</i> VI	13
	<i>bongori</i> V		22
Total			2579

Fuente: WHO 2007

La validación de nuevos serovares se realiza en el WHOCC-Salm, en el Instituto Pasteur, París, Francia, previa confirmación con otros dos laboratorios (WHO 2007).

3.2. SALMONELOSIS ASOCIADA A REPTILES

Los reptiles son reservorios naturales de *Salmonella spp*; capaces de albergar a más de un serovar sin presentar signos clínicos (Chiodini y Sundberg 1981). El estado de portador se explica por la temperatura de los reptiles que impide la expresión de proteínas bacterianas responsables de la invasión del organismo, colonizando sólo el mucus del intestino (Pasmans y col. 2003).

Salmonella spp. también es capaz de provocar salmonelosis en los reptiles, actuando como una enfermedad oportunista, asociada a factores predisponentes como estrés, alta carga parasitaria, traumas u otras enfermedades infecciosas (Cambre y col. 1980, Rosental y Mader 1996).

La excreción de *Salmonella spp.* es intermitente y está asociada a factores estresantes como la cautividad, el transporte, dietas extrañas y el ambiente. Los animales que no están sometidos a estos factores albergan *Salmonella spp.* en cantidades que dificultan el aislamiento microbiológico, en cambio en los animales sometidos a estrés se produce la multiplicación y eliminación de estos microorganismos a niveles detectables. Por estas razones es difícil asegurar que un reptil esté libre de *Salmonella spp.* (Burham y col 1998, Richards y col. 2004, CDC 2008).

Debido a que la eliminación de estas bacterias ocurre a través de fecas y orina, en los reptiles acuáticos cautivos, se contamina el agua y todo lo que tenga contacto con ella. Producto de lo anterior y por la alta resistencia de *Salmonella spp.* al ambiente, las rutas de transmisión al hombre se producen tanto por contacto directo con las fecas y orina como por fomites (Friedman y col. 1998, Warwick y col. 2001, Bauwens y col. 2006).

La identificación de un serovar, tanto en casos de salmonelosis humana como en aislamientos de reptiles mascotas, se usa para investigar el potencial zoonótico de ese serovar (Woodward y col. 1997). Los principales serovares aislados de pacientes con salmonelosis asociada a reptiles pertenecen a *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) y *S. enterica* subsp. *enterica* (I) (Rogers y Johnstone 1985, Chassis y col. 1986, D'Aoust y col. 1990, Ackman y col. 1995, Woodward y col. 1997, Mahajan y col. 2003, Schröter y col. 2004).

3.3. TORTUGAS DE OREJAS ROJAS Y SALMONELOSIS

Las tortugas de orejas rojas (*Trachemys scripta elegans*) son reptiles semiacuáticos de agua dulce, omnívoros, nativos de los ríos, arroyos y lagos del sureste de Estados Unidos. Estos animales constituyen una de las mascotas exóticas más comunes a nivel mundial. El principal país productor es Estados Unidos (HSUS 2001 b). La venta de tortugas de orejas

rojas en ese país se inició en la década de 1930, con la recolección manual de tortugas en la naturaleza, para posteriormente progresar a la producción masiva de tortugas en granjas especializadas (Huges 2000).

Debido a la asociación de las tortugas con salmonelosis en humanos, este negocio ha sufrido una serie de regulaciones, por parte de entidades gubernamentales estadounidenses, (Anderson y col. 1971, U.S. Senate 1972). En 1975 la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) prohíbe la venta de tortuga de orejas rojas vivas menores a 4” y sus huevos viables, exceptuando a aquellos especímenes destinados a exportación (CFR 2005).

Los intentos por controlar la contaminación de los “hatchlings” (tortugas recién eclosionadas) han resultado infructuosos (Kaufmann y col. 1972, Siebling y col. 1975 a y b, Michael-Marler y col. 1983). Finalmente Siebling y col. en 1984 establecieron un protocolo que es usado en la actualidad, es conocido como el “Método Siebling”. Este sistema posee varios pasos:

- 1).- Lavado de huevos recientemente desovados bajo agua corriente.
- 2).- Desinfección con cloro diluido.
- 3).- Medicación con Garasol, mediante el método de temperatura diferencial o el de presión diferencial.
- 4).- Incubación en cámara estéril.

Para garantizar exportaciones de tortugas “libres de *Salmonella*” laboratorios aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) realizan muestreos de lotes, de 20.000 tortugas toman muestras de 5, si alguna de estas muestras resulta positiva eutanasian al lote (Lutz 2000).

A pesar de usar el Método Siebling y de que la FDA garantice que las tortugas exportadas están libres de *Salmonella spp*; diferentes investigadores han documentado salmonelosis humana asociada a tortugas de orejas rojas que fueron importadas desde Estados Unidos (Nagano y col. 2006, Kaibu y col. 2006). Según Diaz y col. (2006) y Mitchell y col. (2007) el Método Siebling no erradica la *Salmonella spp*. de las tortugas, sólo reduce la excreción por parte de los hatchlings. Además se han encontrado cepas de *Salmonella spp*. que son resistentes a la mayoría de los antibióticos (D’Aoust y col. 1990, Shane y col. 1990, Díaz y col. 2006).

3.4. MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE TORTUGAS DE OREJAS ROJAS Y CONTAMINACIÓN CON *Salmonella spp.*

Las tortugas de orejas rojas, son criadas comercialmente en granjas de tortugas, estas poseen estanques artificiales con orillas de arena donde las hembras desovan. Son alimentadas con pellet comerciales y vegetales. La elevada densidad de tortugas, los hábitos coprofágicos, la transmisión cloacal durante la cópula, el alto nivel de nutrientes encontrado en los estanques de reproducción y la temperatura ambiental propician altos niveles de *Salmonella spp.* en los estanques y facilitan la contaminación entre las tortugas adultas (Lutz 2000, HSUS 2001 a y b, Hidalgo y col. 2006).

Hay diferentes investigadores que intentan explicar la forma en que los hatchlings se contaminan con *Salmonella spp.*; sus teorías pueden agruparse en:

- a) Contaminación del huevo durante el desarrollo en el tejido ovárico (Kaufmann y col. 1972 y Wells y col. 1974)
- b) Contaminación del huevo durante el tránsito por el canal de la cloaca (Feeley y Treger 1969).
- c) Contaminación ambiental de los huevos, debido a que las cáscaras de los huevos recién desovados son permeables a la entrada de microorganismos, las *Salmonella spp.* presentes en la arena del nido son capaces de entrar en ellos y contaminarlos. (Feeley y Treger 1969, Kaufmann y col. 1972, Siebling y col. 1975 b, Michael-Marler y col. 1983, Siebling y col. 1984).
- d) Contaminación ambiental de los hatchlings, cuando los hatchlings eclosionan, pueden adquirir *Salmonella spp.* desde el ambiente (Siebling y col. 1975 b, Izadjoo y col. 1987) o por la conducta innata de ingerir fecas para establecer flora intestinal (HSUS 2001 a).

3.5. CARACTERÍSTICAS DE LA TENENCIA DE TORTUGAS DE OREJAS ROJAS QUE LAS HACEN PELIGROSAS

Si bien algunas mascotas exóticas pueden ser reservorios naturales de *Salmonella spp.*; las tortugas de orejas rojas poseen diferentes condiciones que las convierten en vectores de especial importancia:

- a) Parecen ser inocuas: las tortugas ofrecidas en el comercio son pequeñas, no muerden, no arañan y no son ponzoñosas, por esto son especialmente atractivas para los niños (Tauxe y col. 1985, CDC 2008)

- b) Contaminación del entorno: las tortugas viven en aguas temperadas y con alta carga de desechos, condiciones ideales para el crecimiento bacteriano, por lo tanto todo lo que se ponga en contacto con el agua puede actuar como un fomite (Lutz 2000, CDC 2007).
- c) Personas encargadas y medidas higiénicas: debido a que generalmente los encargados de estas mascotas son niños, es común que tengan conductas sanitariamente inapropiadas como tocarlas con los labios, manejarlas como juguetes o que luego de tocarlas no se laven las manos (Warwick y col. 2001, CDC 2007).
- d) Comercio: las tortugas son criadas en grandes números en las granjas desde donde son distribuidas mundialmente, estando disponibles para el público en general (Tauxe y col. 1985, Lutz 2000).

3.6. CONDICIONES GENERALES DE MANTENIMIENTO DE LAS TORTUGAS

A continuación se detallan los aspectos más relevantes para la mantención correcta de este tipo de organismos.

Contenedor: pueden ser de vidrio o de otros materiales. Con respecto al tamaño, es más importante el área de superficie que el alto, la superficie combinada de las tortugas no debe exceder al 25% de la superficie del contenedor. Si fuese necesario, deben implementarse tapas que eviten que la tortuga escape o que entren depredadores (Boyer y Boyer 1996).

Agua: la altura mínima de la columna de agua debe ser igual al ancho de la tortuga más grande, para permitir que ésta pueda voltearse en caso de quedar en decúbito dorsal. Es recomendable usar agua potable para evitar la contaminación del agua con organismos extraños. El cambio de agua debe ser total y frecuente (Boyer y Boyer 1996).

Zona seca: esta zona puede ser cualquier superficie que soporte totalmente a la tortuga, manteniéndola fuera del agua (Boyer y Boyer 1996).

Temperatura: la temperatura del agua dentro del contenedor debe ser de 20° a 28° C, similar a la temperatura del aire. La zona seca debe estar entre los 29 a 32° C¹.

Filtración: La filtración tiene como objetivo disminuir la frecuencia de los cambios de agua, pero no los elimina. Los mejores filtros para tortugas son los filtros externos de alta capacidad y que permiten una filtración mecánica y biológica (Boyer y Boyer 1996).

¹ <http://www.wnyherp.org/care-sheets/turtles/red-ear-slider.php> Fecha de acceso: 13 de julio de 2009.

Sustrato: Debe evitarse el uso de sustratos de gravilla o arena porque dificultan las labores de limpieza, acumulando detritus y además, si es que la gravilla es de diámetro pequeño, las tortugas podrían ingerirla (Boyer y Boyer 1996).

Alimentación: Debe alimentarse a las tortugas adultas 3 a 4 veces a la semana con dietas mayoritariamente herbívoras, en cambio, los hatchlings deben ser alimentados 1 vez al día con dietas ricas en proteínas. Deben excluirse totalmente los insectos deshidratados, por su bajo contenido en nutrientes y los peces vivos capturados en la naturaleza porque pueden ser vectores naturales de parásitos (Boyer y Boyer 1996, Frye 1997, Senneke 2003).

Exposición a la radiación ultravioleta: las tortugas deben ser expuestas a la luz solar directa o en su defecto a sistemas comerciales especializados que emitan esta radiación (Alberts 1993, Barten 1996, Gehrman 1996).

3.7. HIPÓTESIS

Las tortugas (*Trachemys scripta elegans*) vendidas en las tiendas de mascotas y mantenidas en casas particulares de la ciudad de Valdivia son portadoras de *Salmonella spp.* en la cloaca y son una potencial fuente de zoonosis.

3.8. OBJETIVOS

3.8.1. Objetivo general

Caracterizar las condiciones de tenencia y determinar la presencia de *Salmonella spp.* en tortugas de orejas rojas provenientes de tiendas de mascotas y de propietarios particulares en la ciudad de Valdivia.

3.8.2. Objetivos específicos

Aislar microbiológicamente *Salmonella spp.* de muestras cloacales de ejemplares de tortugas de orejas rojas.

Definir la forma de obtención de las tortugas y su origen, así como la implementación, las condiciones de mantenimiento otorgadas, las condiciones físicas de las tortugas y el conocimiento sobre esta zoonosis.

Determinar la cantidad de tortugas ofrecidas por las tiendas de mascotas, también los días de permanencia en la tienda y las temporadas de mayor venta.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Material biológico: Se analizaron 24 tortugas de orejas rojas, de éstas se tomaron 23 muestras cloacales.

4.1.2. Materiales de toma de muestra y de microbiología: Se encuentran detallados en el anexo 1.

4.1.3. Encuestas y fichas: Se confeccionaron encuestas para los propietarios, ya sean tiendas de mascotas o dueños particulares (anexo 2). En el caso de los propietarios particulares se consideraron aspectos relacionados a la: identificación del dueño, condiciones y manejos de las tortugas, implementación del acuario, manejo sanitario del agua, manejo sanitario del sustrato y se anotaron posibles observaciones. Para el caso de las tiendas de mascotas, se obtuvo la misma información, añadiendo la cantidad de tortugas ofrecidas los días de venta del stock y las temporadas de mayor venta.

Se crearon fichas para cada tortuga (anexo 3), en ellas se anotó información referente a: el nombre del propietario, el largo de cada tortuga y posibles alteraciones encontradas en la inspección general.

4.2. MÉTODO

4.2.1. Métodos de obtención de las tortugas: Se siguieron dos metodologías para la adquisición del material biológico, las muestras cloacales de tortugas de orejas rojas:

A). Se determinó el número y la ubicación de las tiendas de mascotas. Luego se visitó cada tienda y se solicitó a los dueños participar en el estudio.

B). Se confeccionaron afiches que fueron situados en diferentes murales de la Universidad Austral de Chile, con el objetivo de contactar dueños particulares de tortugas.

4.2.2. Encuestas y fichas: El primer paso fue realizar las encuestas. Las encuestas fueron completadas con las personas encargadas del aseo de los implementos y cuidado de las tortugas y mediante observación. Luego se procedió a llenar la ficha individual de las tortugas.

Para este fin, se realizó una inspección general de cada tortuga y se midió el largo del caparazón.

4.2.3. Obtención de la muestra: Posteriormente se procedió a tomar la muestra cloacal. Para disminuir la contaminación de la microtórula con bacterias externas a la cloaca, se desinfectó esa zona con alcohol diluido. Después se humedeció una microtórula en el APT y se tomó la muestra cloacal. Una vez muestreadas la totalidad de las tortugas, las muestras fueron transportadas, refrigeradas, al Laboratorio de Alimentos del Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria para su análisis.

4.2.4. Análisis microbiológico: El análisis microbiológico se realizó en 4 pasos: preenriquecimiento no selectivo, enriquecimiento selectivo, aislamiento y confirmación mediante pruebas bioquímicas.

Para el preenriquecimiento no selectivo se siguieron las pautas realizadas por Corrente y col. (2004); dependiendo de la cantidad de materia fecal que se obtuvo con la microtórula se siguieron dos opciones, si la materia fecal fue abundante se mantuvo la microtórula sumergida en 9 ml de APT por 30 segundos, si la cantidad fue escasa, la microtórula se cortó y se mantuvo sumergida durante toda la incubación. En ambos casos se incubó en una estufa de cultivo bacteriano ajustada a 35 ± 1 °C por 24 horas.

Los pasos siguientes, enriquecimiento selectivo, aislamiento y confirmación mediante pruebas bioquímicas, se realizaron según el protocolo descrito en la NORMA CHILENA OFICIAL NCh2675.Of2002. Productos hidrobiológicos – Detección de *Salmonella spp.* (INN 2002). Se adjunta en el anexo 5 un diagrama del procedimiento realizado en este estudio.

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos fueron ingresados a una planilla MS EXCEL® y se analizaron mediante el uso de estadística descriptiva.

5. RESULTADOS

De las 24 tortugas examinadas se muestrearon 23 debido a que 1 estaba convaleciente de un prolapso cloacal.

5.1. PREVALENCIA DE *Salmonella spp.*

Luego del procesamiento de las 23 muestras cloacales, 3 (13%) resultaron positivas al examen microbiológico para detectar *Salmonella spp.* Las tres procedían de tiendas de mascotas (cuadro 2).

Cuadro 2. Prevalencia de *Salmonella spp.* en tortugas de orejas rojas muestreadas en la ciudad de Valdivia entre octubre y diciembre del año 2008.

Propietarios	Muestras analizadas	Muestras analizadas positivas	%
Tienda A	4	2	50,0
Tienda B	3	1	33,3
Casas particulares	12	0	0,0
Vivero de plantas	4	0	0,0
Total	23	3	13,0

5.2. FORMA DE OBTENCIÓN Y ORIGEN DE LAS TORTUGAS

Las tortugas analizadas eran mantenidas por 10 propietarios: dos tiendas de mascotas, siete casas particulares y un vivero de plantas, todos ubicados en la ciudad de Valdivia. De los 7 propietarios particulares, la mayor parte (71,4%) indicó que sus tortugas fueron obtenidas desde tiendas de mascotas de la ciudad de Valdivia, dichas tiendas traían sus tortugas desde Santiago. Las tortugas del vivero de plantas (D) eran donadas por clientes que no podían mantenerlas (cuadro 3).

Cuadro 3. Caracterización de la tenencia de tortugas de orejas rojas en la ciudad de Valdivia, mediante encuesta realizada entre octubre y diciembre del año 2008.

Dueño	Tipo de Propietario	Nº de tortugas	Procedencia	Tiempo de tenencia
A	Tienda de mascotas	4	Santiago	2 semanas
B	Tienda de mascotas	3	Santiago	1 semana
C	Casa particular	1	Osorno	8 años
D	Vivero de plantas	4	Donadas	7 años
E	Casa particular	1	Valdivia	3 meses
F	Casa particular	3	Valdivia y obsequio	1 año
G	Casa particular	3	Valdivia y obsequio	8 años
H	Casa particular	2	Santiago	5 años
I	Casa particular	2	Valdivia	10 meses
J	Casa particular	1	Valdivia	7 meses

5.3. CARACTERIZACIÓN DE LA IMPLEMENTACIÓN

Con respecto al número, al tipo y a las características de los contenedores de tortugas, cada dueño mantenía sólo 1 contenedor, todos eran acuarios de vidrio, con la excepción del dueño D que tenía un estanque de madera. No se apreciaron problemas de sobrepoblación o que el límite del agua fuera muy bajo. Ningún contenedor estaba equipado con ampollas especiales para suministrar calor y tampoco tenían equipos de radiación ultravioleta (cuadro 4).

Cuadro 4. Implementos usados en los contenedores y manejos realizados por los propietarios de las tortugas de orejas rojas en la ciudad de Valdivia, inventariados mediante encuesta realizada entre octubre y diciembre del año 2008.

Items	Presente		Ausente		Solo en invierno	
	n	%	n	%	n	%
Zona seca	6	60	4	40		
Termómetro	0	0	10	100		
Exposición a Rayos UV.	5	50	5	50		
Calefacción	1	10	7	70	2	20
Filtración	5	50	5	50		
- Filtro interno de esponja	4	40				
- Filtro interno de placas	1	10				

5.4. CARACTERIZACIÓN DE MANTENIMIENTO

5.4.1. Manejo sanitario del agua: Al preguntar sobre los manejos del agua, el 100% de los propietarios declaró reponer la totalidad del agua, usando agua potable. Los demás datos se encuentran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Caracterización de los manejos sanitarios del agua realizados por los propietarios de tortugas de orejas rojas en la ciudad de Valdivia, mediante encuesta realizada entre octubre y diciembre del año 2008.

a. Frecuencia del cambio	n	%
- 3 a 4 veces por semana	1	10
- 2 veces por semana	2	20
- 1 a 2 veces por semana	2	20
- Cada dos semanas	2	20
- Una vez al mes	1	10
- Cuando este sucia	2	20
Total	10	100

b. Forma de vaciado	n	%
- Voltea el acuario	5	50
- Con recipientes	4	40
- Sifonea con manguera	1	10
Total	10	100

c. Lugar de eliminación	n	%
- Patio	5	50
- Baño	2	20
- Desagüe	2	20
- Cocina	1	10
Total	10	100

d. Uso de anticloro	n	%
- Utilizado	5	50
- No utilizado	5	50
Total	10	100

5.4.2. Manejo sanitario del sustrato: La gran mayoría de las personas lavaba el sustrato, dentro de baldes, con agua potable; sólo una persona (10%) remojaba la gravilla en cloro diluido como medida antimicrobiana; en el caso del dueño D, el estanque de madera era escobillado para sacar las algas que se generaban (cuadro 6).

Cuadro 6. Caracterización del tipo y de los manejos sanitarios del sustrato realizados por los propietarios de tortugas de orejas rojas en la ciudad de Valdivia, mediante encuesta realizada entre octubre y diciembre del año 2008.

a. Tipo de sustrato			b. Frecuencia de limpieza		
	n	%			
- Gravilla media y gruesa	8	80	- 3 a 4 veces por semana	1	10
- No posee	1	10	- 2 veces por semana	2	20
- Piedras	1	10	- 1 a 2 veces por semana	2	20
Total	10	100	- Cada 2 semanas	1	10
			- 1 vez al mes	1	10
			- Cuando esta sucio	1	10
			- No especifica	1	10
			Total	10	100

5.4.3. Alimentación: Al ser encuestados acerca del tipo de alimentación dada a las tortugas, se destaca la gran cantidad de personas que incluía gambitas (*Gammarus spp.*) deshidratadas y que sólo 1 propietario incluyera alimento vivo en la dieta (cuadro 7).

Cuadro 7. Caracterización del tipo y frecuencia de alimentación suministrada por los propietarios a sus tortugas de orejas rojas en la ciudad de Valdivia, mediante encuesta realizada entre octubre y diciembre del año 2008.

Items	n	%
Tipo de alimentación		
- Sólo con <i>Gammarus spp.</i> deshidratado	3	30
- <i>Gammarus spp.</i> deshidratado y alimento concentrado	3	30
- <i>Gammarus spp.</i> deshidratado y lechugas	1	10
- <i>Gammarus spp.</i> deshidratado y alimento vivo	1	10
- Sera Raffy® y alimentos concentrados	1	10
- Sera Raffy® y verduras	1	10
Total	10	100
Frecuencia diaria		
- 1 vez	5	50
- 2 veces	3	30
- 3 y más veces	2	20
Total	10	100

5.5. CONDICIONES FÍSICAS DE LAS TORTUGAS

El largo del caparazón de las tortugas estaba en el rango de 3,3 cms. a 19 cms. Las tortugas vendidas en las tiendas de mascotas no superaban los 4 cms. de largo del caparazón. Las tortugas que fueron regaladas al vivero estaban en el rango de 15 a 19 cms. (cuadro 8).

Cuadro 8. Largo del caparazón de las tortugas de orejas rojas muestreadas en la ciudad de Valdivia entre octubre y diciembre del año 2008.

Largo (cms.)	n	%
3,3 a 4	9	39,1
4,1 a 9	4	17,4
9,1 y más	10	43,5

Las alteraciones clínicas encontradas durante la inspección general se encuentran resumidas en el cuadro 9.

Cuadro 9. Alteraciones clínicas encontradas en las tortugas de orejas rojas mediante inspección general realizada entre octubre y diciembre del año 2008 en la ciudad de Valdivia.

Hallazgos encontrados	n	%
Mediante anamnesis		
- Sin alteraciones	21	88
- Con alteraciones		
· Prolapso cloacal	1	4
· Alteraciones oculares	2	8
Total	24	100
Al momento del muestreo		
- Sin alteraciones	22	92
- Con alteraciones		
· Blefaroconjuntivitis y abscesos	1	4
· Alteración del caparazón	1	4
Total	24	100
Total de alteraciones	5	20,8

5.6. CONOCIMIENTO SOBRE LA ZONOSIS

La mayor parte de los propietarios desconocía que las tortugas pueden ser un reservorio de *Salmonella spp.* En ambas tiendas de mascotas se desconocía si a las tortugas se les había realizado algún tipo de tratamiento antimicrobiano o si habían sido examinadas microbiológicamente. Ningún propietario usaba guantes para manipular la tortuga o desinfectaba con cloro las superficies que tuvieron contacto con ella (cuadro 10)

Cuadro 10. Conocimiento de los dueños de que las tortugas sean reservorios de *Salmonella spp.* y medidas higiénicas realizadas. Encuesta realizada entre octubre y diciembre del año 2008 en la ciudad de Valdivia.

Dueño	Conocía el problema	Consultó a Médicos Veterinarios	Lavado de manos
A	No	No	No
B	No	No	No
C	Si	No	No
D	No	No	No
E	No	No	No
F	Si	Si	No
G	No	Si	No
H	Si	No	No
I	No	No	Si
J	No	Si	No

5.7. CARACTERÍSTICAS DE LA VENTA DE LAS TORTUGAS

Ambos vendedores señalaron que las tortugas son las mascotas que se venden con mayor frecuencia. En ninguna de las tiendas se especificó el número total de tortugas vendidas por año (cuadro 11).

Cuadro 11. Características de la venta de tortugas de orejas rojas en las dos tiendas encuestadas en la ciudad de Valdivia, entre octubre y diciembre del año 2008.

Items	Tienda A	Tienda B
Stock ofrecido	5 a 6	20 a 30
Días de venta del stock	7	14
Nº tortugas vendido anualmente	No especificado	No especificado
Temporada de mayor venta	Periodos de vacaciones	Días feriados

6. DISCUSIÓN

6.1. AISLAMIENTO DE *Salmonella spp.*

Un 13% de las tortugas muestreadas tenía *Salmonella spp* en la cloaca (cuadro 2), otros estudios han documentado porcentajes de excreción de *Salmonella spp.* diversos. Kaufmann y col. (1972) encontraron prevalencias de 0 a 66% durante 3 años examinando grupos de tortugas en una granja en Lousiana. McCoy y Seidler (1973) hallaron un 20% de prevalencia analizando 27 contenedores individuales procedentes de tiendas de mascotas en Oregon y California. Chiodini y Sundberg (1981) calcularon prevalencias desde 84 a 94% examinando reptiles en tiendas de mascotas de Estados Unidos. Abalem de Sá y Solari (2001), determinaron que el 41% de las tortugas eran portadoras examinando tiendas de mascotas en Brasil. Pasmans y col. (2002), detectaron prevalencia de 12% examinando muestras cloacales y de sedimentos de contenedores procedentes de tiendas de mascotas y de propietarios particulares en Bélgica.

El método de muestreo usado en este estudio se basó en que las bacterias estaban presentes en la cloaca de las tortugas, ya sea por excreción activa o por la entrada de agua contaminada con *Salmonella spp.* Otros métodos muestrean el sedimento del agua de los contenedores de tortugas (Mann y Bjotvedt 1967) o mantienen a la tortuga en contenedores con solución salina estéril por algún tiempo y examinan microbiológicamente la solución salina (McCoy y Seidler 1973). Wells y col. (1974), desarrollaron un método que permite aislar *Salmonella spp.* desde portadores pasivos, desintegrando la tortuga, homogenizándola y examinando los restos. Según Siebling y col. (1975 b) el método de desintegración tiene mejor sensibilidad, al compararlo con los métodos que evalúan la excreción de *Salmonella spp.* cuando se examinan tortugas que han sido tratadas con antibióticos, porque en esas tortugas la excreción de *Salmonella spp.* se suprime pero no la presencia sistémica de ellas y la excreción podría reactivarse. En el presente estudio por razones éticas y económicas, no se llevó a cabo esa metodología. Otros métodos más elaborados incluyen el método de cultivo tradicional, enriqueciendo muestras sospechosas de *Salmonella spp.* en medios semiselectivos, para posteriormente usar técnicas moleculares (Gaertner y col. 2008). Actualmente no hay un protocolo oficial establecido para muestrear *Salmonella spp.* desde las tortugas de orejas rojas.

El procedimiento microbiológico usado permite aislar serovares de *Salmonella spp.* pertenecientes a la subespecie *entérica I*, aislados frecuentemente desde los animales homeotermos y causantes de la mayoría de las salmonelosis. Sin embargo los serovares presentes en los animales poiquilotermos están clasificados dentro de las subespecies *arizonae IIIa* y *diarizonae IIIb* y han sido aislados desde pacientes con salmonelosis asociada a reptiles (Ackman y col. 1995, Abalem de Sá y Solari 2001). Una de las diferencias entre estas

subespecies son las reacciones bioquímicas que presentan. Los serovares pertenecientes a la subespecie *entérica* I no son capaces de utilizar lactosa como sustrato para su metabolismo, a diferencia de los serovares agrupados dentro de las otras subespecies nombradas (Abalem de Sá y Solari 2001, WHO 2007). Como consecuencia, al interpretar las reacciones bioquímicas se descartaron aquellos cultivos bacterianos que fermentaron lactosa. Otros estudios que aislaron *Salmonella spp.* desde reptiles también descartaron colonias bacterianas que fermentaron lactosa (Mann y Bjotvedt 1967, Wells y col. 1974, Siebling 1975 b, Cambre y col. 1980, Siebling y col. 1984, Pasmans y col. 2002, Schröter y col. 2004). Por consiguiente en este estudio es posible que hubiera un mayor número de muestras cloacales positivas que el calculado. Una conclusión similar fue hecha por Ruiz y col. (1996), al evaluar los diferentes medios que se requieren para aislar *Salmonella spp.* lactosa positivas.

Las muestras positivas procedían de tortugas de las tiendas de mascotas, donde compartían el contenedor con otras tortugas de orejas rojas. Debido a que no se examinó el agua del contenedor no se puede asegurar que estuviese contaminada, sin embargo hay reportes que documentan una alta contaminación con *Salmonella spp.*; sobre 1100 ufc/ml, en el agua donde habitan las tortugas (Mann y Bjotvedt 1967). Debido a esta contaminación es probable que las tortugas positivas no fueran portadoras sino solamente que estuvieran contaminadas. Por otro lado, al considerar que las tortugas positivas y negativas han permanecido juntas al menos por una semana (cuadro 3), es posible que todas sean portadoras de *Salmonella spp.*

6.2. FORMA DE OBTENCIÓN Y ORIGEN DE LAS TORTUGAS

Los propietarios particulares de tortugas de orejas rojas, las obtuvieron desde tiendas de mascotas de Valdivia, de Osorno o de Santiago. Las tiendas de Valdivia las adquirieron desde Santiago (cuadro 3). Según datos del Instituto de Fomento Pesquero (IFOP) (2006) estas tortugas son importadas al país desde Estados Unidos. Para el ingreso de tortugas de orejas rojas al país no hay una documentación específica, debiendo usarse las mismas medidas que se siguen para las otras especies hidrobiológicas consideradas como ornamentales. En ninguna de ellas se menciona el potencial peligro de que las tortugas sean reservorios de *Salmonella spp.* (anexo 6)

En el caso del vivero de plantas (dueño D), la totalidad de las tortugas mantenidas fueron donadas por dueños que no podían mantenerlas (cuadro 3). Esta situación es comúnmente observada en esta especie y se debe a que las tortugas son vendidas cuando son pequeñas pero alcanzan un gran tamaño, encareciendo el mantenimiento y dificultando el manejo, lo que lleva a los dueños a deshacerse de ellas, dejándolas encargadas a otras personas o simplemente abandonándolas en ríos, lagunas o pantanos (Cadi y col. 2004, Pupins 2007). Si las condiciones son favorables las tortugas son capaces de adaptarse a su nuevo ambiente y sobrevivir, es así como se han observado ejemplares aislados en diferentes regiones del

mundo² y se ha documentado el establecimiento de poblaciones con éxito reproductivo en Francia, España e Italia (Ficetola y col. 2002, Cadi y col. 2004, Pérez-Santiagosa y col. 2006). La Unión Europea, en el año 1997, prohibió la importación de tortugas de orejas rojas por el posible riesgo que constituyen para la flora y fauna de esa comunidad (Council regulation (EC) N° 338/97). El potencial invasivo de esta tortuga es tan importante que en el año 2000 fue incluida en el listado de las 100 especies invasivas a nivel mundial (Lowe y col. 2000).

6.3. IMPLEMENTACION Y MANTENCION DE LOS CONTENEDORES

Al analizar las encuestas realizadas destaca el poco conocimiento general sobre la implementación adecuada y el correcto mantenimiento:

La zona seca no estaba implementada en el 40% de los contenedores (cuadro 4) al no poder secar su cuerpo las tortugas podrían desarrollar micosis, enfermedades respiratorias y pudrición del caparazón. (Boyer y Boyer 1996)

La mayoría de los contenedores de tortugas carecían de métodos de calefacción y ninguno tenía termómetros (cuadro 4), por lo tanto, no garantizaban que la temperatura del agua estuviera en el margen recomendado para las tortugas de orejas rojas, además ningún contenedor tenía una fuente de calor focal, que permitiera a las tortugas termoregularse. Una temperatura corporal menor a la ideal reduce el metabolismo de los reptiles y les provoca estrés, especialmente afectados se ven los sistemas digestivos e inmune (Funk 1996, Mader 1996).

Al consultar sobre el manejo del agua y del sustrato, sólo el 30% de los propietarios declararon cambiar el agua dos veces a la semana o con mayor frecuencia (cuadro 5), la mitad de los contenedores carecía de equipos de filtración (cuadro 4) y la mayor parte (80%) poseía sustratos de gravilla (cuadro 6), todos estos factores favorecen la acumulación de desechos provenientes de restos alimenticios y de fecas, favoreciendo la multiplicación de organismos patógenos en el agua y la reinfección de las tortugas con ellos (Mann y Bjotvedt 1967).

Para eliminar el agua sucia durante el cambio de agua, el 40% de las personas utilizaba recipientes. Una de las personas encuestadas declaró que eliminaba el agua del contenedor mediante un sifón con una manguera (cuadro 5), realizándolo con la boca; es esperable que en los recipientes y en la manguera exista contaminación bacteriana, lo que constituye un riesgo para estas personas.

El 20% de los dueños declararon que al cambiar el agua del recipiente la eliminaban en sus baños y el 10% en su cocina. Según Barker y Bloomfield (2000) *Salmonella spp.*

² <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?fr=1&si=71> Fecha de acceso: 12 diciembre 2008.

sobrevive hasta 4 semanas en superficies húmedas en los baños incorporándose al biofilm presente y también se generan aerosoles, cuando salpica agua, que podrían contaminar otras superficies. La misma situación sucede en la cocina, con el agravante de que puede contaminar superficies destinadas a la preparación de alimentos, a los alimentos propiamente tales o a los utensilios de cocina. Según las recomendaciones del Centro de Control de Enfermedades (CDC), no se deben usar los lavaplatos para estos fines y en el caso de usar el lavamanos se debe desinfectar con cloro todas las superficies que tuvieron contacto con el agua contaminada (CDC 2007).

Sólo la mitad de los dueños permitía que su tortuga, en forma ocasional, recibiera luz de sol directa (cuadro 4), necesaria para la síntesis de Vitamina D. La falta de radiación ultravioleta en los quelonios puede ser una causa de Enfermedad Metabólica ósea (EMO), de letargia e inapetencia (Alberts 1993, Barten 1996). Una de las tortugas muestreadas, presentaba una deformación piramidal del caparazón, uno de los signos característicos de EMO.

La dieta ofrecida a las tortugas estaba principalmente basada en *Gammarus spp.* deshidratados, dejando de lado dietas más nutritivas con frutas, verduras o proteína animal (cuadro 7). La alimentación desequilibrada, basada en *Gammarus spp.* deshidratados tiene bajos niveles de vitaminas y puede ser la causa de enfermedades.

Según la “Humane Society of the United States” (HSUS) el 90% de los reptiles exportados que sobreviven el embarque y transporte mueren durante el primer año de vida debido al estrés soportado o al mal manejo realizado por parte de los nuevos dueños (HSUS 2001 b, Pupins 2007). En esta investigación se apreció el desconocimiento generalizado, ya que ni uno de los 10 dueños encuestados proveía todas las condiciones básicas para mantener sus tortugas. Todas las condiciones de manejo erróneas llevan a la tortuga a sufrir de estrés, pudiendo aumentar la eliminación de *Salmonella spp.* (Burham y col 1998, Richards y col. 2004, CDC 2008).

6.4. CONDICIONES FÍSICAS DE LAS TORTUGAS

Los resultados de la medida del largo del caparazón de las tortugas mostraron que las tortugas que estaban disponibles en las tiendas de mascotas de Valdivia no superaban los 4 cms (cuadro 8). En Estados Unidos, debido a la prohibición de 1975, no se permite la venta de tortugas menores a 10 cms. de largo, debido a que pueden ser manejadas como juguetes por niños. Sin embargo la exportación de ellas está permitida, siendo Chile uno de los importadores (IFOP 2006) Considerando que la venta de tortugas aumenta en días festivos o feriados es probable que niños sean los principales demandantes de estas tortugas. Además se encontró que las tortugas presentes en el vivero superaban los 15 cms; estos animales fueron donados, se desconocen las causas puntuales de esta donación pero se podría suponer que el desconocimiento del tamaño adulto es una de estas causas.

Las alteraciones clínicas más comunes comentadas por los dueños fueron problemas oculares y fue posible observar, al momento de tomar la muestra, una tortuga con blefaroconjuntivitis (cuadro 9). Esta alteración es una consecuencia de la alimentación deficiente en vitamina A, que lleva a cambios disqueratósicos en las glándulas lacrimales y de Harder. En un principio se manifiesta con un edema leve del párpado y con posible compromiso respiratorio, más tarde hay conjuntivitis y edema marcado del párpado que puede llevar a que se cierren los párpados, además es común la contaminación con bacterias agravando el cuadro. Debido a que las tortugas obtienen su alimento guiándose por su visión, al momento de quedar ciegas dejan de alimentarse contribuyendo a la deficiencia dietaria (Millichamp y Jacobson 1983, Boyer 1996, Williams 1996). En total 3 tortugas cursaron con alteraciones oculares, 1 al momento de la toma de muestra y otras 2 fueron señaladas mediante anamnesis (cuadro 9).

Otra de las alteraciones observadas fue una tortuga que presentaba deformación piramidal del caparazón (cuadro 9), un signo de EMO. Esta enfermedad es producto de un desbalance en la calcemia de los reptiles. Las causas son variadas: deficiencia dietaria de calcio o de precursores de vitamina D, ausencia o escasa exposición a radiación UV, balance negativo en la relación calcio/fósforo en la dieta o falla en la síntesis de vitamina D. Todos estos factores provocan la secreción de parathormona que entre otras acciones, aumenta la actividad de los osteoclastos liberando calcio de los huesos (Alberts 1993, Barten 1996). Debido a que las tortugas jóvenes no poseen el caparazón totalmente endurecido, se desvía ventralmente, especialmente en la zona del puente, producto de la tensión realizada por los músculos apendiculares (Boyer 1996).

6.5 CONOCIMIENTO SOBRE LA ZONOSIS

El 70% de los dueños de tortugas no tenía conocimiento que estas mascotas pueden ser un reservorio de *Salmonella spp.* y que puede ser una zoonosis, entre ellos están las dos tiendas de mascotas encuestadas (A y B) y 2 dueños (G y J) que habían realizado tratamientos recomendados por Médicos Veterinarios (cuadro 10), es decir, las tortugas son vendidas por personas que desconocen esta zoonosis y por lo mismo no comunican a los futuros dueños las medidas preventivas que se deben tomar al manejar estos reptiles como mascotas, más aún los Médicos Veterinarios que recomendaron tratamientos, no informaron a los dueños sobre esta zoonosis. Las 3 personas que tenían conocimiento de esta zoonosis, no se lavaban las manos luego de manipular a sus mascotas (cuadro 10), es decir, no realizaban la medida higiénica mínima requerida para evitar la zoonosis. Además en un documento del IFOP cuyo título es “Bases científicas para la elaboración de protocolos para la internación de especies ornamentales al país”, donde se detalla la cantidad de tortugas de orejas rojas importadas anualmente, se le resta importancia a esta zoonosis y sólo se comenta que en Estados Unidos el Centro de Control de Enfermedades (CDC) regula la importación de algunas tortugas por su posible impacto en la transmisión de *Salmonella spp.* (IFOP 2006). En cambio en Estados

Unidos el CDC en su página web³ y en publicaciones periódicas, informa al público del potencial zoonótico de las tortugas y reptiles en general y recomienda medidas para prevenir el contagio.

Los vendedores de las tiendas de mascotas desconocían si las tortugas habían sido sometidas a tratamientos antimicrobianos o a exámenes microbiológicos. En el presente estudio, durante la revisión bibliográfica, se encontraron datos contradictorios sobre la posibilidad de que las tortugas fueran sometidas a algún tipo de tratamiento bacteriológico; el artículo 16 del decreto exento 626 del 2001 del Ministerio de Economía (MINECOM) que fija las exigencias sanitarias para la internación a Chile de reptiles acuáticos, requiere que la autoridad oficial del país exportador emita un certificado que acredite que los animales no fueron sometidos a terapias farmacológicas (MINECOM 2001), sin embargo las granjas estadounidenses desde las que se importaran tortugas, realizan este tipo de tratamientos en forma rutinaria (Lutz 2000).

6.6. CARACTERÍSTICAS DE LA VENTA DE LAS TORTUGAS

Según los vendedores de las tiendas de mascotas muestreadas, las tortugas son los animales que tienen mayor venta, incrementándose en los días festivos y de vacaciones (cuadro 11). Si bien realizar un cálculo de la venta anual de tortugas para la ciudad de Valdivia con estos datos estaría errado, debido a que no se encuestaron a todas las tiendas presentes en Valdivia durante el periodo del estudio y los datos entregados por los vendedores en las tiendas son ambiguos, se puede tener una idea de la magnitud de tortugas presentes en la ciudad considerando que entre ambas tiendas vendían 11 tortugas en una semana aproximadamente (cuadro 11) y que en Valdivia, al momento de realizar el muestreo, existían 5 tiendas de mascotas que vendían tortugas. También se puede estimar el número de tortugas presentes en Chile considerando que entre los años 2003 a 2005 se importaron 82016 especímenes de tortugas de orejas rojas desde Estados Unidos (anexo 4). Al analizar el tamaño de las tortugas a la venta, la implementación de los contenedores y la forma en que son mantenidas por los propietarios encuestados podemos suponer que la mayor venta, sobre los otros animales ofrecidos en las tiendas de mascotas, se debe a que son consideradas como mascotas de mantención y manejos fáciles y de bajos costos.

³ <http://www.cdc.gov/Features/TurtlesSalmonella> Fecha de consulta: 8 de agosto 2008.

6.7. CONCLUSIONES

Fue posible determinar que el 13% de las tortugas estaban contaminadas con *Salmonella spp.* en sus cloacas.

Se determinó que las tortugas examinadas provienen en su mayoría desde Santiago y son importadas desde Estados Unidos. Los dueños las obtienen en su mayoría como regalos o comprándolas, sin embargo, también son donadas por otros dueños que no las pueden mantener.

Se concluyó que ninguno de los contenedores de las tortugas poseía todos los implementos necesarios y que ningún dueño proveía las condiciones de mantenimiento adecuadas para mantener a estos animales.

Las alteraciones clínicas observadas fueron blefaroconjuntivitis (1/23) y enfermedad metabólica ósea (1/23) y pueden ser producto del mal manejo.

La gran mayoría de los dueños desconoce la zoonosis, por esto no toman medidas higiénicas preventivas.

La venta de tortugas mascotas es una actividad importante dentro de las tiendas de mascotas, siendo vendidas sin restricción o recomendación por personas que desconocen esta zoonosis.

7. REFERENCIAS

- Abalem de Sá I, C Solari. 2001. *Salmonella* in brazilian and imported pet turtles. *Braz J Microbiol* 32, 293-297.
- Ackman D, P Drabkin, G Birkhead, P Cieslak. 1995. Reptile associated salmonellosis in New York State. *Pediatr Infect Dis J* 14, 55-59.
- Alberts A. 1993. Ultraviolet light and Lizards: More than meets the Eye. *The Vivarium* 5, 24-25.
- Anderson H, D Peterson, J Allard. 1971. Control of turtle-associated salmonellosis-Washington. *MMWR* 20, 93.
- Barker J, S Bloomfield. 2000. Survival of *Salmonella* in bathrooms and toilets in domestic homes following salmonellosis. *J Appl Microbiol* 89, 137-144.
- Barten S. 1996. Lizards. In: Mader (ed). *Reptile medicine and surgery*. WB Saunders, Philadelphia. Pp. 47-61.
- Bauwens L, F Vercammen, S Bertrand, J Collard, S De Ceuster. 2006. Isolation of *Salmonella* from environmental samples collected in the reptile department of Antwerp zoo using different selective methods. *J Appl Microbiol* 101, 284-289.
- Boyer T, D Boyer. 1996. Turtles, Tortoises, and terrapins. In: Mader (ed). *Reptile medicine and surgery*. WB Saunders, Philadelphia. Pp. 61-78.
- Boyer T. 1996. Hypovitaminosis A and hypervitaminosis A. In: Mader (ed). *Reptile medicine and surgery*. WB Saunders, Philadelphia. Pp. 382-384.
- Burham B, D Atchley, R DeFusco, K Ferris, J Zicarelli, J Lee, F Angulo. 1998. Prevalence of fecal shedding of *Salmonella* organism among captive green iguanas and potential public health implications. *J Am Vet Med Vet Assoc* 213, 48-50.
- Cadi A, V Delmas, A Prévot-Julliar, P Joly, C Pieau, M Girondot. 2004. Successful reproduction of the introduced slider turtle (*Trachemys scripta elegans*) in the South of France. *Aquatic Conserv: Mar Fresh Ecosyst* 14, 237-246.

- Cambre R, E Green, E Smith, R Montali, M Bush. 1980. Salmonellosis and arizonosis in the reptile collection at the national zoological park. *J Am Vet Ass* 177, 800-803.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention, Estados Unidos. 2007. Turtle-associated salmonellosis in humans - United States, 2006 - 2007. *MMWR* 56, 649-652.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention, Estados Unidos. 2008. Multistate outbreak of human *Salmonella* infections associated with exposure to turtles – United States, 2007-2008. *MMWR* 57, 69-72.
- CFR, Code of Federal Regulations, Estados Unidos. 2005. Turtles intrastate and interstate requirements. *CFR* 21 (4-1-05 edition), 694-696.
- Council Regulation (EC) N° 338/1997, on the protection of species of wild fauna and flora by regulating trade therein.
- Corrente M, A Madio, K Friedrich, G Greco, C Desario, S Tagliabue, M D’Incau, M Campolo, C Buonavoglia. 2004. Isolation of *Salmonella* strains from reptile faeces and comparison of different culture media. *J Appl Microbiol* 96, 709-715.
- Chassis G, E Gross, Z Greenberg. 1986. *Salmonella* in turtles imported to Israel from Louisiana. *J Am Vet Med Assoc* 256, 1003.
- Chiodini R, J Sundberg. 1981. Salmonellosis in reptiles: a review. *Am J Epidemiol* 113, 494-499.
- D’Aoust J, E Daley, M Crozier, A Sewell. 1990. Pet turtles: a continuing international threat to public health. *Am J Epidemiol* 132, 233-238.
- Díaz M, R Cooper, A Cloeckert, R Siebling. 2006. Plasmid mediated high-level gentamicin resistance among enteric bacteria isolated from pet turtle in Louisiana. *Appl Environ Microbiol* 72, 306-312.
- Feeley J, M Treger. 1969. Penetration of turtle eggs by *Salmonella* Braenderup. *Public Health Report* 84, 156-158.
- Ficetola G, A Monti, Padoa-Schioppa E. 2002. First record of reproduction of *Trachemys scripta* in the Po Delta. *Ann Mus civ St nat Ferrara* 5, 125-128.

- Friedman C, C Torigian, P Shillam, R Hoffman, D Hetzel, J Beebe, G Malcolm, W Dewitt, L Hutwagner, P Griffin. 1998. An outbreak of salmonellosis among children attending a reptile exhibit at a zoo. *J Pediatr* 132, 802-807.
- Frye F. 1997. The importance of calcium in relation to phosphorus, especially in folivorous reptiles. *Proceedings of the Nutrition Society* 56, 1105-1117.
- Funk R. 1996. Anorexia. In: Mader (ed). *Reptile medicine and surgery*. WB Saunders, Philadelphia. Pp. 347-348.
- Gaertner J, D Hahn, J Jackson, M Forstner, F Rose. 2008. Detection of Salmonellae in captive and free-ranging turtles using enrichment culture and polymerase chain reaction. *J Herpetol* 42, 223-231.
- Gehrmann. 1996. Evaluation of artificial lighting. In: Mader (ed). *Reptile medicine and surgery*. WB Saunders, Philadelphia. Pp. 463-465.
- Hidalgo J, C Díaz, C de Frutos, C Jimenez, N Pérez. 2006. *Salmonella* in free living terrestrial and aquatic turtles. *Vet Microbiol* 119, 311-315.
- HSUS, The humane society of the United States. 2001 a. *The trade in live reptiles: A human health threat*.
- HSUS, The humane society of the United States. 2001 b. *The trade in live reptiles: export from the United States*.
- Huges D. 2000. The contribution of the pet industry to the Louisiana economy. *Louisiana Rural Economist* 62, 4-5.
- IFOP, Instituto de Fomento Pesquero, Chile. 2006. *Bases científicas para la elaboración de protocolos para la internación de especies ornamentales al país*, proyecto 2005-17, Fondo de Investigación Pesquera.
- INN, Instituto Nacional de Normalización, Chile. 2002. Norma chilena oficial Nch 2675.Of 2002. *Productos hidrobiológicos - Detección de Salmonella*.
- Izadjoo M, C Pantoja, R Siebling. 1987. Acquisition of *Salmonella* flora by turtle hatchlings on commercial turtle farms. *Can J Microbiol* 33, 718-723.

- Kaibu H, K Lida, S Ueki, H Ehara, Y Simasaki, H Anzai, Y Toku, S Shinoro. 2006. Salmonellosis of infants presumably originating from an infected turtle in Nagasaki, Japan. *Jpn J Infect Dis* 59, 281.
- Kaufmann A, M Fox, G Morris, B Wood, J Feeley, M Frix. 1972. Turtle-associated salmonellosis 1972: III The effects of environmental salmonellae in commercial turtle breeding ponds. *Am J Epidemiol* 95, 521-528.
- Le Minor. 1984. Facultative Anaerobic Gram-Negative Rods. In: Noel R. Krieg (ed). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2^a ed. Williams & Wilkins, Baltimore, London, Pp 427-458.
- Lin-Hui S, C Cheng-Hsun. 2007. *Salmonella*: Clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med J* 30, 210-219.
- Lowe S, M Browne, S Boudjelas, M de Poorter. 2000. *100 of the World's Worst Invasive Alien Species A selection from the Global Invasive Species Database*. The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN). 12 pp.
- Lutz G. 2000. *Pet turtle production*. Southern regional aquaculture center, SRAC publication N° 439.
- Mader D. 1996. Upper alimentary tract disease. In: Mader (ed). *Reptile medicine and surgery*. WB Saunders, Philadelphia. Pp. 421-424.
- Mahajan R, S Khan, D Chandel, N Kumar, C Hans, R Chaudry. 2003. Fatal Case of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* Gastroenteritis in an Infant with Microcephaly. *J Clin Microbiol* 41, 5830-5832.
- Mann P, G Bjotvedt. 1967. *Salmonella* organism isolated from water used for storage of pet turtles. *Can J Comp Med Vet Sci* 31, 43-45.
- McCoy R, R Seidler. 1973. Potential pathogens in the environment: isolation, enumeration, and identification of seven genera of intestinal bacteria associated with small green pet turtles. *Appl Microbiol* 25, 534-538.
- Michael-Marler S, M Brown, R Siebling. 1983. Eradication of Arizona hinshawii from artificially infected turtle eggs. *Appl Environ Microbiol* 45, 748-754.

- Millichamp N, E Jacobson. 1983. Diseases of the eye and ocular adnexa in reptiles. *J Am Vet Med Assoc* 18, 1205.
- MINECOM, Ministerio de Economía fomento y reconstrucción, Chile. 2001. Decreto Exento N° 626 del 24 de septiembre de 2001.
- Mitchell M, T Adamson, C Singleton, M Roundtree, R Bauer, M Acierno. 2007. Evaluation of a combination of sodium hypochlorite and polyhexamethylene biguanide as an egg washer for red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*) to suppress or eliminate *Salmonella* organism on egg surfaces and in hatchlings. *Am J Vet Rec* 68,158-164.
- Mitscherlich E, E Marth. 1984. Microbial survival in the environment: bacteria and rickettsiae important in human and animal health. Springer-Verlag, Berlín, Alemania, Pp 802.
- Nagano N, S Oana, Y Nagano, Y Arakawa. 2006. A severe *Salmonella enterica* serotipo Paratyphi B infection in a child related to a pet turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Jpn J Infect Dis* 59, 132-134.
- Pasmans F, P de Herdt, F Haesebrouck. 2002. Presence of *Salmonella* infections in freshwater turtles. *Vet Rec* 150, 692-693.
- Pasmans F, F Van Immerseel, W Van den Broeck, E Bottreau, P Velge, R Ducatelle, F Haesebrouck. 2003. Interactions of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Munchen with intestinal explants of the turtle *Trachemys scripta scripta*. *J Comp Path* 128, 119-126.
- Pérez-Santiagosa N, C Díaz-Paniagua, J Hidalgo-Vila, A Marco, A Andreu, A Portheault. 2006. Características de dos poblaciones reproductoras del galápagos de Florida, *Trachemys scripta elegans*, en el suroeste de España. *Rev Esp Herp* 20, 5-16.
- Pupins M. 2007. First report on recording of the invasive species *Trachemys scripta elegans*, a potential competitor of *Emys orbicularis* in Latvia. *Acta Universitatis Latviensis* 723, 37-46.
- Richards J, J Brown, T Kelly, A Fountain, J Sleeman. 2004. Absence of detectable *Salmonella* cloacal shedding in free-living reptiles on admission to the wildlife centre of Virginia. *J Zoo Wildl Med* 35, 562-563.
- Rogers W, T Johnstone. 1985. *Salmonella* Poona from pet turtles-British Columbia. *Can Dis Wkly Rep* 11, 117-118.

- Rosental K, D Mader. 1996. Microbiology. In: Mader (ed). *Reptile medicine and surgery*. WB Saunders, Philadelphia. Pp. 117-125.
- Ruiz J, M Nuñez, J Díaz, M Sempere, J Gómez, M Usera. 1996. *Note*: Comparison of media for the isolation of lactose-positive *Salmonella*. *J Appl Bacteriol* 81, 571-574.
- SAG, Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. 2006. Resolución Exenta N° 3363 del 26 de julio de 2006.
- Schröter M, P Roggentin, J Hofmann, A Speicher, R Laufs, D Mack. 2004. Pet snakes as a reservoir for *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (serogrup IIIb): a prospective study. *Appl Environ Microbiol* 70, 613-615.
- Senneke D. 2003. *Trachemys scripta* (Slider) Care. *World Chelonian trust*.
- Shane M, R Gilbert, K Harrington. 1990. *Salmonella* colonization in commercial pet turtles (*Pseudemys scripta elegans*). *Epidemiol Infect* 105, 307-316.
- Siebling R, D Caruso, S Neuman. 1984. Eradication of *Salmonella* and *Arizona* species from turtle hatchlings produced from eggs treated on commercial turtle farms. *Appl Environ Microbiol* 47, 658-662.
- Siebling R, P Neal, D Granberry. 1975 a. Evaluation of methods for the isolation of *Salmonella* and *Arizona* organism from pet turtle treated with antimicrobial agents. *Appl Microbiol* 29, 240-245.
- Siebling R, P Neal, D Granberry. 1975 b. Treatment of *Salmonella-Arizona*-Infected turtle eggs with terramycin and chloromycetin by the temperature-differential egg dip method. *Appl Microbiol* 30, 791-799.
- SUBPESCA, Subsecretaria de Pesca, Chile. 1991. Ley 18.892, de 1989 y sus modificaciones, Ley General de Pesca y Acuicultura.
- SUBPESCA, Subsecretaria de Pesca, Chile. 1996. Decreto Supremo N° 96 del 26 de febrero de 1996.
- SUBPESCA, Subsecretaria de Pesca, Chile. 2003. Resolución exenta N° 2286 del 30 de septiembre de 2003.
- SUBPESCA, Subsecretaria de Pesca, Chile. 2007. Resolución N° 2572 del 29 de agosto de 2007.

- SUBPESCA, Subsecretaria de Pesca, Chile. 2008. Resolución exenta N° 2661 del 10 de octubre de 2008.
- Tauxe R, J Rigau-Pérez, J Wells, P Blake. 1985. Turtle-associated salmonellosis in Puerto Rico, hazards of the global turtle trade. *JAMA* 254, 237-239.
- U.S. Senate. 1972. Senate resolution 274. U.S. Government printing office, Washington D.C.
- Warwick C, A Lambiris, D Westwood, C Steedman. 2001. Reptile-related salmonellosis. *J R Soc Med* 94, 124-128.
- Wells J, G McConnel, G Morris. 1974. Evaluation of methods for Isolating *Salmonella* and *Arizona* Organism from pet Turtles. *Appl Microbiol* 27, 8-10.
- WHO, World Health Organization. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. Collaborating centre for reference and research on *Salmonella*.
- Williams D. 1996. Ophthalmology. In: Mader (ed). *Reptile medicine and surgery*. WB Saunders, Philadelphia.- Pp. 175-185.
- Woodward D, R Khakhria, W Johnson. 1997. Human salmonellosis associated with exotic pets. *J Clin Microbiol* 35, 2786-2790.

8. ANEXOS

ANEXO 1

a. Materiales de toma de muestra.

- Guantes estériles
- Caja isotérmica
- Regla
- Gelpack
- Tubos de vidrio con microtórulas estériles
- Agua peptonada tamponada (APT)
- Gradilla para los tubos
- Alcohol diluido en atomizador
- Papel absorbente

b. Material Microbiológico

• Medios de cultivo y reactivos

- Agua peptonada tamponada (APT)
- Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV)
- Caldo selenito/cistina (SC)
- Agar xilosa lisina-desoxicolato (XLD)
- Agar *Salmonella-Shigella* (SS)
- Agar nutritivo
- Agar triple azúcar/hierro (TSI)
- Agar urea
- Agar hierro lisina (LIA)
- Discos Orto-nitrofenilgalactopiranosido (ONPG)
- Solución salina al 85%
- Caldo Rojo de Metilo Voges-Proskauer (RM-VP)
- Creatina
- α -naftol
- Solución de hidróxido de potasio al 40%
- Caldo triptona
- Reactivo de Kovacs

• Aparatos y material de vidrio

- Placas de Petri
- Tubos de ensayo
- Tijera
- Matraces
- Mechero
- Asa de cultivo
- Guantes estériles
- Estufa de cultivo a $35 \pm 1^\circ\text{C}$
- Baño termostático a $42 \pm 1^\circ\text{C}$

ANEXO 2

a. Ficha de identificación de las tiendas de mascotas.

1.- IDENTIFICACIÓN DEL LOCAL:

- 1.1.- Nombre del local:
- 1.2.- Dirección del local:
- 1.3.- Teléfono:

2.- CONDICIONES Y MANEJOS DE LAS TORTUGAS:

- 2.1.- Procedencia de las tortugas:
- 2.2.- Tratamientos previos:
- 2.3.- Exámenes microbiológicos realizados:
- 2.4.- Fecha de ingreso al acuario
- 2.5.- Número de tortugas mantenidas:
- 2.6.- Alimentación:
- 2.6.1.- Tipo de alimentación:
- 2.6.2.- Frecuencia de alimentación:
- 2.7.- Exposición a luz ultravioleta directa:

3.- IMPLEMENTACIÓN DEL ACUARIO:

- 3.1.- Volumen del acuario:
- 3.2.- Zona seca:
- 3.3.- Iluminación:
- 3.4.- Forma de calefacción:
- 3.5.- Filtro:
- 3.5.1.- Tipo de filtro:
- 3.5.2.- Frecuencia de limpieza del filtro:
- 3.5.3.- Forma de limpieza del filtro:

4.- MANEJO SANITARIO DEL AGUA:

- 4.1.- Forma de extracción del agua:
- 4.2.- Lugar de eliminación del agua de desecho:
- 4.3.- Cantidad de agua cambiada:
- 4.4.- Declorinación del agua:
- 4.4.1.- Tipo de productos:
- 4.4.2.- Dosificación del producto:

5.- MANEJO SANITARIO DEL SUSTRATO:

- 5.1.- Tipo de sustrato del acuario:
- 5.2.- Frecuencia de limpieza del sustrato:
- 5.3.- Forma de limpieza del sustrato:

6.- VENTAS DE TORTUGAS:

- 6.1.- Días aproximados de venta del stock:
- 6.2.- Stock de tortugas ofrecido:
- 6.3.- Temporadas de mayor venta:
- 6.4.- Número de tortugas vendidas por año:

7.- OBSERVACIONES:

b. Ficha de identificación de los propietarios particulares.

1.- IDENTIFICACIÓN DEL DUEÑO:

- 1.1.- Nombre del dueño:
- 1.2.- Dirección:
- 1.3.- Teléfono:
- 1.4.- Correo electrónico:

2.- CONDICIONES Y MANEJOS DE LAS TORTUGAS:

- 2.1.- Lugar de obtención:
- 2.2.- Número de tortugas mantenidas:
- 2.3.- Tiempo de tenencia:
- 2.4.- Alimentación:
- 2.4.1.- Tipo de alimentación:
- 2.4.2.- Frecuencia de alimentación:
- 2.5.- Exposición a luz ultravioleta directa:

3.- IMPLEMENTACIÓN DEL ACUARIO:

- 3.1.- Volumen del acuario:
- 3.2.- Zona seca:
- 3.3.- Iluminación:
- 3.4.- Forma de calefacción:
- 3.5.- Filtro:
- 3.5.1.- Tipo de filtro:
- 3.5.2.- Frecuencia de limpieza del filtro:
- 3.5.3.- Forma de limpieza del filtro:

4.- MANEJO SANITARIO DEL AGUA:

- 4.1.- Forma de limpieza del agua:
- 4.2.- Lugar de eliminación del agua de desecho:
- 4.3.- Cantidad de agua cambiada:
- 4.4.- Declorinación del agua:
- 4.4.1.- Tipo de productos:
- 4.4.2.- Dosificación del producto:

5.- MANEJO SANITARIO DEL SUSTRATO:

- 5.1.- Tipo de sustrato del acuario:
- 5.2.- Frecuencia de limpieza del sustrato:
- 5.3.- Forma de limpieza del sustrato:

6.- OBSERVACIONES:

ANEXO 3

Ficha de identificación de las tortugas.

Nº Propietario cms:

Observaciones:

ANEXO 4

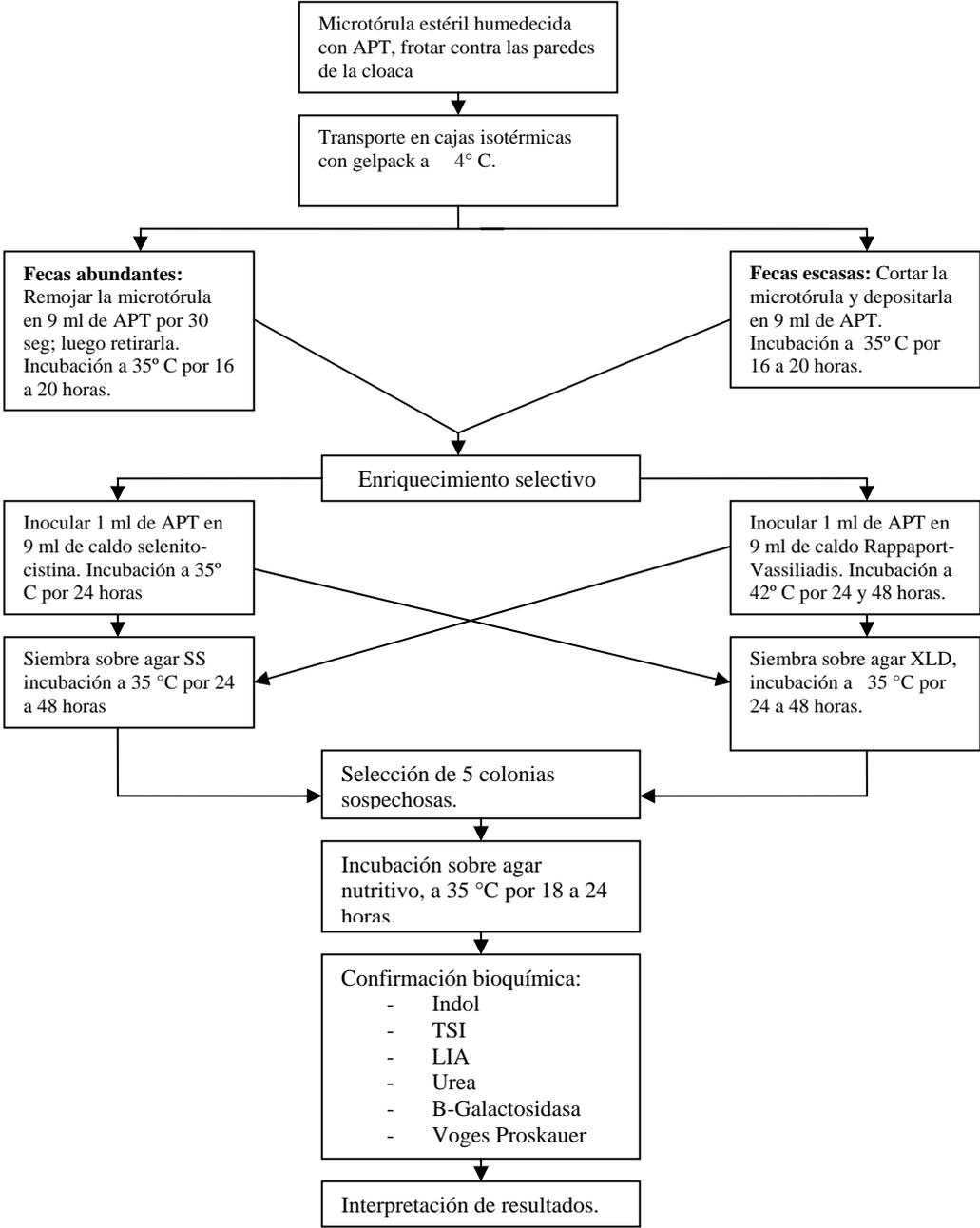
Número de tortugas importadas anualmente de Estados Unidos desde el año 2003 a 2005.

Año	Nº
2003	27.516
2004	34.500
2005	20.000
Total	82.016

Fuente: IFOP 2006.

ANEXO 5

Diagrama del procedimiento microbiológico.



ANEXO 6

REGLAMENTACIÓN DE CHILE PARA EL INGRESO DE TORTUGAS DE OREJAS ROJAS

Estas tortugas son consideradas como organismos hidrobiológicos y como especies ornamentales para efectos de las legislaciones que regulen su importación. Las instituciones encargadas de esta función son: el Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA), la Subsecretaría de Pesca (SUBPESCA) y el Servicio Nacional de Aduanas (SUBPESCA 1991). Los documentos requeridos para importar este tipo de organismos a Chile exigen certificados que acrediten o documenten (SUBPESCA 1996, MINECOM 2001, SUBPESCA 2003, SUBPESCA 2007, SUBPESCA 2008):

- Identificación del importador, exportador, centro de cultivo y transporte.
- Nombre, estado de desarrollo y número o biomasa de la especie importada.
- Que los ejemplares se encuentran libres de enfermedades de alto riesgo clasificadas en la lista 1 y 2⁴
- Que al momento de la inspección, los ejemplares no presentaron ningún signo clínico de enfermedad.
- Que fueron enviadas desde un centro de cultivo donde se les aplicó una cuarentena previa al envío.
- Que en el centro de cultivo de origen y/o vivero, durante los tres meses anteriores al envío, no se detectaron signos de enfermedad o se presentaron mortalidades inexplicadas.
- El historial clínico de cada animal.
- Que previo a la importación los ejemplares no han sido sometidos a una terapia farmacológica que pudiese enmascarar signos clínicos de una enfermedad.

Por último exigen una cuarentena de 15 días para las especies ornamentales importadas. Si hay signos de enfermedad el servicio puede prolongar la cuarentena o efectuar análisis, desinfección, vacunación, devolución, sacrificio o destrucción de los ejemplares, según corresponda (MINECOM 2001). La cuarentena tiene como fin ejecutar acciones de detección precoz de enfermedades infecto-contagiosas (SAG 2006).

⁴ Estas enfermedades están detalladas en la resolución 2572 del 29 de agosto del 2007 de la Subsecretaría de Pesca (SUBPESCA 2007).

9. AGRADECIMIENTOS

A mis padres Oscar Toledo y Fresia Montoya por su apoyo durante mi vida universitaria.

Agradezco a mi polola Rocío Páez, por su amor, por acompañarme en los momentos buenos y malos. Por estar siempre presente, siendo la mayor motivación para que este momento llegara.

A todos mis amigos con los que compartí en algún momento durante mi carrera, como olvidar todos los momentos alegres que vivimos.

A la TM. Mónica Sáez y al personal del Laboratorio de Alimentos del Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria por su cooperación y ayuda en el procedimiento microbiológico.

Por último a Carmen Electra, mi quiltra, por estar siempre a mi lado, mostrándome que siempre se puede estar más alegre.