

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ENTÉRICOS EN MUESTRAS AMBIENTALES Y CLOACALES EN *Crocodylus intermedius* Y Testudines DE LA ESTACIÓN DE BIOLOGÍA TROPICAL ROBERTO FRANCO EN VILLAVICENCIO, COLOMBIA

D. A. Pachón¹ A. P. Pulido¹ C. A. Moreno²

¹ Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

² Departamento de Ciencias para la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Los microorganismos entéricos han sido frecuentemente reportados como patógenos en mamíferos, aves, peces, reptiles y humanos, a pesar de hacer parte de su flora normal intestinal. La Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF), lidera el programa de recuperación del Caimán Llanero (*Crocodylus intermedius*), que se encuentra en inminente peligro de extinción; adicionalmente cuenta con una colección viva de Testudines que comprende más de 20 especies. Con el fin de determinar la presencia de potenciales enteropatógenos en el hábitat de los ejemplares, se obtuvieron 129 muestras ambientales y cloacales de las especies allí encontradas; se utilizó el medio de cultivo CHROMagar Orientación^{BD}® para realizar los aislamientos y la identificación microbiológica. Los resultados muestran una mayor presentación de flora gram negativa predominando microorganismos de los géneros *Escherichia coli* (28%), *Klebsiella* sp (26%), *Salmonella* sp. (6%), *Proteus* sp (3%) y *Citrobacter* sp. (1%) Sin embargo, microorganismos del género *Enterococcus* sp. (gram positivo), fueron hallados en un mayor porcentaje (31%) en todas las muestras sin importar el origen de las mismas. Conscientes del riesgo que implica el aislamiento de microorganismos entéricos que pueden presentar un carácter zoonótico, se dio inicio a la implementación de un manual de bioseguridad para la Estación con el fin disminuir el riesgo para la población humana y animal.

Palabras clave: EBTRF, flora entérica, ambiente, cloacal, CRHOMagar orientación^{bd}®, zoonosis.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ENTERIC MICROORGANISMS IN ENVIRONMENTAL AND CLOACAE SAMPLES OF *Crocodylus intermedius* AND Testudines IN THE ESTACION DE BIOLOGIA TROPICAL ROBERTO FRANCO, VILLAVICENCIO, COLOMBIA

ABSTRACT

Enteric microorganisms has been reported as pathogens for mammals, birds, fishes, reptiles and humans, in spite of being part of the normal intestinal flora. The Estación de

1. pachond@javeriana.edu.co, adriana.pulido@javeriana.edu.co
2. camorennot@unal.edu.co

Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF), leads the program of recovery of the Caiman Llanero which is in imminent extinction danger and also it has an alive collection of Testudines with more than 20 species. With the purpose of evidencing the presence of potential enteropathogens in the habitat of the animals, we collected 129 environmental and cloacae samples from the animals of the Station and we proceeded to use CHROMagar Orientation^{BD}® to isolate and identify enteric microorganisms. The results show a higher prevalence of Gram Negative Flora with predominance of *Escherichia coli* (28%), *Klebsiella* sp (26%), *Salmonella* sp (6%), *Proteus* sp (3%), and *Citrobacter* sp (1%). In spite *Enterococcus* sp. (Gram Positive) was present in a bigger percentage (31%) in all the samples without be important the origin of themselves. Aware of the risk for zoonotic microorganisms we beginning to the implementation of a biosecurity manual for the Station and this way to reduce all risk for the animal and human population.

Key words: EBTRF, enteric flora, environmental, cloacae, CRHOMagar orientation^{BD}®, zoonoses.

INTRODUCCIÓN

La Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF), adscrita a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, ubicada en la ciudad de Villavicencio, es el centro de recuperación de especies silvestres en vía de extinción más importante en el país; es una entidad encaminada al cuidado y la recuperación principalmente de ejemplares de *Crocodylus intermedius* (Caimán Llanero) y Testudines, llevando a cabo investigaciones en el ámbito sanitario, nutricional y reproductivo, lo cual permitirá en un futuro cercano la repoblación de estos ejemplares en su hábitat natural (1).

Las condiciones propias del manejo *ex situ* de la fauna silvestre pueden, en determinadas situaciones, favorecer la susceptibilidad de los ejemplares a patologías causadas por bacterias oportunistas que pueden potencializar su poder patógeno hasta colonizar diferentes tejidos u órganos generando cuadros de enfermedad; esto es fácilmente explicable por situaciones como el estrés a causa del cautiverio, fluctuaciones en la tempera-

tura medioambiental, número de microorganismos presentes, edad y estado nutricional del individuo (2, 3, 4). Estas patologías se expresan clínicamente por alteraciones en tejidos corporales y fluidos, inducción de edemas, úlceras, necrosis tisular, anemia, disminución de la actividad física, pérdida progresiva de peso, anorexia, regurgitación, diarrea, constipación, letargia con complicaciones importantes como coagulación intravascular diseminada, y de manera secundaria gota articular (5, 6, 7, 8); el ejemplo más apropiado para este tipo situación es la colonización por *Salmonella* sp que, aunque ha sido reconocida como flora comensal intestinal en reptiles (9, 10, 11, 12), bajo condiciones de estrés puede producir cuadros septicémicos. La vía de entrada del microorganismo hacia el individuo es generalmente a través del agua, el suelo o el alimento contaminado. Adicionalmente, no se puede hacer caso omiso con respecto a la presencia de estos enteropatógenos

debido a sus implicaciones en la salud pública de la Estación.

Dado que la EBTRF investiga y pretende salvar de la extinción especies representativas de la fauna colombiana, es fundamental el conocimiento de la microbiología entérica normal de estas especies para documentar y apoyar el proceso diagnóstico facilitando el manejo médico de diversas patologías, lo que fortalecerá los programas de conservación (13). Hasta el momento, países como Estados Unidos, Costa Rica, México, Alemania, Reino Unido, Bélgica y España, entre otros, han realizado estudios similares al presente en serpientes (*Vipera aspis*, *Python curtus*, *Boa constrictor*), tortugas (*Trachemys scripta elegans*, *Trachemys scripta scripta*, *Testudo graeca*) y lagartos exóticos (*Cnemidophorus lemniscatus*, *Ameiva ameiva*, *Basiliscus basiliscus*) (6, 7, 8, 14, 15, 16, 17). Cabe resaltar que este estudio es la primera descripción microbiológica de tracto entérico realizada hasta la fecha en ejemplares de *Crocodylus intermedius* en Colombia y en países de la cuenca de la Orinoquia que comparten esta especie.

Este trabajo pretendió definir con la mayor precisión analítica disponible la flora bacteriana entérica en los ejemplares de *Crocodylus intermedius* y Testudines mantenidos *ex situ* en la EBTRF. Mediante el uso de pruebas microbiológicas estándar se llevó a cabo el aislamiento y la identificación de los microorganismos entéricos a partir de muestras de hisopados cloacales y de agua / sedimento y arena / materia fecal hallada en los estanques donde se encuentran los ejemplares, de esta manera fue posible establecer los géneros de microorganismos entéricos que predominan en dichas especies. Adicionalmente, de acuerdo con los hallazgos

especialmente frente a *Salmonella*, se interpretó el potencial riesgo zoonótico de tipo laboral, y se logró por otra parte dar un aporte en la promoción de la conservación de la fauna nativa que se encuentra en peligro de extinción (18, 19).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Esta investigación se llevó a cabo en La Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF) ubicada en la ciudad de Villavicencio, Meta, centro de investigación de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá. Las condiciones climáticas muestran un régimen de lluvias unimodal con una precipitación media anual de 4085 mm, temperatura promedio de 27° C, y una humedad relativa de 77,8% (20).

La Estación cuenta actualmente con un número mayor a 200 ejemplares de *Crocodylus intermedius* distribuidos en diferentes grupos etarios donde sobresalen los neonatos y juveniles (80%) reflejando el éxito de las investigaciones en el área reproductiva; adicionalmente, la Estación posee una colección viva que supera los 300 ejemplares de tortugas terrestres nativas del país, distribuidas en más de 20 especies.

Población muestral

El muestreo se realizó sobre la totalidad de estanques ($N_e = 52$) de la Estación. El total de animales muestreados de forma indirecta (arena / materia fecal; agua / sedimento) es de 29 caimanes adultos (4 años en adelante) distribuidos en 8 estanques, 118 ejemplares juveniles (3-4 años) ubicados en 8 estanques, y 80 caimanes neonatos (1-2 años) distribuidos en 9 estanques. Los ~300 ejemplares del

Orden Testudinea se encontraban distribuidos en 27 estanques en cada uno de los cuales se encuentran animales de diferentes especies algunas de ellas en peligro de extinción.

Obtención de muestras

Se realizaron tres muestreos con una diferencia aproximada de 15 días entre cada uno.

Hisopado cloacal

Crocodylus intermedius neonatos: se introdujo a través de la cloaca un hisopo estéril y se realizaron movimientos suaves de rotación sobre la mucosa; inmediatamente el hisopo se depositó en una bolsa de cierre hermético, a la cual, previamente se le incorporaron 10 ml de caldo lactosado 2% estéril, con el fin de evitar la deshidratación y contaminación de la muestra (10, 12, 14). Se muestreó aleatoriamente el 25% de los ejemplares neonatos (menores de 1 año) encontrados en cada estanque.

Testudines: se evaluó el 25% de la población presente en cada estanque empleando el mismo criterio de muestreo usado para los caimanes neonatos.

Muestreo de agua y sedimento de los estanques

Crocodylus intermedius neonatos y Testudines ($n_e = 36$): se homogeneizó el agua de los estanques y posteriormente, con ayuda de una jeringa estéril de 50 cc conectada a una sonda estéril de 50 cm de longitud, se realizó aspirado del fondo del estanque obteniendo una muestra total de 250 ml de agua y sedimento, ésta se depositó en bolsas de cierre hermético. Se empleó una jeringa y una sonda por cada estanque.

Crocodylus intermedius adultos y juveniles: directamente de los sistemas de evacuación y desagüe de los respectivos estanques ($n_e = 16$) se colectaron en una bolsa aproximadamente 250 ml de agua y sedimento.

Muestreo de arena y materia fecal de los estanques

Se abarcó la totalidad de la playa de cada encierro, llevando a cabo un muestreo significativo en 5 puntos del terreno conformando la letra Z (21), se realizó una excavación aproximadamente de 10 cm de profundidad y a partir de este punto se obtuvo una muestra de 250 g de arena. Adicionalmente, en caso de hallar materia fecal sobre la arena, ésta se colectó de inmediato.

Conservación y transporte de las muestras

Todas las muestras se remitieron en bolsas de cierre hermético debidamente identificadas y se garantizó que llegarán al laboratorio de procesamiento en la ciudad de Bogotá en un periodo de tiempo máximo de 6 horas (22); dichas muestras fueron transportadas en refrigeración y se procesaron en el laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.

Fase analítica

Aislamiento: todas las muestras se cultivaron siguiendo el respectivo protocolo de aislamiento en el medio de cultivo CHROMagar Orientación^{BD®}; posteriormente se incubaron durante 24-48 horas a una temperatura de 37° C.

Identificación preliminar de los cultivos: el reconocimiento de los microorga-

nismos en el CHROMagar Orientación^{BD}® se realizó siguiendo las especificaciones del productor (23) planteadas en la tabla 1.

TABLA 1. Apariencia de los microorganismos en CHROMagar Orientación^{BD}®

Microorganismo	Apariencia de las colonias	Pruebas confirmatorias
<i>E. coli</i>	Colonias rosadas, transparentes, de tamaño medio con o sin halos alrededor	-
Grupo <i>KES</i> *	Colonias de tamaño medio y pigmento azul oscuro	BBL Crystal E/NF, Indol
Grupo <i>PMP</i> **	Colonias beige o crema redondeadas por halos marrón	BBL Crystal E/NF, Indol
<i>Enterococcus</i> sp.	Colonias verde azul de tamaño pequeño	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Colonias pequeñas con pigmento verde, azul claro,	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Colonias pequeñas color púrpura, opacas con o sin halos	Disco de 5 µg novobiocina
Otros (Incluyendo <i>Salmonella</i> sp.)	Colonias sin pigmento, color crema	Identificación bioquímica y serológica

* *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp y *Serratia* sp.

** *Proteus* sp., *Morganella* sp. *Providencia* sp.

RESULTADOS

Microorganismos aislados en el total de estanques de la EBTRF

Los aislamientos obtenidos en el CHROMagar Orientación^{BD}® fueron comparados con la guía de identificación colorimétrica de las colonias proporcionada por el productor, y se estableció una mayor prevalencia de microorganismos gram negativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, encontrándose bacterias del género *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Proteus* sp. *Citrobacter* sp. y *Salmonella* sp. Adicionalmente, se identificaron microorganismos gram positivos como *Staphylococcus saprophyticus* y *Enterococcus* sp. En la figura 1 se resumen los resultados finales. Los microorganismos pertenecientes al género *Enterococcus* sp. se aislaron en 31% de

las muestras, seguido por las enterobacterias *Escherichia coli* (28%) y *Klebsiella* sp. (26%) donde el porcentaje de aislamientos entre una y otra no evidencia una diferencia sustancial.

Microorganismos aislados en Testudines y su hábitat

En la figura 2 se puede observar el porcentaje de presentación de los microorganismos aislados por muestra para el grupo de testudines; teniendo en cuenta que en este estudio no se realizó una diferenciación por especie, es posible evidenciar de manera general la abundante presencia del género *Enterococcus* sp. en cada una de las muestras, así: agua / sedimento 34%, arena / materia fecal 26%, e hisopado cloacal respectivamente, 33%.

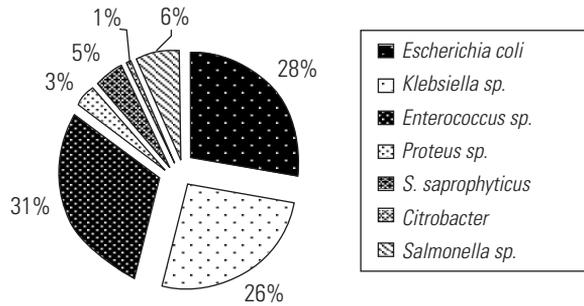


FIGURA 1. Microorganismos aislados en los estanques de la EBTRF

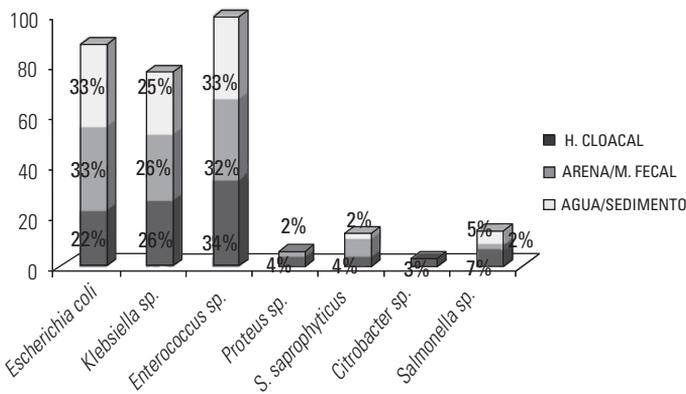


FIGURA 2. Microorganismos aislados en las muestras obtenidas a partir de Testudines en la EBTRF

Microorganismos aislados en *Crocodylus intermedius* y su hábitat

Los datos obtenidos para los ejemplares del orden Crocodylia se encuentran reportados en la figura 3, donde es evidente el porcentaje de presencia de cada microorganismo según el tipo de muestra.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron analizados mediante estadística descriptiva y su interpretación se facilitó con la elaboración de tablas, histogramas y gráficos, entre otros.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Poco se conoce sobre el impacto de las enfermedades infecciosas bacterianas en las poblaciones de reptiles y sobre el papel que varios microorganismos puedan desarrollar como agentes patógenos (15). Por esta razón, es necesario ampliar el conocimiento sobre esta clase de animales para comprender dichos procesos patológicos y realizar manejos médicos adecuados debido a que se reconoce que las enfermedades infecciosas son una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en reptiles dada la inmunosupresión generada por el estado de cautiverio (24).

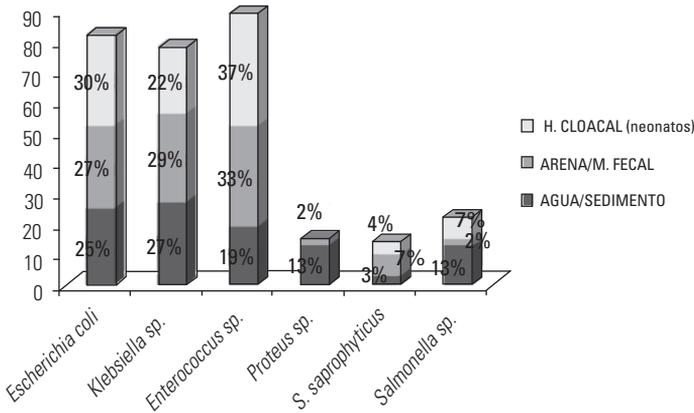


FIGURA 3. Microorganismos aislados en las muestras obtenidas a partir de Crocodylia en la EBTRF

En la Figura 2 se puede establecer que los hallazgos concuerdan con el realizado por Sunderland y Veal (25), al predominar flora gram negativa en los aislamientos, grupo donde se encuentran incluidos los patógenos bacterianos más comunes en los reptiles (24); sin embargo, *Enterococcus sp.* (gram positivo), estuvo presente en un mayor porcentaje (31%) en todas las muestras trabajadas sin importar el origen de las mismas, y aunque las bacterias gram positivas no se consideran patógenas en reptiles por encontrarse generalmente como flora nativa natural, presentan comportamiento oportunista y pueden generar enfermedad en los individuos (24). Desde este punto de vista, muchos de los aislamientos identificados en este estudio se consideran no solo potencialmente patógenos para el hospedador sino también potencialmente zoonóticos, tal como lo son *Citrobacter sp.*, *E. coli* y *Salmonella sp* (6, 26, 27).

Por otra parte, en la figura 3 es posible observar el porcentaje de recuperación de los microorganismos en las muestras de agua / sedimento y arena / materia fecal respectivamente en los estanques

de Testudines muestreados, y se puede notar que en estos dos tipos de muestra evaluados hubo una mayor prevalencia de microorganismos del género *Enterococcus sp* (32%), *Escherichia coli* (28%) y *Klebsiella sp* (26%); sin embargo, se observa que en las muestras de agua / sedimento se recuperaron más microorganismos que en las de arena / materia fecal, aunque los porcentajes de presentación no variaron significativamente entre las muestras. Adicionalmente, se tuvieron en cuenta los microorganismos encontrados a partir de muestras de hisopados cloacales de animales del Orden Testudinata, donde a su vez puede establecerse que hubo una variación en el porcentaje de presentación de *Klebsiella sp.* frente a *Escherichia coli* puesto que a diferencia de las otras muestras, este último microorganismo se encontró en menor proporción. Simultáneamente, se puede concluir mediante la observación de la gráfica que la recuperación de microorganismos fue menor para este tipo de muestra.

Para los ejemplares de Orden Crocodylia, la prevalencia de los microorganismos

mos entéricos fue muy similar a los aislamientos obtenidos en Testudines; sin embargo, tal como se puede observar en la figura 4 existe una marcada variación en los porcentajes de microorganismos aislados a partir de agua / sedimento respecto al comportamiento presentado en las muestras de Testudines evaluadas previamente y los resultados obtenidos en arena / materia fecal e hisopado cloacal en ejemplares de caimán. Es así como en las muestras de agua / sedimento obtenidas a partir de estanques de caimán, hubo una mayor prevalencia de microorganismos del género *Klebsiella* sp. (27%) y, contrario a lo encontrado en otros tipos de muestras se obtuvo 19% de aislamientos de *Enterococcus* sp. La composición y diversidad de especies de enterococos en las heces de animales silvestres parece depender sobre todo de la alimentación y las condiciones del ambiente en el que se desarrolla el ciclo vital del hospedador; así, los animales *ex situ* o de hábitats periurbanos o que tienen una dieta oportunista son los que presentan una mayor diversidad de enterococos. Por el contrario, cuando existe una especialización en un alimento o habitan en ambientes con menor influencia de la actividad humana se encuentra una menor diversidad del microorganismo (26). De igual forma, en un estudio realizado por Mundt (28), se obtuvo un 85,7% de recuperación de *Enterococcus* sp. a partir de muestras fecales de reptiles, el alto porcentaje de recuperación de estos microorganismos es interesante debido a la marcada diferencia en temperatura corporal entre reptiles y mamíferos; en consecuencia se puede decir que las bacterias aisladas, a pesar de ser mesófilas, pueden tener una adaptación a la temperatura llegando a desarrollarse a temperaturas

inferiores de lo esperado. También se han aislado *Citrobacter* sp., *Klebsiella* sp. y *Proteus* sp., las cuales aunque son flora normal, bajo ciertas condiciones pueden llegar a producir septicemias, enterocolitis y diarreas; *Escherichia coli* puede generar dolor abdominal, diarrea, vómitos y fiebre; *Klebsiella*, presenta un comportamiento oportunista y produce enfermedades respiratorias; las principales lesiones posmortem encontradas son poliartritis, peritonitis y meningoencefalitis, las cuales se caracterizan por presentar material mucopurulento en la cavidad peritoneal y encefálica (4, 7, 26, 29); por último, *Citrobacter* sp. ha sido implicado en enfermedades sistémicas en tortugas y alteraciones intestinales (4, 7), por ello el conocimiento de la comunidad microbiana normal en estas especies tan amenazadas permite una mayor capacidad de identificar la participación de las bacterias en posibles procesos infecciosos y facilitar la prevención de estas enfermedades mediante tratamientos y rutinas con desinfectantes convencionales (30, 31).

Un dato de suma importancia es el hallazgo de enterobacterias del género *Salmonella* sp. dado que si bien es cierto que el microorganismo hace parte de la flora comensal de los reptiles, y que su aislamiento en Testudines de diferentes familias ha sido reportado con mayor frecuencia (12, 16, 17, 32, 33), no se puede ignorar el hecho de que para todos los individuos evaluados, las condiciones de cautiverio pueden llegar a generar cuadros de inmunosupresión marcada donde la enterobacteria es excretada de manera intermitente (9, 11, 34) llegando a producir estados patológicos caracterizados por letargia, anorexia, septicemia, pneumonia, celomitis,

abscesos, shock hipovolémico y, bajo circunstancias extremas, la muerte del ejemplar (29, 35). Sin embargo, en un estudio retrospectivo (1997-2008) realizado en la EBTRF, donde se evaluaron los casos de patologías asociadas a bacterias, no se presentó ningún reporte de aislamientos de *Salmonella* sp. tanto en ejemplares de *Crocodylia* como Testudínea. Otro aspecto relevante de la presencia de *Salmonella* sp. es su carácter zoonótico ya que los aislamientos y la clasificación de la bacteria a partir de reptiles se han considerado como patógenos para humanos, al poseer factores de virulencia cruciales en el desarrollo de gastroenteritis (4, 17, 36).

Esta información demuestra la importancia de los resultados ya que en la EBTRF se ha confirmado la presencia de la enterobacteria *Salmonella* sp. en un porcentaje no discriminable tanto en los animales como en su hábitat natural, por lo cual se han programado jornadas educativas con el fin de concientizar al personal que labora en sus instalaciones y que se encuentra en un potencial riesgo de contraer salmonelosis asociada a reptiles; debido a los resultados obtenidos en el estudio la Estación inmediatamente reforzó las medidas de bioseguridad pertinentes y se dio inicio a la implementación de un manual de bioseguridad con el fin prevenir todo riesgo para la población humana y animal.

Es necesario conocer la particular población saprófita en los reptiles debido a que cualquier causa que altere este equilibrio puede desencadenar patologías digestivas o sistémicas; sin embargo, este tipo de afecciones se encuentran condicionadas por el grado de compromiso que presente el sistema inmunológico del animal (7); tal condición se verifica

probablemente porque los sujetos inmunosuprimidos no son capaces de responder adecuadamente a una infección, favoreciendo así la proliferación masiva de bacterias presentes en individuos sanos (25, 33). Adicionalmente, hasta el momento se han realizado análisis como este en otras especies de reptiles (como serpientes y tortugas); no obstante, la información que se ofrece en este trabajo es la primera descripción microbiológica realizada hasta la fecha en las especies de *Crocodylus intermedius* manejadas en Colombia.

La población bacteriana recuperada no permite establecer o enfatizar en demasiadas consecuencias evolutivas o adaptativas sin la realización de estudios adicionales; por lo tanto, las investigaciones acerca de la flora bacteriana en animales silvestres son de fundamental importancia pues permiten conocer el papel que juegan estos microorganismos en las enfermedades infecciosas y como afectarán la supervivencia de las poblaciones de reptiles en las condiciones *in situ* dentro del equilibrio biológico de estos vertebrados. Con base en ello, el conocimiento de la microbiología cloacal de estas especies es fundamental para diagnosticar desórdenes de la flora digestiva así como para prevenir procesos secundarios a estrés e inmunosupresión; todo ello dirigido a optimizar programas de conservación como los implementados a diario en la Estación de Biología Tropical Roberto Franco.

CONCLUSIONES

- Se logró aislar e identificar mediante el medio de cultivo CHROMagar Orientación^{BD}® los microorganismos entéricos en muestras ambientales y cloacales de ejemplares de Testunines

y *Crocodylus intermedius* mantenidos en cautiverio en la Estación de Biología Tropical Roberto Franco en la ciudad de Villavicencio, estableciendo una mayor prevalencia de *Enterococcus* sp. (31%) en todas las muestras procesadas, aunque hubo mayor presentación de flora gram negativa en todas las muestras.

- Se comprueba que ninguna metodología para el aislamiento de microorganismos entéricos es por sí sola suficientemente efectiva para la recuperación de los mismos; de esta manera se deduce que se debe emplear más de un tipo de muestra para obtener mayor porcentaje de resultados positivos.
- El conocimiento de la flora intestinal de este tipo de ejemplares es importante para entender los riesgos potenciales de la zoonosis en la Estación.
- Este documento es el primer reporte sobre microbiología entérica en ejemplares de *Crocodylus intermedius* en Colombia, siendo un aporte básico para los programas de reproducción y repoblamiento de la especie.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia.

Agradecimiento especial a Becton Dickinson Colombia Ltda. por la dotación de medios de cultivo, kit de identificación y sensidiscos.

Al equipo humano de la Estación de Biología Tropical Roberto Franco por toda su colaboración, y especialmente a su directora profesora María Cristina Ardila por sus aportes al trabajo.

Sugerencia: los ejemplares de la EBTRF son portadores asintomáticos de *Salmonella* sp, por lo cual se deben implementar medidas de control que minimicen su potencial como patógeno oportunista, desencadenando cuadros clínicos de salmonelosis. Igualmente, es necesario llevar a cabo un estudio que permita la serotipificación de los aislamientos obtenidos y de esta forma evaluar su potencial zoonótico.

REFERENCIAS

1. Ardila MC, Galvis G, Lugo M. Informe Final Proyecto Programa para la Conservación del Caimán del Orinoco *Crocodylus intermedius*. Bogotá: Colciencias, Universidad Nacional de Colombia; 1998.
2. Bejarano P. Estructura genética de las poblaciones "ex situ" de *Crocodylus intermedius* en Colombia mediante marcadores AFLP'S. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2001. Tesis de Grado.
3. Cárdenas R. Evaluación de dos sistemas de alimento formulado para el Caimán del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) y babilla (*Caimán crocodilus*) juveniles. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 1994. Tesis de Grado.
4. Mader D. Reptile Medicine and Surgery. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1996.
5. Jertborn M, Hagling P, Iwarson S, Svennerholm, M. Estimation of symptomatic and asymptomatic *Salmonella* infections. J Infect Dis 1990; 22: 451-455.
6. Johnson-Delaney CA. Reptile zoonoses and threats to public health (20-33). In: Mader DR (ed). Reptile Medicine and Surgery. Philadelphia: Saunders.
7. Martínez A, Silveira L, Mateo JA, Urioste J, Rodríguez MA, Pether J. Microbiología cloacal en lagartos gigantes amenazados de las Islas Canarias (género *Gallota*) en Cautividad. Rev Esp Herp 2003; 17: 29-37.
8. Monzon C, Ojeda A, Mecherta A, Usera M. Occurrence of *Salmonella* in cold blooded

- animals in Gran Canaria, Canary Islands. *Antonie van Leeuwenhoek* 1995; 68: 191-194.
9. Bradley T, Angulo F, Mitchell M. Public health education on *Salmonella* spp. and reptiles. *JAVMA* 2001; 754-755.
 10. Chambers D, Hulse A. *Salmonella* Serovars in the Herpetofauna of Indiana County, Pennsylvania. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72 (5): 3771-3773.
 11. Ebani VV, Cerri D, Fratini F, Meille N, Valentini P, Andreani E. *Salmonella enterica* isolates from faeces of domestic reptiles and a study of their antimicrobial in vitro sensitivity. *J Vet Sci* 2005; 78: 117-121.
 12. Saelinger C, Lewbart G. Prevalence of *Salmonella* spp in cloacal, fecal, and gastrointestinal mucosal samples from wild North American turtles. *JAVMA* 2006; 229: 266-273.
 13. Lugo LM. Cría del caimán del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) en la estación de Biología Tropical Roberto Franco, Villavicencio, Meta. *Rev Acad Col Cien* 1995; 19 (4): 601-606.
 14. Crawford G, Jackson JR, Jackson M. The Frequency of *Salmonella* and Arizona microorganisms in zoo turtles. *Journal of Wildlife Diseases* 1971; 7: 130-132.
 15. Glazebrook JS, Campbell RSF. A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. II. Oceanarium-reared and wild turtles. *DAO* 1990; 9: 97-104.
 16. Hidalgo J, Díaz C, Pérez N, De Frutos C, Herrero A. *Salmonella* in free living exotic and native turtles and in pet exotic turtles from SW Spain. *J Vet Sci* 2008; 85: 449-452.
 17. Pasmans F, De Herdt P, Dewulf J, Haesebrouk F. Pathogenesis of infection with *Salmonella enteric subsp. enterica* serovar Muenchen in the turtle *Trachemys scripta scripta*. *Vet Microbiol* 2002; 87: 315-325
 18. Ministerio del Medio Ambiente. Tortugas Marinas y Continentales. Programa Nacional para la Conservación. Dirección General de Ecosistemas; 2002.
 19. Rodríguez M, Ramírez J. *Crocodylus intermedius* (caimán llanero) ex situ en la Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF), Colombia (78-132). En: Velasco A, Colomine G, Villarroel G, Quero M. (eds). *Memorias del taller para la conservación del caimán del Orinoco (Crocodylus intermedius) en Colombia y Venezuela*; 2000.
 20. Ramírez P, Burbano C. *Crocodylus intermedius* (caimán llanero) ex situ en la Estación de Biología Tropical Roberto Franco (78-132). En: Velasco A, Colomine G, Villarroel G, Quero M. (eds). *Memorias del Taller para la Conservación del Caimán del Orinoco (Crocodylus intermedius) en Colombia y Venezuela*. 2002.
 21. Petersen RG, Calvin D. *Methods of Soil Analysis, Part 1*. 2 ed. Agronomy 2006; 9 (1): 33-51.
 22. Luna G. Manual operativo de análisis microbiológicos para alimentos. Bogotá: Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano; 1991.
 23. Merlino J, Siarakas S, Robertson GJ, Funnel GR, Gottlieb T, Bradbury R. Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of Gram Negative bacilli and *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol* 1996; 34, 1778-1793.
 24. Rosenthal KL, Mader DR. Microbiology: fungal and bacterial diseases of reptiles - bacterial diseases. In: Mader DR (ed.). *Reptile medicine and surgery*. 2. ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2006. cap. 16, p. 227-238.
 25. Sunderland R, Veal J. An investigation into the faecal flora of clinically healthy tortoises. *Testudo*. *J British Chel Gr* 2001; 5: 23-34.
 26. Ballesteros C. Estudio y caracterización de aislados de *Enterococcus* sp. obtenidos de aves silvestres. Madrid: Universidad Complutense; 2003. Trabajo de Grado.
 27. Siebeling R, Neal P, Granberry D. Treatment of *Salmonella* - Arizona infected turtle eggs with terramycin and chloromycetin by the temperature differential egg dip method. *Appl Microbiol* 1975; 30 (5): 791-799.
 28. Mundt O. Occurrence of *Enterococci* in animals in a wild environment. *Appl Microbiol* 1963; 11.
 29. Frye FL. Infectious diseases. Fungal actinomycete, bacterial, rickettsial and viral diseases (101-160). In: Frye FL. *Biomedical and Sur-*

- gical Aspects of Captive Reptile husbandry. Melbourne: Krieger; 1991.
30. Johnson JH, Benson PA. Laboratory reference values for a group of captive ball pythons (*Python regius*). AJVR 1996; 57: 1304-1307.
 31. Mitchell J, Mc Avoy B. Enteric Bacteria in Natural Populations of Freshwater turtles in Virginia. Virg J Sci 1990; 41 (3): 233-244.
 32. Hidalgo J, Díaz C, Jiménez C. *Salmonella* in free living terrestrial and aquatic turtles. Vet Microbiol 2007; 119: 311-315.
 33. Santoro M, Orrego CM, Hernández G. Flora bacteriana cloacal y nasal de *Lepidochelis olivacea* (Testudines: Cheloniidae) en el pacifico norte de Costa Rica. Rev Biol Trop 2005; 54: 43-48.
 34. Chiodini RJ, Sundberg JP. Salmonellosis in reptiles: a review. Am J Epidemiol 1981; 113: 494-499.
 35. Onderka DK, Finlayson MC. Salmonellae and salmonellosis in captive reptiles. Can J Comp Med 1985; 49: 268-270.
 36. Ardila MC, Barahona P, Bonilla C, Cárdenas R. Aportes al conocimiento de la reproducción, embriología y manejo de *Crocodylus intermedius* en la Estación de Biología Tropical Roberto Franco de Villavicencio. Rev Acad Col Cien 1999; 23: 417-424.