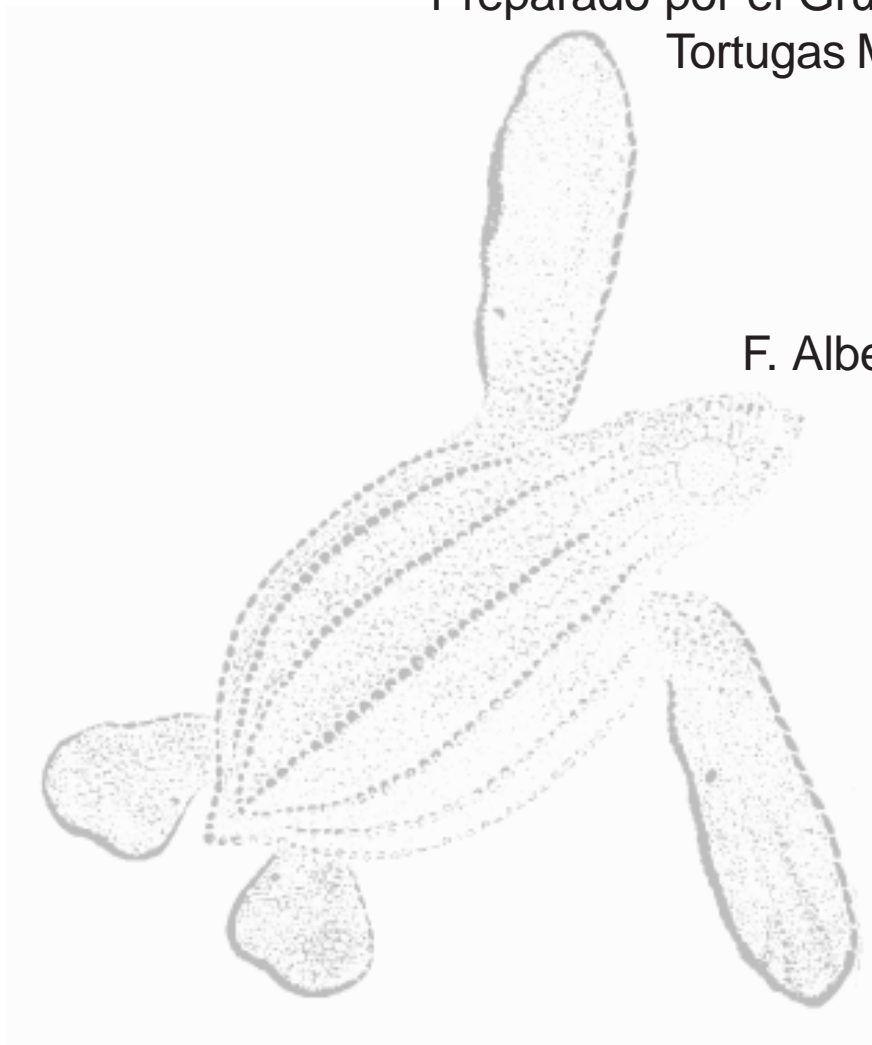


Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas

Preparado por el Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE

Editado por
Karen L. Eckert
Karen A. Bjorndal
F. Alberto Abreu-Grobois
M. Donnelly

Traducido al español por
Raquel Briseño-Dueñas
F. Alberto Abreu-Grobois
con la colaboración de
Laura Sarti Martínez
Ana Barragán Rocha
Juan Carlos Cantú
Ma. del Carmen Jiménez
Jaime Peña



WWF



CMS



SSC



NOAA



MTSG



CMC

El desarrollo y publicación de *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas* fué posible gracias al apoyo generoso de Center for Marine Conservation, Convention on Migratory Species, U.S. National Marine Fisheries Service y el Worldwide Fund for Nature.

©2000 SSC/IUCN Marine Turtle Specialist Group

La reproducción de esta publicación para fines educativos u otros propósitos no comerciales está autorizado sin permiso por el titular del derecho de autor, mientras que la fuente sea citada y que el titular reciba una copia del material reproducido.

La reproducción para fines comerciales está prohibida sin previa autorización del titular del derecho de autor.

ISBN 2-8317-0580-0

Impreso por Consolidated Graphic Communications, Blanchard, Pennsylvania USA

Material artístico para la cubierta, por Tom McFarland- Cría de tortuga laúd, *Dermochelys coriacea*

La cita correcta para esta publicación es la siguiente: Eckert, K. L., K. A. Bjorndal, F. A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (Editores). 2000 (Traducción al español). *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas*. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4.

Para adquirir copias de esta publicación, por favor solicitarlas a:

Marydele Donnelly, MTSG Program Officer
IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group
1725 De Sales Street NW #600
Washington, DC 20036 USA
Tel: +1 (202) 857-1684
Fax: +1 (202) 872-0619
email: mdonnelly@dccmc.org

Presentación

En 1995 el Grupo Especialista en Tortugas Marinas (MTSG por sus siglas en inglés) publicó una *Estrategia Mundial para la Conservación de Tortugas Marinas*. En ella, se definen lineamientos sobre los cuales se deben encauzar los esfuerzos para recuperar y conservar a poblaciones de tortugas marinas reducidas drásticamente o en proceso de declinación, en todo el ámbito de su distribución global. Como elementos singulares en la estructura funcional de ecosistemas complejos, las tortugas marinas sostienen una relación importante con hábitats costeros y oceánicos. Por ejemplo, contribuyen a la salud y el mantenimiento de los arrecifes coralinos, praderas de pastos marinos, estuarios y playas arenosas. La *Estrategia* respalda programas integrales orientados a prevenir la extinción de las especies y promueve la recuperación y el sostenimiento de poblaciones saludables de tortugas marinas que realizan eficientemente sus funciones ecológicas.

Las tortugas marinas y los humanos han estado vinculados desde los tiempos en que el hombre se estableció en las costas e inició sus recorridos por los océanos. Por innumerables generaciones, las comunidades costeras han dependido de las tortugas marinas y sus huevos para la obtención de proteínas y otros productos. En muchas regiones, esta práctica aún continúa. Sin embargo, durante el transcurso del siglo XX, el incremento en la comercialización intensiva de los productos de tortuga marina ha diezmando muchas poblaciones. Debido al complejo ciclo de vida de las tortugas marinas -en este proceso los individuos migran entre varios hábitats que pueden incluir la travesía de toda una cuenca oceánica- para su conservación, se requiere de una planeación del manejo con un enfoque de cooperación internacional, que reconozca la interconexión entre hábitats, de poblaciones de tortugas marinas y de poblaciones humanas, en tanto que se aplique el mejor conocimiento científico disponible.

A la fecha, nuestro éxito para llevar a cabo cualquiera de ambas tareas ha sido mínimo. Las especies de tortugas marinas están catalogadas como “En peligro crítico”, “En peligro” o “Vulnerable” por la Unión Mundial para la Naturaleza (UICN). La mayoría de las poblaciones han disminuido inexorablemente como secuela de las prácticas de extracción no sustentables para el aprovechamiento de su carne, concha, aceite, pieles y huevos. Decenas de miles

de tortugas mueren cada año al ser capturadas accidentalmente en artes de pesca activas o abandonadas. Asimismo, muchas áreas de anidación y alimentación han quedado inhabilitadas o presentan un franco deterioro, por los derrames de petróleo, acumulación de desechos químicos, plásticos no-degradables y otros desechos antropogénicos; aunado a los desarrollos costeros de alto impacto y, al incremento del turismo y la diversificación de estas actividades tanto en la zona costera como en la oceánica.

Para reforzar la supervivencia de las tortugas marinas, es indispensable que en todos los países localizados en las áreas de distribución de estas especies, el personal que realice los trabajos de conservación en el campo, recurra a lineamientos estandarizados y a criterios apropiados. Las técnicas de conservación y manejo estandarizadas promueven la recopilación de datos comparables y hacen posible el compartir los resultados entre los países y regiones.

En tanto que este manual tiene el propósito de cubrir la necesidad de lineamientos y criterios normalizados, reconoce a la vez, que un sector creciente de interesados en el trabajo de campo y tomadores de decisiones requieren orientación sobre las siguientes interrogantes: ¿cuándo y por qué seleccionar una opción de manejo entre las disponibles? y ¿cómo instrumentar efectivamente la opción seleccionada y evaluar los logros obtenidos?

El Grupo Especialista en Tortugas Marinas de la UICN considera que un manejo apropiado no puede realizarse sin el soporte de una investigación de alta calidad enfocada, en la medida de lo posible, hacia temáticas críticas para la conservación. Nuestra intención es que este manual sea de provecho a los interesados en la protección y manejo de las tortugas marinas de todo el mundo. Reconociendo que los programas con mayores logros, combinan las técnicas de censo tradicionales con el manejo de bases de datos electrónicas y el análisis genético con telemetría satelital; tecnologías que apenas podrían ser vislumbradas por los conservacionistas de la generación anterior, dedicamos este manual a los conductores del manejo y conservación de los recursos naturales del siglo XXI, quienes enfrentarán los cada vez más complejos retos de una administración apropiada. Esperamos que encuentren en este manual un entrenamiento y asesoría útiles.

Karen L. Eckert
Karen A. Bjorndal
F. Alberto Abreu Grobois
Marydele Donnelly
Editores

Agradecimientos

Congruente con el espíritu y estructura del Grupo Especialista en Tortugas Marinas de la Unión Mundial para la Naturaleza (MTSG/IUCN, por sus siglas en inglés), este manual es el resultado de los esfuerzos de colaboración de científicos y tomadores de decisiones situados alrededor del mundo. Los Editores estamos profundamente agradecidos por el apoyo y estímulo brindado por nuestros colegas así como por su buena disposición en compartir datos, experiencias y sabiduría. Tenemos una especial deuda con los autores y coautores - más de 60- que hicieron posible este manual, y con todos aquellos especialistas que participaron en el proceso de revisión crítica.

Las siguientes personas, con su revisión experta, contribuyeron sustancialmente a la obtención de la calidad final del manual: Ana Barragán (Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México); Anna Bass (University of Florida, USA); Miriam Benabib (Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México); Alan Bolten (University of Florida, USA); Annette Broderick (University of Wales Swansea, UK); Deborah Crouse (Fish and Wildlife Service, USA); Andreas Demetropoulos (Ministry of Agriculture and Natural Resources, Cyprus); Peter Dutton (National Marine Fisheries Service, USA); Scott Eckert (Hubbs-Sea World Research Institute, USA); Nat Frazer (University of Florida, USA); Jack Frazier (CINVESTAV, México); Marc Girondot (Université Paris 7-Denis Diderot, France); Brendan Godley (University of Wales Swansea, U.K.); Hedelvy Guada (WIDECAS, Venezuela); Julia Horrocks (University of the West Indies, Barbados); George Hughes (KwaZulu-Natal Nature Conservation Service, South Africa); Naoki Kamezaki (Sea Turtle Association of Japan); Rhema Kerr (Hope Zoological Gardens, Jamaica); Jeffrey Miller (Queensland Department of Environment and Heritage, Australia); Jeanne Mortimer (Conservation and National Parks, Republic of the Seychelles); Wallace J. Nichols (University of Arizona, USA); Joel Palma (World Wildlife

Fund-Philippines); Claude Pieau (Institut Jacques Monod, Paris, France); Henk Reichart (STINASU, Suriname); Rodney Salm (IUCN, Eastern Africa Regional Office); Laura Sarti M. (Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México); Barbara Schroeder (National Marine Fisheries Service, USA); Jeffrey Sybesma (Faculty of Law, University of the Netherlands Antilles); Robert van Dam (Institute for Systematics and Population Biology, The Netherlands); Alessandra Vanzella-Khoury (United Nations Environment Programme, Jamaica); and Jeanette Wyneken (Florida Atlantic University, USA).

También, hacemos extensivo nuestro profundo agradecimiento a Tom McFarland («Tom's Turtles») por su contribución artística. Su esmero por la precisión garantiza a los lectores de este manual un acceso a ilustraciones claras y exactas. Sus preciosos dibujos mejoran también la perspectiva de supervivencia de las tortugas marinas de una manera real, ya que una acción efectiva de conservación depende de datos verídicos, incluyendo una correcta identificación de las especies.

El manual no podría haberse realizado sin el apoyo financiero del Centro para la Conservación Marina (CMC), la Convención para Especies Migratorias (CMS), el Fondo Mundial para la Naturaleza (WWF), el Servicio Nacional de Pesquerías Marinas de EUA (NMFS) y la Unidad de Investigación Cooperativa de Pesquería y Vida Silvestre de Florida (USGS, Department of the Interior, Research Work Order 172).

Deborah White Smith diseñó el estilo del manual y transformó docenas de capítulos individuales a un formato coherente. La traducción al español estuvo a cargo de Raquel Briseño Dueñas y F. Alberto Abreu-Grobois, con la participación de Ana Barragán, Juan Carlos Cantú, María del Carmen Jiménez Quiroz, Jaime Peña y Laura Sarti.

En suma, el proyecto resultó beneficiado con los talentos de más de 100 personas de todo el mundo.

¡A todos, nuestro más sincero agradecimiento!

Karen L. Eckert
Karen A. Bjorndal
F. Alberto Abreu Grobois
Marydele Donnelly
Editores

Tabla de Contenido

1. Generalidades

Introducción a la Evolución, Historias de Vida y Biología de las Tortugas Marinas	3
<i>A. B. Meylan y P. A. Meylan</i>	
Diseño de un Programa de Conservación	6
<i>K. L. Eckert</i>	
Prioridades para los Estudios sobre la Biología de la Reproducción y de la Anidación	9
<i>J. I. Richardson</i>	
Prioridades para la Investigación en Hábitats de Alimentación	13
<i>K. A. Bjorndal</i>	
Conservación Basada en la Comunidad	16
<i>J. G. Frazier</i>	

2. Taxonomía e Identificación de Especies

Taxonomía, Morfología Externa e Identificación de las Especies	23
<i>P. C. H. Pritchard y J.A. Mortimer</i>	

3. Evaluación de Poblaciones y de Hábitats

Estudios de Hábitat	45
<i>C. E. Diez y J. A. Ottenwalder</i>	
Prospecciones Poblacionales (Terrestres y Aéreas) en Playas de Anidación	51
<i>B. Schroeder y S. Murphy</i>	
Estudios de Poblaciones en Playas de Arribadas	64
<i>R. A. Valverde y C. E. Gates</i>	
Estudios en Hábitats de Alimentación: Captura y Manejo de Tortugas	70
<i>L. M. Ehrhart y L. H. Ogren</i>	
Estudios Aéreos en Hábitats de Alimentación	75
<i>T. A. Henwood y S. P. Epperly</i>	
Estimación del Tamaño de la Población	78
<i>T. Gerrodette y B. L. Taylor</i>	
Identificación de Poblaciones	83
<i>N. FitzSimmons, C. Moritz y B. W. Bowen</i>	

4. Metodologías y Procedimientos para la Colecta de Datos

Definición del Inicio: La Importancia del Diseño Experimental	95
<i>J. D. Congdon y A. E. Dunham</i>	
Sistemas de Adquisición de Datos para el Seguimiento del Comportamiento y la Fisiología de las Tortugas Marinas	101
<i>S. A. Eckert</i>	
Bases de Datos	108
<i>R. Briseño-Dueñas y F. A. Abreu-Grobois</i>	
Factores a Considerar en el Mercado de Tortugas Marinas	116
<i>G. H. Balazs</i>	
Técnicas para la Medición de Tortugas Marinas	126
<i>A. B. Bolten</i>	
Periodicidad en la Anidación y el Comportamiento entre Anidaciones	132
<i>J. Alvarado y T. M. Murphy</i>	
Ciclos Reproductivos y Endocrinología	137
<i>D. Wm. Owens</i>	
Determinación del Tamaño de la Nidada y el Éxito de la Eclosión	143
<i>J. D. Miller</i>	
Determinación del Sexo en Crías	150
<i>H. Merchant Larios</i>	
Estimación de la Proporción Sexual en Playas de Anidación	156
<i>M. Godfrey y N. Mrosovsky</i>	
Determinación del Sexo de Tortugas Marinas en Hábitats de Alimentación	160
<i>T. Wibbels</i>	
Muestreo y Análisis de los Componentes de la Dieta	165
<i>G. A. Forbes</i>	
Medición del Crecimiento en Tortugas Marinas	171
<i>R. P. van Dam</i>	
Redes de Recuperación y Monitoreo de Tortugas Varadas	174
<i>D. J. Shaver and W. G. Teas</i>	
Entrevistas y Encuestas en Mercados	178
<i>C. Tambiah</i>	

5. Reducción de Amenazas

Reducción de las Amenazas a las Tortugas	187
<i>M. A. G. Marcovaldi y C. A. Thomé</i>	
Reducción de las Amenazas a los Huevos y las Crías: Protección <i>In Situ</i>	192
<i>R. H. Boulon, Jr.</i>	

Reducción de las Amenazas a los Huevos y a las Crías: Los Viveros	199
<i>J. A. Mortimer</i>	
Reducción de las Amenazas al Hábitat de Anidación	204
<i>B. E. Witherington</i>	
Reducción de las Amenazas a los Hábitats de Alimentación	211
<i>J. Gibson y G. Smith</i>	
Reducción de la Captura Incidental en Pesquerías	217
<i>C. A. Oravetz</i>	
6. Crianza, Cuidado Veterinario y Necropsia	
La Crianza y Reproducción en Cautiverio de Tortugas Marinas: Una Evaluación de su Uso como Estrategia de Conservación	225
<i>J. P. Ross</i>	
Rehabilitación de Tortugas Marinas	232
<i>M. Walsh</i>	
Enfermedades Infecciosas en Tortugas Marinas	239
<i>L. H. Herbst</i>	
Toma de Muestras de Tejidos y Técnicas para la Necropsia	246
<i>E. R. Jacobson</i>	
7. Legislación e Instrumentación	
Grupos de Interés de las Bases y Legislación Nacional	252
<i>H. A. Reichart</i>	
Colaboración Regional	256
<i>R. B. Trono y R. V. Salm</i>	
Tratados Internacionales de Conservación	260
<i>D. Hykle</i>	
Aspectos Forenses	265
<i>A. A. Colbert, C. M. Woodley, G. T. Seaborn, M. K. Moore and S. B. Galloway</i>	

Enfermedades Infecciosas en Tortugas Marinas

Lawrence H. Herbst

Institute for Animal Studies, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Ave, Bronx, New York 10461 USA; Tel: +1 (718) 430-8553; Fax: +1 (718) 430-8556; email: herbst@aecom.yu.edu

Una mejor apreciación del papel que juegan las enfermedades infecciosas en la ecología de las tortugas marinas y como causas de enfermedad y mortalidad individual o masiva, requerirá de una aplicación consistente de metodología apropiada de diagnóstico y una cuidadosa interpretación de los resultados. Este capítulo está dirigido principalmente a biólogos de campo, que ocasionalmente se encuentran tortugas enfermas, heridas o muertas, o que pudieran ser confrontados con eventos de enfermedades o mortalidad masivas y desean encontrar la(s) causa(s), o que podrían incorporar programas rutinarios para el monitoreo de salud y la identificación de posibles enfermedades infecciosas como parte de sus estudios poblacionales en general.

El propósito de este capítulo es el de proporcionar un panorama general de los procedimientos de diagnóstico y una guía para la colecta y manejo de muestras para su diagnóstico. Con el espacio disponible, no es posible proporcionar un atlas de enfermedades de tortugas marinas e instrucciones específicas para la diagnóstico de cada una. La diagnóstico y el tratamiento de enfermedades específicas requerirá la asistencia de uno o más especialistas en patología clínica, patología anatómica, microbiología, parasitología, inmunología y medicina especializada en reptiles. Si bien algunos procedimientos para la diagnóstico pueden ser llevados a cabo en el campo, muchos requerirán enviar el material a un laboratorio experimentado. La colecta y manejo adecuados de las muestras será crítico. Además, la mayoría de las enfermedades de tortugas marinas probablemente todavía no han sido descritas, así que una comprensión de los enfoques generales será, por ahora, más útil. Una reciente sinopsis de las enfermedades conocidas en tortugas marinas y una introducción a la literatura pueden ser

encontradas en Herbst y Jacobson (1995). Una revisión y descripción más detallada de enfermedades en tortugas marinas es proporcionada por Lauckner (1985).

Principios

Para comprender las enfermedades infecciosas en las poblaciones uno debe de comprender la diferencia entre el ser infectado por un agente causante de enfermedad y el haber contraído la enfermedad (afección evidente) causada por ese agente. Como regla, la infección será relativamente común en una población pero la enfermedad clínica es rara. Para cualquier agente infeccioso en una población de tortugas habrá individuos que nunca han sido infectados, individuos que están infectados pero no enfermos, aquellos que están tanto infectados como enfermos, e individuos que fueron infectados en el pasado pero ahora son inmunes. Las interacciones de los factores que influyen en el hecho de que la infección sea o no expresada como enfermedad clínica en una población pueden ser muy complejas.

Diferentes pruebas de diagnóstico pueden ser usadas para detectar o monitorear infecciones o enfermedades clínicas que afectaron en el pasado o estén activas en el presente. Los resultados de una sola prueba de diagnóstico deben ser interpretados en el contexto del panorama completo, incluyendo la historia y el patrón de la enfermedad en la población, manifestaciones clínicas, resultados de otras pruebas y lesiones visibles e histopatológicas. La detección o aislamiento de un agente infeccioso o la detección de los anticuerpos a ese agente solamente proporcionan información parcial en una investigación de un problema de enfermedad/mortandad. En algunos

casos, los hallazgos pueden ser completamente incidentales a la causa real de la enfermedad.

Observaciones de Campo: Descripción Detallada, Historial, Síntomas Clínicos

Todo trabajo detectivesco requiere una descripción completa de la escena y preservación de la evidencia física. Una cuidadosa y completa descripción del problema de salud hecha por el biólogo de campo es el primer y más crítico paso para llegar a una diagnosis. La especie, edad, tamaño y sexo de los animales afectados (descripción detallada), el inicio, duración, y desarrollo del problema (historial), las señales clínicas observadas y las lesiones, definirán el problema y guiarán en la selección de como llegar a la diagnosis. Por ejemplo, el varamiento masivo de tortugas con condiciones aparentemente normales de salud después de una drástica disminución de la temperatura del agua pudiera sugerir una infección aguda o shock hipotérmico, mientras que un evento similar en el verano podría ser el resultado de una infección aguda o una toxina. Aunque los síntomas clínicos tales como la pérdida de peso o depresión pueden ser no-específicas, cualquier conclusión acerca de la etiología o patogénesis basada en los resultados de las pruebas de diagnosis tendrían que ser consistentes con estas observaciones.

En la mayoría de los casos, la identificación de los procesos y causas de enfermedad y mortandad provienen de necropsias completas llevadas a cabo cuidadosamente sobre tortugas muertas y moribundas (ver Jacobson, en este volumen) y la examinación física y por biopsia de lesiones visibles en tortugas vivas. Al investigar un evento de enfermedad/mortandad en una población, muy frecuentemente es más informativo sacrificar y realizar una necropsia sobre una tortuga moribunda que sobre otra que murió espontáneamente ya que es más probable encontrar procesos patológicos primarios activos en la tortuga moribunda. Las respuestas inflamatorias crónicas y las infecciones secundarias pueden oscurecer los hallazgos en la que murió espontáneamente.

Análisis Fecal: Parasitología

Los contenidos de toda la región gastrointestinal deben de ser revisados en la necropsia en busca de helmintos intestinales. Muestras fecales frescas de

tortugas vivas pueden ser examinadas mediante frotis directa, flotación y técnicas de sedimentación en busca de infecciones evidentes de helmintos y protozoarios (Sloss *et al.*, 1994).

Microbiología Clínica

Un diagnóstico completo de probables enfermedades virales, bacterianas o micóticas incluiría intentos para aislar e identificar el agente microbiano por medio de cultivo. Los especímenes deben de ser colectados y transportados de tal manera que la viabilidad del patógeno sea preservada y que ocurran cambios mínimos en la composición de la flora causada por un crecimiento desproporcionado de especies con mayores tasas de crecimiento. Las muestras de sangre, fluidos de tejido, exudados, o biopsias histológicas que vayan a ser sometidas al cultivo microbiano deben ser colectadas en condiciones asépticas usando instrumentos estériles y una técnica con la cual el espécimen pueda ser representativo de los microbios encontrados en la lesión y no en los contaminantes. Estas muestras pueden producir resultados falsos y confusos y no vale la pena colectarlas si no pueden ser manejadas adecuadamente y transferidas a tiempo a un laboratorio microbiológico clínico con experiencia.

Se debe contactar al laboratorio que vaya a recibir las muestras con bastante anticipación para que puedan comunicarle al técnico de campo sobre las capacidades del laboratorio, fechas límites para envíos, cuales son los materiales de colecta adecuados, y las vías disponibles de transporte. Aunque muchas especies de bacterias y hongos pueden ser cultivadas usando un medio y procedimientos comunes, muchos otros microorganismos, tales como las especies de *Mycoplasma* y *Mycobacterium*, requieren de condiciones y medios de cultivo especializados. Otros organismos, tales como especies de *Chlamydia* y los virus, requieren un sistema de cultivo celular permisivo para su aislamiento. Se debe identificar un laboratorio de diagnosis que tenga acceso a medios de cultivo y cepas especializadas y que esté capacitado para llevar a cabo los procedimientos de cultivo requeridos para los agentes de interés. Aún especies rutinariamente aisladas pueden requerir modificaciones en los procedimientos para optimizar la recuperación. Es importante recordar que el no aislar un cierto microorganismo no lo elimina como causa potencial de la enfermedad bajo estudio. Los sistemas

apropiados de cultivo para ciertas bacterias, hongos y virus potencialmente patogénicos aún no han sido desarrollados.

Trabajo con Sangre

La sangre es un material de diagnóstico muy útil y fácil de obtener. Los patógenos y parásitos en la sangre pueden ser identificados en frotis de sangre. Los cultivos sanguíneos pueden ayudar a detectar una infección bacteriana sistémica. Un conteo completo y diferencial de células sanguíneas junto con un análisis bioquímico del plasma pueden detectar un problema y ayudar en la identificación del tipo de lesión que ha ocurrido. Por ejemplo, una concentración elevada en el plasma de ácido úrico sugiere una enfermedad en los riñones, mientras que un nivel elevado de kinasa de creatina sugiere que el tejido muscular ha sido dañado. Las pruebas de plasma también pueden detectar la presencia de anticuerpos para agentes específicos (antígenos) y para los mismos antígenos.

Los diferentes tipos de ensayos que pueden ser llevados a cabo en la sangre entera o plasma tienen diferentes requerimientos de colecta, manejo y almacenamiento los cuales pueden limitar su efectividad bajo ciertas condiciones de campo. Todas las muestras de sangre deben ser colectadas de un conducto vascular, tal como el seno cervical dorsal, solo cuando se cuenta con un entrenamiento adecuado y siguiendo los procedimientos recomendados (ver Owens, este volumen). Para la mayoría de los análisis se requiere típicamente de 3 a 5 ml de sangre entera. Las tortugas toleran fácilmente la extracción de hasta un 1 ml de sangre por cada 100 g de peso corporal si es necesario. Los frotis de sangre para el conteo de leucocitos, deben ser llevados a cabo esparciendo una gota de sangre entera sobre un porta-objetos, inmediatamente después de la colecta. Esto minimiza el aglutinamiento y los cambios en la morfología de las células sanguíneas que pueden ocurrir si se espera demasiado. Para conteos celulares sanguíneos completos, una muestra de sangre entera no coagulada debe ser enviada al laboratorio lo más pronto posible, preferencialmente dentro de un período de 24 horas. La sangre entera puede ser almacenada por períodos cortos de tiempo en un refrigerador y transportada sobre hielo.

El plasma para los ensayos bioquímicos debe ser separado de la sangre entera lo más pronto posible.

Una centrífuga clínica para uso en el campo es esencial. Los retrasos en la separación del plasma pueden causar cambios en muchos parámetros bioquímicos. Por ejemplo, la glucosa del plasma disminuirá al ser consumida por las células (que permanecen vivas) y el potasio se incrementará a medida que se filtra gradualmente de las células. La hemólisis de la muestra así como un almacenamiento prolongado a -20°C causará cambios drásticos en la actividad de ciertas enzimas. El plasma debe ser sometido inmediatamente a un análisis bioquímico o almacenado en nitrógeno líquido o un congelador ultra frío ($<-70^{\circ}\text{C}$).

Los resultados de los análisis bioquímicos del plasma o suero también pueden variar con el tipo de analizador usado y el programa de control de calidad del laboratorio (Bolten *et al.*, 1992). De manera similar al manejo de las muestras clínicas para análisis microbiológico, se deben hacer planes antes de que el trabajo de campo inicie para que las muestras de sangre puedan ser sometidas a un solo laboratorio de patología clínica que esté equipado para analizar material de tortugas. El laboratorio debe tener valores de referencia establecidos para la especie bajo estudio. La variación en los datos, debido a diferentes métodos de colecta, manejo y análisis entre estudios y entre muestras dentro de un estudio, hacen que la interpretación de datos sea difícil y debe de ser minimizada.

El plasma (1-2 ml) también debe ser almacenado en varias alícuotas para pruebas serodiagnósticas. Las muestras de plasma para la detección de anticuerpos pueden ser almacenadas en un congelador convencional (a -20°C), pero se debe tener cuidado de evitar el descongelar y congelar repetidamente las muestras ya que esto afecta la sensibilidad de las pruebas. El volumen celular compactado (PCV, por sus siglas en inglés) (o hematocrito, Hct), el cual es el porcentaje de volumen sanguíneo que consiste de células, puede ser medido al momento de la separación del plasma. Un bajo PCV ($<30\%$) no es solamente un criterio útil de pérdida de sangre posterior a un trauma, pero también puede indicar un problema de enfermedad crónica como parasitismo, infección, anorexia/inanición. Por lo regular, una microcentrífuga y tubos capilares son usados para medir el PCV, pero una centrífuga clínica regular y tubos de ensayo con fondo plano también pueden ser usados.

Pruebas Serodiagnósticas: Serología

Las pruebas serodiagnósticas son llevadas a cabo con el plasma o suero para determinar ya sea la presencia de anticuerpos a un agente causante de enfermedad en particular o la presencia de antígenos circulantes provenientes del agente en sí. El primer tipo de pruebas que se menciona es usado para determinar si los individuos en una población han sido expuestos a un agente causante de enfermedad en particular, mediante el hecho de que han provocado una respuesta inmune (anticuerpo) humoral contra el agente. El segundo tipo de pruebas es usado para determinar si el individuo está sometido a una exposición en curso (p. ej., una infección activa), mediante el hecho de que en ese momento tienen sustancias foráneas (antígenos) derivadas del agente causante de enfermedad que se encuentra circulando en su sangre. La alta sensibilidad y especificidad de este tipo de pruebas las hacen extremadamente valiosas en el monitoreo de salud de una población (vigilancia de enfermedades), en el cual la mayoría de las infecciones son subclínicas pero también cuando se trata de probar hipótesis específicas (diagnóstico diferencial) acerca de las causas de erupciones de enfermedades específicas.

El hecho de que los anticuerpos y algunos antígenos permanecen estables en plasma congelado por muchos años hace que sean posibles estudios epizootiológicos retrospectivos que pueden producir información valiosa en el historial de salud de largo plazo de poblaciones de tortugas y ayudar a establecer el momento exacto, quizás mucho antes de que la enfermedad clínica fuera reconocida, en que el agente infeccioso entró a la población.

Pruebas Diagnósticas Moleculares

La ciencia de la detección y caracterización de organismos patógenos ha avanzado tremendamente con el desarrollo de la hibridación de ácidos nucleicos (dot-blot de Southern y Northern, hibridación *in situ*) y las técnicas de amplificación (reacción en cadena de la polimerasa) y los incrementos continuos en la disponibilidad de sondas y cebadores (“primers”) para ácidos nucleicos específicos (Persing *et al.*, 1993). Mientras que las pruebas diagnósticas moleculares existen para muchas bacterias y hongos que son compartidos por tortugas y otros vertebrados, aquellas para los organismos patógenos que son específicos para tortugas marinas aún están bajo desarrollo. Aún así, los especialistas en tortugas marinas deben

anticipar la eventual disponibilidad de estas pruebas y coleccionar los especímenes apropiados. Afortunadamente los tejidos, ya sea fijados en formol o congelados (a $<-70^{\circ}\text{C}$), pueden ser usados para muchas aplicaciones. Para las investigaciones que requieren ADN o ARN no degradado, especímenes de tejido fresco deben ser congelados inmediatamente y almacenados en nitrógeno líquido.

Enfermedades Específicas

El principal papel de un biólogo de tortugas marinas que no es un especialista en enfermedades, al diagnosticar enfermedades infecciosas específicas, es el de reconocer y describir problemas patológicos potenciales en la población y coleccionar y preservar las muestras adecuadas. Las siguientes secciones describen brevemente los tipos de muestras que se necesitarían para diagnosticar los principales agentes de enfermedades infecciosas.

Viruses

Un diagnóstico preliminar de una enfermedad viral usualmente resulta de un examen histopatológico de tejidos fijados obtenidos por medio de una biopsia o durante la necropsia. En combinación con un historial y la sintomatología clínica, la ocurrencia de una citopatología característica como la degradación celular (inflamación y lisis), formación sincitial (fusión de células adyacentes) y cuerpos de inclusión intranucleares o intracitoplasmáticos, proporciona la primera pista de que un agente viral puede estar involucrado. Un examen por microscopía electrónica de estos tejidos fijados puede confirmar la presencia de partículas tipo virus y proporcionar una identificación preliminar del agente. Un diagnóstico completo se logra por medio del aislamiento del virus a partir de muestras frescas o congeladas (a $<-70^{\circ}\text{C}$) en un sistema de cultivo de tejido apropiado, seguido de una caracterización inmunológica y molecular de lo que se aisló. En los casos donde un sistema de cultivo apropiado no ha sido desarrollado para el agente, se puede profundizar en la identificación mediante técnicas inmunohistoquímicas usando anticuerpos específicos al agente o por medio de técnicas moleculares/bioquímicas específicas al agente, si es que éstas están disponibles.

Mínimamente, un biólogo de campo debe de coleccionar tejidos de lesión en formol neutralizado, al 10%. Un examen por microscopía electrónica (ME) puede ser llevado a cabo en especímenes de tejido

fijados en formol e inclusive en aquellos preservados en parafina. Sin embargo, fijadores especiales para la ME deben ser usados cuando la descripción de la patología ultraestructural va a ser de importancia (ver Jacobson, en este volumen). Es también importante guardar especímenes de tejido congelados (a $<-70^{\circ}\text{C}$, preferiblemente en nitrógeno líquido) para el aislamiento de los virus. Aunque algunos virus pueden permanecer intactos e infecciosos por largos períodos de tiempo a temperatura ambiental, los virus más sensibles al ambiente pierden rápidamente su infectividad a menos que sean rápidamente congelados y almacenados a $<-70^{\circ}\text{C}$ (Fenner *et al.*, 1974). Muestras de tejido frescas puestas en un medio de transporte de virus (medio de cultivo de células libres de suero conteniendo antibióticos y antifúngicos) pueden ser enviadas en hielo a un laboratorio que posea una variedad de cepas celulares (incluyendo líneas celulares provenientes de tortugas) para el aislamiento de los virus. Sin embargo, el tejido congelado proporciona un recurso para experimentos adicionales de aislamiento.

Bacterias/Hongos

Una examen grueso combinado con una histología de las lesiones usualmente proporciona la primera evidencia de una enfermedad bacteriana o fungal. Además de las tinciones rutinarias de tejido tales como la hematoxilina y la eosina, las tinciones especiales como la de Gram (Brown y Brimm), el de impregnación de plata (Warthin-Starry, Plata Gomori Methamine), y tinciones de ácido rápido (Zeihl-Nielson), pueden ayudar a reducir por eliminación los posibles agentes. Frotis de los exudados de la lesión o frotis de impresión de los tejidos afectados pueden ser llevados a cabo, pasados por la tinción y examinados en el campo. El envío de especímenes para cultivo de bacterias y hongos debe seguir los mismos pasos discutidos anteriormente (microbiología clínica). Las técnicas de diagnóstico inmunológico y molecular también pueden ser aplicadas a tejidos fijados o congelados o aquellos aislados en cultivo.

Protozoarios

Las enfermedades causadas por protozoarios que han sido descritas en tortugas marinas hasta ahora son principalmente patógenos gastrointestinales. Mientras que un análisis fecal (frotis directos, flotación) puede ser de ayuda en la diagnosis, muchos

protozoarios gastrointestinales pueden ser comensales y el encontrar a los organismos dentro de las lesiones histológicas características es la mejor manera de identificar a las especies patogénicas. Las infecciones causadas por protozoarios en otros órganos también requerirá de una diagnosis histológica.

Parásitos Metazoarios

Los especímenes de ectoparásitos y epibiontes deben ser preservados en formol para su identificación. Los helmintos (tremátodos y nemátodos) pueden ser descubiertos llevando a cabo un examen gastrointestinal cuidadoso así como también en otros órganos huecos y en sus contenidos al llevar a cabo la necropsia. Los tremátodos cardiovasculares adultos (Spirorchidae) son encontrados examinando cuidadosamente el corazón, los pulmones y los principales vasos sanguíneos, así como por un tamizado de la sangre. La colecta de gusanos debe ser tan completa (cuantitativa) como sea posible de tal manera que la diversidad de fauna pueda ser examinada posteriormente. La sedimentación y flotación fecal ayudará a identificar huevecillos de helmintos, incluyendo aquellos de los tremátodos cardiovasculares, los cuales deben llegar al lumen gastrointestinal para tener acceso al medio externo. Los huevecillos de los tremátodos cardiovasculares también pueden ser recuperados mediante la sedimentación de tejidos que hayan sido digeridos con enzimas (Dailey y Morris, 1995; Herbst *et al.*, 1998).

La asociación de parásitos con su hospedero frecuentemente tiene una larga historia coevolutiva y la evidencia de parasitismo es un hallazgo incidental común. La demostración de una patología significativa es necesaria para directamente implicar parásitos particulares como causa de enfermedad y mortandad.

Precauciones Especiales

La distancia filogenética y las diferencias fisiológicas que separan a los reptiles de los humanos disminuye el riesgo de una transmisión de enfermedad de tortuga marina hacia el hombre. Sin embargo, las tortugas marinas pueden portar varias especies de bacterias que se sabe son patógenos humanos o son patógenos oportunistas en una gama amplia de especies de vertebrados. Estas especies incluyen *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Vibrio* y *Chlamydia* (Acha y Szyfres, 1987). Adicionalmente, no hay información

suficiente acerca de otros agentes infecciosos de las tortugas como para estar seguros de los riesgos que puedan o no existir. Los trabajadores de campo deben darse cuenta que estos riesgos existen y contar con el material adecuado para inmediatamente limpiar y desinfectar cualquier herida que pueda llegar a ocurrir al manejar estos animales. Los trabajadores deben recibir atención médica inmediatamente si se llegan a infectar, aunque en pequeñas heridas, o si se enferman sistemáticamente después de trabajar con tortugas. Siempre se deben usar guantes al llevar a cabo necropsias.

Otra preocupación es la posibilidad de que los biólogos accidentalmente distribuyan la infección entre las tortugas por no observar las precauciones indispensables. Los instrumentos tales como agujas, marcas y aplicadores de marcas, laparoscopios, endoscopios y tubos estomacales, pueden transferir agentes infecciosos muy eficientemente. Materiales desechables económicos tales como navajas de bisturí y agujas no deben ser usadas en más de un animal. Los instrumentos que son usados repetidamente deben ser esterilizados o desinfectados entre animales. El adaptar técnicas de descontaminación al campo, aunque difícil, debe ser intentado seriamente. Linton *et al.* (1987) y Rutala (1990) proporcionan información muy útil. El lavar los instrumentos en agua caliente con detergente es una buena técnica. El hipocloruro de sodio (solución de blanqueador diluida 1:10) es un excelente y económico desinfectante, pero es corrosivo y se desactiva rápidamente con detritos orgánicos. Soluciones de glutaraldehidos o formol son esterilizantes efectivos pero sus residuos son muy tóxicos. Las soluciones de clorohexisina y las soluciones de yodo de povidona son efectivas y menos tóxicas a los tejidos, y pueden ser usadas para desinfectar la piel así como las superficies. El alcohol no es un desinfectante efectivo a menos que los instrumentos sean pasados por flama o inmersos por un largo período de tiempo. Sea cual fuere el desinfectante que se use, se debe permitir un tiempo de contacto adecuado para que surta efecto. Cuando se usan compuestos tóxicos o cáusticos, los instrumentos deben ser enjuagados exhaustivamente antes de que entren en contacto con tejidos de seres vivientes.

El Futuro

A medida que las poblaciones de tortugas marinas y los ecosistemas marinos son cada vez más

intensamente manejados, con tortugas individuales y poblaciones siendo manipuladas dentro y posiblemente movidas entre hábitats naturales y artificiales, el potencial de impactar con enfermedades infecciosas se hace más y más evidente. El monitoreo de salud se convertirá en una parte importante del manejo general de tal manera que enfermedades potencialmente devastadoras puedan ser descubiertas antes de que amenacen los esfuerzos de manejo y también para que aquellas enfermedades que ya están teniendo ese efecto puedan ser monitoreadas y controladas. En la actualidad, la mayoría del trabajo diagnóstico llevado a cabo en tortugas marinas es hecho de manera retrospectiva, en la necropsia o en la presencia de un brote de una enfermedad. Será importante transformar las evaluaciones periódicas de salud de poblaciones a procedimientos más prospectivos por medio del desarrollo e implementación de pruebas de sondeo en masa para aquellos agentes de enfermedades que nos preocupan.

Las pruebas serodiagnósticas son altamente sensibles y específicas para un patógeno en particular y son importantes componentes de un monitoreo de salud prospectivo para una población. El desarrollo de las pruebas serodiagnósticas para tortugas marinas se encuentra en las etapas iniciales de desarrollo. Se ha logrado un progreso significativo en la producción de anticuerpos monoclonales específicos para clases de inmunoglobulina de la tortuga verde (Herbst y Klein, 1995). Varios de estos anticuerpos monoclonales también pueden ser usados con otras especies de tortugas marinas. Con estos materiales, las respuestas de anticuerpos de las tortugas marinas hacia antígenos foráneos, incluyendo agentes infecciosos y toxinas, pueden ser detectadas. Las limitaciones al aplicar estos materiales de manera amplia en pruebas estandarizadas, ha sido la escasez de los antígenos.

Mientras que los anticuerpos monoclonales proporcionan la mitad del requerimiento para pruebas serodiagnósticas estandarizadas, repetibles y confiables, aún no contamos con fuentes confiables de antígenos adecuadamente caracterizados para pruebas estandarizadas con los cuales podríamos monitorear cualquier enfermedad. Aunque algunas pruebas inmunodiagnósticas preliminares han sido producidas (Herbst *et al.*, 1988), aun requieren mayor desarrollo y refinación antes de que se hagan disponibles para una aplicación más amplia. Aún así, se debe poner énfasis en el hecho de que los especímenes de plasma deben ser colectados y

archivados ya, porque cada colecta de muestras proporciona un imagen congelada del nivel de exposición a la enfermedad de una población de tortugas. Se le urge a todos los biólogos de campo que manejan tortugas marinas para otros propósitos considerar el coleccionar plasma para ser guardado y examinado posteriormente. Esta recomendación señala la obvia necesidad de establecer un registro o banco de plasma para almacenar estas muestras.

Literatura Citada

- Acha, P. N. y B. Szyfres. 1987. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals, Segunda Edición. Pan American Health Organization, Washington, D.C. 963 pp.
- Bolten, A. B., E. R. Jacobson y K. A. Bjorndal. 1992. Effects of anticoagulant and auto-analyzer on blood biochemical values of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). American Journal of Veterinary Research 53:2224-2227.
- Dailey, M. D. y R. Morris. 1995. Relationship of parasites (Trematoda: Spirorchidae) and their eggs to the occurrence of fibropapillomas in the green turtle (*Chelonia mydas*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 52 (Suplemento 1): 84-89.
- Fenner, F., B. R. McAuslan, C. A. Mims, J. Sambrook y D. O. White. 1974. The Biology of Animal Viruses, Segunda Edición. Academic Press, New York. 834 pp.
- Herbst L. H. y E. R. Jacobson. 1995. Diseases of marine turtles, p.593-596. In: K. A. Bjorndal (Editor), Biology and Conservation of Sea Turtles, Edición Revisada. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- Herbst, L. H. y P. A. Klein. 1995. Monoclonal antibodies for the measurement of class-specific antibody responses in the green turtle, *Chelonia mydas*. Veterinary Immunology and Immunopathology 46:317-335.
- Herbst, L. H., E. C. Greiner, L. M. Ehrhart, D. A. Bagley y P. A. Klein. 1998. Serologic association between spirorchidiasis, herpesvirus infection, and fibropapillomatosis in green turtles (*Chelonia mydas*) from Florida. Journal of Wildlife Diseases 34(3):496-507.
- Lauckner, G. 1985. Diseases of Reptilia, p.551-626. In: O. Kinne (Editor), Diseases of Marine Animals, Volumen IV, Parte 2. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg.
- Linton, A. H., W. B. Hugo, y A. D. Russell. 1987. Disinfection in veterinary and farm animal practice. Blackwell Science, Oxford, U. K. 190 pp.
- Persing, D. H., T. F. Smith, F. C. Tenover y T. J. White (Editores). 1993. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 641 pp.
- Sloss, M. W., R. L. Kemp, y A. M. Zajac. 1994. Veterinary clinical parasitology (6ª edición). The Iowa State University Press, Ames, Iowa. 208 pp.
- Rutala, W. 1990. APIC guidelines for selection and use of disinfectants. American Journal of Infection Control 18:99-117.