



ORIGINAL

## Uso de frotis sanguíneos para la identificación de bacteremias en tortugas del género *Trachemys*

### Use of blood smears for bacteremia identification in turtles of the *Trachemys* genus

Julián Vaillard<sup>1</sup>, Carlos Vásquez Peláez<sup>2</sup>, Liliana Aurora Ramos Garduño<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Programa Único de Internado en Medicina Veterinaria y Zootecnia: Fauna Silvestre. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México

<sup>2</sup> Departamento de Genética y Bioestadística. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México

<sup>3</sup> Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [vaillardjulian@gmail.com](mailto:vaillardjulian@gmail.com) (Julián Vaillard Cerdio).

Recibido el 24 de mayo de 2018; aceptado el 9 de junio de 2018.

JONNPR. 2018;3(8):586-592

DOI: 10.19230/jonnpr.2516

#### Resumen

**Objetivos:** La presencia de bacteremias en quelonios es considerada un hallazgo común. Se pretende realizar la identificación de bacteremias utilizando frotis sanguíneos teñidos con Gram.

**Materiales y Métodos:** Se realizaron frotis sanguíneos de ejemplares de *Trachemys* mayores a 100 gramos sin tratamiento farmacológico previo, utilizando la técnica de Squash y se tiñeron utilizando la tinción de Gram. Los frotis fueron examinados utilizando el objetivo de inmersión 100x.

**Resultados:** Se obtuvieron un total de 28 muestras. Sólo el 14% de las muestras resultaron positivas a cocos Gram +. La ausencia de signos clínicos, así como de alteraciones hematológicas, categorizan la presencia de estas bacterias como contaminación de la muestra.

**Conclusiones:** El frotis sanguíneo es una técnica útil para la identificación de bacterias, sin embargo, se desconoce la eficacia y sensibilidad de la prueba en reptiles, por lo que es necesario realizar nuevos estudios los cuales ayuden a comprobar su eficacia.

#### Palabras clave

*Frotis sanguíneo; Quelonios; Tortugas; Trachemys; Bacteremia; Tinción de Gram*



Los artículos publicados en esta revista se distribuyen con la licencia:  
Articles published in this journal are licensed with a:  
Creative Commons Attribution 4.0.

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>  
La revista no cobra tasas por el envío de trabajos,  
ni tampoco cuotas por la publicación de sus artículos.

### Abstract

**Aims:** Bacteremia is a common finding in chelonian. The aim of this study is to identify this bacteremia using blood smears stained with Gram.

**Methods and Material:** We did Squash blood smears from *Trachemys* patients over 100 grams and without previous treatment. The blood smears were stained with the Gram technique and examined under the immersion objective 100x.

**Results:** We gathered a total of 28 samples. Only 14% of the samples were positive to Gram + cocci. The absence of clinical signs and hematologic alterations in the samples, classifies the presences of these bacteria as sample contamination.

**Conclusions:** The blood smear is a useful technique for bacteremia identification. However, the specificity and sensibility of the test its unknown, therefore it is necessary to perform new studies which can provide insight of its efficacy.

### Keywords

*Blood smear; chelonian; turtles; Trachemys; bacteremia; Gram stain*

## Introducción

Las enfermedades infecciosas son la principal causa de morbilidad y mortalidad en reptiles en cautiverio; las cuales están asociadas a procesos de inmunosupresión<sup>(1)</sup>. Entre los principales factores reportados que se asocian a este tipo de enfermedades se encuentra una mala higiene del albergue, un control inadecuado de la temperatura (bajas temperaturas) y humedad, traumatismos secundarios a agresiones inter/intraespecíficas y disecdisis<sup>(2)</sup>.

Se ha reportado que la presencia de bacterias en sangre es un hallazgo relativamente común en pacientes reptiles bajo el supuesto de que los ejemplares mantenidos en cautiverio suelen presentar cierto nivel de estrés lo cual los hace susceptibles a bacteremias<sup>(3)</sup>. Estos procesos infecciosos pueden causar cambios metabólicos como desbalances electrolíticos, hipoglucemia, alteraciones de la coagulación y toxemias.

En estos procesos infecciosos se han identificado a las bacterias Gram negativas como las más comunes, dentro de estas se encuentran: *Salmonella* spp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp; siendo *Salmonella* la más común, llegando a ser aislada es más del 90% de los casos<sup>(2,4)</sup>.

La presencia de estas bacterias en reptiles clínicamente sanos es común debido a que algunos de ellos son parte de la microbiota intestinal, así como parte del ambiente en el que habitan. En tortugas semiacuáticas se han identificado principalmente *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., entre otras<sup>(5)</sup>. Por el contrario, se ha reportado que las bacterias Gram positivas son menos frecuentes en este tipo de infecciones y su hallazgo en el diagnóstico clínico es importante<sup>(2)</sup>.

En frotis sanguíneos de sangre periférica, la tinción de Gram es una herramienta poco utilizada, pero de gran utilidad la cual ayuda a la diferenciación entre bacterias y puede ser útil para la identificación de otros agentes etiológicos como hongos filamentosos y levaduras<sup>(2)</sup>. Además de su bajo costo, es una herramienta auxiliar para la toma de decisiones en pacientes septicémicos; ya que con base en la morfología y afinidad tintorial de las bacterias se puede iniciar una antibioterapia inicial previa a obtener resultados de un aislamiento microbiológico con su respectivo antibiograma<sup>(2,4)</sup>.

Algunas alteraciones que se pueden observar hematológicamente en ejemplares septicémicos son: anemia, hipoproteinemia, heterofilia, mononocitosis, leucopenia y hemólisis. Citológicamente se puede observar la presencia de fagocitosis de estructuras bacterianas por leucocitos, así como una desviación a la izquierda tóxica, los heterófilos tóxicos presentan hialinización del núcleo, aumento de volumen, cariorréxis, cariolisis, vacuolización y un citoplasma basófilo<sup>(6)</sup>.

Se han reportado casos de bacteremias identificadas a través de frotis sanguíneos de sangre periférica con presencia de fagocitosis de estructuras bacterianas en una iguana rinoceronte (*Cyclura cornuta*), un camaleón orejero (*Chamaeleo dilepis*) y en boas arborícolas (*Corallus hortulanus*) con neumonía<sup>(7)</sup>.

Las tortugas del género *Trachemys* son los reptiles más comunes en la consulta privada<sup>(8)</sup>. Aunado a esto, la presencia de septicemias en muchos ejemplares en cautiverio quedan únicamente como un diagnóstico presuntivo; la identificación de bacteremias asociadas a estos procesos ayudará a tener más herramientas para la toma de decisiones clínicas para cada caso particular.

En el presente trabajo se buscó identificar la presencia de bacteremias en tortugas del género *Trachemys* mantenidas en cautiverio a través de frotis sanguíneos, utilizando la tinción de Gram para la identificación morfológica y afinidad tintorial de las bacterias presentes.

## Población y Métodos

**Grupo de estudio:** Se utilizaron ejemplares del género *Trachemys* que asistieron a consulta entre los meses: noviembre 2017 a febrero 2018, al Hospital Veterinario de Especialidades en Fauna Silvestre y Etología Clínica (UNAM HVE-FSEC) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se excluyeron a aquellos pacientes cuyo peso fue menor a los 100 gramos y que se encontraran bajo tratamiento farmacológico.

**Métodos:** Se recolectó de 0.1 ml a 0.2 ml de sangre de cada ejemplar a través de la venopunción de la vena yugular, coccígea dorsal, coccígea caudal o del seno subcarapacial, utilizando jeringas de 0.3 ml, 0.5 ml o de 1ml estériles dependiendo del tamaño del ejemplar y

la habilidad del operador para obtener la muestra. El sitio de venopunción fue embrocado con alcohol y yodo previo a la inserción de la aguja, en caso de que se requiriera extraer la aguja y volver a puncionar, el sitio era embrocado nuevamente y el material reemplazado por empaques estériles nuevos. Se utilizó la técnica de Squash<sup>(9)</sup> para realizar dos frotis sanguíneos por cada muestra, ambos frotis sanguíneos se fijaron al calor y se tiñeron. La tinción de los frotis sanguíneos se realizó utilizando la tinción de Gram<sup>(10)</sup>, el kit de colorantes utilizado fue de la distribuidora Hycel®. Los frotis sanguíneos fueron montados con resina y se examinaron bajo el objetivo de inmersión (100X).

**Análisis estadístico:** Se realizó una réplica del estudio de los frotis sanguíneos obtenidos. La descripción de los resultados se realizó a través del uso de estadística descriptiva.

## Resultados

Se obtuvieron un total de 28 muestras sanguíneas pertenecientes a tortugas del género *Trachemys*, el 75% (n=21) de las muestras fueron de tortugas de orejas rojas (*Trachemys scripta elegans*), 21% (n=6) de tortugas pavorreal (*Trachemys venusta*) y el 4% (n=1) a una tortuga de orejas amarillas (*Trachemys scripta scripta*). De estos ejemplares el 57% (n=16) fueron machos y el 43% (n=12) fueron hembras. De estos ejemplares el 25% (n=7) presentaron algún tipo de patología, mientras que el 75% (n=21) se encontraban clínicamente sanas.

De los 28 frotis sanguíneos examinados, sólo cuatro de los frotis sanguíneos resultaron positivos a la presencia de bacterias cocos Gram + extracelulares. El resto de los frotis sanguíneos resultaron negativos. No se pudo realizar la replicación del estudio en 3 de los 28 frotis sanguíneos debido a problemas con el manejo de las muestras; en la replicación ninguna de las muestras resultó positiva a la presencia de bacterias.

## Discusión

La presencia de cocos Gram + extracelulares se presentaron en dos pacientes con algún proceso patológico (gota articular y traumatismo, respectivamente) y en dos ejemplares clínicamente sanos. Esta presencia de bacterias extracelulares, asociada a una cantidad de escasa de bacterias en la muestra, la ausencia de signos clínicos o en su defecto la presencia de signos clínicos no asociados a procesos septicémicos, así como a la ausencia de alteraciones hematológicas<sup>(6)</sup>, son compatibles con la contaminación de las muestras; Van der Meera en 2002<sup>(11)</sup> describe que existen dos tipos de contaminación de muestras sanguíneas: la primera está relacionada a muestras obtenidas de catéteres centrales y suelen presentar bacterias intracelulares; mientras que aquellas muestras frescas de sangre periférica presentan

bacterias extracelulares asociados a equipo y material contaminado; tal como fue el caso de nuestros resultados.

En medicina humana se ha demostrado que el frotis sanguíneo tiene una sensibilidad entre el 80 y 90% y una especificidad de hasta el 96% para la detección de bacteremias<sup>(12,13)</sup>. Sin embargo, cabe resaltar que las muestras obtenidas en estos estudios son a través de catéteres centrales en los pacientes y los frotis sanguíneos realizados son de la capa flogística en lugar de utilizar una muestra de sangre completa como en este estudio.

Hay muy pocos casos publicados en los cuales se reporte el uso de esa técnica en reptiles. Jacobson<sup>(14,15)</sup> identificó la presencia de *Chlamydia* en un camaleón orejero (*Chamaeleo dilepis*), así como la presencia de espiroquetas en una iguana rinoceronte (*Cyclura cornuta*). La presencia de bacterias tanto extracelulares como intracelulares, más diferentes alteraciones hematológicas fueron los hallazgos en ambos casos. La escasez de estudios hace complicada la comparación de la eficacia de esta técnica en la detección de bacteremias en reptiles.

La ausencia de bacterias en los frotis sanguíneos también podría relacionarse a que los ejemplares no estaban cursando con un cuadro septicémico. Este supuesto va en contra de lo propuesto por algunos autores<sup>(3,16)</sup> que es una patología común en quelonios y siempre debería estar presente en los procesos diagnósticos de los clínicos. Sin embargo, la extensión de este estudio no nos ofrece la evidencia suficiente para confirmar o descartar esta teoría.

En conclusión, el uso de frotis sanguíneos es una herramienta accesible y de bajo costo que puede ser útil en el diagnóstico de bacteremias, sin embargo, se desconoce la sensibilidad y la especificidad de la prueba en reptiles, por lo cual no es posible descartar una bacteremia utilizando esta prueba. Nuevos estudios utilizando frotis sanguíneos a la par de hemocultivos pueden demostrar la efectividad de los primeros para la detección de bacteremias en estos pacientes. Asimismo, puede resultar de utilidad el realizar frotis sanguíneos utilizando la capa flogística tal como es usada en pacientes humanos, sin embargo, la cantidad de muestra necesaria podría resultar desafiante.

## Reconocimiento

Agradecemos al UNAM HVE-FSEC por permitirnos realizar el presente estudio en sus instalaciones así como a todo el equipo de médicos que colaboró en la realización de este estudio.

## Conflicto de interés

Sin conflicto de interés

## Referencias

1. Jacobson E. Biology and diseases of reptiles. En: Fox J. Cohen B. y Loew F. Laboratory animal medicine. 1a edición. EUA: Academic Press; 1984.
2. Mader D. Reptile medicine and surgery. 2a edición. EUA: Saunders Elsevier; 2006.
3. McArthur S, Wilkinson R, Meyer J. Medicine and Surgery of tortoises and turtles. 1a edición. Dinamarca: Blackwell Publishing; 2004.
4. Plowman C, Montali R, Phillips L. Septicemia and chronic abscesses in iguanas (*Cyclura cornuta* and *Iguana iguana*) associated with a *Neisseria* species. J Zoo Wildl Med. 1987; 18(2):86-93.
5. Mader D, Divers S. Current therapy in reptile medicine and surgery. 1a edición. EUA: Saunders Elsevier; 2014.
6. Campbell T. Clinical pathology. En: Mader D. Reptile medicine and surgery. EUA: Saunders Elsevier; 1996.
7. Stacy N, Alleman A, Saylor K. Diagnostic hematology of reptiles. Clin Lab Med. 2011; 31(1):87-108.
8. Maldonado I, Brousset D, Ramírez G, Toledo L, Fuentes G. Reporte de atención en consulta de tortugas de orejas rojas (*Trachemys scripta elegans*) y resolución de distocias en dos casos. Veterinary Medicine en Español. 2010; 4(5): 1-8.
9. Stockham S, Scott M. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. 2a edición. EUA: Blackwell Publishing; 2008.
10. Hugget J, O'Grady J. Molecular diagnostics – Current Research and Applications. 1a edición. Reino Unido: Caister Academic Press; 2014.
11. Van der Meer W, Verwiël J, Gidding C, Metz m, Keijzer M. Bacteria in Blood Smears: Overwhelming Sepsis or Trivial Contamination. Acta haematol. 2002; 107(4): 220-223.
12. Kleiman M, Reynolds J, Schreiner R, Smith J, Allen S. Rapid diagnosis of neonatal bacteremia with acridine orange-stained buffy coat smears. J Pediat. 1984; 105(3): 419-421.
13. Kite P, Dobbins B, Wilcox M, McHanon M. Rapid diagnosis of central-venous-catheter-related bloodstream infection without catheter removal. Lancet. 1999; 354(9189): 1504-1507.
14. Jacobson E, Telford S. Chlamydial and Poxvirus Infections of Circulating Monocytes of a Flap-necked Chameleon (*Chamaeleo dilepis*). J Wildl Dis. 1990; 26(4): 572-577.
15. Simpson C, Jacobson E, Harvey J. Electron Microscopy of a Spiral-Shaped Bacterium in the Blood and Bone Marrow of a Rhinoceros Iguana. Can J comp Med. 1981; 45(4): 388-391.

16. Chitty J. Raftery A. Essential of Tortoise Medicine and Surgery. Blackell Publishing. 1a edición. Reino Unido: Willey Blackwell; 2013.