

## Etiología y descripción clínica de la rinitis crónica en tortuga mora (*Testudo graeca*)

A. MARTÍNEZ-SILVESTRE,<sup>1\*</sup> E. MATEU DE ANTONIO,<sup>2</sup> A. RAMIS<sup>3</sup> & N. MAJÓ<sup>3</sup>

\* Dirección de contacto

<sup>1</sup> Centro de Recuperación de Anfibios y Reptiles de Cataluña (C.R.A.R.C.)

08783 Masquefa, Barcelona.

e-mail: crarc\_comam@hotmail.com

<sup>2</sup> Unidad de Patología Infecciosa

<sup>3</sup> Unidad de Anatomía Patológica

Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona (Bellaterra)

**Resumen:** En una población de 11 tortugas moras (*Testudo graeca*) con rinitis mantenida durante al menos 4 años se han tomado muestras para su análisis hematológico, microbiológico, citológico y radiológico. Se han realizado también la histopatología de las 3 tortugas muertas durante el tiempo de estudio. Se han hallado cambios significativos en la población celular de heterófilos, linfocitos y basófilos, así como en el recuento de leucocitos, la albúmina y el colesterol, todo ello relacionado con un estadio de consumo de reservas lipídicas y proteicas en tortugas con una enfermedad infecciosa crónica. Se han aislado las bacterias acompañantes de esta enfermedad y se han podido visualizar herpesvirus en los tejidos respiratorio y bucolingual de las tortugas necropsiadas

**Palabras clave:** Tortuga mora, *Testudo graeca*, rinitis, herpesvirus, diagnóstico.

**Summary: Etiology and clinical description of chronic rhinitis in Spur-thighed tortoises (*Testudo graeca*).**

There have been taken samples from a population of 11 ill Spur-thighed tortoises (*Testudo graeca*) suffering from rhinitis for four years at least. The samples were to get the hematological, microbiological, cytological and radiological analysis. It has also been done the histopathology of the tortoises that died during the investigation. Significant changes were found in the cell population of heterophils, lymphocytes and basophils, as well as in the leukocytes count, albumin and cholesterol. All this caused by the consumption of lipidic and protein reserves in tortoises suffering from a chronic infectious disease. The bacteria presents in this disease were isolated. It was observed viral particles identified as herpesviridae in the respiratory and bucolingual tissues of three dead tortoises.

**Key words:** Spur-thighed tortoises, *Testudo graeca*, Rhinitis, Herpesvirus, Diagnostic.

### INTRODUCCIÓN

La rinitis es un signo de enfermedad de las vías altas respiratorias que se ha descrito en numerosas especies de tortugas terrestres como *Testudo hermanni*, *Testudo graeca*, *Terrapene carolina*, o *Gopherus agassizii* (HOLT 1979; JACKSON & NEEDHAM 1983, JACOBSON *et al.* 1991, LAWRENCE & NEEDHAM 1985). Si bien se han descrito afecciones concomitantes en instalaciones con *Testudo hermanni* y *Testudo graeca* (MÜLLER *et al.* 1990), en los casos observados en España parece que el agente causal afecta sólo a *Testudo graeca*, aun y conviviendo con otras tortugas del mismo género en el mismo cercado (MARTÍNEZ SILVESTRE 1994).

Esta enfermedad tiene, al menos localmente, un marcado carácter especieespecífico.

En la rinitis crónica la sintomatología inicial consiste en un exudado seroso en mayor cantidad de lo normal. Las mucosidades en exceso progresan hacia mucopurulentas. Al mismo tiempo se presenta progresivamente una pérdida del apetito y una disminución de la actividad general de los animales afectados. La entrada de aire por los orificios nasales está dificultada por lo que el animal abre la boca durante el proceso de espiración y suele ser frecuente oír pequeños estertores y sibilancias. El proceso avanza afectando al estado físico del animal hasta que finalmente sufre emaciación, caquexia y deshidratación (MARTÍNEZ

SILVESTRE & MATEU DE ANTONIO 1993). En nuestra experiencia, muchas tortugas moras afectadas de rinitis siguen viviendo durante años con estos síntomas, cronificándose de un modo importante la enfermedad. En estadios avanzados esta infección provoca inflamación de la mucosa bucal y lingual. La estomatitis y glositis son signos inequívocos de fases terminales en las tortugas que tienen rinitis crónica.

Esta sintomatología se presenta especialmente de modo más intenso en los períodos del año que preceden y siguen a la hibernación. En verano los animales que superan las primeras fases (mucosidades nasales sin pérdida del apetito) suelen tener un comportamiento normal aunque no dejan de manifestar los síntomas básicos de mucosidades nasales.

La rinitis crónica de la tortuga mora representa una enfermedad aislada del resto de rinitis que afectan a las tortugas de tierra sean de origen bacteriano diverso (LAWRENCE & NEEDHAM 1985; SNIPER *et al* 1980; JACOBSON *et al.* 1991), como más específicamente de origen micoplásmico (JACOBSON 1993, JACOBSON *et al.* 1995) o por clamidias (VANROMPAY *et al.* 1994). La etiología vírica de esta enfermedad se ha propuesto en numerosos estudios realizados en poblaciones cautivas que manifiestan los síntomas de un modo agudo o subagudo y de los que se han aislado virus tipo Sendai (JACKSON & NEEDHAM 1983), herpesvirus (HELDSTAB & BESTETI 1989, MÜLLER *et al.* 1990, JIMÉNEZ MONTALBÁN, COM.PERS. 1994, BLAHAK 1995, MURO *et al* 1998), adenovirus (COOPER *et al.* 1988), reovirus (MARSCHANG *et al.* 1998) e incluso virus no identificados (MARSCHANG *et al.* 1998). En el presente estudio se plantea la investigación sobre los aspectos clínicos y etiopatogénicos en 11 tortugas moras con rinitis crónica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales:

Para la descripción de esta enfermedad se han utilizado 11 animales con signos de rinitis

crónica manifestados durante más de cuatro años. Durante los dos años que han transcurrido de este estudio, se han practicado las necropsias de tres tortugas que murieron durante la experiencia. Las tortugas estaban mantenidas en condiciones de semilibertad consistentes en cercados al aire libre donde comían vegetación autóctona así como frutas y verduras variadas aportadas de acuerdo con las necesidades de esta especie (HIGHFIELD 1990).

Excepto cuando se indica lo contrario, a todos los animales se les han practicado los siguientes análisis clínicos:

**Radiología** para conocer el grado de afectación pulmonar en los animales con síntomas de rinitis.

**Microbiología** a fin de determinar la población bacteriana acompañante en esta enfermedad. Se muestrearon tres animales clínicamente sanos como control.

**Hematología** para una valoración hematológica y de bioquímica sanguínea en comparación con 6 tortugas sanas mantenidas en las mismas condiciones de manejo y mantenimiento.

**Citología** de exudado nasal en comparación con la misma población control utilizada en hematología para comprobar la población celular presente. En total se realizaron citologías de 17 animales (11 enfermos y 6 sanos).

**Histopatología**, realizada a las tres tortugas que murieron durante la experiencia y a las que se les practicó una necropsia antes de las 12 horas de la muerte.

El muestreo de microbiología, citología y hematología se realizó durante los meses de junio y julio del primer año de estudio a fin de eliminar los efectos que la hibernación podría tener en estas pruebas.

### Materiales

**Radiología:** Se realizaron radiografías de los 11 ejemplares afectados en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. A cada animal se le practicó una radiografía de proyección cráneo-caudal, otra latero-lateral y otra dorso-ventral.

**Citologías:** Las muestras para citología se procesaron en el Centro de Recuperación de Reptiles y Anfibios de Cataluña (Masquefa, Barcelona). Cada muestra se dejó secar a temperatura ambiente y se procesó inmediatamente después de su recolección. Se utilizaron para ello tinciones del tipo Romanowsky (Diff-Quick), Gram, Ziehl Neelsen y Nuevo Azul de Metileno.

**Hematología:** Realizada en el Centro de Recuperación de Reptiles y Anfibios de Cataluña (Masquefa, Barcelona). Las muestras de sangre se recogieron en todos los animales de la vena coccígea dorsal. La sangre se incluyó en tubos con heparina de litio. El hematocrito se calculó mediante técnica de centrifugación. Se realizó un recuento eritrocitario y leucocitario en cámara de Neubauer modificada, siguiendo la técnica de Natt y Herrick adaptada por FRYE (1991). Se realizó frotis teñido con Tinciones tipo Diff Quick para el recuento diferencial de leucocitos. Se calcularon también los valores de Volumen Corpuscular Medio, Hemoglobina Corpuscular Media y Concentración Media de Hemoglobina Corpuscular Media mediante la aplicación de fórmulas estandarizadas a partir del valor hematocrito, valor de hemoglobina y Recuento Total de Eritrocitos (CAMPBELL 1996). Se separó el plasma mediante centrifugación para análisis de bioquímica sanguínea, en el que se determinaron los valores de actividad transaminasa (SGOT), urea, creatinina, ácido úrico y colesterol. La determinación del nivel de proteínas sanguíneas se realizó a partir de plasma mediante la técnica de proteinograma espectrofotométrico. Las pruebas bioquímicas y el cálculo del valor de hemoglobina se realizaron en el laboratorio de análisis clínicos VetLab (Barcelona) utilizando un analizador químico (SEAC, Chemacomp 90, Italia) y un analizador celular (Sysmex Microcellcounter F-800) respectivamente.

**Cultivos microbiológicos:** procesados en el departamento de Patología Infecciosa de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. Las muestras fueron incluidas

en Agar sangre, Agar Salmonella-Shigella y medio McConkey. Finalmente las muestras también fueron introducidas en tripticosa-soja-agar. Se incubaron en atmósfera aeróbica a 37 °C durante 48h. Después de 48 h de incubación se realizaron subcultivos en Agar sangre y se incubaron en las mismas condiciones ya descritas. Los aislamientos bacterianos fueron identificados presuntivamente por su morfología microscópica, tinción Gram y reacción catalasa y oxidasa. Se llegó a la identificación de especie por medio de galerías API-20E, APIStaph y APICoryne systems (BioMérieux, Barcelona, España). En los casos que el sistema API no permitía una identificación definitiva se utilizaron tests bioquímicos convencionales.

**Necropsias:** Realizadas en el centro de recuperación (C.R.A.R.C.) y procesadas histológicamente en la Unidad de Anatomía patológica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. De cada animal se tomaron muestras de hígado, laringe, cavidad nasal, intestino, riñón, lengua, mucosa oral, bazo y pulmón y se fijaron en formol al 10 %. Se realizaron cortes de 5 µm mediante histotomo y se realizaron inclusiones en bloques de parafina, donde fueron teñidas mediante la tinción de Hematoxilina/Eosina para su observación bajo microscopía óptica. Para el estudio de microscopía electrónica, las muestras se fijaron en una solución al 2% de tetraóxido de osmio ( $OsO_4$ ) a temperatura ambiente. Se practicaron secciones ultrafinas y se tiñeron con uranil acetato y nitrato de plomo para su análisis mediante microscopio electrónico de transmisión.

Para la interpretación estadística de los datos hematológicos comparativos se aplicó un test de t de Student - Fisher entre dos grupos (sanos y enfermos). Las diferencias significativas se consideraron cuando el valor  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS

**Radiología:** No se observó ninguna alteración al nivel de las vías bajas respiratorias.

Los campos pulmonares se mantienen claros y aparentemente inalterados en todos los animales radiografiados.

**Bacteriología:** Las bacterias aisladas a partir del exudado nasal de tortugas con esta enfermedad fueron las señaladas en la tabla 1.

**Hematología y bioquímica:** Los valores hematológicos encontrados en este proceso patológico, comparados con los de los animales control son los que se expresan en la tabla 2. Para los valores de Recuento Total de Eritrocitos, Hematocrito, Volumen Corpuscular Medio, Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media, urea, creatinina, ácido úrico y SGOT (AST) los valores no expresaban diferencias significativas entre las dos poblaciones y además no diferían de los ya publicados hasta el momento en esta especie de tortuga (MURO *et al.* 1998). Las diferencias significativas entre las dos poblaciones muestreadas se observan a nivel del recuento total de leucocitos, recuento de heterófilos, linfocitos, basófilos, valor de hemoglobina, hemoglobina corpuscular media (HCM), proteínas totales (albúmina) y colesterol.

**Citología:** La observación de las mucosidades eliminadas mediante técnicas citológicas permitió detectar una abundante población linfocitaria, junto con macrófagos y células del epitelio respiratorio desprendidas. Entre esta población celular se observan siempre acúmulos bacterianos difusos. En el mucus de animales en fases avanzadas pueden observarse abundantes linfocitos activados (con vacuolización por incremento de la actividad lisosomal e incremento del volumen citoplásmico) y células en distintas fases de picnosis o degeneración celular. En ninguna de las citologías se pudieron observar cuerpos de inclusión víricos (incluso en las citologías de las tortugas que murieron posteriormente y se les realizó un análisis histopatológico). En los animales control no se manifestaron ninguno de estos últimos signos descritos.

**Anatomía patológica:** En las necropsias realizadas se observaron palidez de mucosas

**Tabla 1:** Cultivos bacterianos tomados de exudados nasales en 11 tortugas afectadas.

**Table 1:** Bacterial cultures from 11 rhinitic tortoises.

Microorganismo aislado	Numero de muestras
<i>Providencia rettgeri</i>	7 (41.2%)
<i>Citrobacter freundii</i>	1 (5.8%)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	2 (11.7%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 (11.7%)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2 (11.7%)
<i>Pasteurella multocida</i>	1 (5.8%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (11.7%)
<i>Staphylococcus intermedius</i>	2 (11.7%)
<i>Staphylococcus lentus</i>	1 (5.8%)
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1 (5.8%)
<i>Achromobacter spp</i>	2 (11.7%)
<i>Chromobacterium spp</i>	1 (5.8%)
<i>Corynebacterium spp</i>	3 (15.7%)

nasales y coanas, intensa caquexia, ausencia de depósitos grasos, vísceras de reducido tamaño y alteraciones inflamatorias de laringe, tráquea y esófago. También se encontraron lesiones aparentemente no relacionadas con esta enfermedad como parasitismo intestinal por nematodos *Angusticaecum spp* (2 tortugas) o oxyuros (1 tortuga).

A microscopía óptica se observó en la cavidad nasal una necrosis extensa del epitelio respiratorio. Las células epiteliales presentaban pérdida de cilios y en la mayoría de ellas se apreciaban cariomegalia, marginación de la cromatina y presencia de cuerpos de inclusión intranucleares amfófilos (Figura 1). En la luz de la cavidad nasal se observaban gran cantidad de restos de células epiteliales necróticas. La lámina propia del epitelio respiratorio presentaba un leve infiltrado inflamatorio compuesto mayoritariamente por linfocitos y macrófagos. En el endotelio de algunos vasos sanguíneos de la lámina propia se observaban cuerpos de inclusión intranucleares amfófilos. En la lengua, cavidad oral adyacente y esófago se observó una necrosis por coagula-

**Tabla 2:** Valores sanguíneos determinados en tortugas moras con rinitis en *Testudo graeca*.**Table 2:** Blood values selectes in spor thiqed tortoises with rhinitis

Determinación	Grupo I (sanas) n = 6			Grupo II (rinitis) n = 11			p
	$\bar{x}$	(rango)	DS	$\bar{x}$	(rango)	DS	
RTL (cel/ $\mu$ l)	<b>18230</b>	(14100-24200)	4846	<b>12158</b>	(4400-22000)	6558	***
Hb (g/dl)	<b>9.04</b>	(8.3-11.1)	1.19	<b>6.59</b>	(4.1-11.7)	2.83	***
HCM (pg)	<b>147.8</b>	(123-168)	16.66	<b>105.25</b>	(73-173)	32.36	***
Diferencial (%)							
Heterófilos	<b>51.5</b>	(54-64)	3.56	<b>49.3</b>	(31-78)	15.74	***
linfocitos	<b>31.3</b>	(25-37)	4.76	<b>38.7</b>	(21-49)	9.99	***
Monocitos	<b>0.5</b>	(0-2)	0.84	<b>3.2</b>	(0-15)	5.	NS
Eosinófilos	<b>7.5</b>	(2-15)	4.37	<b>8.7</b>	(1-21)	7.73	NS
Basófilos	<b>1.17</b>	(0-2)	0.75	<b>0.10</b>	(0-1)	0.32	***
Trombocitos (por 100 leucocitos)	<b>321.2</b>	(210-477)	113.55	<b>212.4</b>	(33-432)	144.69	NS
Proteínas totales (g/dl)	<b>4.46</b>	(3.2-6)	0.92	<b>2.67</b>	(1.4-3.9)	0.8	***
Albumina (g/dl)	<b>1.6</b>	(1.5-1.7)	0.95	<b>0.84</b>	(0.52-1.26)	0.32	***
Globulinas (g/dl)							
Alfa	<b>0.5</b>	(0.37-0.63)	0.32	<b>0.61</b>	(0.29-0.98)	0.37	NS
Beta	<b>0.72</b>	(0.69-0.74)	0.42	<b>0.79</b>	(0.5-1.19)	0.31	NS
Gamma	<b>0.82</b>	(0.07-1.57)	0.03	<b>0.04</b>	(0.01-0.07)	0.03	NS
Colesterol (mg/dl)	<b>232.8</b>	(155-335)	114.03	<b>127</b>	(90-153)	25.08	***

**Nomenclatura:** n: Tamaño de muestra.  $\bar{x}$ : Media. DS: Desviación Standard \*\*\*:  $p < 0,05$ . RTL: Recuento Total de Leucocitos. Hg: Hemoglobina. HCM: Hemoglobina Corpuscular Media. NS: No Diferencias Significativas.

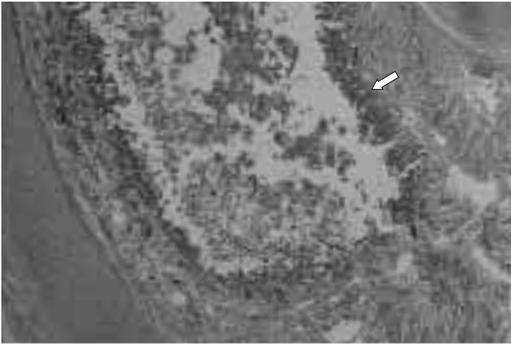
ción masiva y extensa del epitelio. La superficie lingual estaba recubierta por restos de células epiteliales necróticas, fibrina, eritrocitos y algunas colonias bacterianas. Algunas células epiteliales basales presentaban cariomegalia y cuerpos de inclusión intranucleares anfófilos (Figura 2). En la lámina propia se observaba un moderado infiltrado inflamatorio formado por macrófagos y linfocitos. El endotelio de algunos vasos sanguíneos de la lámina propia también presentaba cuerpos de inclusión intranucleares anfófilos.

La observación mediante microscopio electrónico permitió comprobar la marginación de la cromatina en la cara interna de la membrana nuclear así como observar partículas víricas. Éstas presentaban una nucleocápside de simetría icosaédrica y un tamaño de 100 a

120 nm. En función de la morfología y cuadro celular lesional, dichas partículas se identificaron como herpesvirus. La mayoría estaban dentro del núcleo y algunas pudieron observarse atravesando la membrana nuclear y localizándose en el citoplasma (Figura 3).

## DISCUSIÓN

Los valores obtenidos mediante el estudio radiológico permiten asegurar que esta enfermedad se manifiesta únicamente mediante afectación de las vías altas respiratorias. Al igual que otras enfermedades riníticas ya descritas en tortugas norteamericanas (JACOBSON *et al.* 1991), sólo se han descrito casos ocasionales con afectación pulmonar (MURO *et al.* 1998), correspondiendo probablemente



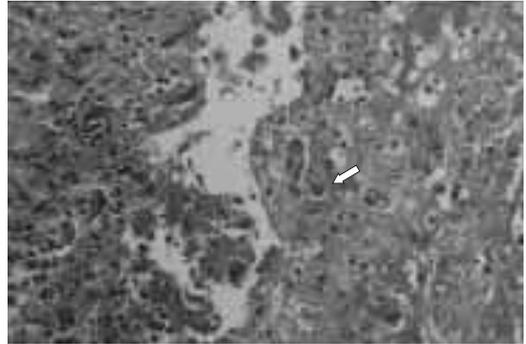
**Figura 1.-** Cavidad nasal ( $\times 200$ )(Hematoxilina/Eosina). Pueden observarse la formación de cuerpos de inclusión intranucleares (flecha).

**Figure 1.-** Nasal cavity ( $\times 200$ )(Hematoxilin/Eosin). Intranuclear inclusion bodies can be seen (arrows).

a un proceso de diseminación bacteriana de la enfermedad.

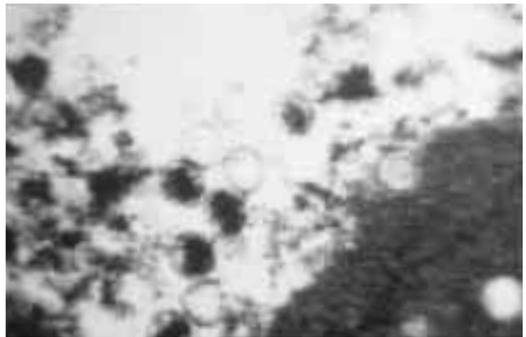
De acuerdo con MURO *et al.* 1998, los valores sanguíneos observados muestran una significativa depleción de heterófilos y una linfocitosis lo cual es compatible con una infección por algún agente microbiano o vírico. Ésta se ve complicada por una población bacteriana acompañante y eso provoca una activación de la respuesta inflamatoria y fagocitaria sistémica inespecífica, lo cual explica la linfocitosis observada (FRYE 1991; WORLEY *et al.* 1989). La presencia de granulación tóxica en los heterófilos observados demuestra la actividad fagocitaria del sistema inmunitario ante un agente invasor (CAMPBELL 1996; FRYE 1991). En todo caso los resultados obtenidos se relacionan con una depleción general granulocitaria correspondiente a un estado de inmunodepresión. Estadios parecidos se observan sólo en reptiles que, durante la hibernación, tienen el sistema inmunitario apenas activo de un modo fisiológico (COHEN 1970; DESSAUER 1970). Esta situación por tanto, es anormal en unos animales muestreados en una época del año en la que la activación inmunitaria es máxima (LAMBERT 1981; LAWRENCE 1987).

Por otro lado, los cultivos bacteriológicos han permitido aislar una población bacteriana



**Figura 2.-** Detalle de la mucosa lingual ( $\times 400$ )(Hematoxilina/Eosina). Pueden observarse también cuerpos de inclusión intranucleares (flecha).

**Figure 2.-** Tongue mucosa detail ( $\times 400$ )(Hematoxilin/Eosin). Intranuclear inclusion bodies can be seen (arrows).



**Figura 3.-** Fotografía a microscopio electrónico de transmisión ( $\times 40.000$ ) Se observan partículas víricas icosaédricas en el interior y periferia del núcleo celular.

**Figure 3.-** Electronic microphotographie ( $\times 40.000$ ). Icosaedric viral particles are inside and in the periferia of cell nucleous.

exclusiva en exudado nasal. Esta flora es significativamente distinta de la aislada en animales sanos (MARTÍNEZ-SILVESTRE & MATEU 1997). Además las bacterias presentes son géneros y especies que se consideran como patógenos específicos o al menos patógenos oportunistas. Los microorganismos aislados se aprovecharían de un estado de inmunosupresión crónica en el hospedador para instaurarse y complicar la sintomatología observada. Así pues no se aíslan las mismas especies patóge-

nas en todas las tortugas y eso será en función de las condiciones de mantenimiento de la tortuga e incluso de la flora normal del mucus en ese individuo. Ensayos de tratamiento con agentes antimicrobianos consecuentes a un Antibiograma pueden atenuar los síntomas pero no suelen llegar curar totalmente al individuo, lo que es indicador que las bacterias sólo son parte de un proceso multifactorial.

La teoría de la inmunosupresión se ve nuevamente respaldada por los resultados bioquímicos. En efecto, se observan diferencias altamente significativas entre el grupo de animales enfermos y los sanos control en los valores de proteínas sanguíneas. El análisis detallado de las proteínas permite observar un descenso significativo en la albúmina. Según MURO *et al.* (1998) se observa una deplección de la fracción alfa de las proteínas, cuyo significado se desconoce con relación a la rinitis. En nuestro estudio sólo se observa una significativa deplección de la albúmina. La hipoalbuminemia en un animal con una enfermedad cronificada es consecuencia del intenso consumo proteico cuando los demás recursos metabólicos están prácticamente agotados (WILL 1975). Cabe destacar que también se ha observado una deplección del colesterol en los animales enfermos respecto a los sanos. Todo ello responde a un estadio de caquexia por consumo de reservas. La contribución de la albúmina al volumen plasmático es muy importante en la hidratación de tortugas de ambientes secos y cálidos como la tortuga mora. Aunque no se observa una deshidratación en los animales muestreados, la hipoalbuminemia indica la posibilidad de que este estadio sea inminente, con lo cual se compromete seriamente la vida del animal.

La disminución que se observa en el valor de hemoglobina y hemoglobina corpuscular media es una forma de anemia que se ha descrito en tortugas desérticas (*Gopherus* sp) con enfermedad respiratoria crónica (JACOBSON *et al.* 1991), dato que coincide con nuestra población muestreada. Esta fase de anemia pare-

ce observarse sólo en tortugas afectadas de un modo crónico de rinitis puesto que no ha sido observado en tortugas con fases más agudas (MURO *et al.* 1998).

Por otro lado, la detección de herpesvirosis es un hecho relativamente frecuente tanto en quelonios acuáticos, marinos como en terrestres (JACOBSON 1995; PETTAN-BREVER *et al.* 1996). En la tortuga mora se han aportado casos vinculados a infecciones orofaríngeas únicamente en condiciones de cautividad, zoológicos o centros de recuperación (JACKSON & NEEDHAM 1983; HELDSTAB & BESTETTI 1989; MÜLLER *et al.* 1990), datos que coinciden con el presente estudio. Si bien se han observado ejemplares con sintomatología aparente de rinitis en la naturaleza (PONS & AGUILAR 1992; PONS & SALVADOR 1993; ANDREU, com. pers; EGUIA, com. pers), la existencia de esta enfermedad en condiciones de libertad no ha sido contrastada aún mediante cultivos, pruebas serológicas o controles histopatológicos.

Las infecciones por herpesvirus descritas hasta ahora en tortuga mora mencionan lesiones histológicas idénticas a las aquí descritas al nivel de boca y lengua, faringe y aparato respiratorio (COOPER *et al.* 1988; BLAHAK 1995; MURO *et al.* 1998). Coincidiendo también con las otras investigaciones, en nuestro caso, el cuadro lesional al nivel de boca y lengua se observa sólo en fases terminales de los animales afectados.

El correcto funcionamiento del sistema inmunitario de estos animales es esencial para la posible recuperación, cronificación o desenlace de los mismos (FRYE 1991). Se ha observado que los animales enfermos que consiguen sobrepasar el invierno pasan después correctamente el verano y entran de nuevo en hibernación al año siguiente. El sistema inmune de estos animales sufre siempre una "reactivación primaveral" que les ayuda a sobreponerse hasta el invierno siguiente aunque no se curan totalmente. Nuevamente, la deplección de defensas durante el invierno constituye el único paralelismo fisiológico con la inmunode-

presión observada en estos animales enfermos (DESSAUER 1970; REDROBE 1996). Se ha demostrado además, que las condiciones de mantenimiento, unidas a la superpoblación presente en los centros de acogida y al estrés de cautividad en las instalaciones zoológicas son factores predisponentes a esta inmunodepresión (JACOBSON 1994; O'CONNOR *et al* 1994). Este factor también determinaría que muchas tortugas afectadas permanecieran asintomáticas durante años y en momentos determinados de inmunodeplección se reactive la infección y aparezcan los signos clínicos.

El gran número de partículas virales observadas en los animales necropsiados, junto con la falta de respuesta a la terapia antimicrobiana convencional sugiere la posibilidad que esos organismos sean la causa de los síntomas observados.

También puede ser que una rinitis bacteriana simple se complicara en fases finales con la invasión del herpesvirus causante del cuadro final. Ambas fases acabarían con síntomas de estadios terminales (rinitis-estomatitis- glositis) y con la muerte del animal.

Por otro lado, los hallazgos citológicos son signos de un proceso inflamatorio crónico concomitante a una intensa proliferación bacteriana (COOPER 1986, CAMPBELL 1996). Incluso en algunas muestras sería posible observar células epiteliales desprendidas en estadios iniciales de replicación, con lo que los cuerpos de inclusión se harían visibles. Estos signos de inflamación bacteriana crónica o vírica no se observan en la rinitis por fluctuaciones térmicas bruscas o en la exteriorización de saliva por las coanas nasales. La posibilidad de encontrar cuerpos de inclusión en células mediante una citología es baja. Mediante este sistema diagnóstico, las células recogidas del área superficial de la mucosa lesionada y afectadas por una replicación viral se encuentran en un estado de picnosis que dificulta la interpretación citológica, incluso en animales que posteriormente se confirme la virosis mediante histología. De este modo, la búsqueda de un

agente viral mediante el uso exclusivo de técnicas citológicas puede producir falsos negativos que sólo se descubrirían mediante técnicas histológicas.

Así pues, un detallado análisis hematológico y citológico permiten discriminar la rinitis crónica de otros procesos infecciosos e incluso fisiológicos que provocan síntomas parecidos a ésta en fases iniciales.

Por otro lado, y basándose en lo anteriormente expuesto, deberían excluirse de cualquier proyecto de reintroducción todos los animales afectados y los asintomáticos que han convivido con los primeros. La capacidad de los herpesvirus y otros virus descritos en tortugas hasta el momento de crear infecciones persistentes en tortuga mora es muy elevada (MARSCHANG *et al.* 1998) y desaconseja trabajar con ejemplares sospechosos dirigidos para la suelta en la naturaleza sin la realización de, al menos, controles hematológicos, bioquímicos y citológicos completos.

No se conoce aún si los virus son invasores oportunistas ante un animal inmunosuprimido por condiciones externas (ambientales, de manejo, translocación, etc...) o si son los agentes inmunosupresores. En todo caso, el conocimiento del grado de respuesta serológica al virus y poder descartar su presencia en animales asintomáticos son algunas de las pautas a tener en cuenta en futuras investigaciones.

#### *Agradecimientos*

Los autores desean expresar sus agradecimientos por la colaboración prestada en la realización de las investigaciones y el aporte de datos a A. Sixto (ANSE, Cartagena), J. Soler (CRARC, Masquefa, Barcelona), A. Andreu (Estación Biológica de Doñana), S. Eguia (Centro de Recuperación del Valle, Murcia), A. Martínez Ribas (Laboratorios VETLAB, Barcelona) y B. Devaux (SOPTOM, Gonfaron, Francia) y a la Comisión de Medio Ambiente del Ayuntamiento de Masquefa por el soporte a esta investigación.

## REFERENCIAS

- BLAHAK, S. (1995): Herpesvirus infection in land tortoises as a problem of chelonian conservation. *International Congress of Chelonian Conservation* Gonfaron, Francia.
- CAMPBELL, T.W. (1996): Clinical pathology. In: *Reptile medicine and surgery*, edited by D.R. Mader, pp. 248-257. Saunders company, Philadelphia.
- COHEN, N. (1971): Reptiles as models for the study of immunity and its phylogenesis. *JAVMA*, 159:1662-1703.
- COOPER, J.E. (1986): The role of pathology in the investigation of diseases of reptiles. *Acta zoologica et pathologica antverpiensia*, 79:15-32.
- COOPER, J.E., GSCHMEISSER, S., AND BONE, R.D. (1988): Herpeslike virus particles in necrotic stomatitis of tortoises. *The Vet.Rec.*, 123:544.
- DESSAUER, H.C. (1970): Blood chemistry of reptiles: Physiological and evolutionary aspects. In: *Biology of the reptilia*, edited by C. Gans, pp. 172. Academic Press, London.
- FRYE, F. (1991): *Reptile care, an atlas of diseases and treatments*. T.F.H. Publications, New Jersey.
- HELDSTAB, A., AND BESTETTI, G. (1989): Herpesviridae causing glossitis and meningoencephalitis in land tortoises (*Testudo hermanni*). *Herpetopathologia.*, 1:5-10.
- HIGHFIELD, A.C. (1990): Notes on the dietary constituents for herbivorous terrestrial chelonians and their effect on growth and development. *ASRAj.*, 3(3):7-19.
- HOLT, P.E., COOPER, J.E., NEEDHAM, J.R. (1979): Diseases of tortoises: a review of seventy cases. *J small anim pract*;20:269-286.
- JACKSON, O.F., NEEDHAM, J.R. (1983): Rhinitis and virus antibody titres in chelonians. *J small anim pract*;24:3136.
- JACOBSON, E.R. (1995): Health problems of tortoises and marine turtles. *International Congress of Chelonian Conservation*: 125-126
- JACOBSON, E.R., BROWN, M.B., SCHUMACHER, I.M., COLLINS, B.R., HARRIS, R.K., KLEIN, P.A. (1995): Mycoplasmosis and the desert tortoise (*Gopherus agassizii*) in Las Vegas Valley, Nevada. *Chelonian Conservation and Biology*;1(4):279-284.
- JACOBSON, E.R. (1993): Implications of infectious diseases for captive propagation and introduction programs of threatened/endangered reptiles. *J Zoo Wild Med*; setembre:245-255.
- JACOBSON, E.R., GASKIN, J.M., BROWN, M.B. (1991): Chronic upper respiratory tract disease of freeranging desert tortoises (*Xerobates agassizii*). *J Wild Dis*;27.2:296-316.
- JACOBSON, E.R. (1994): Causes of mortality and diseases in tortoises: a review. *Jo.Zoo. Wild.Med.*, 25(1):2-17.
- LAMBERT, M.R.K. (1981): Temperature, activity and field sighting in the mediterranean spurthighed or common garden tortoise *Testudo graeca* L. *Biological conservation.*, 21:39-54.
- LAWRENCE, K., NEEDHAM, J.R.(1985): Rinitis in long term captive Mediterranean tortoises (*testudo graeca* and *Testudo hermanni*). *Vet Rec*;117:662-664.
- LAWRENCE, K. (1987): Seasonal variation in blood biochemistry of long term captive Mediterranean tortoises (*Testudo graeca* and *Testudo hermanni*). *Research in Veterinarian Science.*, 43:379-383.
- MARSCHANG, R.E., POSTHAUS, H., GRAVENDYCK, M., KALETA, E.F., BACCIARINI, L.N. (1998): Isolation of viruses from land tortoises in switzerland. *Proceedings AAZV and AAWV Joint Conference*: 281-284.
- MARTÍNEZ SILVESTRE, A., MATEU, E.(1993): Procesos riníticos en tortuga mora (*Testudo graeca*). *Hoja informativa de CONCER*; 7:4-9.
- MARTÍNEZ SILVESTRE, A.(1994): *Manual clínico de Reptiles*, Barcelona, GrassIatros Ediciones. 200 pp
- MARTÍNEZ SILVESTRE, A., AND MATEU, E. (1997): Bacteriological features of rhinitis

- in Captive Greek tortoises, *Testudo graeca*. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 7(2):12-15.
- MURO, J., RAMIS, A., PASTOR, J., VELARDE, R., TARRES, J., LAVIN, S. (1998): Chronic rhinitis associated with herpesviral infection in captive spur-thighed tortoises from Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 34(3): 487-495.
- MÜLLER, M., SACHSSE, W., AND ZANGGER, N. (1990): Herpesvirusepidemie bei der griechischen (*testudo hermanni*) und der maurischen landschildkröte (*Testudo graeca*) in der Schweiz. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 132: 199-203.
- O'CONNOR, M.P., GRUMBLES, J.S., GEORGE, R.H., ZIMMERMAN, L.C., AND SPOTILA, J.R. (1994): Potential hematological and biochemical indicators of stress in free ranging desert tortoises and captive tortoises exposed to a hydric stress gradient. *Herpetological monographs*, 8:5-26.
- PETTANBREWER, K.C.B., DREW, M.L., RAMSAY, E., MOHR, F.C., AND LOWENSTEIN, L. (1996): Herpesvirus particles associated with oral and respiratory lesions in a California desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *Jou.Wild.Dis.*, 32(3):521-526.
- PONS, S., AGUILAR, J.S.(1992): Incidencia de la enfermedad respiratoria de las tortugas de tierra en poblaciones silvestres de tortuga mora en Mallorca. *Concer*;3:8-10.
- PONS, S., SALVADOR, J.(1993): Epidemiologia de *Testudo graeca*. *Estudio no publicado*. Conselleria Balear de Medi Ambient.
- REDROBE, S. (1996): Posthibernation anorexia in tortoises. *the vet.rec.*, 139:480.
- SNIPE, K.P., BIBERSTEIN, E.L., FOWLER, M.E.(1980): A *Pasteurella* sp. associated with respiratory disease in captive desert tortoises. *Curr Vet ther*;1:804-807.
- VANROMPAY, D., DE MEURICHY, W., AND DUCATELLE, R. (1994): Pneumonia in Moorish tortoises (*Testudo graeca*) associated with avian serovar A *Chlamydia psittaci*. *the vet. rec.*, 17:284-285.
- WILL, R. (1975): Die verschiebungen des Bluteiwei(bildes (Dysproteinämien) bei Lebererkrankungen von Reptilien (Boidæ, Pythonidæ, Varanidæ). *zbl.Met.Med.*, 22:635-655.
- WORLEY, R.T.S., JURD, R.D., and MUTHUKARUPPAN, VR. (1989): Lymphocyte behaviour in two species of sauria. *Herpetopathologia.*, 1:41-48.

Recibido: 01/12/98

Aceptado: 16/09/99