



**ESPE**

**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE  
LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“Identificación de organismos del Filo Apicomplexa y Orden  
Rickettsiales en tortugas gigantes (*Chelonoidis* spp.) en las Islas  
Galápagos”**

**AUTOR: SEVILLANO MERA GABRIELA FERNANDA**

**DIRECTOR: PROAÑO PÉREZ FREDDY, Ph.D.**

**SANGOLQUÍ**

**2017**



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

### **CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, “**Identificación de organismos del Filo Apicomplexa y Orden Rickettsiales en tortugas gigantes (*Chelonoidis spp.*) en las Islas Galápagos**” realizado por la señorita **GABRIELA FERNANDA SEVILLANO MERA**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar la señorita **GABRIELA FERNANDA SEVILLANO MERA** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 13 de febrero del 2017

-----  
FREDDY PROAÑO PEREZ, Ph.D.

DIRECTOR



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD**

Yo, **GABRIELA FERNANDA SEVILLANO MERA**, con cédula de identidad N° 1726261983, declaro que este trabajo de titulación “**Identificación de organismos del Filo Apicomplexa y Orden Rickettsiales en tortugas gigantes (*Chelonoidis spp.*) en las Islas Galápagos**” ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 13 de febrero del 2017

-----  
GABRIELA FERNANDA SEVILLANO MERA

C.C: 1726261983



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN**

Yo, **GABRIELA FERNANDA SEVILLANO MERA**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación “**Identificación de organismos del Filo Apicomplexa y Orden Rickettsiales en tortugas gigantes (*Chelonoidis spp.*) en las Islas Galápagos**” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 13 de febrero del 2017

-----  
GABRIELA FERNANDA SEVILLANO MERA

C.C: 1726261983

## **DEDICATORIA**

A Dios porque sin Él no sería posible la vida, por todas las bendiciones que he recibido, por su infinito amor, y misericordia, por sus consejos y su ayuda, por su paciencia y porque cada día me regala un milagro.

A mis padres Fernando y Rocío por su amor incondicional, por su ayuda y apoyo, por su ejemplo de lucha y superación, porque gracias a su dedicación, esfuerzo, perseverancia, su amor, han hecho de mí una persona de bien, por su enorme apoyo en toda la ejecución del proyecto de investigación y por ayudarme a cumplir mi sueño de ser Ingeniera en Biotecnología.

A mis hermanas Verónica y María José por todos los momentos vividos, porque sin ellas mi vida no estaría completa. Y a mis angelitos Julio Cesar y José Joaquín porque ellos son las luces de mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y al Laboratorio de Biotecnología Animal que financió la realización de este proyecto de investigación.

Al Dr. Freddy Proaño, por ser mi Director de tesis, por su apoyo, preocupación, su tiempo, por su paciencia y ayuda en la ejecución de este proyecto. Por la oportunidad que me brindo en la realización de este Proyecto, en favor de la conservación de la biodiversidad que es uno de las principales razones por las que escogí esta carrera.

Al Dr. Armando Reyna, por ser mi maestro, por guiarme en cada fase de la investigación, por el tiempo que me dedico, la paciencia y por los conocimientos que me brindo, por las bromas y por los consejos.

A la Dra. María Augusta Chavéz por sus sabios consejos en los momentos precisos, por permitirme trabajar junto con el equipo del Laboratorio de Biotecnología Animal.

Al Dr. Washington Tapia Director de la Iniciativa de Restauración de Tortugas Gigantes en la Fundación Galápagos Conservancy, por su ayuda en la ejecución de este proyecto de investigación y por brindarme la oportunidad de formar parte de su iniciativa, y al Parque Nacional Galápagos y Fundación Charles Darwin, por poner a mi disposición las instalaciones de los mismos.

Al Dr. Jorge Ron, por su ayuda al aclarar las dudas con respecto al proceso investigativo.

Al Sr. Freddy Villalva, por su asistencia en el manejo de las tortugas gigantes y por la información brindada durante la ejecución del proyecto.

A la Dra. Andrea Loyola, por su ayuda, tiempo y compromiso durante mi estadía en Galápagos con el manejo de las tortugas gigantes.

Al equipo del laboratorio de Biotecnología Animal, especialmente Viviana Medina, Cristina Cholota y Michelle Caicedo que más que colegas han sido verdaderas amigas.

## TABLA DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN .....	II
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD .....	III
AUTORIZACIÓN .....	IV
DEDICATORIA .....	V
AGRADECIMIENTOS .....	VI
LISTADO DE FIGURAS .....	X
LISTADO DE TABLAS .....	XII
LISTADO DE ABREVIATURAS .....	XIII
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Formulación del problema.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Justificación del problema .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Objetivos de la investigación.....</b>	<b>4</b>
1.3.1 Objetivo general .....	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
<b>CAPÍTULO 2: REVISION BIBLIOGRAFICA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Tortugas gigantes de las Galápagos .....	5
2.1.1 Descripción .....	5
2.1.2 Taxonomía.....	6
2.1.3 Morfología.....	6
2.1.4 Distribución .....	7
2.1.5 Alimentación .....	8
2.1.6 Reproducción.....	9
2.1.7 Densidad Poblacional .....	9
2.1.8 Crianza en cautiverio .....	10
2.2 Hemoparásitos presentes en tortugas terrestres .....	11
2.2.1 Filo Apicomplexas.....	11
2.2.1.1 Morfología.....	12
2.2.1.2 Ciclo de vida.....	13
2.2.1.3 Taxonomía.....	14
2.2.1.4 Cuadro clínico .....	15
2.2.1.5 Diagnóstico.....	15
2.2.1.6 Tratamiento .....	15

2.2.1.7	Apicomplexas encontradas en Tortugas .....	16
2.2.1.7.1	<i>Haemoproteus geocheilonis</i> spp. ....	16
2.2.1.7.2	<i>Haemoproteus anaticum</i> spp. ....	18
2.2.1.7.3	<i>Haemoproteus caucásica</i> spp. ....	19
2.2.2	Clase Coccidias .....	20
2.2.2.1	Morfología .....	20
2.2.2.2	Ciclo de Vida .....	21
2.2.2.3	Taxonomía .....	22
2.2.2.4	Cuadro clínico .....	22
2.2.2.5	Diagnóstico .....	23
2.2.2.6	Tratamiento .....	23
2.2.2.7	Coccidias presentes en las Tortugas .....	24
2.2.2.7.1	<i>Cryptosporidium</i> .....	24
2.2.2.7.2	<i>Isospora gopheri</i> spp. ....	25
2.2.2.7.3	<i>Eimeria iversoni</i> spp. ....	26
2.2.3	Orden Rickettsiales .....	27
2.2.3.1	Morfología .....	28
2.2.3.2	Taxonomía .....	28
2.2.3.3	Ciclo de Vida .....	28
2.2.3.4	Epidemiología .....	29
2.2.3.5	Cuadro Clínico .....	29
2.2.3.6	Diagnóstico .....	29
2.2.3.7	Tratamiento .....	30
2.3	Sistema de hipótesis o pregunta de investigación .....	30
<b>CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>		<b>31</b>
<b>3.1 Participantes .....</b>		<b>31</b>
<b>3.2 Zona de estudio .....</b>		<b>31</b>
3.2.1	Trabajo de campo .....	31
3.2.2	Trabajo de laboratorio .....	32
<b>3.3 Período de tiempo de la investigación .....</b>		<b>32</b>
<b>3.4 Análisis Estadístico .....</b>		<b>32</b>
3.4.1	Descripción de la muestra .....	32
3.4.2	Cálculo del tamaño de la muestra .....	33
<b>3.5 Procedimiento .....</b>		<b>34</b>
3.5.1	Detección de parásitos gastrointestinales .....	34
3.5.1.1	Recolección de muestras fecales .....	35
3.5.1.2	Análisis Coproparasitarios: Métodos de concentración por flotación y sedimentación .....	35
3.5.1.3	Parámetros estadísticos .....	37
3.5.1.4	Extracción de ADN de muestras fecales .....	37
3.5.1.5	Estandarización de la PCR .....	38

3.5.1.5.1	Detección de Coccidias en muestras de heces de tortugas gigantes .....	38
3.5.1.5.2	Estimación de la temperatura de hibridación de los cebadores .	40
3.5.1.5.3	Estimación de la cantidad de MgCl <sub>2</sub> .....	41
3.5.1.6	PCR para identificación de coccidias .....	42
3.5.1.6.1	Visualización de Resultados.....	43
3.5.1.7	Análisis filogenético.....	44
3.5.2	Detección de hemoparásitos .....	44
3.5.2.1	Recolección de muestras de sangre periférica .....	44
3.5.2.2	Extracción de ADN de muestras de sangre periférica.....	45
3.5.2.3	Análisis moleculares PCR .....	46
3.5.2.3.1	Detección de Apicomplexas en muestras de sangre de tortugas gigantes .....	46
3.5.2.3.2	Detección de Rickettsias en muestras de sangre de tortugas gigantes .....	48
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>50</b>
4.1	Identificación de parásitos gastrointestinales en tortugas gigantes de Galápagos .....	50
4.2	Estandarización de la técnica de PCR para detección de apicomplexas de la clase coccidia.....	62
4.3	Detección de apicomplexas de la clase coccidia en muestras de heces de tortugas gigantes mediante la técnica de PCR.....	69
4.4	Caracterizar el tipo de coccidia presente en las muestras de heces de las tortugas gigantes, mediante un análisis filogenético. ....	70
4.5	Determinar la presencia de hemoparasitos del filo Apicomplexa y orden Rickettsiales en muestras de sangre periférica de tortugas gigantes de las Islas Galápagos, mediante el uso de técnicas moleculares PCR.....	75
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>		<b>82</b>
5.1	<b>Conclusiones</b> .....	<b>82</b>
5.2	<b>Recomendaciones</b> .....	<b>83</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>		<b>84</b>

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Tortuga gigante de Galápagos ( <i>Geochelone nigra</i> ) en el Parque Nacional Galápagos, Ecuador .....	5
Figura 2. Subespecies de tortugas gigantes de Galápagos ( <i>Geochelone nigra</i> ) .....	8
Figura 3. Mapa de distribución de tortugas Galápagos a través del Archipiélago de Galápagos. ....	8
Figura 4. Desciende la población de tortuga gigante 1600 – 2011. ....	10
Figura 5. Morfología de un zooito apicomplexa.....	13
Figura 6. Ciclo de vida de apicomplexas. ....	14
Figura 7. <i>Haemoproteus geocheloni</i> sn spp. en la tortuga <i>Geochelone denticulata</i> , con tinción de Giemsa.....	17
Figura 8. <i>Haemoproteus anatolicum</i> spp. ....	18
Figura 9. Ooquistes sin esporular de <i>Eimeria</i> spp.). ....	21
Figura 10. Ciclo de vida generalizado para los parásitos dentro del género <i>Eimeria</i> spp. ....	22
Figura 11. Ooquite esporulada de <i>Isospora gopheri</i> n. spp. ....	26
Figura 12. Ooquite de <i>Eimeria iversoni</i> n. sp.....	27
Figura 13. Corrales Centro de Crianza Fausto Llerena, “Parque Nacional Galápagos”. ....	35
Figura 14. Toma de muestra de sangre vena subcaparacial en corrales Centro de Crianza Fausto Llerena, “Parque Nacional Galápagos” .....	45
Figura 15 Necropsia de la tortuga gigante <i>Chelonoidis donfaustoi</i> .....	51
Figura 16. Parásitos en muestras fecales encontradas en tortugas gigantes de Galápagos. ....	54
Figura 17. Coccidias en muestras fecales encontradas en tortugas gigantes de Galápagos .....	55
Figura 18. Evaluación de la intensidad parasitaria de ooquistes de coccidia.....	56
Figura 19. Evaluación de la abundancia media parasitaria de ooquistes de coccidia.....	57
Figura 20. Evaluación de la prevalencia de parásitos gastrointestinales en muestras de heces de tortugas gigantes.....	58
Figura 21. Evaluación del grado de dominancia de parásitos gastrointestinales en muestras de heces de tortugas gigantes. ....	59
Figura 22. Evaluación la intensidad media de parásitos gastrointestinales en muestras de heces de tortugas gigantes .....	59
Figura 23. Extracción de ADN de muestras fecales.....	63
Figura 24. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) para identificación del tipo de coccidia en muestras de ADN fecal de tortugas gigantes. ....	65
Figura 25. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) para identificación del tipo de coccidia en muestras de ADN fecal de tortugas gigantes .....	66
Figura 26. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) para identificación del tipo de coccidia en muestras de ADN fecal de tortugas gigantes. ....	68
Figura 27. Análisis filogenético molecular por método de máxima verosimilitud	

de las secuencias parciales de nucleótidos 18S rRNA de coccidias .....	72
Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de ADN total de tortugas gigantes.....	76
Figura 29. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) para identificación del filo Apicomplexa en muestras de ADN de sangre de tortugas gigantes.....	77
Figura 30. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) para identificación del filo Apicomplexa en muestras de ADN de sangre de tortugas gigantes.....	77
Figura 31. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) para identificación del filo Apicomplexa en muestras de ADN de sangre de tortugas gigantes.....	78
Figura 32. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) para identificación de la clase Rickettsiales en muestras de ADN de sangre de tortugas gigantes.....	78
Figura 33. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) para identificación de la clase Rickettsiales en muestras de ADN de sangre de tortugas gigantes.....	79

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1 Estimación del tamaño de las muestras de sangre de tortugas gigantes en centro de crianza “Fausto Llerena” del Parque Nacional Galápagos.....	34
Tabla 2 Toma de muestras por islas.....	34
Tabla 3 Cebadores usados para amplificar un fragmento de 1300pb del gen 18S rRNA de Apicomplexas.....	39
Tabla 4 Concentraciones usadas para PCR Coccidias.....	39
Tabla 5 Programa amplificación de gen 18S rRNA de Apicomplexas.....	39
Tabla 6 Programa amplificación de gen 18S rRNA de Apicomplexas.....	40
Tabla 7 Gradientes de temperaturas de hibridación usadas para la estandarización de PCR.....	40
Tabla 8 Concentraciones usadas para la estandarización de PCR.....	41
Tabla 9 Concentraciones usadas para la estandarización de PCR.....	41
Tabla 10 Concentraciones usadas para la estandarización de PCR.....	42
Tabla 11 Concentraciones usadas para la estandarización de PCR.....	42
Tabla 12 Concentraciones usadas para identificación de coccidia.....	43
Tabla 13 Concentraciones usadas para identificación de coccidia.....	43
Tabla 14 Cebadores usados para amplificar un fragmento de 300-400pb del gen 18S rRNA de Apicomplexas.....	46
Tabla 15 Concentraciones usadas para PCR Apicomplexas.....	47
Tabla 16 Programa amplificación de gen 18S rRNA de Apicomplexas.....	47
Tabla 17 Cebadores usados para amplificar un fragmento de 1200pb del gen 16S rRNA de Rickettsias.....	48
Tabla 18 Concentraciones usadas para PCR Rickettsias.....	48
Tabla 19 Programa amplificación de gen 16S rRNA de Rickettsias.....	49
Tabla 20 Muestras tomadas del Centro de Crianza “Fausto Llerena”.....	52
Tabla 21 Total parásitos gastrointestinales encontrados en tortugas gigantes diagnosticadas por isla.....	56
Tabla 22 Parámetros estadísticos parásitos gastrointestinales encontrados en tortugas gigantes diagnosticadas por isla.....	58
Tabla 23 Tabla de interacción entre nematodos.....	60
Tabla 24 Factores de expansión de Oxiuros.....	60
Tabla 25 Factores de expansión de Estróngilos.....	61
Tabla 26 Cuantificación de ADN en muestras fecales de tortugas gigantes de Galápagos.....	64

## LISTADO DE ABREVIATURAS

**(C-)** = Control negativo

**(C+)** = Control positivo

**μL**= microlitros

**μm**= micrometro

**μM**= microMolaridad

**16S** = Gen 16s, rRNA

**18S** = Gen 18S, rRNA

**3F**= Cebador directo eucariota

**ABG**= Agencia de Bioseguridad de Galápagos

**ADN**= Ácido desoxiribonucleico

**ANOVA**= Análisis de varianza

**Api1R**= Cebador inverso específico Apicomplexa

**ARNr**= ARN ribosomal

**bp**= Pares de bases

**dNTPs**= Desoxiribonucleótidos trifosfato

**EDTA**= Ácido etilendiaminotetraacético

**hpg**= número de parásitos por gramo

**i**= error que se prevé cometer si es del 10 %

**M**= Marcador de peso molecular

**N**= tamaño de la población

**n**= tamaño muestra

**NaCl**= cloruro de sodio

**ngr**= nanogramos

**p**= prevalencia esperada del parámetro a evaluar, en caso de desconocerse ( $p = 0.5$ ), que hace mayor el tamaño de la muestra

**PCR**= Reacción de cadena de polimerasa

**PIRO A**= cebador directo para apicomplexas

**PIRO B**= cebador reverso para apicomplexas

**q**=  $1 - p$  (si  $p = 70\%$ ,  $q = 30\%$ )

**rpm**= revoluciones por minuto

**SDS**= Dodecil sulfato de sodio

**Spp.**= especie

**Taq**= *Thermus aquaticus*

**UICN**= Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

**YaF**= cebador directo para rickettsias

**YaR**= cebador reverso para rickettsias

**z**= valor correspondiente a la distribución de gauss,  $z_{\alpha=0.05} = 1.96$  y  $z_{\alpha=0.01} = 2$ .

## RESUMEN

Dentro del Programa de restauración de especies de tortugas gigantes financiado por Galápagos Conservancy, se planteó realizar una la evaluación de la salud de las tortugas gigantes de Galápagos, utilizando técnicas moleculares de diagnóstico para la identificación de enfermedades infecciosas y parasitarias en la población de tortugas. Se realizó una necropsia de una tortuga, observando la presencia de nódulos en el intestino compatibles con coccidiosis. Posteriormente se llevó a cabo un examen coproparasitario en 21 muestras de heces de tortugas, provenientes de las islas Santa Cruz, Santiago, Española y Pinzón, encontrándose una presencia del 100% de ooquistes y por ello, se estableció un posterior análisis molecular usando cebadores específicos para coccidias a fin de evaluar las muestras por PCR. Las muestras de heces analizadas obtuvieron resultados positivos con el PCR para la infección coccidial. La secuenciación y los análisis filogenéticos indicaron la presencia de un coccidio no clasificado. El análisis de inferencia de máxima verosimilitud lo colocó próximo a *Eimeriidae ambiental* dentro del grupo de *Eimeriidae* spp. La presencia de ooquistes coccidiales en muestras de heces de tortugas gigantes plantea preguntas sobre el método de transmisión estableciéndose que sea por vía oral debido a contaminación del agua o de las plantas con las que se alimentan. Este estudio representa la primera caracterización molecular de coccidias en las tortugas gigantes de Galápagos. Además se evaluó la presencia de hemoparásitos del filo Apicomplexa y orden Rickettsiales; sin embargo, no se encontró ninguno positivo en el muestreo realizado, por lo que se estableció que al ser las islas Galápagos un sistema de parque nacionales protegidos el impacto de estos parásitos pudiera ser mínimo.

**PALABRAS CLAVE:**

**GALÁPAGOS**

**TORTUGAS GIGANTES (*CHELONOIDIS* SPP.)**

**HEMOPARÁSITOS**

**COCCIDIAS**

**PCR**

**COPROPARASITARIOS**

**FILOGENIA**

## ABSTRACT

Within the Giant Tortoise Restoration Program financed by Galapagos Conservancy, it was raised to perform an assessment on health of the giant Galapagos tortoises, applying molecular diagnostic techniques to identify infectious and parasitic diseases in the population of tortoises. Necropsies was undertaken on one tortoise, observing the presence of nodules in the intestine compatible with coccidian disease. Subsequently, coproparasitary analysis was performed on 21 stool samples of tortoises from Santa Cruz, Santiago, Española and Pinzón islands. All samples were positive for coccidial infection by microscopic examination. A subsequent molecular analysis was established using coccidial primers in order to evaluate the samples by PCR. Stool samples analyzed showed positive results with PCR for coccidial infection. Sequencing and phylogenetic analysis indicated the presence of a non-classified coccidium. Maximum likelihood inference analyses placed the genotype closest to *Eimeriidae enviromental* and *Eimeriidae* spp. group. The presence of coccidiales ooquites in giant tortoises stool samples raises questions about the method of transmission, by contamination of the water or the plants. This study represents the first characterization molecular of coccidial in the tortoises giant of Galapagos. Also assessed the presence of hemoparasites of the phylum Apicomplexa and Rickettsial order; however, no positive results were found in the sampling performed , so it was established that the impact of these parasites is minimal to the Galapagos Islands, because is a system of parks nationals protected.

### KEY WORDS:

**GALÁPAGOS**

**GIGANT TORTOISES (*CHELONOIDIS* SPP.)**

**HEMOPARASITES**

**COCCIDIA**

**PCR**

**COPROPARASITARIOS**

**PHYLOGENY**

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1.1 Formulación del problema

Las Islas Galápagos, son reconocidas a nivel mundial, tanto por su valor ecológico, como por ser un símbolo mundial de descubrimientos científicos. Además de representar uno de los mayores desafíos de conservación para la sociedad. El archipiélago cuenta con 128 islas que son únicas en la tierra, poseen un alto endemismo biológico y se estima que un 95% de la diversidad está aún presente en las Islas, por lo que acciones de mantenimiento y restauración de la biota en el archipiélago son relativamente significativos, evitando que los ecosistemas se vean afectados gravemente, sin embargo en la actualidad se presenta las más altas tasas de extinción en el mundo, debido a la falta de control de especies exóticas y a las actividades humanas (Tye, Snell, Peck, & Adsersen, 2002).

Las tortugas gigantes son los animales terrestres más grandes que habitan las Islas Galápagos, es una especie endémica y una de las más importantes por su valor ecológico y turístico (Rubio, 2008). Desde el descubrimiento de las islas por los españoles en el siglo 16, ha disminuido su número significativamente de un aproximado de 250 000 a 14 000-8000 individuos en la década de 1970, probablemente como resultado de la presencia humana y a que han tenido que vencer un ambiente sumamente inhóspito (Poulakakis, Russello, Geist, & Caccone, 2012).

De los 14 taxones reconocidos de tortugas gigantes (Poulakakis *et al.*, 2012), cuatro se extinguieron durante el año 1535, y otro en 2012 con la muerte de Solitario George, el único superviviente de la Isla Pinta (Edwards *et al.*, 2013). Según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, UICN (2016), los nueve taxones restantes están actualmente en peligro de extinción, principalmente debido a la llegada del hombre y a la introducción de especies invasoras, por lo que necesitan un sistema adecuado de restauración, mediante el establecimiento de procesos de reproducción y reintroducción de especies en condiciones óptimas, libres de parásitos y enfermedades a sus islas de origen.

Como parte del programa de restauración de especies de tortugas gigantes propuesto por Galápagos Conservancy, uno de los componentes que se estableció es la evaluación sanitaria y salud de las tortugas, utilizando técnicas moleculares de diagnóstico para la identificación de enfermedades infecciosas y parasitarias en la población de tortugas. Por lo cual dentro del presente proyecto se plantea evaluar la presencia de organismos del filo Apicomplexa de muestras de sangre y heces y del orden Rickettsiales en muestras de sangre de las tortugas Gigantes de diferentes edades procedentes de las Islas Galápagos.

## **1.2 Justificación del problema**

La presencia de parásitos en tortugas, y en menor cantidad en las tortugas gigantes de Galápagos no ha sido ampliamente estudiada, existen ciertas investigaciones que evidencian la presencia de estos organismos en tortugas, sin embargo es un tema que no se ha desarrollado completamente como en el caso de otras especies, por lo cual, no es sorprendente que prácticamente no hay datos disponibles sobre patogenicidad y virulencia, ni sobre el impacto que producen sobre la biodiversidad, el estado de salud de los animales, o sus poblaciones (Javanbakht *et al.*, 2015).

El parasitismo en las poblaciones de animales salvajes es reconocido como un factor fundamental que podría afectar la fecundidad y supervivencia, además de la conservación de la vida silvestre, reduciendo significativamente las poblaciones existentes (Fournie *et al.*, 2015; Hudson, Dobson, & Newborn, 1998). Por lo que la evaluación de las comunidades de parásitos en poblaciones de animales salvajes es, esencial para la gestión de los procesos de conservación (Fournie *et al.*, 2015).

El problema de la pérdida de especies de tortugas gigantes se puede atribuir a la posibilidad de contraer enfermedades y a la presencia de vectores como son las garrapatas, que se han adaptado a las tortugas como hospedero y cuya prevalencia es especialmente alta en aquellas que viven de manera silvestre. Según varios estudios realizados a nivel mundial, estos ectoparásitos son los causantes de una cantidad importante de agentes patógenos por lo que su estudio es de gran relevancia (Ehlers *et al.*, 2016; Erster, Roth, Avni, King, & Shkap, 2015; Peirce & Castleman, 1974).

Según la Dirección del Parque Nacional Galápagos, 2014, datos recientes muestran que a pesar que las islas conservan la mayor parte de las especies nativas y endémicas originales y ninguna o muy pocas especies introducidas. Es por esto que las especies de tortugas gigantes se constituyen como individuos fundamentales para los ecosistemas y su ausencia temporal o permanente en islas como Española, Pinta, Floreana y Santa Fe; o el tener poblaciones muy reducidas en Pinzón, Santiago y el Sur de Isabela, se está generando una pérdida de la integridad ecológica de estas islas, debido a que la ausencia de las tortugas está produciendo un desbalance en las relaciones entre las especies nativas, una situación que la restauración de las tortugas gigantes a gran escala puede mejorar.

Para lo cual se han establecido programas de reintroducción de especies de tortugas gigantes a las islas en las cuales su ausencia es significativa, la reintroducción es un componente clave para la recuperación de muchas especies amenazadas. Hasta la actualidad, la translocación que es la introducción de animales a la naturaleza se ha utilizado para establecer, reestablecer y aumentar poblaciones de especies no nativas y restaurar las especies nativas extintas. Ante la creciente tasa de extinción de especies y la reducción inminente de la diversidad biológica la translocación de especies se ha convertido en una técnica de conservación cada vez más importante (Griffith, Scott, Carpenter, & Reed, 1989).

Para llevar a cabo un proceso de restauración es necesario establecer estrategias adecuadas que sugieran un mayor éxito e identificar los factores que puedan afectar la translocación, como la presencia de organismos patógenos, y cuya finalidad sea reintroducir especies libres de enfermedades, asegurando el bienestar, y supervivencia de las tortugas en ambientes silvestres.

### **1.3 Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Identificar organismos del Filo Apicomplexa y Orden Rickettsiales en tortugas gigantes (*Chelonoidis* spp.) en las Islas Galápagos

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- ✓ Detectar parásitos gastrointestinales en muestras de heces de tortugas gigantes procedentes de las Islas Galápagos, mediante métodos de flotación y sedimentación.
- ✓ Estandarizar la técnica de reacción de cadena de polimerasa (PCR) para la identificación de apicomplexas de la clase coccidia en muestras de heces de tortugas gigantes.
- ✓ Determinar la presencia de apicomplexas de la clase coccidia en muestras de heces de tortugas gigantes mediante la técnica de PCR.
- ✓ Caracterizar el tipo de coccidia presente en las muestras de heces de las tortugas gigantes, mediante un análisis filogenético.
- ✓ Determinar la presencia de hemoparásitos del Filo Apicomplexa y Orden Rickettsiales en muestras de sangre periférica de tortugas gigantes de las Islas Galápagos, mediante el uso de técnicas moleculares PCR.

## CAPÍTULO 2: REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Tortugas gigantes de las Galápagos

#### 2.1.1 Descripción

Las tortugas gigantes han persistido a través del tiempo únicamente en islas oceánicas de origen volcánico entre ellas las Galápagos, Seychelles, y Mascareñas, en este lugar el último quelonio se extinguió por causa antrópica en 1804. Las tortugas de las islas Seychelles están representadas por una única población ubicada en el atolón de Aldabra (Soler, Martinez, Medina, & Solé, 2001). Sólo las Galápagos tienen distintas poblaciones distribuidas en sus diferentes Islas (Figura 1)

Las tortugas gigantes de las Islas Galápagos (*Geochelone nigra*) son reconocidos por su contribución al desarrollo de la teoría de la selección natural de Darwin, y como símbolos de la riqueza emblemática de las Islas (Pritchard, 1996). Es uno de los vertebrados de más larga vida, pudiendo llegar a la edad de 152 años. La tortuga gigante de Galápagos está clasificada como una especie vulnerable en la Lista Roja de la UICN.



**Figura 1. Tortuga gigante de Galápagos (*Geochelone nigra*) en el Parque Nacional Galápagos, Ecuador**

### 2.1.2 Taxonomía

A pesar de su importancia, la taxonomía de las tortugas de Galápagos ha sido largamente debatida y ha experimentado cambios recurrentes. En primer lugar, Mertens y Wermuth describen grupos a nivel de subespecie, bajo el nombre *Testudo elephantopus*. A continuación, sobre la base de datos morfológicos, Loveridge y Williams establecieron *Geochelone* como el género más apropiado para las tortugas Galápagos y las coloca en una especie (*G. Elephantopus*) dentro del subgénero *Chelonoidis*. Más recientemente, Bour nombró a *Chelonoidis* como especie y Pritchard establece a *Geochelone* y *Chelonoidis* como el género y subgénero respectivamente, finalmente según datos genéticos presentados por Le, Raxworthy se indica que *Geochelone* es polifilético y por lo tanto *Chelonoidis* es considerado como género (Poulakakis *et al.*, 2015).

Obteniéndose la taxonomía descrita a continuación:

**Reino** Animalia

**Filo** Chordata

**Clase** Reptilia

**Orden** Testudines

**Familia** Testudinidae

**Género** *Chelonoidis* (IUCN, 2012)

### 2.1.3 Morfología

Las subespecies de tortugas gigantes difieren en ciertas características morfológicas, tales como la forma de caparazón, que puede ser en cúpula o montura, el tamaño máximo del adulto, y la longitud del cuello y las extremidades (Fritts, 1984). Se puede distinguir tres morfotipos dependiendo de las características climáticas y las zonas vegetales de las islas dentro estas húmedas, áridas y semiáridas (Márquez *et al.*, 2004).

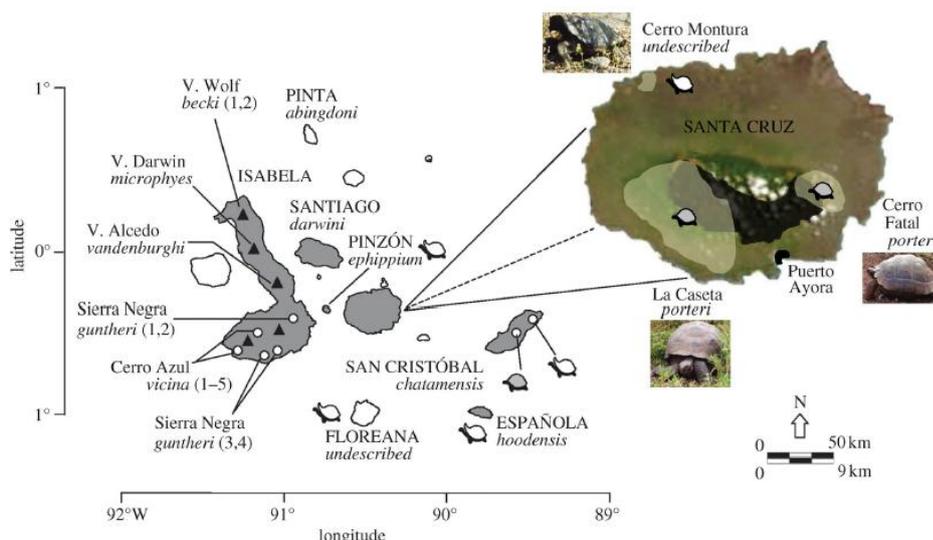
1. Las tortugas con caparazón en forma de cúpula habitan en las zonas húmedas, como Islas Santa Cruz e Isabela, son las tortugas de mayor tamaño y peso, un macho puede alcanzar 170cm de longitud y un peso de 320 kg; y la hembra 120cm y 100 kg de peso, tienen extremidades y cuello corto.
2. Las tortugas con caparazón en forma de montura viven en islas bajas y áridas, dentro de estas las Islas Española, Pinzón y Pinta, son las tortugas más pequeñas, los machos pueden medir hasta 100 cm en longitud, con un peso de 85 kg. Las hembras alcanzan los 70 cm y 40 kg de peso, tienen el cuello y extremidades largas.
3. Las tortugas con caparazón intermedia que habitan en islas semiáridas, como Isla San Cristóbal, son de tamaño intermedio. Los machos alcanzan los 112 cm de longitud y pesan hasta 80 kg, con cuello y extremidades intermedias.

#### **2.1.4 Distribución**

Originalmente existieron quince especies de tortugas gigantes, pero a causa de la sobreexplotación de los alimentos, la pérdida de hábitat y los impactos de las especies invasoras, actualmente existen once especies, dentro de las que se pueden nombrar (Figura 2): *abingdonii* (originaria de la Isla Pinta, extinta en 2012), *becki* (Volcán Wolf, Norte de la Isla Isabela), *chathamensis* (Isla San Cristobal), *darwini* (Isla Santiago), *elephantopus* (extinta originaria de Floreana, también llamada nigra), *ephippium* (Isla Pinzón, llamada también *duncanensis*), *hoodensis* (Isla Española), *porteri* (Isla Santa Cruz), y *vicina* (Centro y Sur de Isla Isabela), una especie sin nombre procedente del Cerro Fatal, Isla Santa Cruz y una especie extinta que no ha sido nombrada originaria de la Isla Santa Fé, *wallacei* (Isla Rabida), *phantastica* (extinta originaria de Fernandina) (Caccone, Gibbs, Ketmaier, Suatoni, & Powell, 1999).

Subspecies	Locality
<i>becki</i>	Isabela–Wolf
<i>microphyes</i>	Isabela–Darwin
<i>vandenburghi</i>	Isabela–Alcedo
<i>guntheri</i>	Isabela–Sierra Negra
<i>vicina</i>	Isabela–Cerro Azul
<i>darwini</i>	San Salvador
<i>porteri</i>	Santa Cruz
<i>abingdoni</i>	Pinta
<i>ephippium</i>	Pinzón
<i>chatamensis</i>	San Cristóbal
<i>hoodensis</i>	Española

**Figura 2. Subespecies de tortugas gigantes de Galápagos (*Geochelone nigra*)**  
Fuente: (Caccone *et al.*, 1999).



**Figura 3. Mapa de distribución de tortugas Galápagos a través del Archipiélago de Galápagos**  
Fuente: (Russello *et al.*, 2005).

### 2.1.5 Alimentación

La tortuga gigante es un animal herbívoro, su dieta principal son las tunas, debido a la cantidad de agua que se encuentra dentro de esta planta, complementan su alimentación con hierbas, pastos, y flores (Suárez & García, 1986).

No tienen depredadores naturales, pero sus huevos y crías son presa de las varias especies introducidas como las cabras y por humanos. Además presentan amenazas de otros animales asilvestrados como perros, gatos y ratas que representan

un peligro antes de que las tortugas juveniles desarrollen su caparazón, mientras que las cabras y el ganado compiten con la tortuga gigante de las Islas por la vegetación (Márquez *et al.*, 2004).

Tienen una gran capacidad para sobrevivir sin agua y sin alimento durante varios meses. Para elevar su temperatura corporal, se expone a los rayos de sol de las primeras horas de la mañana. Es de movimientos lentos, y tiende a desplazarse durante el día en busca de alimento y en la noche descansa entre la vegetación para conservar su calor o en las depresiones excavadas en el suelo (Soler *et al.*, 2001).

### **2.1.6 Reproducción**

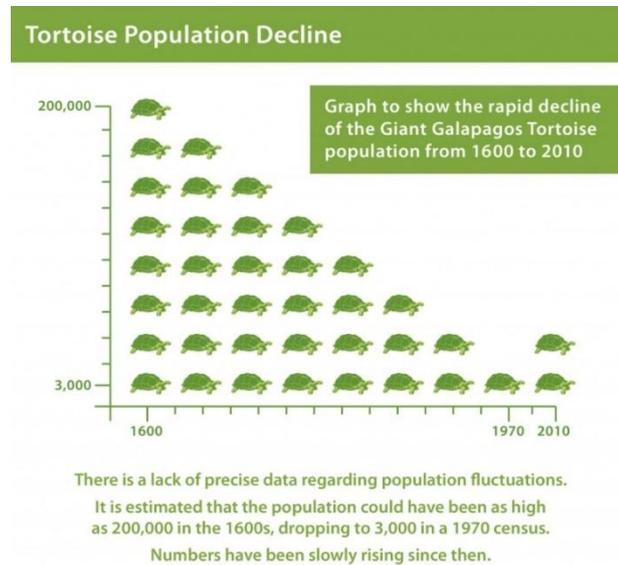
La tortuga gigante tiene una fertilización interna, entre los meses de enero y agosto, el macho busca a la hembra, la persigue y comienza el cortejo con la intimidación, se pega a la parte delantera de su caparazón y pellizca sus piernas expuestas, inmovilizándola. A continuación, se acopla con ella. La anidación tiene lugar en momentos diferentes, pero por lo general entre junio y diciembre. En época de reproducción migran a las zonas bajas de las islas para anidar. La tortuga hembra pone de 2 a 16 huevos en un nido excavado en la tierra arenosa, y lo cubren con tierra y hojas. Las crías tardan alrededor de tres a ocho meses en eclosionar, incluso períodos más largos dependiendo del clima de la zona (Benítez, Revelo, Hidalgo, & Ecuatoriana, 1997).

### **2.1.7 Densidad Poblacional**

Las tortugas que sobrevivieron a la captura y a ser fuente de alimentación, se enfrentan a nuevas amenazas, una creciente industria turística de la población, el aumento de la agricultura humana, el desarrollo de la infraestructura y la introducción de especies invasoras como cabras, ratas, cerdos y hormigas de fuego (Soler *et al.*, 2001)

La cantidad de especies de tortugas gigantes ha disminuido significativamente en los últimos años, con una población total estimada de entre 6.000 y 20.000 individuos

en comparación con alrededor de 250.000 antes de la llegada de los seres humanos a las islas (Márquez *et al.*, 2004).



**Figura 4. Desciende la población de tortuga gigante 1600 – 2011**  
**Fuente:(GalapagosConservationTrust, 2011).**

### 2.1.8 Crianza en cautiverio

Debido a los fuertes impactos que han tenido las actividades humanas, la introducción de animales exóticos y la destrucción de los hábitats de las tortugas, el gobierno ecuatoriano desde 1970 declaró a las tortugas como animales en peligro y se hallan estrictamente protegidas. En los años setenta el Parque Nacional Galápagos, junto con sus colaboradores estableció un programa para salvar a las tortugas, cuando se tenía solo una población 100 tortugas, mediante la recolección de huevos, crianza en cautiverio y repoblación de hábitat de tortugas han logrado que la especie de estabilice (Aguilera, Malaga, & Gibbs, 2015).

### *Reproducción y de crianza de tortugas*

El Parque Nacional Galápagos realiza dos veces al año viajes de monitoreo de las población de tortugas gigantes, el primero durante la época de anidación en la que se determina la ubicación de los nidos, un segundo viaje se lleva a cabo para la recolección de huevos y de las tortugas precoces recién nacidas. Los huevos son colocados en incubadoras a diferentes temperaturas, de 29,5 °C y 28°C para obtener

hembras y machos, respectivamente. Luego pasan a cajas oscuras en las cuales eclosionan los huevos, a continuación son llevadas a corrales donde se las mantiene en cuarentena, alimentándolas únicamente de hojas de otoy (*Xanthosoma sagittifolium*) y tallos de porotillo (*Erythrina fusca*).

Las tortugas permanecen juntas y aisladas del resto durante su estancia en el Centros de Crianza “Fausto Llerena”, en las instalaciones de la Dirección del Parque Nacional Galápagos y la Estación Científica Charles Darwin, en la isla Santa Cruz. Cuando la curva del caparazón de las tortugas alcanza los 20-25 centímetros, se marcan para futuras identificaciones y monitoreos y son empacadas para trasladarlas a su lugar de origen.

El Centro de Crianza “Fausto Llerena” aloja más de 1000 tortugas de las islas Santa Cruz, Santiago, Pinzón y Española, 75 de las cuales son adultas y se mantienen en el Centro con fines reproductivos y ecoturísticos.

## **2.2 Hemoparásitos presentes en tortugas terrestres**

Los parásitos de la sangre de los reptiles son diversos y morfológicamente variables que en otros hospederos como son mamíferos y aves, esto puede estar relacionado con el tamaño más grande de los eritrocitos de reptil y la presencia de núcleos prominentes dentro de ellos, además sus hábitats son más restringidos y aislados, lo que favorece a un aumento de la diversidad taxonómica de los parásitos (Telford, 2016).

### **2.2.1 Filo Apicomplexas**

Apicomplexa es el phylum protista más grande y complejo, han sido descritas 5000 especies y 60.000 aún no tiene nombre (Levine, 1988). Los protozoos que pertenecen a este grupo tienen características biológicas y morfológicas comunes, que las distinguen de los demás grupos restantes, entre las que se pueden citar:

La presencia de una organela exclusiva, el complejo apical, todos los zoitos que tienen la función de penetrar dentro de la célula hospedera tienen esta estructura, la cual les facilita su desarrollo intracitoplasmático (Berenguer, 2007).

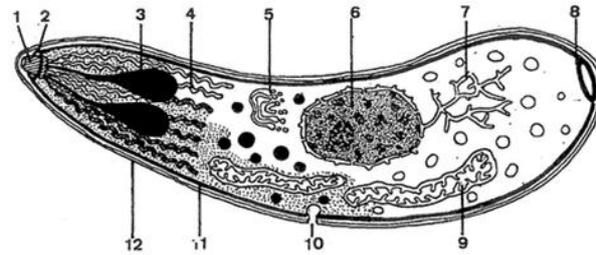
Son parásitos intracelulares obligados que dependen de la célula huésped para la supervivencia y replicación, en sus fases de multiplicación asexual (Berenguer, 2007; Dogga & Soldati-Favre, 2016).

Cumplen un ciclo biológico metacíclico, durante el cual se evidencian tres fases: multiplicación asexual o agamogónica, formación de gametos o gamogónica que finaliza con la formación de un cigoto, formación de esporozoitos que son los responsables de pasar el parásito, directa o indirectamente a un nuevo hospedero (Berenguer, 2007).

#### **2.2.1.1 Morfología**

Los apicomplexa tienen una estructura que se conoce como el complejo apical, tienen un solo núcleo, no tienen cilios ni flagelos, excepto en los microgametos (Schmidt & Roberts, 2000).

Presenta un cuerpo oval alargado, de unos pocos  $\mu\text{m}$  de largo, su citoplasma está limitado por una membrana laminar reforzada en su cara interna por una serie de microtúbulos, que recorren longitudinalmente el cuerpo del zoito, estos microtúbulos tienen en sus extremos un anillo polar anterior, muy próximo a la región apical y un anillo posterior cercano al extremo posterior del zoito. En la membrana laminar se encuentran microporos, cuya pared está formada por la membrana plasmática. El complejo apical está constituido por un conoide, situado a nivel del anillo polar anterior y posee unas estructuras microfibrilares, en forma helicoidal, robtrias que son dos o más organelas piriformes y micronemas, que se prolongan desde el conoide hasta el primer tercio del cuerpo del zoito. Se puede distinguir un aparato de Golgi, retículo endoplásmico granuloso y liso, y formaciones granulares llamados gránulos densos (Berenguer, 2007).



**Figura 5. Morfología de un zoocito apicomplejo**

**Fuente: (Berenguer, 2007).**

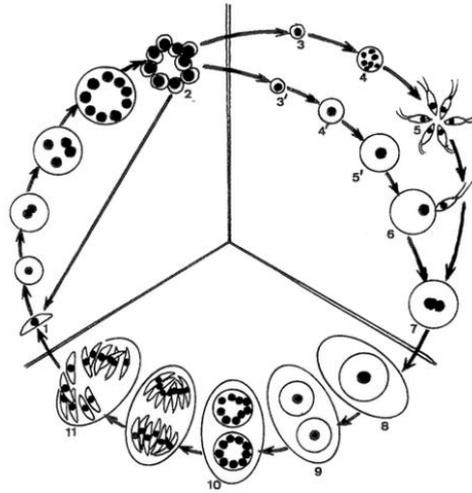
Presenta 1.conoide 2.anillo polar 3.rostrias 4.micronemas del complejo apical 5.aparato de Golgi 6. núcleo 7.retículo endoplásmico 8.anillo polar posterior 9.mitocondria 10.microporo 11.microtubulos subpeliculares 12.película

### 2.2.1.2 Ciclo de vida

El género hemogregarina perteneciente al filo Apicomplexa, son las hemoparásitos comunes y ampliamente distribuidos de reptiles (Telford, 2016). El ciclo de vida de hemogregarina comienza cuando el vector artrópodo que es el hospedero definitivo ingiere sangre que contiene macro y microgametocitos. En el intestino se induce una serie compleja de eventos, donde los gametocitos maduran. Los microgametocitos producen de 8 a 12 células pequeñas en forma de hilo, los microgametos, que fecundan al macrogameto. La fertilización origina cigotos móviles, que penetran las células epiteliales del intestino, originando un ooquiste. Cuando el ooquiste madura, libera los esporozoitos. Estos migran y se acumulan en las glándulas salivares del vector infectando al huésped al alimentarse (Matta & Rodríguez, 2001).

Cuando el ciclo de vida inicia con un hospedador vertebrado se inicia la fase agamogónica o asexual, en la cual el parásito se multiplica en los órganos y tejidos de su hospedador. Ocurren varias divisiones asexuales obteniendo merozoitos o esquizoitos, que son células sexuales inmaduras, con las cuales inicia la segunda fase sexual, fase gamogónica o sexual inicia con la maduración de las merozoitos, que tienen el nombre de microgametos que tienen la presencia de flagelos y macrogametos. Se produce la unión de los gametos y se forma los cigotos, que inician la tercera fase esporogónica, en la cual se produce la división del cigoto formando los esporozoitos (Berenguer, 2007).

Cuando en el ciclo interviene un vertebrado e invertebrado, este último actúa como un vector, y en él ocurre la maduración de los gametos y la formación del ooquiste que inicia la fase esporogónica y la liberación de los esporozoitos a la cavidad hemocélica del artrópodo, que pasan a las glándulas salivales y son introducidos al vertebrado (Berenguer, 2007).



**Figura 6. Ciclo de vida de apicomplexas**

**Fuente: (Berenguer, 2007).**

Primera fase: ocurre varias divisiones y se forman los merozoitos. Segunda fase: maduración de merozoitos y formación de microgametocitos y macrogametocitos, unión de los gametocitos y formación del cigoto. Tercera fase: formación del ooquiste, maduración y liberación de los esporozoitos

### 2.2.1.3 Taxonomía

Los parásitos apicomplexas pertenecen al reino Protista, subreino Protozoa (Siachoque, 2006), se caracterizan por la presencia de un complejo apical. El phylum Apicomplexa se dividen en cinco grupos principales: los Gregarinas, Haemogregarines, Coccidios, Haemosporidia y Piroplasmas. Los Apicomplexa están divididos en más de 300 géneros y más de 60 familias, sin embargo la mayoría de estos grupos contienen sólo una o unas pocas especies. Existen aproximadamente 50 géneros con 10 o más especies nombradas, y sólo el 8 géneros con 100 especies. Estos 8 géneros (*Eimeria*, *Haemogregarina*, *Gregarina*, *Isospora*, *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Sarcocystis*, y *Babesia*) comprenden más de la mitad de las especies (Levine, 1988).

#### **2.2.1.4 Cuadro clínico**

Las hemogregarinas de los reptiles están bien adaptadas al huésped y normalmente no causan enfermedad clínica, sin embargo, las infestaciones intensas pueden causar anemia e inanición. Debido a que son relativamente no específicos del huésped, los hemogregaridios pueden causar enfermedad clínica significativa en especies hospedantes anormales, tales infecciones resultan en lesiones inflamatorias severas en varios órganos (Divers & Mader, 2005).

#### **2.2.1.5 Diagnóstico**

Tradicionalmente la microscopia es la prueba gold-standard para estudios parasitológicos, se ha usado además en la identificación y clasificación de la diversidad de biota protistas y hemoparasitos en reptiles (Telford, 2016).

Las infecciones con *Haemoproteus* se pueden diagnosticar por medio de frotis sanguíneos tenidos o por cortes histológicos de los órganos afectados (Romero, 1999).

#### ***Técnicas moleculares PCR***

Las técnicas moleculares son ampliamente usadas para la detección y caracterización de protistas en animales salvajes y doméstico. Comparados con los métodos tradicionales, como microscopia, las técnicas moleculares son las beneficiosas, debido a mayor especificidad y sensibilidad en la detección de infecciones parasitarias, especialmente cuando se presenta niveles bajos de parasitemia (Telford, 2016). La técnica de PCR para el filo apicomplexas, usa un cebador diseñado para hibridar una única región 18 S rRNA conservado entre las especies de apicomplexas que las diferencia de los dinoflagelados (Acton, 2012).

#### **2.2.1.6 Tratamiento**

Ningún tratamiento notificado es efectivo en el tratamiento de la hemogregariedad (Divers & Mader 2005). Las infecciones con los organismos apicomplexas del género *Haemoproteus*, generalmente no se requieren tratamiento, pero si es necesario se usa la quinacrina, que es efectiva contra gametos, no contra esquizontes (Romero, 1999).

### 2.2.1.7 Apicomplexas encontradas en Tortugas

Los parásitos *Haemoproteus*, se caracterizan por sus ciclos de vida heteroxeno y por su patrón de distribución que es determinado por factores climáticos y ecológicos que permiten una co-distribución, tanto de hospederos intermedios y definitivos. Las características del hábitat tienen un efecto considerable sobre la ocurrencia y abundancia de acogida, el vector, y las especies de parásitos. La incidencia y la intensidad de la infección pueden verse afectados por otros factores, tales como la susceptibilidad del huésped, el huésped de preferencia del vector, y la abundancia relativa de huéspedes y vectores. En el caso de los reptiles al ser los hábitats más reducidos y su movilidad más baja en comparación con los demás animales, la diversidad de hemoparásitos es mayor que en mamíferos o aves (Javanbakht *et al.*, 2015).

#### 2.2.1.7.1 *Haemoproteus geocheilonis* spp.

##### *Taxonomía*

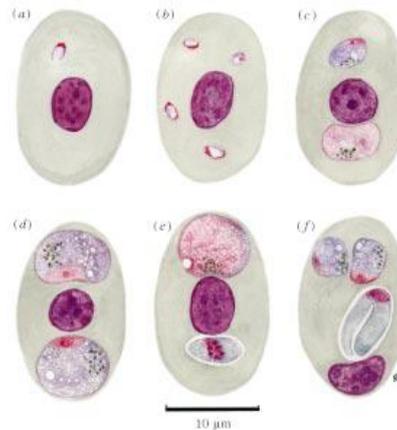
**Filo** Apicomplexa

**Clase** Aconoidasida

**Orden** Haemosporida

**Familia** Haemoproteidae

**Género** *Haemoproteus*



**Figura 7. *Haemoproteus geocheloni* sn spp. en la tortuga *Geochelone denticulata*, con tinción de Giemsa  
Fuente: (Lainson & Naiff, 1998)**

### *Características*

El parásito se desarrolla en los eritrocitos maduros, presenta una forma redonda u ovoide y mide  $1,6 \mu\text{m} \times 1,0 \mu\text{m}$ . consta de una vacuola, alrededor de la cual se distribuye el citoplasma y la cromatina a manera de una banda delgada que la hace semejante a la forma del anillo de *Plasmodium falciparum* o *Theileria*. Los parásitos pierden su forma ameboide durante su crecimiento, tomando forma de riñón, alcanzando aproximadamente  $4,0 \mu\text{m} \times 3,0 \mu\text{m}$ , y logrando distinguirse entre gametocitos masculinos y femeninos, usando la tinción de Giemsa. El citoplasma muestra una sola vacuola, rara vez dos, ubicada con mayor frecuencia situada cerca de la periferia del organismo. Presentan además gránulos de pigmento color verde oscuro o negro que se encuentran generalmente agrupados en la periferia del organismo. El núcleo no está definido pero presenta una única o fragmentada cariosoma que es visible debido a su coloración más profunda con la tinción de Giemsa (Lainson & Naiff, 1998).

**2.2.1.7.2 *Haemoproteus anatolicum* spp.**  
*Taxonomía*

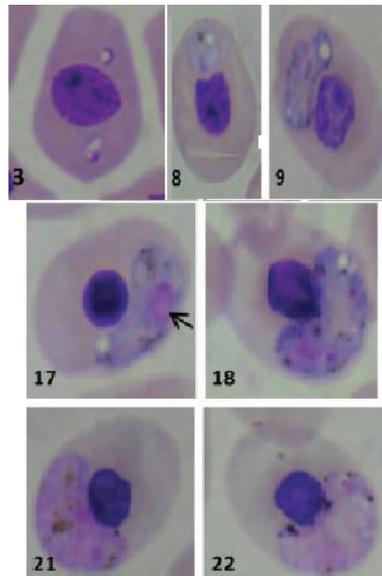
**Filo** Apicomplexa

**Clase** Aconoidasida

**Orden** Haemosporida

**Familia** Haemoproteidae

**Género** *Haemoproteus*



**Figura 8. *Haemoproteus anatolicum* spp.**  
**Fuente: (Orkun & Guven, 2013)**

***Características***

Cuando están en estado inmaduro, presentan una forma anillo u oval, asemejándose a *Theileria*, y se pueden encontrar entre uno y seis dentro del mismo eritrocito. Los parásitos tienden a desarrollarse dentro de los eritrocitos adultos, se caracterizan por la presencia de una vacuola grande en el citoplasma, no presenta gránulos de pigmento. Durante la diferenciación de gametocitos, el citoplasma del microgametocito es de color rosa pálido, mientras que en el macrogametocito es de

color azul. El núcleo presenta una coloración rosada, los macrogametocitos presentan una sola vacuola, en tanto que los microgametocitos pueden parasitar sin vacuola, se distingue la presencia de gránulos de pigmento negro, pueden estar de uno a tres en los eritrocitos. Los microgametocitos maduros están situados en la región terminal o lateral en el interior de los eritrocitos, el citoplasma es de color rosa pálido, con una o tres vacuolas y con gránulos de pigmento dispersos en el citoplasma. Parásito núcleo no se puede distinguir. Al comparar los eritrocitos infectados con los no infectados, se reveló que el núcleo de eritrocitos no infectados son más largos que los infectados, pero que el núcleo de los eritrocitos infectados es más anchos que los no infectados (Orkun & Guven, 2013).

### **2.2.1.7.3 *Haemoproteus caucásica* spp.**

#### ***Taxonomía***

**Filo** Apicomplexa

**Clase** Aconoidasida

**Orden** Haemosporida

**Familia** Haemoproteidae

**Género** *Haemoproteus*

#### ***Características***

Los macrogametocitos jóvenes son redondos u ovalados, se colocan por lo general en posición terminal dentro del eritrocito. Presentan de dos a tres vacuolas distintas y finos gránulos de pigmento negro-marrón que están presentes en el citoplasma de color púrpura. Los microgametocitos jóvenes tienen una apariencia esférica u oval y al igual que los macrogametocitos se ubican en posición terminal. El citoplasma presenta un color morado pálido, puede contener pequeñas vacuolas y unos gránulos de color marrón. Los macrogametocitos son de forma redonda o ameboide, por lo general más delgada en un extremo y más amplio y voluminoso en

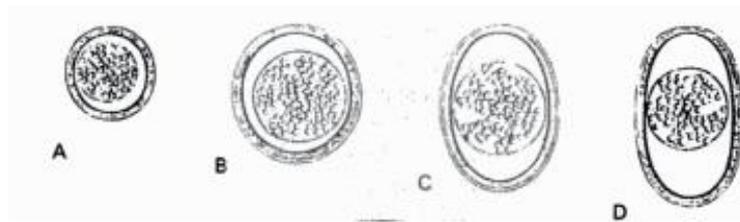
el extremo opuesto. Los parásitos se encuentran en la mayoría de los eritrocitos en posición terminal, dispone de citoplasma de color púrpura y de uno a seis pequeñas vacuolas, con gránulos negro-marrón de tamaño variable. Mientras que los microgametocitos maduros en forma de riñón, y con posición terminal en el eritrocito, disponen de un citoplasma de color blanco o rosa pálido, rara vez vacuolado y con gránulos de pigmentos color marrón oscuro, dispersos en varias áreas o formando agregaciones (Javanbakht *et al.*, 2015).

### **2.2.2 Clase Coccidias**

Se caracterizan por presentar ooquistes esporocistados, es decir que los esporozoitos se desarrollan dentro de cubiertas esporoquísticas y no en la cavidad del ooquiste. Cada género se diferencia de la familia por el número de esporoquistes, y por los esporozoitos formados. Además se identifican porque parasitan células epiteliales y a un rango reducido de hospedadores, siendo frecuente que varias se encuentren dentro de un mismo animal (Berenguer, 2007).

#### **2.2.2.1 Morfología**

Los ooquistes tienen forma esférica, oval, elipsoidal, o subesférica. La pared está formada por una o dos capas y puede estar delimitada por una membrana. Los ooquistes esporulados puede presentar o no, una abertura en el extremo anterior llamada micrópilo, tiene cuatro esporoblastos, cada uno con dos esporozoitos. Consta de un gránulo polar refráctil, un residuo del ooquiste y de los esporoblastos. Los esporoblastos pueden tener en uno de sus extremos una estructura a manera de botón, llamado cuerpo de Stiedae. Los esporozoitos tienen forma de coma. Los estados parasitarios se pueden observar durante varias etapas de su desarrollo dentro de células epiteliales, dependiendo de la especie, pueden estar dentro del tracto digestivo, el duodeno, ciego y yeyuno, algunas pueden encontrarse en las microvellosidades. La localización dentro de la célula varía de especie a especie, ubicándose cerca del núcleo o lejos de este (Romero, 1999).



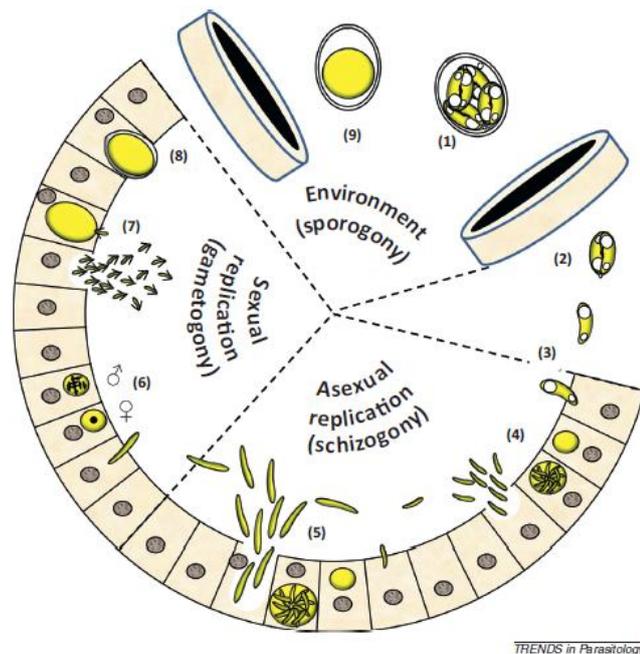
**Figura 9. Ooquistes sin esporular de *Eimeria* spp.  
Fuente: (Romero, 1999).**

### 2.2.2.2 Ciclo de Vida

Las coccidias son parásitos apicomplexas, que se caracterizan por que su ciclo de vida y replicación ocurre en el tejido del intestino del hospedero vertebrado, a diferencia de las hemogregarinas que cumplen su ciclo de vida en un hospedero invertebrado (Telford, 2016). La infección por coccidia se produce después de la ingestión de alimentos, agua o material contaminado con ooquistes de heces contaminadas. (Cama & Mathison, 2015).

La ingestión de un ooquiste esporulado inicia las fases endógenas del ciclo de vida de *Eimeria*. Después la digestión enzimática en el estómago y en el intestino proximal rompe mecánicamente la pared del ooquiste y libera cuatro esporocistos de cada ooquiste esporulado, la exposición a enzimas digestivas permite que el esporozoito escape del esporocisto a medida que pasa por el intestino. El esporozoito continúa su paso por la luz del intestinal hasta que se adhiere e invade el tejido epitelial. En el interior de la célula epitelial, el esporozoito toma una forma redonda formando un trofozoito antes de producirse una esquizogonía (fisión múltiple asexual), dando como resultado la producción de múltiples merozoitos que se rompen y salen de la célula huésped, estos merozoitos se diferencian en gametos, comenzando con la fase sexual del ciclo de vida, estos merozoitos forman macrogametocitos y microgametocitos inmaduros. Los microgametos maduros abandonan la célula huésped y penetran en células vecinas, fertilizando a los macrogametos maduros para formar el cigoto. Después la macrogameta forma una pared resistente, transformándose en un ooquiste, que se libera de la célula huésped en el lumen intestinal para ser excretados en el ambiente, iniciando la fase exógena.

El ooquiste experimenta una esporulación en el ambiente, requiriendo calor, oxígeno y humedad, produciendo una división nuclear secuencial meiotica y mitótica, para convertirse en un ooquiste esporulado, cada uno con cuatro esporocistos con dos esporozoitos, que ahora sin infecciosos (Blake & Tomley, 2014).



**Figura 10. Ciclo de vida generalizado para los parásitos dentro del género *Eimeria* spp.**

**Fuente: (Blake & Tomley, 2014).**

### 2.2.2.3 Taxonomía

Los coccidios son protozoarios del filo apicomplexa, de la clase coccidia que se disponen en el epitelio mucoso del intestino delgado y grueso donde se multiplican, se conoce algunas familias de coccidios entre ellas Eimeridae, agrupados en dos géneros: *Eimeria* e *Isospora* y Cryptosporidiidae (Pineda, 1985).

### 2.2.2.4 Cuadro clínico

El primer signo de la enfermedad suele ser la aparición de diarrea profusa, con expulsión de materias fecales semilíquidas, de olor fétido, con sangre o moco. Las mucosas pueden estar pálidas, puede darse casos de anemia, debilidad, deshidratación, enflaquecimiento y anorexia (Romero, 1999).

### **2.2.2.5 Diagnóstico**

El diagnóstico parasitológico se basa en la identificación de los ooquistes del parásito presentes en el material fecal. Para esto se puede recurrir al examen directo en fresco, al coproparasitoscópico de concentración por flotación con sacarosa o con solución salina, usando la solución de Sheater y la microscopia fluorescente. Otra alternativa es realizar frotis fecales usando la tinción de ácido alcohol resistencia de Kinyoun, en el caso que se realicen biopsias de las paredes del duodeno, yeyuno e íleon, se debe realizar con hematoxilina eosina. Para observar la esporulación y facilitar la identificación de los esporoquistes con sus respectivos esporozoitos, se debe incubar a los ooquistes inmaduros en una solución de dicromato de potasio al 2.5% a 25-32°C, en un tiempo de aproximadamente dos semanas (Cabello, 2007).

### ***Técnicas Moleculares PCR***

El desarrollo de técnicas moleculares, especialmente la reacción de cadena de polimerasa PCR, es una alternativa rápida, sensible, precisa y de bajo costo, para el diagnóstico convencional de coccidias en humanos, animales domésticos y salvajes, esta herramienta molecular acompañada de la secuenciación del amplicón proporciona información sobre la variabilidad genética de las diversas especies, y puede demostrar que lo que antes se pensaba que era una sola especie, no son genéticamente uniformes, sino que se componen de distintas especies. La mayoría de estudios genéticos usan cebadores de PCR específicos del parásito y secuenciación, con la finalidad de superar el problema de contaminación de los ooquistes recuperados de muestras fecales (Duszynski & Couch, 2013).

El gen 18S rRNA, ha sido usado para la construcción filogenética, que determinan la relación filogenética entre organismos, esta es usado en organismos como *Cryptosporidium* spp., colocándolos dentro del grupo de coccidios del filo apicomplexa, junto con *Eimeria* spp, y *Cyclospora* spp (Rochelle, De Leon, & Atwill, 2001).

### **2.2.2.6 Tratamiento**

El tratamiento de coccidia no cuenta con muchas alternativas, se ha utilizado el trimetoprim-sulfametoxazol (Cabello, 2007).

### 2.2.2.7 Coccidias presentes en las Tortugas

Más de 30 especies de coccidios son conocidas en las tortugas, siendo las más comunes de la clase *Eimeria*, que no causa una enfermedad significativa en sus anfitriones, aunque en animales jóvenes puede desarrollar la enfermedad clínica si la intensidad de la infección es alta. Además hay evidencias de la presencia de *Cryptosporidium* spp. es raro, pero se ha informado en reptiles, anfibios, mamíferos y aves. La enfermedades en los reptiles, incluyendo otras especies de tortugas, se asocia comúnmente con infecciones por *Cryptosporidium* (McGuire *et al.*, 2013).

#### 2.2.2.7.1 *Cryptosporidium*

##### *Taxonomía*

**Filo** Apicomplexa

**Clase** Coccidia

**Orden** Eucoccidiorida

**Suborden** Eimeriorina

**Familia** Cryptosporidiidae

*Cryptosporidium* spp. son parásitos protozoarios con etapas de desarrollo endógenos situados en el borde del epitelio de la mucosa intestinal en huéspedes vertebrados Tienen un ciclo de vida monoxeno, con una única etapa exógena e infecciosa, los ooquistes son transmitidos por vía fecal oral y frecuentemente a través del agua (Graczyk, Cranfield, Mann, & Strandberg, 1998).

*Cryptosporidium* spp. son morfológicamente caracterizado por la presencia de un orgánulo alimentador de fijación, se ubica en las células del huésped, de manera intracelular o extracitoplásmico, presenta dos tipos de ooquistes funcionales de pared fina y gruesa, no presenta la fase de esporocistos, no gránulos polares, requieren un solo huésped para completar su ciclo de vida. Se caracterizan por que sus ooquistes son totalmente esporulados, de pared gruesa y se eliminan en las heces. A diferencia de otros coccidias intestinales, los ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

son inmediatamente infectivos, cuando son eliminados desde el hospedador (Cama & Mathison, 2015).

### ***Cryptosporidium presentes en Tortugas***

Se ha reportado infecciones por *Cryptosporidium* en heces de tortugas, en especies como *Clemmys muhlen bergi*, *Geochelone elegans*, *Geochelone carbonaria* y *Chelonia mydas*, la presencia de este parásito puede identificarse por la sintomatología, una de los síntomas más comunes es la gastritis, suponiendo que la región gástrica es el sitio de la infección. Un caso estudiado fue en una tortuga hembra adulta de 2 años de edad *T. kleinmanni*, a la cual se le realizó una necropsia, observándose una severa infección por *Cryptosporidium*, en el intestino delgado. Se realizaron frotis fecales de otros tres *T. kleinmanni* del mismo grupo y cuatro *T. kleinmanni* del mismo corral y se observó ooquistes de *Cryptosporidium* mediante tinción con ácido rápido, no se observó una infección grave parasitaria en el intestino de las tortugas (Graczyk *et al.*, 1998).

La sintomatología que presenta en la tortuga incluye síntomas gastrointestinal como diarrea, dysorexia y pica (Traversa, Iorio, Otranto, Modry, & Slapeta, 2008).

#### **2.2.2.7.2 *Isospora gopheri* spp.**

##### **Taxonomía**

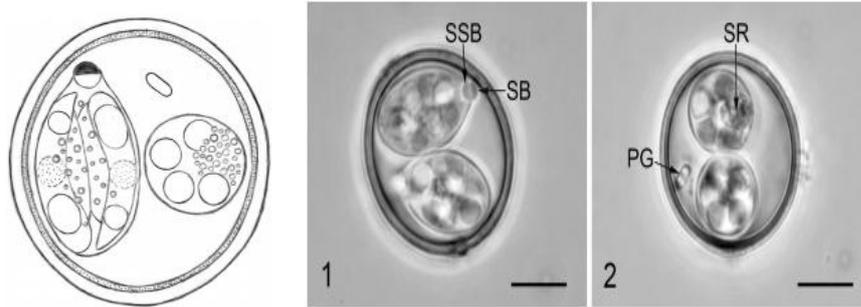
**Filo** Apicomplexa

**Clase** Coccidia

**Orden** Eucoccidiorida

**Suborden** Eimeriorina

**Familia** Eimeriidae



**Figura 11. Ooquite esporulada de *Isospora gopheri* n. spp.**

**Fuente: (Hnida, 2015)**

PG, gránulo polar; SB, cuerpo Stieda; SR, residuo esporoquiste; SSB, cuerpo sub-Stieda

Se caracterizan por poseer oocistos esporulados, sus ooquistes son de forma esferoidal a subesferoidal, presentan bicapas, una capa exterior que es lisa e incoloro a amarillo claro, y una capa interior más oscura, por lo general forma elipsoidal, los ooquistes pueden estar libres o en el interior de la pared de los mismos. Los esporoquistes pueden estar dispersos o formando una masa compacta de distintos tamaños gránulos. Los esporozoitos se encuentran dentro de los esporocistos, tienen forma alargada, con la parte anterior del cuerpo esferoidal y refractante y la posterior del cuerpo elipsoidal y refráctiles. Pueden o no presentar un cuerpo de Stieda, o pueden presentar un cuerpo de Steida junto con uno sub-Stieda. El núcleo es difícil de distinguir, y se ubica cerca del punto medio de esporozoitos (Hnida, 2015).

### 2.2.2.7.3 *Eimeria iversoni* spp.

#### *Taxonomía*

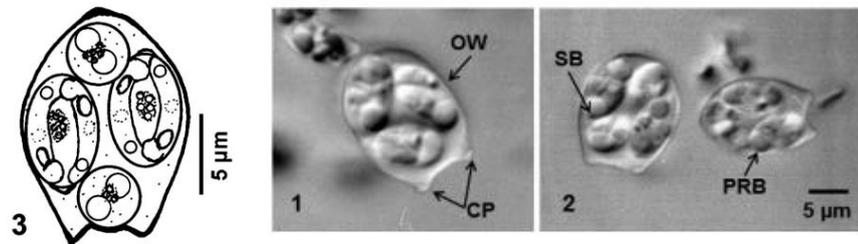
**Filo** Apicomplexa

**Clase** Coccidia

**Orden** Eucoccidiorida

**Suborden** Eimeriorina

### Familia Eimeriidae



**Figura 12. Ooquiste de *Eimeria iversoni* n. sp.**

**Fuente: (McAllister, Duszynski, & Roberts, 2014)**

CP, proyección cónica; OW, pared del ooquiste; PRB, cuerpo posterior retractile; SB, cuerpo de Stieda

La especie *Eimeria iversoni* posee ooquistes esporulados en forma ovoide y con una pared de una sola capa lisa. Los ooquistes presentan una característica distintiva, que es la presencia de 2 proyecciones cónicas al final del ooquiste. Los esporocistos y esporozoitos tienen forma alargada y elipsoidal, con una pared de una sola capa lisa. Presentan un cuerpo de Stieda, cinco residuos esporoquísticos en forma de pequeños glóbulos, esporozoitos, cuerpos retráctiles anteriores y posteriores, pero está ausente el cuerpo sub-Stieda y para-Stieda, el núcleo es visible (McAllister *et al.*, 2014).

#### 2.2.3 Orden Rickettsiales

Las rickettsias son bacterias Gram negativas, parásitos intracelulares obligados, dependen de la célula huésped para la obtención de energía en forma de ATP, necesaria para ejecutar sus funciones vitales (García, 2004). Da origen a la rickettsiosis una enfermedad infecciosa y a veces zoonótica de distribución universal, transmitida por organismos artrópodos como piojos, pulgas, garrapatas y ácaros, en el cual se desempeña tanto como vector como de reservorio. Pueden infectar a varios animales vertebrados silvestres y los convierte en reservorio continuo de la enfermedad (Negroni, 2009).

### 2.2.3.1 Morfología

Las bacterias del género *Rickettsia*, tienen forma bacilar, cocobacilar o son pleomórficas, con un tamaño alrededor de 0,3 a 0,5  $\mu\text{m}$  por 1 a 2  $\mu\text{m}$ . Las rickettsias son bacterias intracelulares obligadas transmitidas por artrópodos que infectan principalmente células endoteliales (Negroni, 2009).

### 2.2.3.2 Taxonomía

Pertenecen al Dominio Bacteria, Phylum Proteobacteria, orden *Rickettsiales*, en el cual se incluyen a su vez dos familias *Rickettsiaceae* y *Anaplasmataceae*. La familia *Rickettsiaceae*, comprenden dos géneros *Orientia* y *Rickettsia*, mientras que la familia *Anaplasmataceae* con los géneros *Anaplasma* y *Ehrlichia* (Negroni, 2009).

### 2.2.3.3 Ciclo de Vida

El ciclo de la bacteria involucra hospederos vertebrados e invertebrados. El invertebrado generalmente una garrapata puede adquirir el agente patógeno de dos maneras de manera horizontal es decir de la larva, a la ninfa y de esta al adulto o transovárica, vertical de la madre al huevo (Koneman & Allen, 2008).

*Rickettsias* inicialmente infectan células epiteliales del estómago superior de la garrapata, sin dañar aparentemente a la garrapata hospedera, entrando en el torrente circulatorio y a continuación invaden y se multiplican en otros tejidos de la garrapata, incluyendo glándulas salivales y ovarios. Cuando ocurre la infección generalizada, todos los tejidos de la garrapata pueden estar infectados, esto ocurre en un periodo de 7 a 10 días. Las larvas infectadas mudan a ninfas infectadas, las cuales, al alimentarse, pueden infectar animales de tamaño mediano. Estas ninfas infectadas, mudarán, resultando en garrapatas adultas que pueden infectar animales mayores (Barba, 2009).

Adultos y ninfas no infectadas pueden comenzar a infectarse con rickettsias cuando éstas se alimentan frecuentemente de animales infectados. Las hembras infectadas cuando depositan sus huevos, pasan de manera transovarialmente a la siguiente generación de garrapatas en el proceso. *Rickettsia* no es transmitida eficazmente a garrapatas hembras por esperma masculino durante su apareamiento (Barba, 2009).

### **2.2.3.4 Epidemiología**

La distribución mundial de rickettsiosis transmitida por garrapatas y la expansión de la población de garrapatas podría introducir agentes rickettsias a nuevas áreas geográficas, a causa de la densidad y distribución de las garrapatas y a la densidad de la población hospedera, estableciendo nuevas relaciones en la dinámica entre estos agentes patógenos y los vectores (Brites-Neto, Duarte, & Martins, 2015).

Se ha demostrado la infección por bacterias del género *Rickettsia* en garrapatas *Haemaphysalis juxtakochi*, *Haemaphysalis leporispalustris*, *Amblyomma parvum*, *Amblyomma neumanni*, *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma longirostre*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma cooperi*, *Ixodes loricatus*, y en pulgas *Polygenis sp* y *Anomiopsyllus nudata* (Quintero-Vélez, Hidalgo, & Rodas, 2012).

### **2.2.3.5 Cuadro Clínico**

Los animales presentaban anomalías hematológicas y signos clínicos como descarga ocular bilateral, congestión en esclerótica, edema conjuntival, anemia, anorexia, fiebre y letargia (Quintero-Vélez *et al.*, 2012).

### **2.2.3.6 Diagnóstico**

El cultivo de las rickettsias es la técnica diagnóstica más específica, para determinar especies de *Rickettsia* predominantes en un área en particular, se emplea medios celulares vivos, recientemente se adaptó nuevas técnicas de cultivo que permiten identificar rickettsias en 48-72 horas. El principal problema del cultivo es la baja sensibilidad, debido a la poca duración de la rickettsemia (Ruiz & Guillén, 2006).

Las rickettsias también se tiñen con el método de Giemsa, que consiste en realizar un frotis sanguíneo delgado, se fija con metanol por 5 min y se colorea con Giemsa por 30 min. La lámina se observa al microscopio con aceite de inmersión a 100X. La identificación se hizo siguiendo las características morfológicas de los hemoparásitos. La intensidad de parasitemia se calcula contando 100 glóbulos rojos por campo en un total de 100 campos. Asimismo, la muestra es considerada positiva cuando se encuentra un hemoparásito, así sea en un campo (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013).

### ***Técnicas Moleculares PCR***

La aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite detectar ADN de *Rickettsia*, es un diagnóstico rápido y específico, para una mejor identificación de especies (Ruiz & Guillén, 2006), la detección por PCR realizada a partir de muestras de sangre usa una variedad de genes, la más común es el gen que codifica el 16S rRNA, que permite que el ensayo tenga más alta especificidad y sensibilidad (Gillespie & Hawkey, 2006).

#### **2.2.3.7 Tratamiento**

Las rickettsiosis son enfermedades similares causadas por rickettsias muy afines, son transmitidas por garrapatas, que se encuentran distribuidas en todo el mundo y varía según su zona geográfica. Las medidas de control para todas las fiebres por rickettsias también son semejantes, y el tratamiento de referencia es la doxiciclina (Heymann, 2005).

### **2.3 Sistema de hipótesis o pregunta de investigación**

Existe la presencia de organismos del filo Apicomplexas, orden Rickettsiales en muestras de sangre de tortugas gigantes *Chelonoidis* spp. de las islas Galápagos.

Existe la presencia de organismo del filo Apicomplexas, clase Coccidias en tortugas gigantes *Chelonoidis* spp. de las Islas Galápagos.

## CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Participantes

La investigación titulada “Identificación de organismos del Filo Apicomplexa y Orden Rickettsiales en tortugas gigantes (*Chelonoidis* spp.) en las Islas Galápagos” es parte del proyecto “Restauración de las Poblaciones y Especies de Tortugas Gigantes de Galápagos a través de Investigación y Manejo Integrados: Más allá del Rescate hacia una Completa Recuperación”, de Galápagos Conservancy, junto con el Parque Nacional Galápagos, el cual forma parte del proyecto de vinculación con la sociedad gestionado por el grupo GISAH del departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

La recolección de muestras se realizó en el centro de crianza “Fausto Llerena” del Parque Nacional Galápagos, Ecuador.

La organización Galápagos Conservancy proporcionó la ayuda para la recolección de muestras de sangre y heces.

La Agencia de Bioseguridad de Galápagos (ABG), proporcionó los permisos necesarios para el transporte de las muestras desde la Isla Santa Cruz hasta los laboratorios de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.

Los ensayos de microscopía, extracción de ADN y PCR fueron realizados en el Laboratorio “Fabricio Valverde” del Parque Nacional Galápagos y en Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

### 3.2 Zona de estudio

El proyecto involucrará dos fases:

#### 3.2.1 Trabajo de campo

Las muestras de sangre y heces de tortugas gigantes (*Chelonoidis* spp.) son procedentes de las Islas Galápagos, ubicada en el Océano Pacífico sobre la línea

ecuatorial, aproximadamente a 960 Km. de la costa continental ecuatoriana, entre 1°20' de latitud norte y 1°0' de latitud sur, y los 89° y 92° de longitud occidental.

### **3.2.2 Trabajo de laboratorio**

Posteriormente el trabajo de investigación se realizará en el Laboratorio Fabricio Valverde del Parque Nacional Galápagos, en Isla Santa Cruz, y en el Laboratorio de Biotecnología Animal, de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, se encuentra ubicado en Av. General Rumiñahui S/N, Sector Santa Clara - Valle de los Chillos Sangolquí – Ecuador, cerca de la ciudad de Sangolquí, en el Valle de los Chillos, a una distancia de 22 kilómetros al Sur - Este de Quito, capital de la República del Ecuador, a una altitud de 2.510 metros sobre el nivel del mar.

### **3.3 Período de tiempo de la investigación**

La presente investigación fue iniciada en el mes de junio del año 2016 y finalizada en el mes de enero del año 2017.

### **3.4 Análisis Estadístico**

Para este estudio se recolectó 138 muestras de sangre y 21 muestras fecales de tortugas del centro de crianza “Fausto Llerena” del Parque Nacional Galápagos. Las muestras de sangre fueron tomadas de tortugas juveniles y adultas provenientes de las islas Floreana, Volcán Wolf, Española, Santiago, Pinzón, Santa Fe e Isabela. Las muestras fecales fueron tomadas de tortugas criadas en cautiverio menores a un año, provenientes de las islas Española, Santa Cruz, Santiago, y Pinzón. Para la identificación del tipo de coccidia presenta se eligieron 4 muestras fecales de cada isla y se analizó mediante PCR. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el software MEGA 7.

#### **3.4.1 Descripción de la muestra**

La toma de muestra de sangre se realizará a todas las tortugas en estado juvenil, debido a que en las crías más pequeñas es difícil la toma de muestra de sangre periférica, ya que las venas son muy delgadas y se corre el riesgo de lastimar al animal.

Las muestras de heces serán tomadas dos de cada grupo de tortugas criadas en cautiverio antes de llegar a la etapa juvenil.

### 3.4.2 Cálculo del tamaño de la muestra

Según Murray y Larry (2005), para el cálculo del tamaño de la muestra en una población finita y conocida se emplea la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 \cdot N \cdot p \cdot q}{i^2 N - 1 + Z_{\alpha}^2 \cdot p \cdot q}$$

**Dónde:**

**n:** tamaño muestra

**N:** tamaño de la población

**z:** valor correspondiente a la distribución de gauss,  $z_{\alpha=0.05} = 1.96$  y  $z_{\alpha=0.01} = 2.58$

**p:** prevalencia esperada del parámetro a evaluar, en caso de desconocerse ( $p=0.5$ ), que hace mayor el tamaño de la muestra

**q:**  $1 - p$  (si  $p = 70\%$ ,  $q = 30\%$ )

**i:** error que se prevé cometer si es del  $10\%$ ,

**i** = 0.1

Para una población de aproximadamente 1460 tortugas en el centro de crianza “Fausto Llerena” del Parque Nacional Galápagos, se calculó el tamaño de la muestra usando como valor  $z_{\alpha=0.01} = 2.58$ ,  $p=0.1$ ,  $q=0.3$ ,  $i=0.1$ , se utilizó un valor de prevalencia esperada de 0,1 debido a que la infectividad con hemoparásitos depende de la presencia de garrapatas, obteniéndose un tamaño de la muestra de 140 muestras de sangre de tortugas gigantes, que representa un  $10\%$  por población de cada una de las islas (Tabla 1).

**Tabla 1**

**Estimación del tamaño de las muestras de sangre de tortugas gigantes en centro de crianza “Fausto Llerena” del Parque Nacional Galápagos**

<b>Número de tortugas</b>	1460
<b>Z<sub>a</sub></b>	1,96
<b>P</b>	0,1
<b>Q</b>	0,3
<b>I</b>	0,1
<b>n= tortugas muestreadas</b>	140

Para la toma de muestras de heces se usaron criterios sintomatológicos, tomando 20 muestras de heces diarreicas de crías de tortugas de entre 1 a 2 años de edad del centro de crianza “Fausto Llerena” del Parque Nacional Galápagos, Ecuador (Tabla 2).

**Tabla 2**

**Toma de muestras por islas**

<b>Corrales por Isla</b>	<b>Población</b>	<b>Muestras</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Santa Cruz</b>	32	4	13%
<b>Santiago</b>	88	6	7%
<b>Española</b>	93	5	5%
<b>Pinzón</b>	31	5	16%

### **3.5 Procedimiento**

#### **3.5.1 Detección de parásitos gastrointestinales**

En el mes de junio del 2016, se presentó síntomas de anorexia y letargo en una tortuga gigante de Galápagos (*Chelonoidis donfaustoi*), de 6 meses de edad criada en cautividad en el Centro de Crianza “Fausto Llerena”, en la Isla Santa Cruz, Ecuador, esta tortuga y se mantenía con otras tortugas de diferente edad en el corral de preadaptación, la tortuga fue sometida a una observación y cuidado sin embargo, después de 3 días murió. Inmediatamente después de la muerte de la tortuga se

realizó una necropsia (Figura 4.1). Después de la muerte de esta tortuga se presentó la misma sintomatología en 2 tortugas más, las cuales también murieron a los pocos días.

### 3.5.1.1 Recolección de muestras fecales

La recolección de excretas se realizó en el mes de noviembre para lo cual se procedió a recolectar muestras diarreicas de tortugas criadas en cautiverio de cada grupo de individuos, de 1 a 2 años de las islas Santiago, Santa Cruz, Española y Pinzón (Figura 3.1) colocándolas en tubos de ensayo de 15ml, las muestras fueron divididas en dos tubos, uno de ellos contenía formol al 10% en una proporción 3:1 (3 heces:1 formol), que es necesario para evitar la eclosión de los huevos y a continuación fue refrigerado, la otra parte de las muestras fue congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior examen coproparasitario y extracción de ADN, respectivamente.



**Figura 13. Corrales Centro de Crianza Fausto Llerena, “Parque Nacional Galápagos”.**

### 3.5.1.2 Análisis Coproparasitarios: Métodos de concentración por flotación y sedimentación

El procedimiento consistió en homogenizar 1 a 2 g de materia fecal con suero fisiológico en un envase de plástico, a continuación el material homogenizado se transfiere a un nuevo envase con ayuda de una gasa doblada para filtrar el material

sólido presente en la muestra fecal, se coloca en un tubo de ensayo de 15ml y se centrifuga a 3400 rpm durante 2 minutos, a continuación se elimina el sobrenadante, y se agrega la solución sobresaturada, que contiene 500g de azúcar, 320ml de agua destilada y 10ml de formol, hasta 1 cm del borde del tubo, se agita hasta disolver el sedimento, y se procede a centrifugar a 3400 rpm por 2 min, luego se completa con la solución de azúcar hasta el borde y se espera de 2 a 5 minutos hasta la formación de un menisco. Después se toma una muestra de la superficie del menisco y se la coloca en un portaobjeto, se agrega lugol, y se cubre con un cubreobjetos, para observar al microscopio a 10X y 40X (Sheather, 1923).

La técnica de sedimentación de parásitos gastrointestinales en heces, se basa en la centrifugación y la recuperación de protozoarios, ooquistes, huevos y larvas por gravedad de la materia fecal. Esta técnica elimina la mayoría de compuestos orgánicos como las grasas y mantiene la integridad de los organismos. Este procedimiento consiste en homogenizar 1 g de heces con 10 ml de solución salina, se filtra la suspensión a través de una gasa y se coloca en un tubo de ensayo de 15 ml, se centrifuga 2 minutos a 3400 rpm, a continuación se elimina el sobrenadante, luego se agrega 5 ml de formol al 10%, se mezcla y se deja en reposo por 10 min, se añade 3ml de éter y se agita vigorosamente por 1 min, se centrifuga a 3400 rpm por 2 min, se elimina el sobrenadante y se coloca una gota del sedimento en portaobjetos, para su posterior observación al microscopio a 10X y 40X (Olivas, 2004).

Para la técnica de flotación con NaCl se homogenizó de 1 a 2 g de materia fecal con agua destilada en un envase de plástico, a continuación se procedió a filtrar la muestra para eliminar el material sólido, se colocó el material filtrado en un tubo de ensayo de 15ml y se centrifuga a 3400 rpm durante 2 minutos, a continuación se elimina el sobrenadante, y se agrega la solución sobresaturada de NaCl, que contiene 800ml de agua destilada y 210 g de NaCl, con una gravedad específica de 1,3, se completa la solución hasta el borde del tubo, y se observa la formación de un menisco, sobre la cual se coloca el cubreobjetos, se deja reposar de 10 a 15 minutos para que los ooquistes se fijen al cubreobjetos, a continuación se observa al microscopio a 10X y 40X (Wolf *et al.*, 2014).

### 3.5.1.3 Parámetros estadísticos

Para determinar el grado de la infección, se evaluaron ciertos parámetros entre ellos:

- **Carga parasitaria** expresada de la siguiente manera:

$$\text{Carga parasitaria} = \frac{\text{número de huevos de parásito} \times 10}{\text{gramos de muestra}}$$

Este es un método matemático usado para calcular el número de huevos de parásitos gastrointestinales.

Los términos de prevalencia, intensidad, y abundancia son utilizados de acuerdo a Margolis et al. (1982).

- **Prevalencia:** número de hospedadores infestados por una especie parásita en particular, dividido por el número total de hospedadores examinados, se expresa como porcentaje.
- **Intensidad:** número de parásitos de una especie parásita en un solo hospedador.
- **Intensidad media:** número total de parásitos de una especie parásita dividido el número de hospedadores parasitados.
- **Abundancia media:** es el número promedio de parásitos por hospedador examinado en una muestra (incluye a los no infectados); se corresponde con la media aritmética, ya que se obtiene al dividir el número total de parásitos presentes en una muestra de hospedadores examinados positivos entre el número total de hospedadores examinados.
- **Dominancia:** es la proporción o porcentaje de una especie parásita en relación con el conjunto de especies presentes.

### 3.5.1.4 Extracción de ADN de muestras fecales

Para la extracción de ADN de muestras fecales se seleccionó aquellas muestras pertenecientes a diferentes corrales, que contengan la una mayor presencia

de ooquistes, se la realizó con el kit comercial QIAamp DNA Stool Mini (Qiagen). Para medir la concentración de ADN extraído se usó el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), para una cuantificación rápida y precisa de ADN, según parámetros sugeridos en el manual. Se usó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para visualizar la presencia e integridad de ADN extraído. La visualización del resultado se realizó en el fotodocumentador UVP BioDoc-It™ System con luz ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm.

### **3.5.1.5 Estandarización de la PCR**

#### **3.5.1.5.1 Detección de Coccidias en muestras de heces de tortugas gigantes**

Para el PCR se utilizó una modificación del protocolo establecido por Chapman *et al.* 2016, que consiste en el uso de un cebador eucariota genérico hacia adelante (3F: 5' GTT CGA TTC CGG AGA GGG A-3') y un cebador apicomplexa inverso específico (Api1R: 5' TAA TCT ATC ATC CCC ACG ATG C-3') (Saffo, McCoy, Rieken, & Slamovits, 2010), la reacción contiene en volumen total de 25 µl, compuesto de 2,5 µl de Colorless GoTaq® Reaction Buffer 5X (Promega), 4 µl de la mezcla dNTP a una concentración final de 1,25 mM cada uno, 2,5 µl de cada cebador a una concentración de 10 mM, 1,25 unidades de GoTaq® DNA Polymerase (Promega), 1,5 µl de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) y 1 µl de ADN, completando el volumen que falta con agua (H<sub>2</sub>O) (Tabla 3.3). Las condiciones de la amplificación consisten en una temperatura inicial de 94 ° C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94 ° C durante 30 segundos, 57 ° C durante 30 segundos y 72 ° C durante 2 minutos, con un paso de extensión final de 72 ° C durante 10 minutos (Tabla 3.4) (Chapman *et al.*, 2016). Se realizó los ensayos de PCR con las muestras de heces que presentan mayor cantidad de ooquistes al visualizarlos al microscopio con un aumento de 40X, y se seleccionó la muestra con mayor cantidad de ADN (S2016, 1) para realizar la estandarización del PCR.

**Tabla 3**

**Cebadores usados para amplificar un fragmento de 1300pb del gen 18S rRNA de Apicomplexas.**

Cebadores	Secuencia 5'-3'	T° hibridación	Fragmento
3F	GTT CGA TTC CGG AGA GGG A	57	1300 pb
Api1R	TAA TCT ATC ATC CCC ACG ATG C	57	

**Tabla 4**

**Concentraciones usadas para PCR Coccidias**

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración Final	Volumen (μL)
H <sub>2</sub> O	μL	N/A		10,25
Buffer Go Taq	10x	5,00	1,00	5,00
3F	μM	10,00	1,00	2,50
Api 1R	μM	10,00	1,00	2,50
MgCl <sub>2</sub>	mM	25,00	1,50	1,50
dNTP	μM	40,00	0,80	0,50
Go Taq	U/μL	5,00	1,25	0,25
ADN	ngr		100	1
			<b>Total</b>	25,00

**Tabla 5**

**Programa amplificación de gen 18S rRNA de Apicomplexas**

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización Inicial</b>	94	5'	1
<b>Desnaturalización</b>	94	30"	40
<b>Alineamiento</b>	57	30"	40
<b>Extensión</b>	72	2'	40
<b>Extensión Final</b>	72	10'	1
<b>Mantenimiento</b>	4	∞	1

### 3.5.1.5.2 Estimación de la temperatura de hibridación de los cebadores

Para evitar la presencia de bandas inespecíficas se procedió a realizar un gradiente de temperaturas desde 54°C-60,2°C.

**Tabla 6**

#### Programa amplificación de gen 18S rRNA de Apicomplexas

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración Final	Volumen ( $\mu$ L)	Volumen mezcla
<b>H<sub>2</sub>O</b>	$\mu$ L	N/A		10,25	<b>70,00</b>
<b>Buffer</b>	x	5,00	1,00	5,00	<b>40,00</b>
<b>3F</b>	$\mu$ M	10,00	1,00	2,50	<b>20,00</b>
<b>Api1R</b>	$\mu$ M	10,00	1,00	2,50	<b>20,00</b>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	mM	25,00	3,00	3,00	<b>24,00</b>
<b>dNTP</b>	$\mu$ M	40,00	0,80	0,50	<b>4,00</b>
<b>Go Taq</b>	U/ $\mu$ L	5,00	1,25	0,25	<b>2,00</b>
<b>ADN</b>	ngr		100	1	<b>8,00</b>
		<b>Total</b>		25,00	200
			<b>MUESTRAS</b>	<b>8</b>	

Se usó una cantidad de ADN de la muestra fecal #2 de la Isla Santiago de 3 $\mu$ l con una concentración de 37,3 ng/ $\mu$ l, por cada muestra, además de dos controles negativos, para verificar contaminación. Usando las temperaturas indicadas en la Tabla 3.6

**Tabla 7**

#### Gradientes de temperaturas de hibridación usadas para la estandarización de PCR

<b>Temperaturas usadas °C</b>	56,8	57,1	57,8	58,1	58,6	59,1
-------------------------------	------	------	------	------	------	------

### 3.5.1.5.3 Estimación de la cantidad de MgCl<sub>2</sub>

Al observar la presencia de bandas inespecíficas después de aumentar la temperatura, se procedió a realizar una disminución de la cantidad de cloruro de magnesio, mediante un gradiente de concentración desde 1-3 µl de MgCl<sub>2</sub>.

**Tabla 8**

#### Concentraciones usadas para la estandarización de PCR

SIN GLICEROL					
Reactivos	Unidad	Stock	Concentración Final	Volumen (µL)	Volumen mezcla
Buffer	x	5,00	1,00	5,00	30,00
3F	µM	10,00	1,00	2,50	15,00
Api1R	µM	10,00	1,00	2,50	15,00
dNTP	µM	40,00	0,80	0,50	3,00
Go Taq	U/µL	5,00	1,25	0,25	1,50
		<b>Total</b>		<b>10,75</b>	64,50
			<b>MUESTRAS</b>	<b>6</b>	

En cada uno de los microtubos de 250µl se colocó 10,75 µl de Master Mix indicada en la Tabla 3.7. Y luego se colocó en cada muestra la cantidad de H<sub>2</sub>O, ADN, y MgCl<sub>2</sub> indicada en la Tabla 3.8.

**Tabla 9**

#### Concentraciones usadas para la estandarización de PCR

SIN GLICEROL						
	#1	#2	#3	#4	#5	CN
H <sub>2</sub> O	10,25	9,75	9,25	8,75	8,25	10,25
ADN	3	3	3	3	3	1
MgCl <sub>2</sub>	1	1,5	2	2,5	3	3

Se usó alternativamente otro ensayo usando 1,25 ul de glicerol por muestra para dar mayor especificidad a la reacción.

**Tabla 10****Concentraciones usadas para la estandarización de PCR**

<b>CON GLICEROL</b>					
<b>Reactivos</b>	<b>Unidad</b>	<b>Stock</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Volumen (μL)</b>	<b>Volumen mezcla</b>
<b>Buffer</b>	x	5,00	1,00	5,00	<b>30,00</b>
<b>Glicerol</b>	x	5,00		1,25	<b>7,50</b>
<b>3F</b>	μM	10,00	1,00	2,50	<b>15,00</b>
<b>Api1R</b>	μM	10,00	1,00	2,50	<b>15,00</b>
<b>dNTP</b>	μM	40,00	0,80	0,50	<b>3,00</b>
<b>Go Taq</b>	U/μL	5,00	1,25	0,25	<b>1,50</b>
		<b>Total</b>		<b>12,00</b>	72,00
			<b>MUESTRAS</b>	<b>6</b>	

En cada uno de los microtubos de 250 μL de colocó 12 μl de Master Mix indicada en la Tabla 3.9. Y luego se colocó en cada muestra la cantidad de H<sub>2</sub>O, ADN, y MgCl<sub>2</sub> indicada en la Tabla 3.10.

**Tabla 11****Concentraciones usadas para la estandarización de PCR**

<b>CON GLICEROL</b>						
	<b>#1</b>	<b>#2</b>	<b>#3</b>	<b>#4</b>	<b>#5</b>	<b>CN</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	9	8,5	8	7,5	7	9
<b>ADN</b>	3	3	3	3	3	1
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1	1,5	2	2,5	3	3

**3.5.1.6 PCR para identificación de coccidias**

Se procedió a realizar un PCR para cada muestra de heces fecales de las Islas Santa Cruz, Santiago, Española y Pinzón, usando las cantidades observadas en la Tabla 12.

**Tabla 12****Concentraciones usadas para identificación de coccidias**

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración Final	Volumen (μL)	Volumen mezcla
Buffer	x	5,00	1,00	5,00	<b>25,00</b>
3F	μM	10,00	1,00	2,50	<b>12,50</b>
Api1R	μM	10,00	1,00	2,50	<b>12,50</b>
MgCl <sub>2</sub>	mM	25,00	1,50	1,50	<b>7,50</b>
dNTP	μM	40,00	0,80	0,50	<b>2,50</b>
Go Taq	U/μL	5,00	1,25	0,25	<b>1,25</b>
		<b>Total</b>		<b>12,25</b>	61,25
			<b>MUESTRAS</b>	<b>5</b>	

Se colocó 12,25μl de Master Mix en cada uno de los microtubos de 250 μL, y luego se dispuso a colocar la cantidad de ADN y H<sub>2</sub>O, requerida según la cuantificación realizada, indicada en la Tabla 13.

**Tabla 13****Concentraciones usadas para identificación de coccidias**

	H <sub>2</sub> O	Cuantificación	ADN
<b>Muestra 1</b>	0,75	8,6	12
<b>Muestra 2</b>	9,75	37,3	3
<b>Muestra 3</b>	6,75	18,4	8
<b>Muestra 4</b>	8,75	30,2	4
<b>C-</b>	11,75		1

**3.5.1.6.1 Visualización de Resultados**

Se corrió las muestras de PCR en el termociclador TECHNE TC-512, usando las especificaciones indicadas en la Tabla 3.4. Con los productos obtenidos se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando SYBER Safe y BlueJuice Gel Loading Buffer (10X) (Thermo Fisher Scientific), las bandas obtenidas se

visualizaron con el transiluminador UVP BioDoc-It™ System con luz ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm. El tamaño de los productos se estimó por comparación con un marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen). Los productos amplificados fueron purificados mediante el QIAquick® Gel Extraction Kit - Qiagen (QIAGEN). Posteriormente se secuenció las muestras mediante el método de Sanger en la empresa Macrogen Inc. (Korea).

### **3.5.1.7 Análisis filogenético**

Los cromatogramas de las secuencias fueron examinados por el programa Sequencher y alineados con MEGA (versión 7.0.21).

La filogenia se analizó mediante el paquete de software MEGA (versión 7.0.21) un árbol de máxima verosimilitud usando el programa Geneious versión 10.08, con 2000 repeticiones bootstrap, para generar un árbol filogenético por máxima verosimilitud. Se especificó el modelo de sustitución Tamura-Nei. Las secuencias 18S de ARN ribosomal de Apicomplexas fueron obtenidos de GenBank y alineados con MEGA (versión 7.0.21) para su comparación con las obtenidas durante nuestro trabajo.

## **3.5.2 Detección de hemoparásitos**

### **3.5.2.1 Recolección de muestras de sangre periférica**

La recolección de muestras de sangre se la realizó en el mes de junio y fueron tomadas del seno subcaparacial (Figura 3.2) localizado en la zona media de la entrada craneal del caparazón justo debajo de las escamas nucales (Wilke, 2010), de las tortugas jóvenes del centro de crianza provenientes de las islas Española, Santiago, Floreana, Santa Fé y de la vena dorsal de la pata, siendo necesario sostener la pata fuera del caparazón e incidir dorsalmente con la aguja en la zona media en un ángulo de 45 grados (Wilke, 2010), de las tortugas adultas, de las islas Española, Volcán Wolf las cuales se procedieron a recolectar en tubos EDTA y serán almacenadas en congelación a -20°C.



**Figura 14. Toma de muestra de sangre vena subcaparacial en corrales Centro de Crianza Fausto Llerena, “Parque Nacional Galápagos”**

### **3.5.2.2 Extracción de ADN de muestras de sangre periférica**

Se utilizó el método empleado por De La Rosa *et al.* (2013), procediendo a colocar 400uL de sangre periférica con EDTA en un tubo eppendorf de 1.5ml, a continuación se adicionó 1ml de tampón (Tris HCL-20mM pH 7.6), se mezcló por inversión y se incubó a 25°C por 10 minutos, a continuación se centrifugó cada tubo a 20800 RCF por 40 segundos y se eliminó el sobrenadante. Debido a que en la sangre de tortuga existe mayor cantidad de glóbulos rojos y estos son nucleados, se procede a realizar otro lavado con 1ml de tampón (Tris HCL-20mM pH 7.6), se centrifuga y se elimina el sobrenadante. Luego se colocó en cada tubo 400uL de solución lítica (EDTA-1mM, Tris HCl-10mM, 0.1% -SDS, pH 8), seguido de 2,5uL de ribonucleasa (RNAsa) y se incubó a 37°C por 30 minutos, después se añadió en cada tubo 2,5 uL de proteinasa K (20mg/mL) y se incubó a 60°C por 2 horas. Una vez transcurrido el tiempo se agrega 300uL de acetato de potasio 5M frío, se agita y se centrifuga a 20800 RCF por 7 minutos. Para que pueda precipitar todo el ADN se divide el sobrenadante en dos tubos eppendorf de 1,5ml y se agrega 3 volúmenes o hasta el borde del tubo de una solución fría de etanol al 100% con acetato de sodio 0,12 M, se mezcla por inversión hasta observar la precipitación del ADN. Se deja incubar los tubos a -20°C por 30 minutos, pasado este tiempo se centrifuga en frío a 20800 RCF por 7 minutos, el precipitado obtenido se lava dos veces con etanol al 70% frío y se deshidrata al vacío, una vez eliminado todo el etanol de los tubos, se procede a

resuspender la muestras de ADN con una solución (Tris- 10mM, EDTA 1mM, pH 8).

Para medir la concentración de ADN extraído se utilizó el Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), para una cuantificación rápida y precisa de ADN, utilizando los parámetros sugeridos en el manual. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para visualizar las presencia e integridad de ADN extraído. La visualización del resultado se realizó en el fotodocumentador UVP BioDoc-It™ System con luz ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm.

### 3.5.2.3 Análisis moleculares PCR

#### 3.5.2.3.1 Detección de Apicomplexas en muestras de sangre de tortugas gigantes

El PCR realizado amplifica el gen 18S rRNA de Apicomplexas. Se usó los cebadores PIRO A (5'-AAT ACC CAA TCC TGA CAC AGG G-3') y PIRO B (5'-TTA AAT ACG AAT GCC CAA C-3') (Carret *et al.* 1999). La reacción contiene en un volumen final de 25 µl que incluye 0,1µl de Platinum® DNA Polymerases (Thermo Fisher Scientific), 0,63 µl de cada cebador a una concentración de 10 µM, 1 µl de ADN genómico con una concentración de 100ng/µl, y 18,9 µl de agua, 2,5µl de Buffer 10X, 0,75 µl de Cl<sub>2</sub>Mg y 0,5µl de dNTPs (Tabla 3.14) Las reacciones se realizaron con el siguiente programa de amplificación: 94 ° C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 ° C durante 1 min, 55 ° C durante 1 min, 72 ° C durante 1 min, y 72 ° C durante 5 min (Tabla 3.15).

**Tabla 14**

**Cebadores usados para amplificar un fragmento de 300-400pb del gen 18S rRNA de Apicomplexas.**

Cebadores	Secuencia 5'-3'	T° hibridación	Fragmento
PIRO A	AAT ACC CAA TCC TGA CAC AGG G	55	300-400 pb
PIRO B	TTA AAT ACG AAT GCC CAA C	55	

**Tabla 15****Concentraciones usadas para PCR Apicomplexas**

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración Final	Volumen (μL)
H <sub>2</sub> O	μL	N/A		18,90
Buffer	10x	10,00	1,00	2,50
Piro A	μM	10,00	0,25	0,63
Piro B	μM	10,00	0,25	0,63
MgCl <sub>2</sub>	mM	50,00	1,50	0,75
dNTP	μM	40,00	0,80	0,50
Taq	U/μL	5,00	0,50	0,10
ADN	ngr		100	1
		<b>Total</b>		<b>25,00</b>

El control positivo usado fue un plásmido de *Babesia* spp. proporcionado en el laboratorio de biotecnología animal.

**Tabla 16****Programa amplificación de gen 18S rRNA de Apicomplexas**

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización Inicial</b>	94	5'	1
<b>Desnaturalización</b>	94	1'	35
<b>Alineamiento</b>	55	1'	35
<b>Extensión</b>	72	1'	35
<b>Extensión Final</b>	72	5'	1
<b>Mantenimiento</b>	4	∞	1

El control positivo usado fue un plásmido de *Anaplasma* spp. proporcionado en el laboratorio de biotecnología animal.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% con SYBER Safe y usando BlueJuice Gel Loading Buffer (10X) (Thermo Fisher Scientific) y se visualizaron bajo luz ultravioleta.

### 3.5.2.3.2 Detección de Rickettsias en muestras de sangre de tortugas gigantes

El PCR amplifica el gen 16S rRNA de Rickettsias. Los cebadores usados son YaReF16S (5'-TAA CAC ATG CAA GTC GAA CGG- 3') y YaReR16S (5'-ACC CAA CCT TAA ATG GCT GC-3') (Yare, 2016). La reacción contiene en un volumen final de 25 µl que incluye 0,1µl de Platinum® DNA Polymerases (Thermo Fisher Scientific), 1,25 µl de cada cebador a una concentración de 10 µM, 1 µl de ADN genómico con una concentración de 100ng/µl, y 17,4 µl de agua, 2,5µl de Buffer 10X, 1 µl de Cl<sub>2</sub>Mg y 0,5µl de dNTPs (Tabla 2.17). Las reacciones se realizaron con el siguiente programa de amplificación: 95 ° C durante 5 min, seguido de 45 ciclos de 94 ° C durante 30 s, 66 ° C durante 30 s, 72 ° C durante 1 min 30 s, y 72 ° C durante 5 min (Tabla 3.18).

Los productos de PCR se correrán en un gel de agarosa al 1%, teñido con SYBER Safe y usando BlueJuice Gel Loading Buffer (10X) (Thermo Fisher Scientific) y se visualizaron bajo luz ultravioleta.

**Tabla 17**

**Cebadores usados para amplificar un fragmento de 1200pb del gen 16S rRNA de Rickettsias**

Cebadores	Secuencia 5'-3'	T° hibridación	Fragmento
YaReF16	TAA CAC ATG CAA GTC GAA CGG	66	1200pb
YaReR16S	ACC CAA CCT TAA ATG GCT GC	66	

**Tabla 18**

**Concentraciones usadas para PCR Rickettsias**

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración Final	Volumen (µL)
H <sub>2</sub> O	µL	N/A		17,40
Buffer	10x	10,00	1,00	2,50
YaR	µM	10,00	0,50	1,25

<b>YaF</b>	$\mu\text{M}$	10,00	0,50	1,25
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	mM	50,00	2,00	1,00
<b>dNTP</b>	$\mu\text{M}$	40,00	0,80	0,50
<b>Taq</b>	U/ $\mu\text{L}$	5,00	0,50	0,10
<b>ADN</b>	ngr		100	1
		<b>Total</b>		25,00

**Tabla 19**

**Programa amplificación de gen 16S rRNA de Rickettsias**

<b>Proceso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
<b>Desnaturalización Inicial</b>	94	5'	1
<b>Desnaturalización</b>	94	30"	45
<b>Alineamiento</b>	66	60"	45
<b>Extensión</b>	72	90"	45
<b>Extensión Final</b>	72	5'	1
<b>Mantenimiento</b>	4	$\infty$	1

Los productos de PCR se correrán en un gel de agarosa al 1% con SYBER Safe y usando BlueJuice Gel Loading Buffer (10X) (Thermo Fisher Scientific) y se visualizaron bajo luz ultravioleta.

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

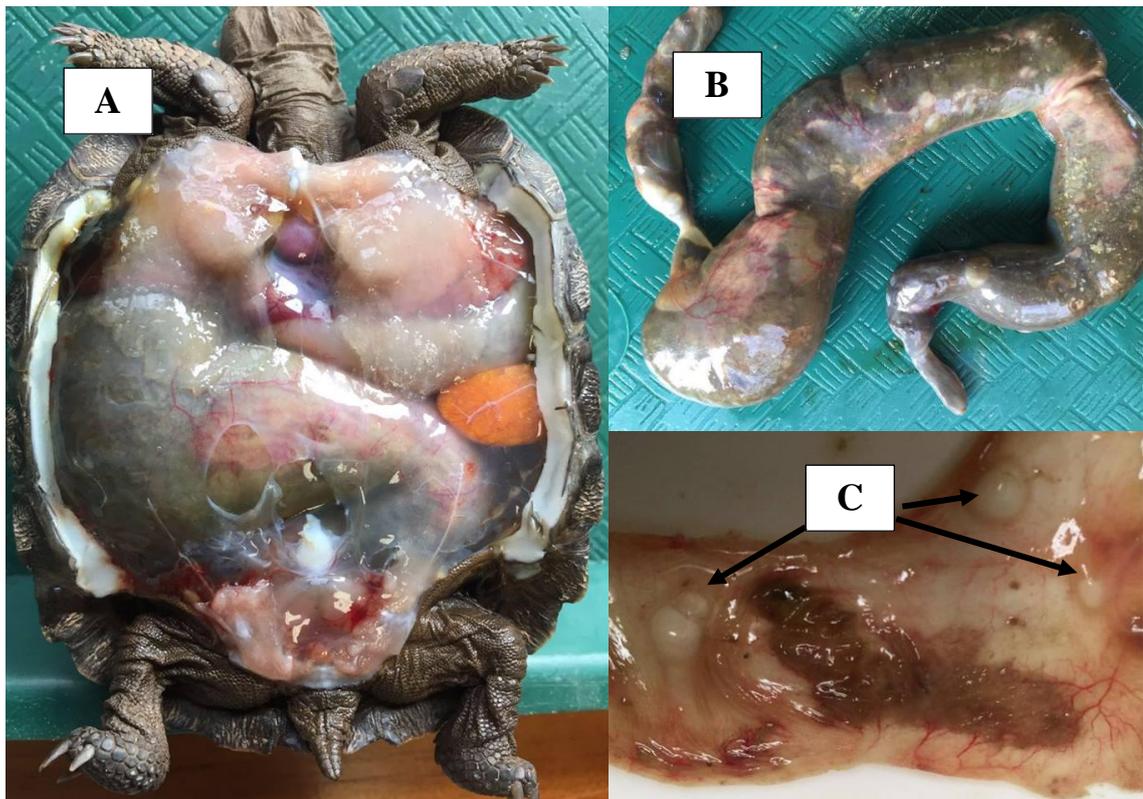
La determinación de parásitos gastrointestinales presentes en las tortugas gigantes de Galápagos se realizó mediante un examen coproparasitario utilizando la técnica de flotación con una solución sobresaturada de NaCl y mediante una caracterización molecular usando la técnica de reacción de cadena de polimerasa (PCR). Finalmente, se realizó la secuenciación de las muestras positivas, para la elaboración de un análisis filogenético.

La identificación de hemoparásitos se la hizo mediante la técnica de PCR, tanto para los organismos del Filo Apicomplexa y para organismos de la Orden Rickettsiales.

### **4.1 Identificación de parásitos gastrointestinales en tortugas gigantes de Galápagos**

La necropsia realizada en la tortuga podría ser un indicio de la presencia de una infección por coccidias, datos bibliográficos indican que la presencia de nódulos en el intestino es una patología común en la infección por coccidias, debido a que estas generalmente parasitan al epitelio intestinal (Cruz-Reyes & Camargo-Camargo, 2000). Las lesiones producidas en el tejido intestinal están vinculados al ciclo biológico de los coccidios, el género *Eimeria* spp. se caracterizan por entrar al hospedero, a través de las células epiteliales de la mucosa intestinal causando a menudo daños graves a la integridad del intestino, las lesiones patogénicas incluyen la presencia de nódulos grises o blancos o bien estrías en la luz del intestino (Yun, Lillehoj, & Lillehoj, 2000). Debido a que las lesiones intestinales se pueden ver únicamente en el examen post mortem, se debe distinguir los signos clínicos que presenten entre los que se pueden incluir diarrea crónica, disminución del apetito, disminución de la tasa de crecimiento, pérdida de peso, letargo y el paso de alimentos no digeridos (Gibbons & Steffes, 2013). Las imágenes observadas tras la necropsia indican que la muerte de la tortuga podrían ser a causa de la presencia de

coccidias ya que se pueden distinguir las lesiones nodulares blanquesinas compatibles con enteritis intestinales de coccidias, además se puede apreciar que existe una mala digestión, ya que intestino presenta una acumulación excesiva de alimento ocasionando una obstrucción en el tránsito intestinal (Figura 4.1).



**Figura 15** Necropsia de la tortuga gigante *Chelonoidis donfaustoi*

A) Tortuga gigante B) Intestino C) nódulos encontrados en el intestino

Durante el mes de junio de 2016, se recolectó 138 muestras de sangre de tortugas gigantes de Galápagos, tanto juveniles como adultas, pertenecientes a las Islas Española, Santiago, Volcán Wolf, Floreana, Pinzón, y varias Islas

Posteriormente en el mes de noviembre de 2016, se recolectaron un total de 21 muestras fecales de tortugas gigantes juveniles de entre 1 a 2 años provenientes de los corrales de preadaptación, del Centro de Crianza de las Islas Española, Santa

Cruz, Pinzón, Santiago, y Floreana. Se tomó en cuenta para la recolección de muestras que las tortugas no fueran alimentadas previamente y se recogió únicamente muestras fecales blandas o diarreicas (Tabla 4.1).

**Tabla 20**

**Muestras tomadas del Centro de Crianza “Fausto Llerena”**

<b>ISLAS</b>	<b>N° muestras de sangre</b>	<b>N° muestras de heces</b>
Española	40	5
Pinzón	21	5
Santiago	12	6
Santa Cruz	0	4
Floreana	16	1
Volcan Wolf	32	0
Varias Islas	17	0
<b>Total</b>	<b>138</b>	<b>21</b>

La realización de exámenes coproparasitológicos son pruebas directas y de rutina muy comunes para detección de parásitos gastrointestinales, no son exámenes totalmente fiables, sin embargo al ser un examen no invasivo y fácil de realizar, es recomendable para reptiles recién introducidos, durante el período de cuarentena o incluso en animales que no presenten síntomas clínicos, asegurando así el bienestar y salud de los reptiles (Ras-Norynska & Sokol, 2015). Los exámenes coproparasitarios realizados en este estudio revelaron la presencia de ooquistes de coccidias en las 21 muestras fecales diarreicas analizadas, mediante la técnica de flotación. La determinación de parásitos se basó en el análisis del tamaño, forma, presencia de membranas bien definidas y estructuras propias de cada huevo observado.

El almacenamiento correcto de muestras fecales es un parámetro importante para la identificación de parásitos mediante la observación microscópica por lo que el uso de preservantes es necesario si las muestras tomadas no se las va a analizar de forma inmediata, de esta manera se evita la eclosión de los huevos, por lo que se recomienda usar formol al 10%, que es un buen conservante de la morfología de huevos de helmintos, larvas, quistes de protozoos y coccidios, es de fácil preparación, larga duración y es adecuado para las técnicas de concentración y flotación, no obstante puede interferir con el ensayo de PCR, especialmente luego de

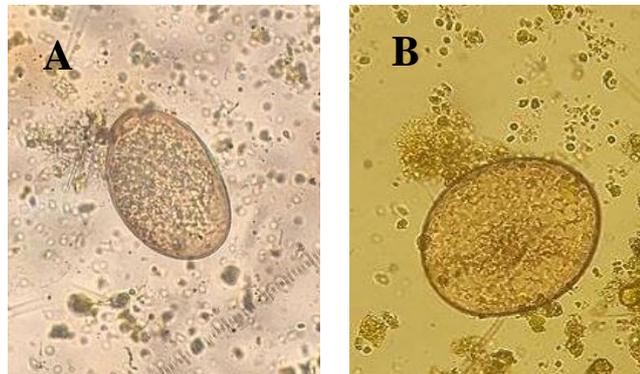
un tiempo prolongado de fijación (Magaró *et al.*, 2000). Para evitar que el uso del persevante intervenga en el ensayo de PCR, se procedió a dividir la muestra de heces en dos partes, en la primera parte se colocó formol al 10% en una proporción de 3:1, y en la segunda parte fue congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para su posterior extracción de ADN.

Pese a que en la mayoría de ensayos se recomienda usar métodos de flotación usando una solución sobresaturada de azúcar o métodos de flotación por sedimentación, la solución sobresaturada de cloruro de sodio, presenta un mayor capacidad para detectar etapas de protozoos, principalmente ooquistes de coccidios, además presenta una más alta sensibilidad para detectar huevos de nematodos, como huevos de oxyuris. Aparentemente, el procedimiento de flotación tiene una mayor capacidad para concentrar estos tipos de huevos que la técnica de sedimentación. Por lo tanto, parece aconsejable examinar reptiles en cautiverio por medio del método de flotación con solución sobresaturada de cloruro de sodio (Wolf *et al.*, 2014).

La mayoría de reptiles no presentan síntomas clínicos específicos para enfermedades parasitarias, aunque pudieran presentar la patología, esto debido a que en los reptiles la regeneración del epitelio gastrointestinal es lo suficientemente rápido como para no mantener los síntomas, por lo que la infección parasitaria es imperceptible la mayoría de veces. En ciertos casos se manifiesta vómitos, heces formadas incorrectamente, debilidad y anorexia, cambio en la consistencia de las heces, estas se vuelven más acuosas y se presenta un aumento del olor de los excrementos, se puede presentar además inflamación en el tracto gastrointestinal, así como la aparición de fragmentos más grandes de alimentos, la infección es más común en tortugas jóvenes ocasionando un crecimiento limitado en aquellas mantenidas en cautiverio, pero puede afectar a tortugas adultas afectando su fertilidad (Ras-Norynska & Sokol, 2015). Para esta investigación, preferimos tomar muestras fecales de tortugas jóvenes porque presentan una mayor frecuencia de infección según lo descrito por Inacio *et al.* (2016), además se consideró dentro de este grupo solo tomar muestras de heces blandas o diarreicas.

Los nematodos encontrados tras el análisis de las muestras de heces de tortugas gigantes pertenecen a la familia Oxyuridae y Strongylidae (Figura 4.2), que

según Fournié, (2006), son nematodos gastrointestinales comunes de tortugas gigantes de Galápagos.



**Figura 16. Parásitos en muestras fecales encontradas en tortugas gigantes de Galápagos identificados con método de flotación con solución sobresaturada de NaCl, observadas a 40X.** A) Huevo de la Familia Oxyuridae, B) Huevo de la familia Strongylidae

La presencia de huevos de nematodos difiere según el sitio, encontrándose que existe una diferencia entre la cantidad y diversidad de este tipo de parásitos en las muestras provenientes de las diferentes islas, en donde se encontraron nematodos pertenecientes a las dos familias (Tabla 4.2). El número de huevos presentes en las heces depende del número de parásitos adultos que se encuentran en el tubo digestivo, y su fertilidad, pueden variar según la especie del parásito. Los oxiuros están presentes en el colon, mientras que estróngilos están presentes en el intestino delgado, los huevos de oxiuros debe ser más abundantes en la periferia de las heces, a diferencia de los huevos de estróngilos que son más abundante en el centro de las heces (Fournié, 2006). Los nematodos pertenecientes a las familias Oxyuridae y Strongylidae son importantes organismos comensales, comunes en reptiles herbívoros (Rataj, Lindtner-Knific, Vlahovic, Mavri, & Dovc, 2011)

Las coccidias tienen estadios de resistencia, los ooquistes, que son eliminados sin esporular a través del flujo intestinal junto con las heces, tienen un aspecto de una masa citoplásmica indiferenciada denominada esporonte, que está rodeada por una doble membrana, y cuando tienen las condiciones adecuadas de oxigenación, temperatura y humedad forman los esporocistos (Del Cacho, 2010). Al realizar el

examen coproparasitario mediante la técnica de flotación con una solución sobresaturada de cloruro de sodio en las muestras fecales de tortugas se identificó estructuras de forma redonda con doble membrana y con un núcleo en el interior, y se las consideró como coccidias, encontrándose que todas los casos estudiados presentan estas estructuras. Los ooquistes de coccidia suelen ser redondo, de 4-6  $\mu\text{m}$ , y cada ooquiste presenta un núcleo que mide aproximadamente 1-2,5  $\mu\text{m}$ ; el microscopio electrónico es muy específico para identificar este tipo de estructuras pero es menos sensible (Forbes, 2009), las estructuras observadas en el microscopio tienen estas características por lo que se asumen como coccidias (Figura 4.3).

Los ooquistes observados presentan un núcleo en su interior y no son esporulados, se puede distinguir su forma redonda, la presencia de una doble membrana y son translucidos a la luz del microscopio (Figura 4.3)



**Figura 17. Coccidias en muestras fecales encontradas en tortugas gigantes de Galápagos identificados con método de flotación con solución sobresaturada de NaCl, observadas a 40X.**

En este estudio se encontró una mayor infección con huevos de coccidias seguidos de oxiuros, y por último estrongilos. Se determinó la intensidad parasitaria de coccidias en cada una de las muestras de heces de las diferentes islas analizadas, obteniéndose que existe un mayor número de ooquistes de coccidias en relación con los huevos de los demás parásitos encontrados (Tabla 4.2), con una prevalencia del 100%, observándose que existe una mayor cantidad en las muestras provenientes de la Isla Santiago, seguida de las muestras de la Isla Santa Cruz, Española, Pinzón y por último Floreana, que solamente se pudo tomar una muestra de una única tortuga por lo que no es significativamente relevante (Tabla 4.2). El individuo S2016, 1,

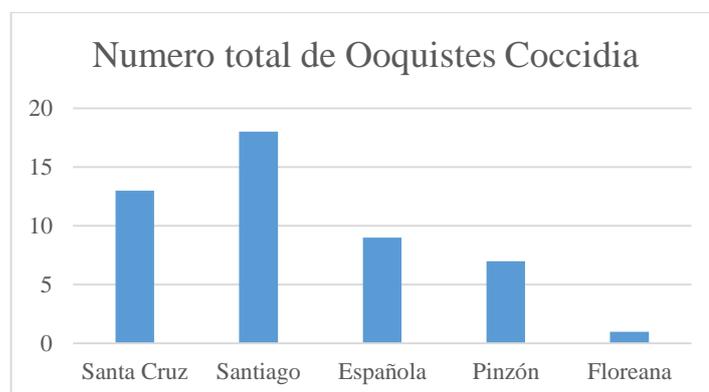
presentó una mayor intensidad, encontrándose 7 ooquistes de coccidias al observarse al microscopio con un aumento de 40X (ANEXO E).

**Tabla 21**

**Total parásitos gastrointestinales encontrados en tortugas gigantes diagnosticadas por isla**

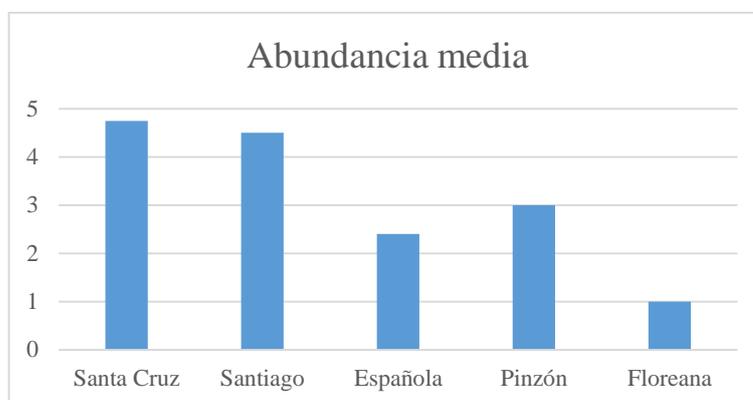
Nombre de Corrales	Carga parasitaria Coccidia (hpg)	Carga parasitaria <i>Oxyuridae</i> (hpg)	Carga parasitaria <i>Strongylidae</i> (hpg)	Abundancia media
Santa Cruz	1300	200	400	475,0
Santiago	1800	900	0	450,0
Española	900	100	300	260,0
Pinzón	700	1000	100	360
Floreana	100	0	0	100

La isla que presentó un mayor número de ooquistes fue Santiago con un total 1800 hpg que representa el 37,5% (1800/4800) con respecto a las coccidias encontradas en las demás islas, al observarse al microscopio con un aumento de 40X (Figura 4.4)



**Figura 18. Evaluación de la intensidad parasitaria de ooquistes de coccidia.**

Las muestras procedentes de la isla Santa Cruz presentan una mayor abundancia media, es decir que el número total de parásitos presentes por muestra es mayor que en las demás islas (Figura 4.5).



**Figura 19. Evaluación de la abundancia media parasitaria de ooquistes de coccidia.**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe una variación entre la intensidad de parásitos encontrados en las muestras de heces de tortugas de las diferentes Islas Santa Cruz, Española, Santiago y Pinzón, excluyendo a la muestra tomada en la isla Floreana, obteniendo que existe una diferencia significativa entre la intensidad de parásitos encontrados de coccidia, oxyuridae y strongylidae, cada isla (ANEXO G), determinando que existe una mayor intensidad parasitaria de ooquistes en las cuatro islas ( $p > 0.05$ ). Del mismo modo se realizó un análisis para determinar si existe una diferencia entre el total de parásitos encontrados en cada isla obteniéndose que no existe una diferencia significativa entre islas, con lo que se puede comprobar que la cantidad de muestras obtenidas por isla no presentan un sesgo y no interfieren con la cantidad de parásitos encontrados ( $p > 0,05$ ) (ANEXO H).

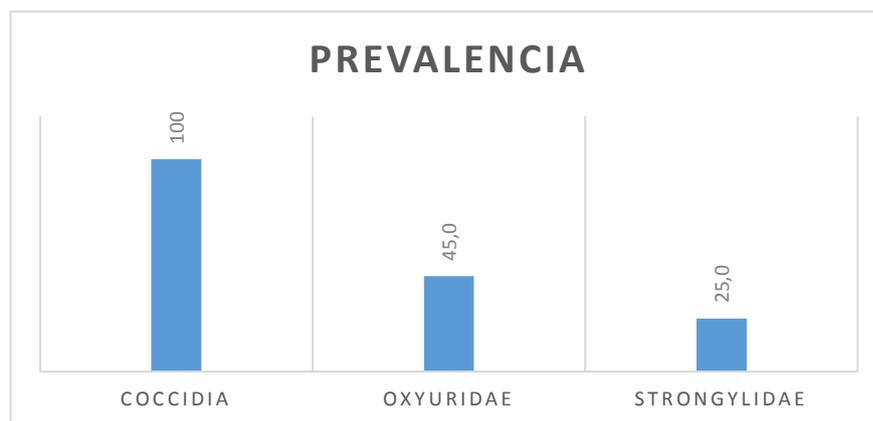
Se evaluaron cuatro parámetros que son la prevalencia, carga parasitaria que está dada por el número de huevos por gramos de heces (hpg), grado de dominancia y la intensidad media que son especificados en el capítulo 2, con lo cual podemos evaluar el grado de infección en las tortugas gigantes (Tabla 4.3).

Tabla 22

**Parámetros estadísticos parásitos gastrointestinales encontrados en tortugas gigantes diagnosticadas por isla**

Parámetros	Coccidia	<i>Oxyuridae</i>	<i>Strongylidae</i>
Prevalencia	100	45,0	25,0
Carga parasitaria (hpg)	4700	2200	800
Intensidad media	235,0	110,0	40,0
Grado de dominancia	61,04	28,6	10,4

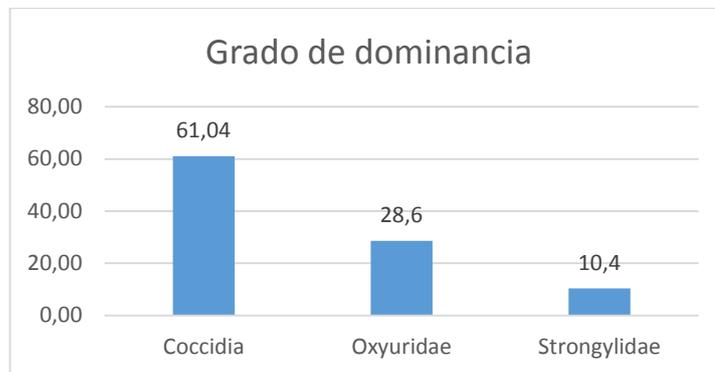
Se determinó que la prevalencia de ooquistes de coccidias es mayor que la de los demás parásitos gastrointestinales en las muestras de heces de tortugas gigantes con un valor de 100% (21/21) (Figura 4.6).



**Figura 20. Evaluación de la prevalencia de parásitos gastrointestinales en muestras de heces de tortugas gigantes.**

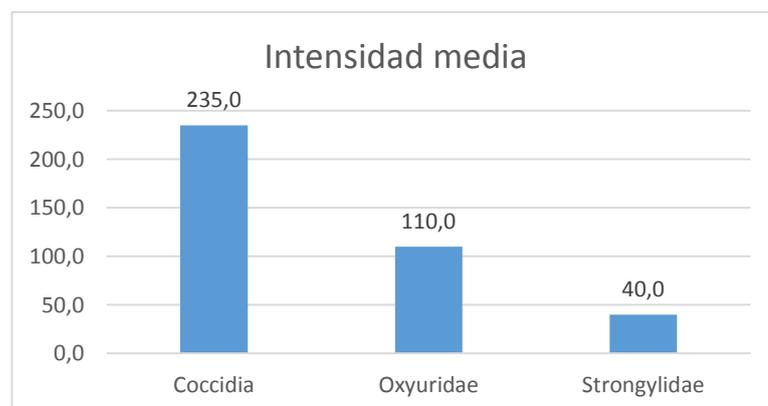
Se determinó que el porcentaje de grado de dominancia parasitaria de ooquistes de coccidias es mayor a la de los demás huevos de parásitos

gastrointestinales encontrados en las muestras de heces de tortugas gigantes con un valor de 61.04% (Figura 4.7).



**Figura 21. Evaluación del grado de dominancia de parásitos gastrointestinales en muestras de heces de tortugas gigantes.**

Se determinó que la intensidad media parasitaria de ooquistes de coccidia es de 223.8 hpg, lo que indica que el número total de ooquistes de coccidia por muestra es mayor que los demás huevos de parásitos encontrados en las muestras fecales de las tortugas gigantes de las diferentes islas (Figura 4.8).



**Figura 22. Evaluación la intensidad media de parásitos gastrointestinales en muestras de heces de tortugas gigantes**

Al realizar un análisis de varianza (ANOVA), se pudo establecer que los parámetros de prevalencia, carga parasitaria, grado de dominancia, e intensidad media, son estadísticamente significativos entre los parásitos encontrados en las muestras de heces provenientes de las diferentes islas, determinándose que existe valores mayores en la infección de tortugas con coccidias (ANEXO F).

**Tabla 23**

**Tabla de interacción entre nematodos**

	<i>Estróngilos</i>		
<i>Oxiuros</i>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>Total</b>
<b>0</b>	10	1	<b>11</b>
<b>1</b>	5	4	<b>9</b>
<i>Total</i>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>20</b>

Se puede observar que no existe una diferencia significativa, lo que demuestra que no existe una interacción entre los nematodos pertenecientes a las familias Oxiuros y Estróngilos (Tabla 4.4).

**Tabla 24**

**Factores de expansión de Oxiuros**

	<i>Oxiuros</i>		
	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>Total</b>
<i>Española</i>	4	1	<b>5</b>
<i>Pinzón</i>	1	4	<b>5</b>
<i>Santiago</i>	4	2	<b>6</b>
<i>Santa Cruz</i>	2	2	<b>4</b>
<i>Total</i>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>20</b>

Al realizar una prueba de  $\chi^2$ , se puede observar que no existe una influencia de la isla en función de la distribución de los resultados en presencia de nematodos oxiuros (Tabla 4.5).

**Tabla 25****Factores de expansión de Estróngilos**

	<i>Estróngilos</i>		<b>Total</b>
	<b>0</b>	<b>1</b>	
<i>Española</i>	3	2	<b>5</b>
<i>Pinzón</i>	4	1	<b>5</b>
<i>Santiago</i>	6	0	<b>6</b>
<i>Santa Cruz</i>	2	2	<b>4</b>
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>20</b>

Al realizar una prueba de  $\chi^2$ , se puede observar que no existe una influencia de la isla en función de la distribución de los resultados en presencia de nematodos estróngilos (Tabla 4.6).

Las infecciones intestinales por coccidia son muy comunes en reptiles de vida libre y en cautiverio, en muchos de los casos identificados en este estudio el número de ooquites y huevos excretados fueron altamente significativos, lo que refleja la alta intensidad de la infección, la presencia de ooquites en todos los casos estudiados puede explicarse debido al espacio limitado en el que se desarrollan las tortugas en cautiverio, resultando en una contaminación ambiental con agentes como coccidias, pudiendo ser del género *Eimeria* spp (Ras-Norynska & Sokol 2015).

Datos previos presentados por Couch *et al*, (1996) revela la presencia de coccidias en tortugas gigantes de Galápagos, en el que se describe una especie de *Eimeria* spp. en una sola tortuga de 26 muestreadas en el Centro de Crianza de la Isla Santa Cruz, con gran número de ooquistes descargados, la presencia en solo una de ellas se atribuyó a que estas tortugas son vegetarianos estrictos, lo que les proporciona cierta resistencia natural a la infección, los datos presentados en este estudio difieren con esta investigación encontrándose que todas las tortugas jóvenes muestreadas del Centro de Crianza presentaron la infección, por lo que se podría atribuir al tipo de alimentación, ya que al ser únicamente alimentadas con dos clases de plantas, hojas de otoy y porotillo, las tortugas tienen un estilo de vida monófago,

en sus primeras etapas de desarrollo y estarían perdiendo la capacidad de resistencia a la infección, o podría ser el caso que las plantas estén contaminadas con ooquistes de coccidias.

Se debe descartar en los dos estudios mencionados la probabilidad de que las coccidias encontradas sean pseudoparásitos ya que se encontró un gran número de ooquistes en ciertas muestras y todos presentan una buena integridad estructural, que sugiere una verdadera infección, además las tortugas muestreadas se mantienen en corrales separados donde el contacto con la mayoría de los otros animales es limitada, y no están inclinados a practicar la coprofagia (Couch, Stone, Duszynski, Snell, & Snell, 1996).

Existen casos en los que la presencia de coccidias son relativamente leves esto es debido a que estas infecciones son transitorias y producen infecciones breves que consisten en un número finito de ciclos endógenos de multiplicación, usualmente en el tracto intestinal o en los conductos y órganos asociados, cuyo ciclo se termina por la formación de ooquistes, que son pasados del huésped a sus heces, poniendo así fin a la infección (Duszynski & Morrow, 2014), sin embargo debido a que las tortugas viven en grupos, se podría estar contaminado el agua con las heces de aquellas que presentan la infección, logrando contaminar nuevos individuos.

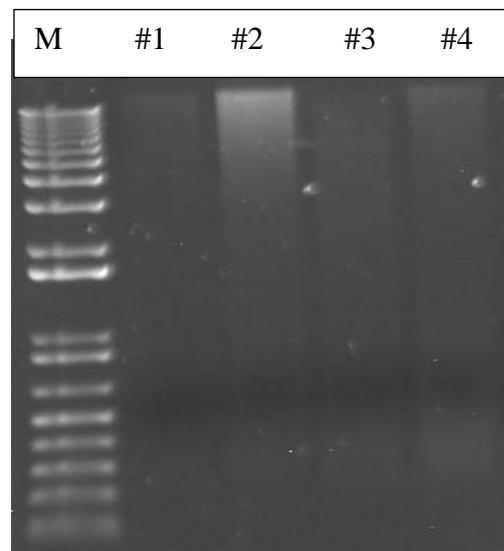
#### **4.2 Estandarización de la técnica de PCR para detección de apicomplexas de la clase coccidia**

El uso de técnicas moleculares para la identificación de parásitos gastrointestinales es importante para la validación de los resultados, el PCR se usa para indicar que las técnicas microscópicas con métodos de flotación y sedimentación detectaron correctamente ooquistes en las muestras fecales. Las cuatro muestras seleccionadas de las diferentes islas mostraron ser positivas al amplificar el fragmento deseado, afirmando los resultados observados mediante microscopia (Inacio *et al.*, 2016).

Los datos moleculares proporcionan herramientas valiosas y sensibles en la detección e identificación de parásitos, logrando ayudar en estudios epidemiológicos,

las técnicas moleculares son un diagnóstico eficaz y confiable, además de una herramienta esencial en la vigilancia y manejo de enfermedades, y han sido un éxito para la detección y diagnóstico de otras infecciones coccidianas como *Toxoplasma gondii* y *Sarcocystis* sp. (Chapman *et al.*, 2016).

Después de realizar la examinación de las 21 muestras de heces de tortugas se identificó la presencia de coccidias en todas las muestras. Se seleccionaron las muestras de heces con mayor número de huevos de coccidias, es decir aquellas que presentan un grado de intensidad superior, de las diferentes Islas, escogiendo a las muestras SC2016, 1; S2016, 2; P2016, 3 y E2014, 4 se las etiquetó del número 1 al 4 y se realizó una extracción de ADN. Las 4 muestras seleccionadas fueron sometidas a una extracción de ADN usando el kit comercial QIAamp DNA Stool Mini (Qiagen), se cuantificó en el NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) y en un gel de agarosa al 0,8% (Figura 4.10).



**Figura 23. Extracción de ADN de muestras fecales.** M=marcador, #1= Santa Cruz, 2016; #2= Santiago, 2016; #3= Pinzón, 2016; #4= Española, 2014.

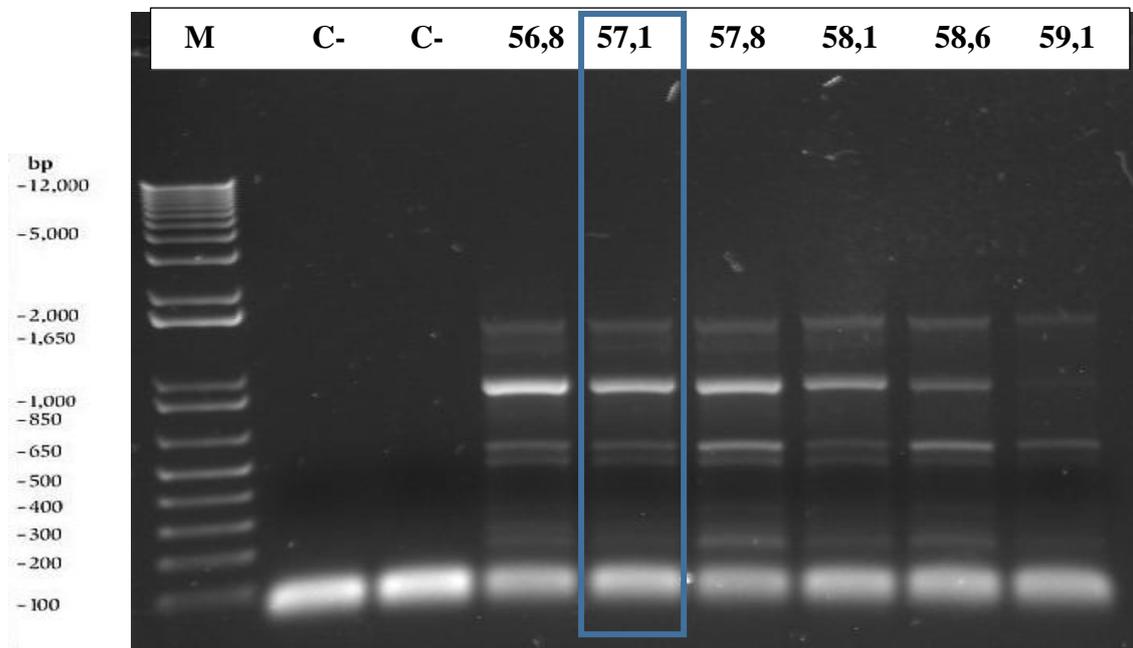
La muestra (#2) presenta mayor cantidad de ADN en la cuantificación con NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) y la electroforesis en gel de agarosa, por lo que se la utilizará para la estandarización de PCR para identificación de coccidias (Tabla 4.4).

**Tabla 26****Cuantificación de ADN en muestras fecales de tortugas gigantes de Galápagos**

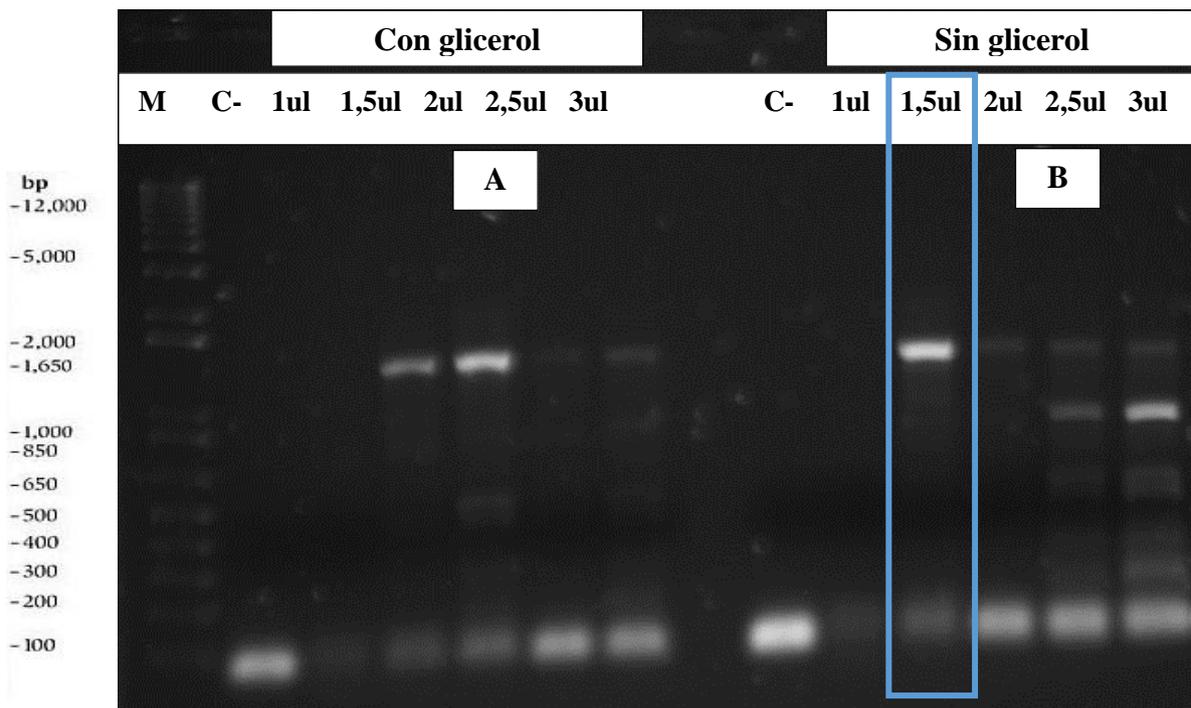
<b>Muestra</b>	<b>Concentración</b>	<b>Unidad</b>
#1	8,6	ng/ $\mu$ l
#2	37,3	ng/ $\mu$ l
#3	18,2	ng/ $\mu$ l
#4	30,2	ng/ $\mu$ l

En el presente estudio se estandarizó el PCR para la identificación de coccidias en base al protocolo establecido por Chapman *et al.* (2016), las condiciones de la prueba de PCR fueron optimizadas con los equipos y reactivos disponibles. Las concentraciones finales óptimas determinadas para la reacción fueron las siguientes: 0,8  $\mu$ M de desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 1,25 U/ $\mu$ L de la enzima GoTaq, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Figura 4.13) y 1  $\mu$ M de cada cebador (3F y Api1R). La temperatura óptima de hibridación de los cebadores fue 57°C (Figura 4.12). Los ciclos de temperatura para la amplificación óptima fueron: una denaturación inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de denaturación de 94°C por 30 segundos, una temperatura de hibridación de 57°C por 30 segundos y una temperatura de extensión de 72°C por 2 minutos, finalmente, una extensión de 72°C por 10 minutos.

Debido a que la PCR presentó inconsistencias, es decir bandas de tamaños diferentes, a causa de un exceso de magnesio (Mg<sup>+2</sup>) y a una temperatura de hibridación muy baja (SARRIÓN, PARDO, & CAPARRÓS), se procedió a realizar una estandarización de la reacción, aumentando la temperatura de hibridación (Figura 4.11) , y disminuyendo la cantidad Mg<sup>+2</sup>, se procedió además a usar glicerol (Figura 4.12).



**Figura 24. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) para identificación del tipo de coccidia en muestras de ADN fecal de tortugas gigantes. Prueba de temperaturas. M=marcador, C- =control negativo, gradiente de temperaturas (56,8; 57,1; 57,8; 58,1; 58,6; 59,1).**



**Figura 25. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) para identificación del tipo de coccidia en muestras de ADN fecal de tortugas gigantes.** A) Prueba de Cl<sub>2</sub>Mg con glicerol, B) Prueba de Cl<sub>2</sub>Mg sin glicerol. M=marcador, C- =control negativo, gradiente de Cl<sub>2</sub>Mg (1ul; 1,5ul; 2ul; 2,5ul; 3ul).

En la prueba con glicerol se observa que disminuyó la cantidad de bandas inespecíficas al usar una menor cantidad de Mg<sup>+2</sup>, obteniéndose que con 1,5ul y 2ul es suficiente para amplificar la banda que se requiere entre 1000 pb-1650 pb, además que aumenta la especificidad de la PCR (Figura 4.12. A).

En la prueba sin glicerol se observa que se eliminó las bandas inespecíficas al usar una menor cantidad de Mg<sup>+2</sup> de 1,5ul, obteniéndose la banda que se requiere en la amplificación entre 1000 pb-1650 pb, y aumentando la especificidad de la PCR (Figura 4.12. B).

Obteniéndose mejores resultados con una cantidad de 1,5ul de Mg<sup>+2</sup> y con una temperatura de hibridación de 57°C. Para tener una mayor seguridad de la banda amplificada es la correcta, se resolvió usar 1,25ul de glicerol al 5% como coadyuvante, aumentando así la especificidad de la reacción (Escrig, 2003).

Se producen productos no específicos cuando la astringencia del PCR es excesivamente baja, dando como resultado bandas de PCR no específicas con longitudes variables. Esto produce un efecto de escalera sobre un gel de agarosa, por lo que es aconsejable elegir las condiciones de PCR que aumenten su astringencia (Lorenz, 2012).

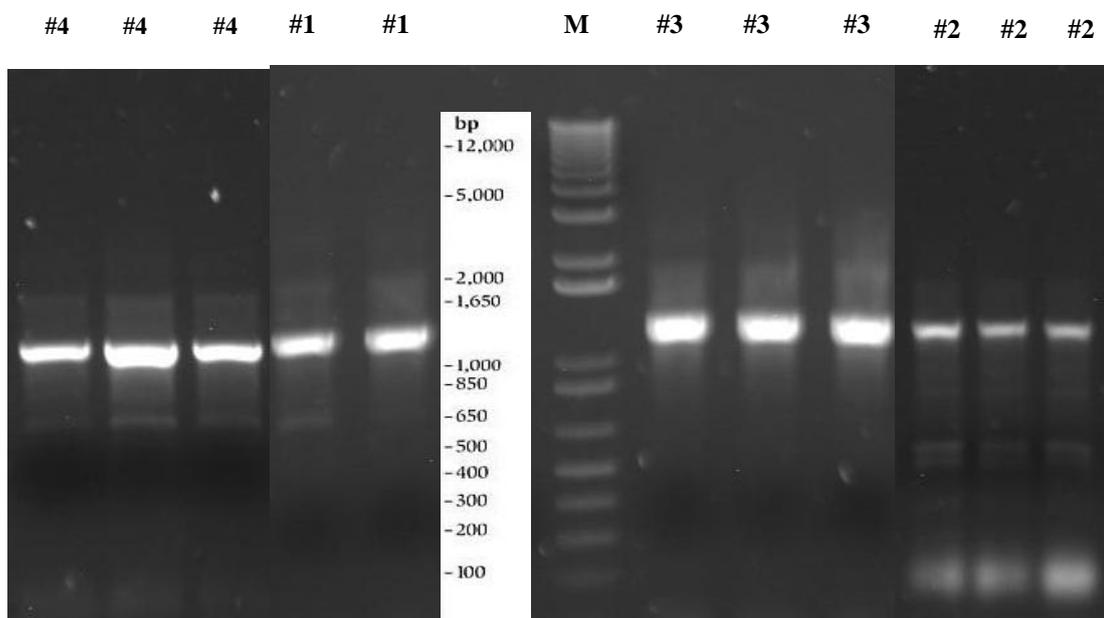
En condiciones óptimas, la reacción es muy eficiente, la estandarización es necesaria para lograr condiciones óptimas para la PCR. Optimización de la PCR consiste en probar una serie de variables, una de las cuales es la temperatura de hibridación ( $T_a$ ). Si el  $T_a$  es demasiado bajo, se amplifican fragmentos no específicos de ADN. Mientras que si el  $T_a$  es demasiado alto, el rendimiento del producto deseado, y en ciertas ocasiones la pureza se reduce debido a un mal recocido de cebadores (Rychlik, Spencer, & Rhoads, 1990).

Se sabe que el glicerol aumenta la eficiencia y la especificidad de la PCR. La desnaturalización incompleta del ADN molde o de sus estructuras secundarias, dificulta que las bases coincidan con la secuencia cebadora, impidiendo de este modo la amplificación, el glicerol facilita el reconocimiento de cebador a su secuencia complementaria mediante la desnaturalización de sus estructuras secundarias, debido a que promueve la separación de hebras, lo que permite una amplificación específica. Una vez que la secuencia complementaria queda disponible para el cebador, este reconoce su sitio apropiado y logra una amplificación específica. Por otro lado, mayores concentraciones de glicerol tienen efectos inhibitorios sobre Taq ADN polimerasa. Por lo tanto, el efecto favorable del glicerol podría verse comprometido por su efecto inhibitorio sobre la PCR (Nagai, Yoshida, & Sato, 1998).

Las ADN polimerasas termoestables requieren la presencia de sal de magnesio ( $Mg^{2+}$ ), para actuar como un cofactor durante el proceso de reacción. La concentración de  $Mg^{2+}$ , es uno de los reactivos más fáciles de manipular, y es el que tiene mayor impacto en la astringencia de la PCR. En general, el rendimiento del producto de PCR aumentará con la adición de mayores concentraciones de  $Mg^{2+}$ . Sin embargo, mayores concentraciones de  $Mg^{2+}$  también disminuirán la especificidad y fidelidad de la ADN polimerasa. La sal  $Mg^{2+}$  no se consume realmente en la reacción, pero la reacción no puede continuar sin estar presente.

Cuando hay demasiado  $Mg^{2+}$ , no se produce una desnaturalización completa del ADN molde, también puede producir que los cebadores se adhieran de forma incorrecta en el ADN molde, disminuyendo la especificidad y dando como resultados productos de PCR no deseados. Cuando no hay suficiente  $Mg^{2+}$ , la reacción no se produce, y no se obtiene el producto del PCR (Lorenz, 2012).

Se procedió a realizar la PCR usando una concentración final de 1,5ul de  $Cl_2Mg$  25mM, y sin glicerol, con las demás muestras seleccionadas: SC2016, 3; S2016, 1; P2016, 2 y E2014, 3; obteniéndose el siguiente resultado al correr una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, se colocó 10ul del producto del PCR en cada pocillo. Después de realizar el ensayo de PCR se observa que todas las muestras son positivas para coccidias, presentando una banda de aproximadamente 1200pb a 1300pb (Figura 4.13).



**Figura 26. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) para identificación del tipo de coccidia en muestras de ADN fecal de tortugas gigantes.** A) Prueba de  $Cl_2Mg$  con glicerol, B) Prueba de  $Cl_2Mg$  sin glicerol. M=marcador, C- =control negativo, gradiente de  $Cl_2Mg$  (1ul; 1,5ul; 2ul; 2,5ul; 3ul).

#### 4.3 Detección de apicomplexas de la clase coccidia en muestras de heces de tortugas gigantes mediante la técnica de PCR

Las coccidias están dentro de las clases de parásitos gastrointestinales más comunes en tortugas, es variable entre las especies (Innis *et al.*, 2007). Se cree que la presencia de este tipo de parásitos en las tortugas gigantes de Galápagos se transite por vía oral, pero no por ingestión directa de heces fecales, sino por contaminación del agua con material fecal de animales infectados o por contaminación de las plantas con las que se alimentan. Las fluctuación atípicas de temperatura, es decir la subida de temperatura del agua en épocas de verano y las bajas de temperatura invernales, pueden influir en el desarrollo coccidial y la tasa de replicación, siendo una causa de la presencia de estos organismos, en ciertas épocas (Chapman *et al.*, 2016).

Las especies de *Caryospora*, *Eimeria* e *Isospora* son las más específicas de los coccidios, pudiendo infectar las especies huésped dentro de un mismo género o dentro de géneros estrechamente relacionados. Estas protistas parecen relativamente comunes en las tortugas y están representadas por unas 71 especies que se ajustan taxonómicamente a cinco géneros en tres familias que incluyen Crystosporidiidae, Eimeriidae y Sarcocystidae (Duszynski & Morrow, 2014). Dentro de los cuales se ha encontrado más de 30 especies de parásitos de coccidias descritas en *Chelonidae*, y la especie *Eimeria* spp. es aparentemente la coccidia más común (V. Schmidt *et al.*, 2008).

Dentro de la familia Eimeriidae se ha descrito 13 especies de coccidias, de 11 especies de tortugas en 8 géneros de la familia Testudinidae. Estos huéspedes y coccidias incluyen: la tortuga radiada, *Astrochelys radiata*, en el que se ha encontrado una coccidia nuclear, *Chelonoidis carbonaria*, encontrando 4 coccidias de especie *Eimeria* spp., en *Chelonoidis nigra*, se ha registrado únicamente una coccidia *Eimeria* spp., en *Chelonoidis denticulata* se encontró 3 coccidias de especie *Eimeria* spp., y una *Isospora* spp.; en *Chersina angulata* una coccidia nuclear, de género desconocido; *Gopherus polyphemus* se encontró 1 coccidia de especie *Eimeria* spp.; en *Indotestudo forstenii* se identificó una coccidia nuclear, de género desconocido; en *Manouria impressa* una coccidia nuclear, de género desconocido; en

la tortuga leopardo, *Stigmochelys pardalis*, se encontró un coccidiano nuclear, de género desconocido; en la tortuga espinal mediterránea, *Testudo graeca* se identificó una coccidia de especie *Eimeria* spp.; en *Testudo horsfieldii* una coccidia *Isospora* spp., en *Chelonoidis* se ha estudiado más que cualquier otro género de tortugas, encontrándose 9 especies de coccidias del género *Eimeria* en 3 especies de tortugas del género *Chelonoidis* (McAllister *et al.*, 2014). En este estudio se han identificado una clase de coccidia, según el tamaño del fragmento amplificado por reacción de cadena de polimerasa (PCR), de aproximadamente 1200 pb a 1300 pb, en 4 especies de tortugas criadas en cautiverio en el centro de crianza “Fausto Llerena” en el Parque Nacional Galápagos, Ecuador, provenientes de las islas Santa Cruz, Santiago, Pinzón y Española (Figura 4.13).

Existen por lo menos 3 especies de *Eimeria* únicas para cada especie de tortuga, entonces puede haber hasta 160 eimerianos que parasitan a miembros de esta familia, que aún no han sido identificados, ni clasificados dentro de un grupo, por lo que se estima que actualmente alrededor del 6% (11 de 171) de la biodiversidad de especies de *Eimeria* es conocida en el orden Testudinidae (McAllister *et al.*, 2014).

#### **4.4 Caracterizar el tipo de coccidia presente en las muestras de heces de las tortugas gigantes, mediante un análisis filogenético.**

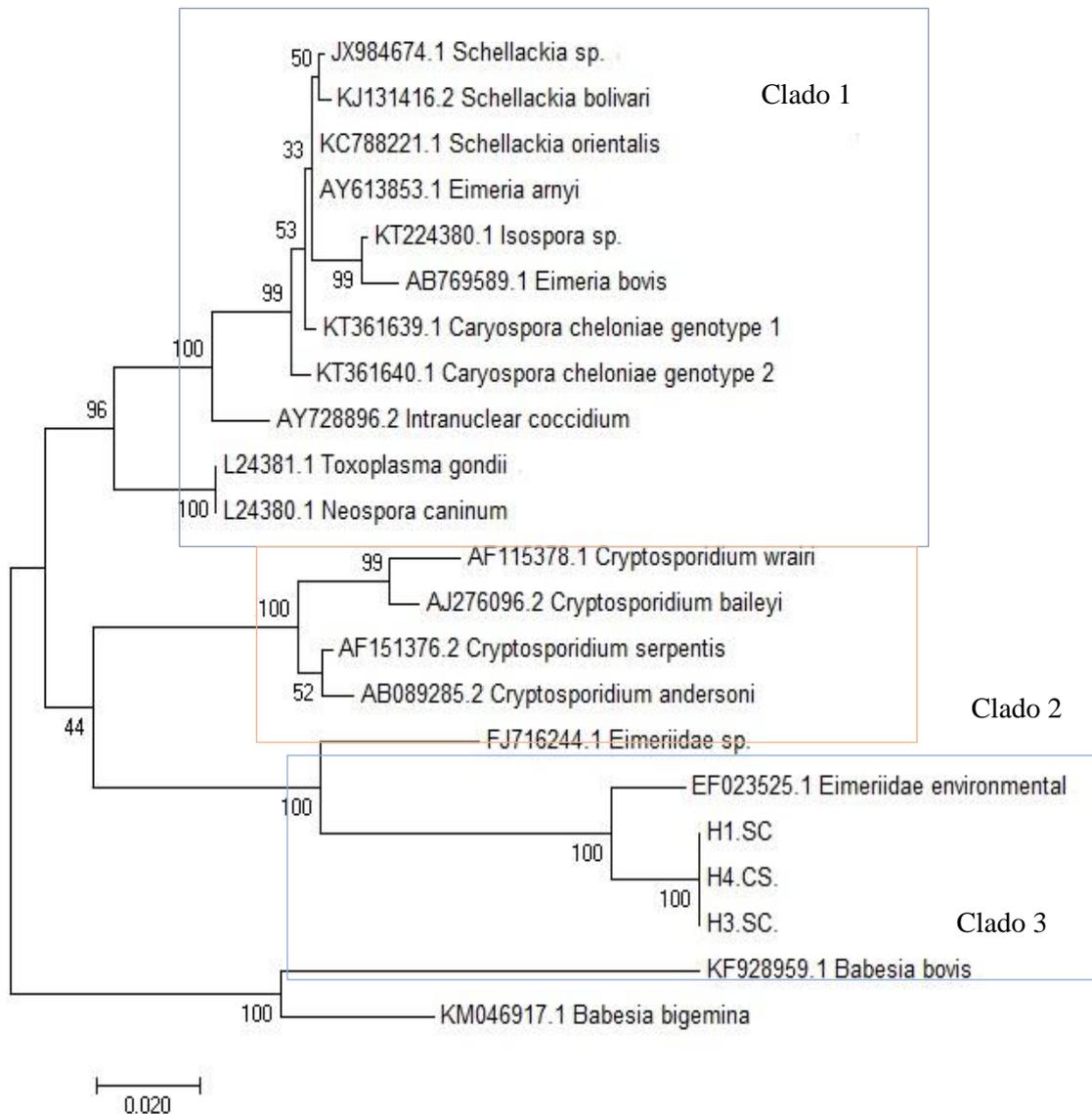
. Después de realizar la secuenciación mediante el método de Sanger, en la empresa Macrogen (Corea del Sur), se obtuvieron cuatro secuencias, cada una de estas secuencias corresponde a un grupo de individuos de las cuatro islas estudiadas.

Los cromatogramas obtenidos tras la secuenciación fueron examinados utilizando el software bioinformática Sequencher (versión 5.4.6) y alineados con MEGA (versión 7.0.21), con lo cual se obtuvo tres secuencias consenso (ANEXO H) que corresponden a un mismo organismo provenientes de las muestras fecales #1, #3, #4, la secuencia #2 no pudo ser alineada debido a que la secuenciación no presentó buenos resultados, se obtuvo segmentos demasiado cortos. A partir de las 3

secuencias obtenidas, se realizó una solo consenso ya que eran 100% homólogos y se la nombro Consenso H (ANEXO I).

Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias conocidas en GenBank NCBI (Centro Nacional de Información de Biotecnología). Las bases de datos con BLASTN predijeron secuencias de nucleótidos homólogas de coccidias, encontrando las más altas similaridad con *Eimeriidae ambiental* (EF023525.1) mostrando un 93% de similitud y con *Eimeriidae* sp. (FJ716244.1) mostrando un 90% de similitud.

Se utilizó *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* como el outgroup (GenBank número de acceso KM046917 y KF928959, respectivamente). Otras secuencias fueron recuperadas de GenBank: *Schellackia bolivari* (KJ131416), *Schellackia* sp. (JX984674), *Schellackia orientalis* (KC788221), *Isoospora* sp. (KT224380), *Eimeria bovis* (AB769589), *Eimeria arnyi* (AY613853), *Caryospora cheloniae* genotipo 1 (KT361639), *Caryospora cheloniae* genotipo 2 (KT361640), Intranuclear coccidium (AY728896), *Toxoplasma gondii* (L24381), *Neospora caninum* (L24380), *Cryptosporidium andersoni* (AB089285), *Cryptosporidium baileyi* (AJ276096), *Cryptosporidium serpentis* (AF151376), *Cryptosporidium wrairi* (AF115378), *Eimeriidae ambiental* (EF023525.1) y *Eimeriidae* sp. (FJ716244.1). Obteniendose el siguiente resultado en el software MEGA (versión 7.0.21) (Figura 4.14).



**Figura 27. Análisis filogenético molecular por método de máxima verosimilitud de las secuencias parciales de nucleótidos 18S rRNA de coccidias**

Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos de Neighbor-Join, usando el método de máxima probabilidad compuesta (MCL), con 2000 repeticiones. El análisis involucró 22 secuencias de nucleótido. Se eliminaron todas las posiciones que contenían vacíos y datos perdidos. Se obtuvo un total de 850 posiciones en el conjunto final de datos.

Los datos de las secuencias de coccidias obtenidas previamente proporcionan información para el diseño de análisis filogenético dividiendo a estos organismos en tres grupos principales que corresponden a las familias Sarcocystidae, Eimeriidae, y Cryptosporidiidae a partir del gel 18 S rRNA de coccidias (Garner *et al.*, 2006). Nuestros estudios indicaron que las secuencias de parásitos gastrointestinales de la clase coccidia encontrados en las tortugas gigantes de Galápagos no pertenecen a estas familias, representando un grupo no clasificado de coccidias, llegando a concluirse que este organismo puede ser parafilético a estas familias.

Los arboles de máxima verosimilitud mostraron una topología similar que estudios previamente realizados con las secuencias de coccidias obtenidas. La historia evolutiva se dedujo mediante el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Tamura-Nei, mostrando el árbol con mayor probabilidad de registro. El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agrupan, se muestra junto a las ramas, indicando que las tres coccidias obtenidas se agruparon en un 100% con *Eimeriidae environmental* y *Eimeriidae spp.* (Figura 4.14).

Se formaron 3 clados principales; el primero fue compuesto por especies de la familia Eimeriidae y Sarcocystidae, el segundo formado por las coccidias de la familia Cryptosporidiidae y el último formado por las secuencias obtenidas en este estudio.

Las secuencias obtenidas de las muestras de heces de tortugas gigantes pertenecen al tercer clado, que corresponde a un grupo no clasificado de coccidias, indicando que existe un grupo de coccidias más distantes que no forman parte del mismo al que pertenecen *Eimeria bovis* (ganado bovino) y *Eimeria arnyi* (serpiente), lo que sugiere que estos últimos pueden formar su propio género o géneros relacionados. El análisis filogenético de estas tres secuencias (H1. CS, H4.CS y H3.CS) demostró una relación más cercana a la familia Cryptosporidiidae que a Sarcocystidae y Eimeriidae (Figura 4.14).

Debido a que los únicos reportes de coccidias en tortugas gigantes de Galápagos han sido solo por caracterización morfológica, este es el primer reporte por caracterización molecular de coccidias presentes en tortugas gigantes. Existen pocas coccidias identificadas por caracterización molecular en tortugas, entre ellas se puede

citar a coccidia de tipo intranuclear (AY728896) en una tortuga (*Intestudo Forstenii*) y una tortuga leopardo (*Geochelone pardalis*), una coccidia (EU168432.1) encontradas en tortugas radiadas (*Geochelone radiata*), y las coccidias del género *Caryospora* genotipo 1 (KT361639) y *Caryospora* genotipo 2 (KT361640) en tortugas marinas verdes *Chelonia mydas*.

Antes de este estudio solo dos tortugas gigantes de Galápagos han sido examinadas para coccidias, mediante caracterización morfológica, encontrando *Eimeria geochelona* y *Eimeria iversoni*. Ambas especies presentan características estructurales diferentes, *Eimeria geochelona* encontrada en tortugas gigantes de Galápagos en la Isla Santa Cruz, Ecuador presenta ooquistes esporulados elípticos u ovoides (Couch *et al.*, 1996), que son completamente diferentes a las especies *Eimeria iversoni* encontrada en tortugas gigantes de Galápagos del Zoológico de Dallas que presenta ooquistes esporulados con proyecciones cónicas y una forma irregular, similar a 6 Eimerianos encontrados en otras tortugas. Estos son: *Eimeria amazonensis* de la tortuga *Chelonoidis carbonaria* de Brasil, *Eimeria hynekprokopi* en la tortuga, *Cuora galbinifrons*, *Eimeria jirkamoraveci* en tortuga, *Mesoclemmys heliostemma* de Perú, *Eimeria mitraria* de 12 especies de tortugas, *Eimeria motelo* de la tortuga de patas amarillas *Chelonoidis denticulata* de Perú y *Eimeria stylosa* de las tortugas deslizadores de orejas rojas, *Trachemys scripta* de Texas, Estados Unidos (McAllister *et al.*, 2014). Debido a que los únicos reportes de coccidias en tortugas gigantes de Galápagos han sido solo por caracterización morfológica, y este es el primer reporte por caracterización molecular de coccidias en tortugas gigantes de Galápagos no se puede asegurar que se traten de los mismos parásitos encontrados en este estudio.

Sin embargo datos previos descritos sugieren que *Eimeria iversoni* podría ser una coccidia no específica de las tortugas gigantes de Galápagos, sino una infección transitoria o incluso falsa, pudiendo ser una infección de otro huésped que viva conjuntamente con esta tortuga (McAllister *et al.*, 2014). Mientras que *Eimeria geochelona* encontrada en una de las tortugas gigantes de Galápagos de la Isla Santa Cruz, Ecuador, fue considerada como una nueva especie de parásito encontrada en estos individuos, debido al gran número de ooquistes descargados, a su escaso contacto con otros animales ya que mantienen en corrales aislados, y a que la

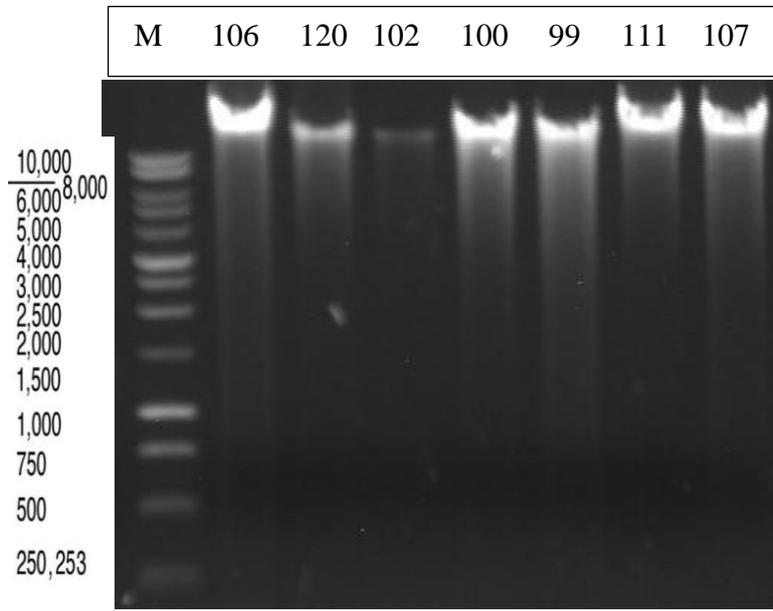
estructura de ooquistes encontrados no se asemejan a otros descritos en otros animales (Couch *et al.*, 1996). Los ooquistes encontrados en nuestro estudio podrían ser los mismos que aquellos reportados con anterioridad en la Isla Santa Cruz, sin embargo al no realizarse un estudio de la morfología del ooquiste esporulado, no se puede asumir completamente dicha hipótesis. De igual manera los ooquistes previamente encontrados han sido clasificados dentro del género *Eimeria*, debido a que sus características morfológicas son similares a otros ooquistes esporulados descritos en la Colección Nacional de Parásitos (USNPC) no. 85499, pero sin un estudio molecular, no se puede tener la seguridad de que se trate del mismo organismo.

Para determinar si las coccidias gastrointestinales encontradas en las tortugas gigantes de Galápagos son una especie nueva son necesarios estudios adicionales como un aislamiento y esporulación de los ooquistes, lo cual proporcionaría la información adicional para su identificación, y ayudaría en la determinación del estatus taxonómico del organismo. Además se necesita estudios de infectividad experimental para elucidar la patogénesis completa de la infección (Garner *et al.*, 2006).

Se requieren más estudios, incluidos estudios análisis de otras especies de tortugas, junto con la caracterización morfológica e investigaciones de patogenicidad para validar a la Eimeriida encontrada como un nuevo género.

#### **4.5 Determinar la presencia de hemoparasitos del filo Apicomplexa y orden Rickettsiales en muestras de sangre periférica de tortugas gigantes de las Islas Galápagos, mediante el uso de técnicas moleculares PCR.**

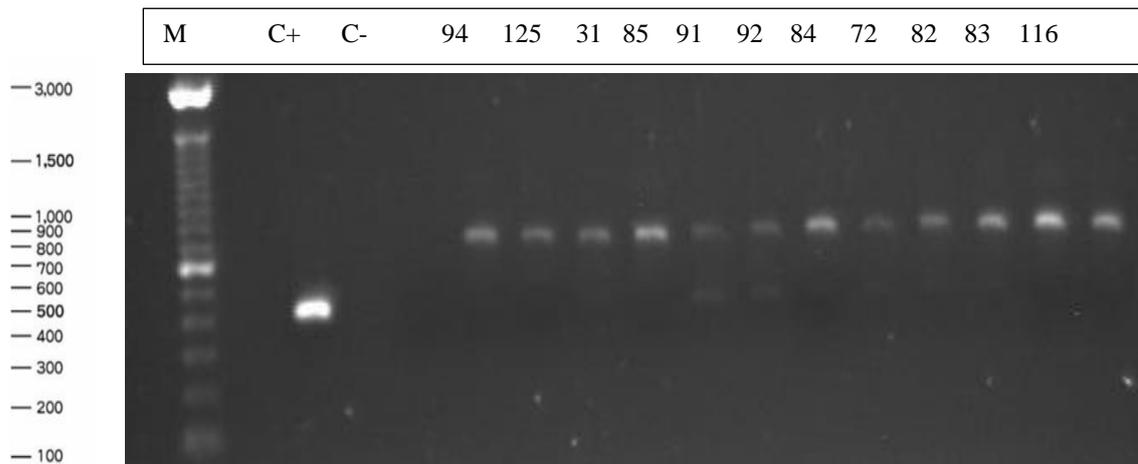
La técnica de extracción de ADN y su cuantificación mediante NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) (ANEXO D), y por electroforesis en gel de agarosa, permitió detectar ADN íntegro y puro en las 138 muestras sanguíneas. Las muestras obtenidas mostraron altas concentraciones por lo que necesitaron ser diluidas con la solución de resuspensión Tris- EDTA hasta un valor aproximado de 100ng/ul (Figura 4.15).



**Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de ADN total de tortugas gigantes.** M=marcador, 106, 120, 100, 99, 111, 107= ADN total tortugas gigantes

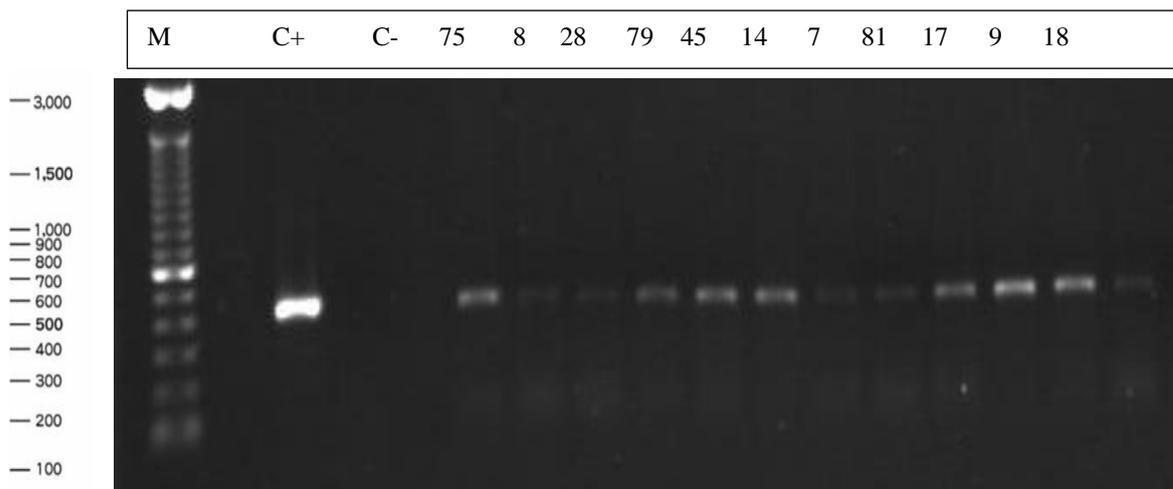
Se obtuvo 138 muestras de sangre de tortugas gigantes de distintas edades del centro de crianza “Fausto Llerena” de la provincia de Galápagos, proveniente de las Islas Española, Floreana, Española, Santiago, Pinzón y el Volcán Wolf, a las cuales se les realizó PCR para identificación Apicomplexas y Rickettsias, dando resultado negativo en ambos casos.

Se obtuvo los siguientes resultados:



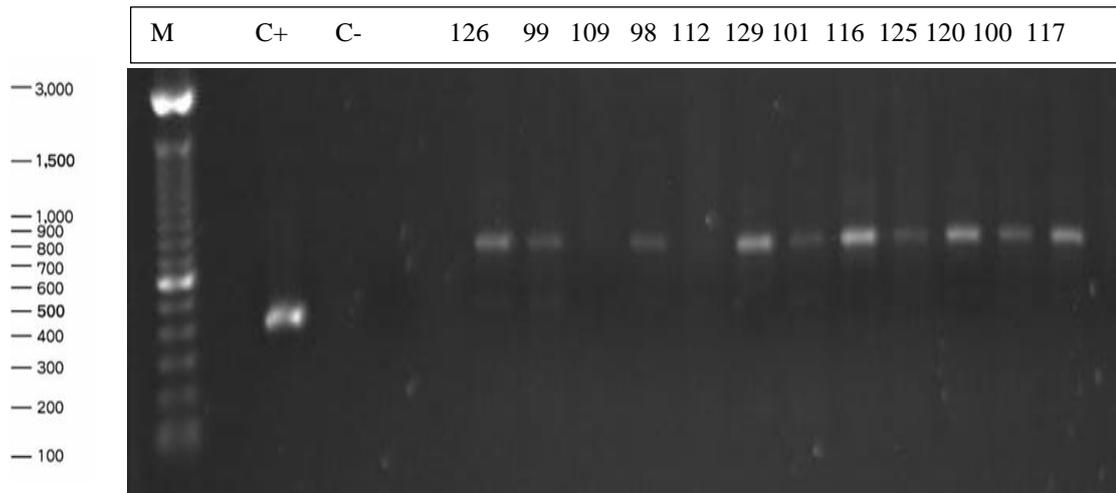
**Figura 29. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) para identificación del filo Apicomplexa en muestras de ADN de sangre de tortugas gigantes.**

M=marcador, (C -) = control negativo, (C+)= control positivo, 94, 125, 31, 85, 91, 92, 84, 72, 82, 83, 116 = resultado negativo para apicomplexas

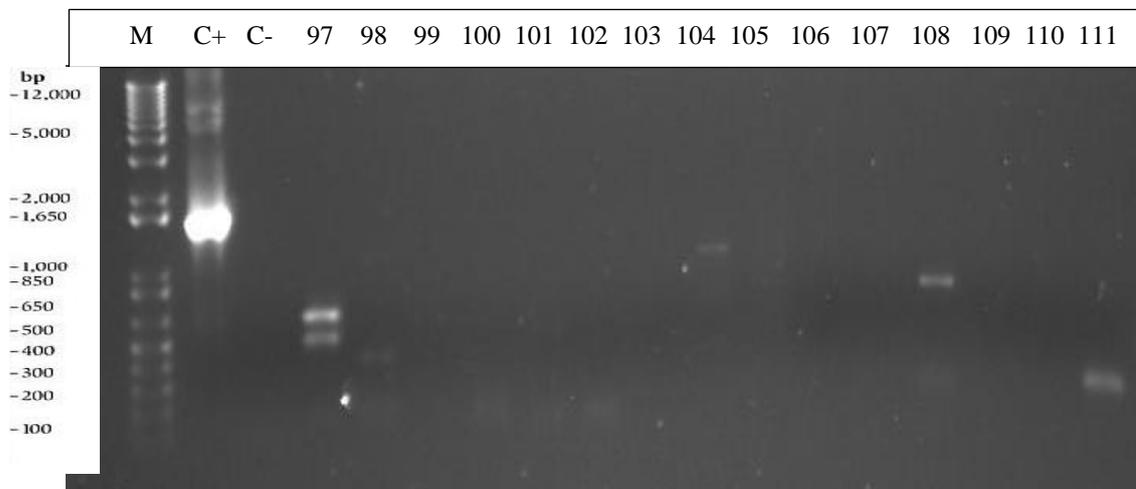


**Figura 30. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) para identificación del filo Apicomplexa en muestras de ADN de sangre de tortugas gigantes.**

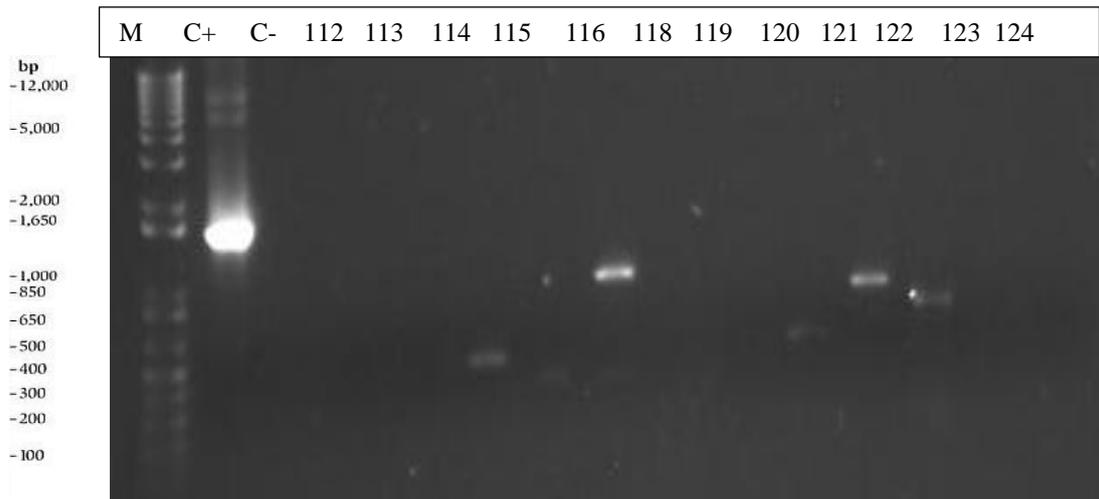
M=marcador, (C -) = control negativo, (C+)= control positivo, 75, 8, 28, 79, 45, 14, 7, 81, 17, 9, 18, 41, 70 = resultado negativo para apicomplexas.



**Figura 31. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) para identificación del filo Apicomplexa en muestras de ADN de sangre de tortugas gigantes.**  
M=marcador, (C-) = control negativo, (C+)= control positivo, 126, 99, 109, 98, 112, 129, 101, 116, 125, 120, 100, 117= resultado negativo para apicomplexas.



**Figura 32. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) para identificación de la clase Rickettsiales en muestras de ADN de sangre de tortugas gigantes.**  
M=marcador, (C-) = control negativo, (C+)= control positivo, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110 = resultado negativo para apicomplexas.



**Figura 33. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) para identificación de la clase Rickettsiales en muestras de ADN de sangre de tortugas gigantes.**

M=marcador, (C-) = control negativo, (C+)= control positivo, 112, 113, 114, 115, 116, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124 = resultado negativo para rickettsias.

En el caso de Apicomplexas se mostró una banda en todas las muestras analizadas por lo que se procedió a realizar una secuenciación, sin embargo se determinó que la banda es inespecífica, ya que al realizar el BLASTN no se encontró similitud con ninguna especie de apicomplexa, ni con el genoma de las tortugas gigantes de galápagos.

Las infecciones con hemoparásitos son muy comunes en los reptiles en todo el mundo, parásitos apicomplexos, son frecuentes en serpientes, tortugas y lagartos, estos parásitos necesitan vectores, como artrópodos o sanguijuelas, para su desarrollo o transmisión (Telford, 2016). Varios géneros de hemoproteidos fueron registrados originalmente en tortugas, incluyendo especies de *Haemoproteus* (Cook, Smit, & Davies, 2010). Otro tipo de hemoparásitos que puede ocasionar problemas en las tortugas son aquellas de la clase rickettsia encontradas en garrapatas de tortugas, por lo que se cree que estas tienen un alto potencial para infectar con éxito a los animales hospedadores (Erster *et al.*, 2015) por lo que en este estudio se realizó una identificación del filo apicomplexa y orden rickettsias.

Sin embargo en este estudio no se identificó la presencia de hemoparásitos en las tortugas gigantes de Galápagos, pudiendo ser a que las islas Galápagos son parte

de un sistema de parques nacionales protegidos, tal que la implicación humana y su impacto en la biología, así como la presencia de parásitos que pueden afectar a sus especies, es mínima (Couch *et al.*, 1996). Además la prevalencia de hemoparasitos y la parasitemia varían según la especie huésped y el estado del huésped, es decir si es salvaje o cautivo y la ubicación, siendo factores importantes por los cuales la presencia de este tipo de parásitos es reducida en las Islas Galápagos (Halla, Korbel, Mutschmann, & Rinder, 2014).

Los parámetros de infección por hemoparasitos pueden variar en tiempo y espacio, lo cual es importante especialmente en parásitos que tienen ciclos de vida complejos y que son transmitidas por vectores, como es el caso de los hemoparasitos apicomplexas del género *Hepatozoon*. Por ejemplo, un estudio transversal de dos especies de parásitos de la malaria ha mostrado una variación específica del parásito en los patrones espaciales de riesgo de la enfermedad en dos especies de aves estrechamente relacionados, en las cuales se observó que las variaciones estacionales o ambientales debido al cambio climático, no sólo puede afectar a la abundancia del vector, y al desarrollo del parásito dentro de los vectores, sino también puede influir en el comportamiento del huésped y a la condición inmunológica de este. Por lo tanto, se deben realizar estudios en varias poblaciones y en diferentes temporadas, para tener una buena evaluación de la interacción huésped-parásito y comparar entre especies diferentes. Por lo tanto es fundamental la identificación y comparación de la especificidad del huésped, además es importante evaluar la competencia del huésped invertebrado para las hemogregarinas de reptiles, estos parámetro son esenciales para comprender mejor la ecología evolutiva y la dinámica de transmisión de estos parásitos (Maia, Harris, Carranza, & Gomez-Diaz, 2014). Las tortugas muestreadas se dividen en dos grupos uno que pertenece a tortugas juveniles del Centro de Crianza que no presentan ningún tipo de vector, como las garrapatas, por lo que se podría explicar que no exista prevalencia de hemoparasitos, y el otro que corresponde a las tortugas adultas de vida silvestre pertenecientes a otras islas que llegan al centro de crianza como parte del proyecto de restauración, y presentan una alta prevalencia de ectoparasitos. Antes de ingresar al centro, las tortugas son sometidas a procesos de desparasitación. No obstante durante el muestreo se encontró dos garrapatas en las tortugas gigantes adultas. En este estudio no se

encontró la presencia de ningún hemoparásitos pudiendo ser a causa de factores ambientales, temporales o espaciales, o a la especificidad del parásito por el hospedero vertebrado o invertebrado, por lo tanto para tener una mejor información sobre la presencia de hemoparásitos en tortugas se debería realizar un muestreo de tortugas gigantes de vida silvestre en las demás islas, con lo que se podría determinar la verdadera prevalencia de la enfermedad.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

Los parásitos gastrointestinales encontrados en muestras de heces de tortugas gigantes de Galápagos provenientes de las islas Santiago, Santa Cruz, Española, y Pinzón, fueron nematodos de la familia Oxyuridae y Strongylidae, y parásitos de coccidias pertenecientes a la familia Eimeriidae.

El uso de la técnica de flotación usando una solución sobresaturada de cloruro de sodio mostró buenos resultados para detectar nematodos y coccidios propios de las tortugas gigantes.

Los ooquistes en las diferentes muestras de heces presentaron una mayor prevalencia, intensidad, carga parasitaria, abundancia media y dominancia parasitaria, en comparación con los huevos de nematodos, por lo que se puede concluir que se presenta una mayor infección por coccidias, pudiendo ser la causa de la enteritis encontrada en el intestino al realizar la necropsia en la tortuga gigante.

Los mejores resultados en la estandarización de la reacción de cadena de polimersa (PCR) para identificación de coccidas, se obtuvo con una cantidad de 1,5ul de Mg+2 y con una temperatura de hibridación de 57°C.

El uso de técnicas moleculares como la reacción de cadena de polimerasa (PCR) y la secuenciación demuestra la capacidad para diferenciar especies de coccidias, debido a que una caracterización morfológica tiene poca resolución y una baja capacidad de identificación.

El análisis filogenético mostró que la especie de coccidias encontradas en las muestras de heces de tortugas gigantes de Galápagos pertenecen a un grupo no clasificado de coccidias, formando un clado diferentes junto con las *Eimeriidae* sp, y *Eimerridae ambiental*, determinándose que existe un grupo de coccidias no clasificados diferente a aquellas encontradas en otras especies.

Esta es la primera caracterización molecular de coccidias realizada en tortugas gigantes Galápagos, planteando la posibilidad de que la esta primera secuencia reportada se trate de una nueva especie de coccidias propia de estos individuos. No existe la presencia de hemoparásitos del filo apicomplexa y orden

rickettsiales en la muestra de sangre de tortugas gigantes de Galápagos, pudiendo ser una de las causas el ecosistema aislado en el que se desarrollan las tortugas, sin embargo se necesita un mayor muestreo de tortugas de vida silvestre para determinar la verdadera prevalencia de estos hemotrópicos.

## **5.2 Recomendaciones**

Se debe utilizar herramientas moleculares conjuntamente con estudios epidemiológicos, morfológicos y patológicos para obtener un mejor entendimiento y manejo de futuros brotes en tortugas.

La reintroducción de tortugas en edad juveniles podría favorecer la introducción de nuevas especies de nematodos y coccidias en las poblaciones silvestres donde estaban originalmente ausente, por eso es necesario realizar exámenes coproparasitarios antes de la repatriación.

Se deben considerar mejores opciones de control en el centro de crianza, para limitar la esporulación de los ooquistes, y la propagación de los parásitos, es importante considerar medidas como mejorar la calidad del agua y del alimento que se suministra, mantener bajos niveles de humedad, la limpieza completa de los corrales en donde se desarrollan las tortugas.

Se debe realizar un muestreo de las tortugas gigantes de vida silvestre de las demás islas, para determinar la verdadera prevalencia de las enfermedades transmitidas por hemoparásitos.

## REFERENCIAS

- Acton, Q. A. (2012). *Issues in Life Sciences: Bacteriology, Parasitology, and Virology: 2011 Edition*: ScholarlyEditions.
- Aguilera, W. T., Malaga, J., & Gibbs, J. P. (2015). Conservation: Giant tortoises hatch on Galapagos island. *Nature*, *517*(7534), 271. doi:10.1038/517271a
- Barba, J. (2009). Fiebre manchada de las Montañas Rocosas. *Rev Mex Patol Clin*, *56*, 193-208.
- Benítez, R. F., Revelo, J., Hidalgo, F. M., & Ecuatoriana, C. d. I. C. (1997). *Bibliografía científica ecuatoriana sobre las Islas Galápagos*: Casa de la Cultura Ecuatoriana "Benjamín Carrión", Centro Nacional de Documentos Científicos Ecuatorianos.
- Berenguer, J. G. (2007). *Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*: Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona.
- Blake, D. P., & Tomley, F. M. (2014). Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. *Trends Parasitol*, *30*(1), 12-19. doi:10.1016/j.pt.2013.10.003
- Brites-Neto, J., Duarte, K. M., & Martins, T. F. (2015). Tick-borne infections in human and animal population worldwide. *Vet World*, *8*(3), 301-315. doi:10.14202/vetworld.2015.301-315
- Cabello, R. R. (2007). *Microbiología y parasitología humana / Microbiology and Human Parasitology: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias / Etiological Basis of Infectious and Parasitic Diseases*: Médica Panamericana.
- Caccone, A., Gibbs, J. P., Ketmaier, V., Suatoni, E., & Powell, J. R. (1999). Origin and evolutionary relationships of giant Galapagos tortoises. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(23), 13223-13228.
- Cama, V., & Mathison, B. (2015). Infections by Intestinal *Coccidia* and *Giardia duodenalis*. *Elsevier Inc.*, 1-22. doi:10.1016/j.cll.2015.02.010
- Cook, C. A., Smit, N. J., & Davies, A. J. (2010). Hemoproteids (Apicomplexa: Haemoproteidae) from South African tortoises (Cryptodira: Testudinidae). *J Parasitol*, *96*(6), 1168-1172. doi:10.1645/GE-2527.1
- Couch, L., Stone, P. A., Duszynski, D. W., Snell, H. L., & Snell, H. M. (1996). A survey of the coccidian parasites of reptiles from islands of the Galapagos Archipelago: 1990-1994. *J Parasitol*, *82*(3), 432-437.
- Cruz-Reyes, A., & Camargo-Camargo, B. (2000). *Glosario de términos en Parasitología y Ciencias Afines*: Plaza y Valdes.
- Chapman, P. A., Owen, H., Flint, M., Traub, R. J., Cribb, T. H., & Mills, P. C. (2016). Molecular Characterization of *Coccidia* Associated with an Epizootic in Green Sea Turtles (*Chelonia mydas*) in South East Queensland, Australia. *PLoS One*, *11*(2), e0149962. doi:10.1371/journal.pone.0149962
- Divers, S. J., & Mader, D. R. (2005). *Reptile Medicine and Surgery*: Elsevier Health Sciences.
- Dogga, S. K., & Soldati-Favre, D. (2016). Biology of rhomboid proteases in infectious diseases. *Semin Cell Dev Biol*. doi:10.1016/j.semcdb.2016.08.020
- Duszynski, D. W., & Couch, L. (2013). *The Biology and Identification of the Coccidia (Apicomplexa) of Rabbits of the World*: Elsevier Science.

- Duszynski, D. W., & Morrow, J. J. (2014). *The Biology and Identification of the Coccidia (Apicomplexa) of Turtles of the World*: Elsevier Science.
- Edwards, D. L., Benavides, E., Garrick, R. C., Gibbs, J. P., Russello, M. A., Dion, K. B., . . . Caccone, A. (2013). The genetic legacy of Lonesome George survives: giant tortoises with Pinta Island ancestry identified in Galápagos. *Biological conservation*, *157*, 225-228.
- Ehlers, J., Ganzhorn, J. U., Silaghi, C., Kruger, A., Pothmann, D., Ratovonamana, R. Y., . . . Poppert, S. (2016). Tick (*Amblyomma chabaudi*) infestation of endemic tortoises in southwest Madagascar and investigation of tick-borne pathogens. *Ticks Tick Borne Dis*, *7*(2), 378-383. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.12.011
- Erster, O., Roth, A., Avni, Z., King, R., & Shkap, V. (2015). Molecular detection of *Rickettsia bellii* in *Amblyomma rotundatum* from imported red-footed tortoise (*Chelonoides carbonaria*). *Ticks Tick Borne Dis*, *6*(4), 473-477. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.03.015
- Escrig, A. J. (2003). *Manual de neurogenética*: Díaz de Santos.
- Forbes, B. A. (2009). *Diagnostico Microbiologico*: Médica Panamericana.
- Fournie, G., Goodman, S. J., Cruz, M., Cedeno, V., Velez, A., Patino, L., . . . Cunningham, A. A. (2015). Biogeography of Parasitic Nematode Communities in the Galapagos Giant Tortoise: Implications for Conservation Management. *PLoS One*, *10*(9), e0135684. doi:10.1371/journal.pone.0135684
- Fritts, T. (1984). Evolutionary divergence of giant tortoises in Galapagos. *Biological Journal of the Linnean Society*, *21*, 165-176.
- GalapagosConservationTrust. (2011). Galapagos giant tortoise Retrieved from <http://www.savegalapagos.org/galapagos/galapagos-giant-tortoise.shtml>
- García, V. (2004). *INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA (2a ed.)*: Euned.
- Garner, M. M., Gardiner, C. H., Wellehan, J. F., Johnson, A. J., McNamara, T., Linn, M., . . . Jacobson, E. R. (2006). Intranuclear coccidiosis in tortoises: nine cases. *Vet Pathol*, *43*(3), 311-320. doi:10.1354/vp.43-3-311
- Gibbons, P. M., & Steffes, Z. J. (2013). Emerging infectious diseases of chelonians. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, *16*(2), 303-317. doi:10.1016/j.cvex.2013.02.004
- Gillespie, S., & Hawkey, P. M. (2006). *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*: Wiley.
- Graczyk, T. K., Cranfield, M. R., Mann, J., & Strandberg, J. D. (1998). Intestinal *Cryptosporidium* sp. infection in the Egyptian tortoise, *Testudo kleinmanni*. *Int J Parasitol*, *28*(12), 1885-1888.
- Griffith, B., Scott, J. M., Carpenter, J. W., & Reed, C. (1989). Translocation as a species conservation tool: status and strategy. *Science*, *245*(4917), 477-480. doi:10.1126/science.245.4917.477
- Halla, U., Korbel, R., Mutschmann, F., & Rinder, M. (2014). Blood parasites in reptiles imported to Germany. *Parasitol Res*, *113*(12), 4587-4599. doi:10.1007/s00436-014-4149-5
- Heymann, D. L. (2005). *El control de las enfermedades transmisibles*: Organización Panamericana de la Salud.
- Hnida, J. A. (2015). A new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from Morafka's desert tortoise *Gopherus morafkai* (Testudines:

- Testudinidae). *Syst Parasitol*, 92(3), 219-222. doi:10.1007/s11230-015-9595-7
- Hudson, P. J., Dobson, A. P., & Newborn, D. (1998). Prevention of population cycles by parasite removal. *Science*, 282(5397), 2256-2258.
- Inacio, S. V., Gomes, J. F., Oliveira, B. C., Falcao, A. X., Suzuki, C. T., Dos Santos, B. M., . . . Bresciani, K. D. (2016). Validation of a new technique to detect *Cryptosporidium* spp. oocysts in bovine feces. *Prev Vet Med*, 134, 1-5. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.09.020
- Innis, C. J., Garner, M. M., Johnson, A. J., Wellehan, J. F., Tabaka, C., Marschang, R. E., . . . Jacobson, E. R. (2007). Antemortem diagnosis and characterization of nasal intranuclear coccidiosis in Sulawesi tortoises (*Indotestudo forsteni*). *J Vet Diagn Invest*, 19(6), 660-667.
- IUCN. (2012). IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Retrieved from [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)
- Javanbakht, H., Kvicerova, J., Dvorakova, N., Mikulicek, P., Sharifi, M., Kautman, M., . . . Siroky, P. (2015). Phylogeny, Diversity, Distribution, and Host Specificity of *Haemoproteus* spp. (Apicomplexa: Haemosporida: Haemoproteidae) of Palaearctic Tortoises. *J Eukaryot Microbiol*, 62(5), 670-678. doi:10.1111/jeu.12227
- Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/ Text and Color Atlas: Médica Panamericana*.
- Lainson, R., & Naiff, R. D. (1998). *Haemoproteus* (Apicomplexa: Haemoproteidae) of tortoises and turtles. *Proc Biol Sci*, 265(1400), 941-949. doi:10.1098/rspb.1998.0382
- Levine, N. D. (1988). *PROTOZOAN PHYLUM APICOMPLEXA*: CRC-Press.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*(63), e3998. doi:10.3791/3998
- Magaró, H., Uttaro, A., Serra, E., Ponce de Leon, P., Echenique, C., Nocito, I., . . . Indelman, P. (2000). TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO.
- Maia, J. P., Harris, D. J., Carranza, S., & Gomez-Diaz, E. (2014). A comparison of multiple methods for estimating parasitemia of hemogregarine hemoparasites (apicomplexa: adeleorina) and its application for studying infection in natural populations. *PLoS One*, 9(4), e95010. doi:10.1371/journal.pone.0095010
- Márquez, C., Wiedenfeld, D., Snell, H., Fritts, T., Flyway, M., MacFarland, C., . . . Naranjo, S. (2004). POPULATION STATUS OF GIANT LAND TORTOISES (*Geochelone* spp., *Chelonya*: Testudinae) FROM THE GALAPAGOS ISLANDS. *Ecologia Aplicada*, 3, 98-111.
- Matta, N., & Rodríguez, O. (2001). Hemoparásitos aviares. *Acta Biológica Colombiana*, 6.
- McAllister, C. T., Duszynski, D. W., & Roberts, D. T. (2014). A new coccidian (Apicomplexa: Eimeriidae) from Galapagos tortoise, *Chelonoidis* sp. (Testudines: Testudinidae), from the Dallas Zoo. *J Parasitol*, 100(1), 128-132. doi:10.1645/13-307.1
- McGuire, J. L., Miller, E. A., Norton, T. M., Raphael, B. L., Spratt, J. S., & Yabsley, M. J. (2013). Intestinal parasites of the gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*) from eight populations in Georgia. *Parasitol Res*, 112(12), 4205-4210. doi:10.1007/s00436-013-3612-z

- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2013). *Microbiología Médica + StudentConsult*: Elsevier Health Sciences Spain.
- Nagai, M., Yoshida, A., & Sato, N. (1998). Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR. *Biochem Mol Biol Int*, *44*(1), 157-163.
- Negróni, M. (2009). *Microbiología Estomatológica*: Ed. Médica Panamericana.
- Olivas, E. (2004). *Manual de practicas de Microbiología I y II y Parasitología*: Uacj.
- Orkun, O., & Guven, E. (2013). A new species of Haemoproteus from a tortoise (*Testudo graeca*) in Turkey, with remarks on molecular phylogenetic and morphological analysis. *J Parasitol*, *99*(1), 112-117. doi:10.1645/GE-3100.1
- Peirce, M. A., & Castleman, A. R. (1974). An intraerythrocytic parasite of the Moroccan tortoise. *J Wildl Dis*, *10*(2), 139-142.
- Pineda, S. A. B. (1985). *Prevalencia y determinación de endoparásitos en bovinos*: INIAP Archivo Historico.
- Poulakakis, N., Edwards, D. L., Chiari, Y., Garrick, R. C., Russello, M. A., Benavides, E., . . . Caccone, A. (2015). Description of a New Galapagos Giant Tortoise Species (*Chelonoidis*; Testudines: Testudinidae) from Cerro Fatal on Santa Cruz Island. *PLoS One*, *10*(10), e0138779. doi:10.1371/journal.pone.0138779
- Poulakakis, N., Russello, M., Geist, D., & Caccone, A. (2012). Unravelling the peculiarities of island life: vicariance, dispersal and the diversification of the extinct and extant giant Galapagos tortoises. *Mol Ecol*, *21*(1), 160-173. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05370.x
- Pritchard, P. C. H. (1996). *The Galápagos Tortoises: Nomenclatural and Survival Status*: Chelonian Research Foundation.
- Quintero-Vélez, J., Hidalgo, M., & Rodas, J. (2012). Rickettsiosis, una enfermedad letal emergente y re-emergente en Colombia. *Universitas Scientiarum*, *17*, 82-99.
- Ras-Norynska, M., & Sokol, R. (2015). Internal parasites of reptiles. *Ann Parasitol*, *61*(2), 115-117.
- Rataj, A. V., Lindtner-Knific, R., Vlahovic, K., Mavri, U., & Dovc, A. (2011). Parasites in pet reptiles. *Acta Vet Scand*, *53*, 33. doi:10.1186/1751-0147-53-33
- Rochelle, P. A., De Leon, R., & Atwill, E. R. (2001). *Evaluation of Genotyping Techniques for Cryptosporidium Parvum*: AWWA Research Foundation and the American Water Works Association.
- Romero, H. Q. (1999). *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*: Limusa.
- Rubio, I. (2008). Las tortugas gigantes de las Islas Galápagos. *REVISTA DE LA CONSEJERÍA DE EDUCACIÓN DEL REINO UNIDO E IRLANDA, NIPO: 651-08-010-4*.
- Ruiz, V. A., & Guillén, S. M. (2006). *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*: Editorial Médica Panamericana.
- Russello, M. A., Glaberman, S., Gibbs, J. P., Marquez, C., Powell, J. R., & Caccone, A. (2005). A cryptic taxon of Galapagos tortoise in conservation peril. *Biol Lett*, *1*(3), 287-290. doi:10.1098/rsbl.2005.0317

- Rychlik, W., Spencer, W. J., & Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res*, 18(21), 6409-6412.
- Saffo, M. B., McCoy, A. M., Rieken, C., & Slamovits, C. H. (2010). Nephromyces, a beneficial apicomplexan symbiont in marine animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(37), 16190-16195. doi:10.1073/pnas.1002335107
- SARRIÓN, M. C. S., PARDO, J. B. C., & CAPARRÓS, M. M. *Biología molecular y citogenética*: Paraninfo S.A., Editorial.
- Schmidt, & Roberts. (2000). Parasitología Filum Apicomplexa: Malaria y Piroplasms.
- Schmidt, V., Dyachenko, V., Aupperle, H., Pees, M., Krautwald-Junghanns, M. E., & Dauschies, A. (2008). Case report of systemic coccidiosis in a radiated tortoise (*Geochelone radiata*). *Parasitol Res*, 102(3), 431-436. doi:10.1007/s00436-007-0781-7
- Sheather, A. (1923). The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *Journal of Comparative Technology*, 36, 266-275.
- Siachoque, H. O. (2006). *Inmunología. Diagnóstico e interpretación de pruebas de laboratorio*: Universidad del Rosario.
- Soler, J., Martinez, A., Medina, D., & Solé, R. (2001). El ocaso de las Tortugas Gigantes. *ANIMALIA*, 130, 56-65.
- Suárez, L., & García, M. (1986). *Extinción de animales en el Ecuador: descripción de 60 especies amenazadas*: Fundación Natura.
- Telford, S. R. (2016). *Hemoparasites of the Reptilia: Color Atlas and Text*: CRC Press.
- Traversa, D., Iorio, R., Otranto, D., Modry, D., & Slapeta, J. (2008). Cryptosporidium from tortoises: Genetic characterisation, phylogeny and zoonotic implications. *Mol Cell Probes*, 22(2), 122-128. doi:10.1016/j.mcp.2007.11.001
- Tye, A., Snell, H. L., Peck, S. B., & Adersen, H. (2002). Outstanding terrestrial features of the Galapagos archipelago. In A Biodiversity vision for the Galapagos Islands. *Charles Darwin Foundation and World Wildlife Fund*.
- Wilke, H. (2010). *Tortugas terrestres*: Editorial Hispano Europea, S.A.
- Wolf, D., Vrhovec, M. G., Failing, K., Rossier, C., Hermosilla, C., & Pantchev, N. (2014). Diagnosis of gastrointestinal parasites in reptiles: comparison of two coprological methods. *Acta Vet Scand*, 56, 44. doi:10.1186/s13028-014-0044-4
- Yun, C. H., Lillehoj, H. S., & Lillehoj, E. P. (2000). Intestinal immune responses to coccidiosis. *Dev Comp Immunol*, 24(2-3), 303-324.