

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Ambientales y Biológicas.

**Detección Molecular de Helmintos (Cestodos y
Nematodos) en guano de murciélagos de Yasuní y Manabí**
Proyecto de Investigación

Carla Lizeth Torres Sobrevilla

Licenciatura en Biología

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Licenciatura en Biología

Quito, 23 de mayo de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO CIENCIAS AMBIENTALES Y BIOLÓGICAS

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Detección Molecular de Helmintos (Cestodos y
Nematodos) en guano de murciélagos de Yasuní y Manabí**

Carla Lizeth Torres Sobrevilla

Calificación:

Sonia Zapata Mena. Ph.D

Firma del profesor

Quito, 23 de mayo de 2019

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Carla Lizeth Torres Sobrevilla

Código: 00116530

Cédula de Identidad: 1721823795

Lugar y fecha: Quito, 23 mayo de 2019

RESUMEN

Los murciélagos son mamíferos pertenecientes al orden Quiróptera, cumplen un rol importante en los ecosistemas, siendo los principales dispersores de semillas, sin embargo, también pueden ser reservorios de virus, bacterias y parásitos. El objetivo de la presente investigación fue la detección molecular de helmintos (cestodos y nematodos) en 90 muestras de guano de diferentes gremios alimenticios de murciélagos en la estación de biodiversidad Tiputini y en 3 localidades de Manabí (Azuluna, Ayampe y Pto.Rico-Azuluna). Para esto, se amplificó dos regiones del gen mitocondrial Citocromo Oxigenasa 1(Cox1) para cestodos (127pb) y nematodos (145pb) y se secuenció en ambos sentidos. Se encontró la presencia del cestodo *Moniezia expansa* en todas las muestras de Manabí, no así en las muestras del Tiputini. Todas las muestras fueron negativas para nematodos. A nuestro conocimiento este es el primer estudio de helmintos en murciélagos, la presencia de *M. expansa* nos indica que estos mamíferos podrían ser portadores de helmintos y puede estar relacionado con la cercanía a animales de granja y domésticos, así como zonas con mayor influencia humana.

Palabras clave: murciélagos; gremio; COX1; cestodos; nematodos; *Moniezia expansa*

ABSTRACT

Bats are mammals, they have an important role in the ecosystem, but in some cases, they are reservoirs of virus, bacteria and parasites. The objective of this investigation was the molecular detection of helminths (cestodes and nematodes) in 90 fecal samples of different food guilds on two areas: Tiputini Biodiversity Station and Manabí (Azuluna, Ayampe y Pto. Rico-Azuluna). For this amplified two regions of mitochondrial gene cytochrome oxidase 1 (Cox 1) for cestodes (127pb) and nematodes (145pb) two-way sequencing. We are finding the cestode *Moniezia expansa* in all the samples of Manabí, but not in the samples of Tiputini. All the samples were negative for nematodes. For our knowledge this is the first study of helminths in bats, the present of *M. expansa* show us that this mammal could be helminths carriers and can be related with the closeness to farm and domestic animals, as well as areas with greater human influence.

Key words: Bats, guild, COX1, cestode, nematode, *Moniezia expansa*.

TABLA DE CONTENIDO

Tabla de contenido	6
Índice de tablas	7
Índice de figuras	8
1. Introducción.....	9
2. Objetivo.....	12
3. Metodología.....	13
4. Resultados.	16
5. Discusión	16
6. Conclusiones	19
7. Referencias bibliográficas	20
Anexo A: Tablas	22
Anexo B: Figuras.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Master Mix Beta-actina	22
Tabla 2. Programa termociclador Beta-actina	22
Tabla 3. Master Mix Cestodos	22
Tabla 4. Programa termociclador Cestodos	23
Tabla 5. Master Mix Nematodos	23
Tabla 6. Programa Termociclador Nematodos	23
Tabla 7. Muestras positivas para Cestodos en Manabí	24
Tabla 8. Muestras negativas para Nematodos en Manabí	24
Tabla 9. Muestras negativas para Cestodos y Nematodos en Yasuní	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético de <i>Moniezia expansa</i> en diferentes gremios de murciélagos en Manabí.....	28
---	----

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características generales de los murciélagos

A nivel mundial, más del 20% de mamíferos son murciélagos siendo su rol ecológico y muchas veces económico importante puesto que ayudan a dispersar semillas, en especial el gremio de los frugívoros y semilleros. Los murciélagos se encuentran en el orden Quiróptera, Cheip < Mano> y ptero <Ala>, por su capacidad de volar, son los mamíferos placentarios más evolucionados y se los ha dividido en dos grandes grupos Mega quirópteros y Micro quirópteros; entre los primeros se encuentran los murciélagos del viejo mundo, frugívoros o zorros voladores y existen alrededor de 167 especies. En el segundo grupo existen alrededor de 834 especies ubicadas en el Nuevo Mundo (Fenton, et al. 2016).

Tienen una amplia distribución mundial exceptuando los polos, se encuentran en mayor proporción en las regiones tropicales, especialmente en Centro y Norte de Sudamérica. Una de las características más notables que poseen son sus alas, las cuales son cinco dedos unidos por una membrana la cual les permite planear, esta membrana se denomina patagio y recubre las falanges de los dedos a excepción del pulgar, mientras que la membrana que cubre los miembros posteriores desde el tobillo hasta la cola en algunas especies se denomina Uropatagio (Tirira, et al. 2016).

Los murciélagos poseen diferentes tipos de dieta, de acuerdo a su clasificación encontramos a los frugívoros, aquellos que su dieta se basa en frutas, semilleros en semillas, carnívoros en carne (pequeños mamíferos u otros murciélagos), piscívoros de peces, vampiros de sangre (pequeños o grandes mamíferos, y aves) o insectívoros de insectos (Burneo, Proaño y Tirira, 2014). Viven en varios hábitats, en zonas tanto bajas como altas, son abundantes en bosques cálidos, al ser animales nocturnos descansan en el día en cuevas, cavernas, grutas, en rocas o troncos huecos de árboles u hojas. En Ecuador existen varios lugares con diversidad de

murciélagos y de características beneficiosas, tanto en la sierra, costa y Amazonía (Tirira, 2016).

1.2 Parasitosis en murciélagos

En varias ocasiones estos mamíferos han sido asociados con enfermedades o por ser portadores de varios virus, bacterias y parásitos, dentro de los últimos se encuentran el grupo de los helmintos, los cuales son organismos abundantes en la naturaleza. Estos se dividen en dos phylas diferentes Platyhelminthes (gusanos planos), que se subdividen en Cestodos y Trematodos y Nematelminthes (gusanos redondos) (Caspeta, et al. 2017).

Los Cestodos poseen un ciclo de vida que requiere de uno o más hospederos intermediarios para completar su ciclo, la gran mayoría de estos son hermafroditas y su cuerpo está estructurado por un escólex, cuello y estróbilo, siendo el último el resto del cuerpo que se forma por la unión de proglótides que forman una cadena, al romperse alguno de estos libera los huevos hacia el exterior, por otro lado el escólex es la parte por la cual el parásito logra adherirse a algún órgano en el hospedador definitivo (Caspeta et. al 2017).

Por otro lado, el phyla Nematoda se caracteriza por ser parásitos dioicos, es decir, poseen los sexos separados, su ciclo de vida puede ser indirecto como directo. En el estadio adulto infectan el tubo digestivo de vertebrados. Su cuerpo es cilíndrico y las hembras son de mayor tamaño que los machos, los huevos pueden variar en tamaño, forma y estructura y tienen desde células no segmentadas hasta larvas (Moravec, 1998).

1.3 Helmintos y murciélagos

Las investigaciones realizadas por Crespo et al. (2007) encuentran una gran relación entre los murciélagos y helmintos, tanto cestodos (*Vampirolepis elongatus*) como nematodos (*Linustrongylus pteronoti*, Molineidae spp y *Capillaria* spp), pertenecientes a diferentes géneros. Por otro lado, Caspeta et al. (2017) en su investigación realizada en la ciudad de

México mencionan que los murciélagos pueden intervenir como hospederos intermediarios, paratenicos y definitivos, de varias especies de helmintos.

Los parásitos que se encuentran en estos mamíferos han sido documentados hace más de 70 años en dicho país con la investigación de varios autores; la recopilación de estos reporta como cestodo a *Vampirolepis gertschi*, encontrado en el intestino de nueve especies de murciélagos como *Artibeus jamaicensis*, mientras se registró más de 60 especies de nematodos, dentro de las cuales tenemos a la familia Ornithostrongylidae con una especie, la familia Ritctularidae (dos especies), Seuratidae (una especie), Spiruridae (una especie), Trichuridae (seis especies); Acuariidae (una especie), Onchocercidae, Physalopteridae y Spirocercidae todas con una especie (Crespo, Montiel y Rubio, 2007).

Otro estudio realizado desde octubre del 2016 hasta marzo del 2017 en Brasil, donde se estudió tres especies de murciélagos (*Molossus molossus*, *Myotis lavalii*, *Nocilio albiventris*), se encontró el 96,29% de positividad para parásitos gastrointestinales en 54 muestras de heces analizadas, siendo uno de estos helmintos en su forma inmadura (huevos o larvas) (Santana, et al. 2018). El cestodo *Vampirolepis nana* es la especie reportada con mayor frecuencia en murciélagos especialmente en el área de Sur América, por otro lado, las especies reportadas de nemátodos fueron Ancylostomatidae, Ascaridae, Pharyngodonidae (*Thelandros* sp), Physalopteridae (*Physalopteridae* sp.), Strongyloididae (*Strongyloididae* sp.), Trichuridae (*Capillaria* sp.). La especie de murciélago *Molossus molossus* presentó una gran riqueza en parásitos gastrointestinales a diferencia de las otras dos especies analizadas (Santana, et al. 2018).

2. OBJETIVO

El objetivo de la presente investigación es la detección molecular de helmintos en varias especies de diferentes gremios alimenticios de murciélagos en dos áreas (Manabí y Tiputini) y tratar de entender el rol de estos parásitos en estas poblaciones murciélagos.

3. METODOLOGÍA

3.1 Colección de muestras

Se recolectó las muestras en las áreas de Manabí, en las localidades Ayampe, Azuluna y Puerto Rico-Azuluna y en el Yasuní. La captura de los murciélagos se realizó mediante el uso de redes de neblinas localizadas en varios puntos, siguiendo los protocolos de bienestar animal y técnicas de captura e identificación de murciélagos tomadas de Toms McConnell en su libro *Bats*.

Al capturar los murciélagos se realizó la toma de medidas morfológicas para la determinación de la especie; a la par se realizó la toma de muestras de heces mediante un hisopo y se lo guardó en el medio de transporte Virocult. Las muestras fueron transportadas en hielo y posteriormente se las guardó en un ultracongelador a -80°C en el Instituto de Microbiología. El mismo procedimiento se aplicó para las muestras recolectadas en Manabí. La colecta fue aprobada y se obtuvo los permisos de movilización del Ministerio del Ambiente.

Los controles positivos fueron obtenidos del Camal Metropolitano de Quito y del Hospital General Docente de Calderón.

3.2 Extracción de ADN

La extracción de controles positivos (*Taenia sp* y *Ascaris sp.*) se realizó con el kit PureLink, para esto se colocó 20mg de la muestra macerada con 180 μl de PureLink Genomic Digestion Buffer y 20 μl de Proteinasa K, se incubó a 55°C entre 5 y 30 minutos dependiendo de la muestra, hasta observar lisis completa, luego se centrifugó a 16.1 rfc por 3 minutos. Todas las centrifugaciones se realizaron a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se colocó 20 μl de RNasa A, se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 200 μl de PureLink Genomic Lysis / Binding buffer y se agitó con la ayuda de un vortex por 20 segundos, luego se colocó 200 μl de etanol absoluto y se agitó por 20 segundos.

Posteriormente, se tomó entre 640 y 700 μ l del preparado anterior y se colocó en la Spin Column, luego se centrifugó por 1 minuto a 1000 gr, se descartó el líquido y se colocó en otro tubo para proceder al lavado.

Se agregó 500 μ l de Wash buffer 1, se centrifugó a 16.1 rcfs por 1 minuto, se descartó el líquido y se colocó la columna en otro tubo limpio, se agregó Wash Buffer 2, se centrifugó por 3 minutos a 16.1 rcfs y se procedió a eluir el ADN con 80 μ l de PureLink Eluting Buffer, se incubó por 1 minuto luego se centrifugó por 1 minuto a 16.1 rcfs

La extracción de muestras de heces de murciélagos se hizo con el kit DNeasy PowerSoil, se agregó 0.25 gramos de la muestra en un tubo Power Bead, con 60 μ l de la solución C1, se mezcló a máxima revolución 10 minutos, se centrifugó a 10000 rcfs por 30 segundos. Se transfirió el sobrenadante (400-500 μ l) a un tubo limpio de 2ml y se agregó 250 μ l de solución C2, se incubó a 4°C por 5 minutos, posteriormente se centrifugó a 10.000 rcfs por 1 minuto. Se transfirió 750 μ l del sobrenadante a un tubo limpio de 2ml conjuntamente con 1200 μ l de solución C4, se agitó por 5 segundos.

Se cargó 675 μ l en un tubo MB Spin Column y centrifugó a 10.000 rcfs por 1 minuto, se descartó el líquido que quedo en el tubo, se repitió este paso hasta que se procesó toda la muestra. Posteriormente se agregó 500 μ l de solución C5, luego se centrifugó por 30 segundos a 10.000 rcfs, se descartó el líquido y se volvió a centrifugar por 1 minuto a 10.000 rcfs. Finalmente se pasó el MB Spin Column a un tubo nuevo de 2m, se agregó solución C6 de preferencia en el medio del filtro de la membrana, se centrifugó a 10.000 rcfs por 30 segundos, se eliminó la columna y se obtuvo el ADN.

Se prosiguió a cuantificar el ADN en el Nano View. Colocando 2 μ l de blanco (agua de PCR) para calibrar y posteriormente 2 μ l de la muestra.

3.3 Amplificación del gen de Beta-actina

Los primers que se usó para la amplificación de beta-actina fueron forward 5´ CGGAACCGCTCATTGCC 3´ y reverse 5´ ACCCACACTGTCCCATCT 3´ (Pom, et.al, 2017). Las condiciones de amplificación por reacción d 10 ul fueron: MgCl₂ (1.5mM) dNTP´s (0.12 mM) primers F y R (0.1mM) y Green Buffer (0.2X) y 0.025 U de taq polimerasa. El programa de termociclador fue para la desnaturalización 94°C a 2:00 minutos seguido por una temperatura 92°C a 0:50 minutos, 45°C a 0:50 minutos, 72°C a 0:50, se repitió el paso el 2 por 35 ciclos y finalmente 72°C por 2:00. (Tabla 1 y 2)

3.4 Amplificación Cestodos.

Los primers para cestodos fueron forward 5´ TGGGTTATTGTTTGCTATGTTTTTTCWA 3´ y reverse 5´ CCCCTATTATCATAGTAACMGAAGTAAA 3´ la banda amplifica para 127pb (Pon et., al, 2017). Las condiciones de amplificación por reacción de 10µl fueron: Green Buffer (1x) MgCl₂ (1 mM), dNTP´s (0.012mM) y primers F y R a (0.08mM) y 0.05 U de taq polimerasa. El programa de termociclador fue para la desnaturalización 95°C a 10:00 minutos seguido por una temperatura 95°C a 1:00 minutos, 57°C a 1:00 minutos, 72°C a 1:00, se repite el paso el 2 por 40 ciclos y finalmente 72°C por 10:00 (Tabla 3 y 4).

3.5 Amplificación Nematodos.

Los primers usados para cestodos fueron forward 5´ TGTCTTTACCWGTTTTTRGCTGG 3´ y reverse 5´ CCGAAAGCAGGYAAAATHARAA 3´, la banda amplifica a 143pb (Pon et.,al, 2017) las condiciones de amplificación por reacción para 10µl fueron: Green Buffer (1x), MgCl₂ (1.375 mM), dNTP´s (0.012mM), primers F y R (0.08Mm) y 0.05 U de taq polimerasa El programa de termociclador fue para la desnaturalización 95°C a 10:00 minutos seguido por una temperatura 95°C a 1:00 minutos, 57°C a 1:00 minutos, 72°C a 1:00, se repitió el paso el 2 por 35 ciclos y finalmente 72°C por 10:00 (Tabla 5 y 6).

3.6 Secuenciamiento

Todos los productos de PCR fueron enviados a Functional Biosciences (Madison, Wisconsin, USA) para secuenciamiento en ambos sentidos. Las secuencias fueron analizadas con los programas e Pregap4, Gap y MEGA 10.0. Se utilizó secuencias de *M. espanza* como referencia y *M. benedeni* como grupo hermano.

4. RESULTADOS.

Un total de 15 muestras de guano fueron recolectadas en virocult y procesadas de Pto. Rico-Azuluna, Azuluna y Ayampe de las cuales las especies identificadas mediante taxonomía fueron *Anoura caudifer*, *Artibeus fraterculus*, *Stunira lilium*, *Artibeus obscurus*, *Amorphocilus schnablii*, *Noctilio albiventris*. (Tabla 9).

4.1 Análisis molecular

Las 15 muestras de la localidad de Azuluna, Ayampe y Pto. Río Azuluna, el 100 % de muestras dieron positivas para el cestodo *Moniezia expansa*. (Tabla 7). Se realizó un árbol filogenético con las secuencias obtenidas y se agregó la secuencia *M.benedeni* como grupo hermano (Figura 1)

5. DISCUSIÓN

Los murciélagos son relacionados como reservorios de virus, bacterias y parásitos, varios estudios indican que poseen varias familias de nematodos y coinciden en una familia de cestodo, siendo *Vampyrolepis* spp, el más hallado en varios gremios alimenticios (Crespo, Montiel y Rubio, 2007). En este estudio se encontró *Moniezia expansa*, en murciélagos de varios gremios entre ellos insectívoros, frugívoros y nectarívoros de 2 localidades cercanas a Manabí. Este cestodo tiende a infectar a animales de granja, como vacas, ovejas y cabras, el parásito adulto se ubica en el intestino delgado de estos animales (Johnrose, et.,al, 2017).

El ciclo de vida de *Moniezia expansa* es indirecto donde el hospedador definitivo es un animal rumiante y en algunos casos monos que porta las formas adultas del parásito en el intestino delgado y elimina proglótides con huevos en las heces fecales y estos son ingeridos por ácaros coprófagos del orden Oribatida. que constituye el hospedero intermediario estos ácaros se adhieren al pasto o césped, el cual es ingerido por el hospedador definitivo y el ciclo continua (Stunkard, 1961).

Al encontrarse este cestodo en los ácaros que se encuentran en el suelo, pueden ser ingeridos por los murciélagos insectívoros. Mientras que, en los otros gremios, si bien son comedores de frutas o néctar, complementan su alimentación con otro tipo de alimento, pudiendo ser ácaros en este caso.

La cercanía de estos mamíferos a centros poblados, en los cuales exista animales domésticos o de granja, puede ser un detonante para la explicación del por qué se encuentran infectados, mientras que murciélagos del Yasuní no se obtuvo cestodo o nematodo alguno.

Moniezia expansa ha sido reportada en varios estudios en animales de granja, siendo las vacas y ovejas el hospedador definitivo más común, sin embargo, también se ha encontrado en animales de vida salvaje como es el caso del alce de Finlandia donde mediante análisis molecular se encontró este cestodo en 10 individuos, en este mismo estudio se investigó animales de granja (ovejas y vacas) donde se obtuvo más muestras positivas (40) (Haukisalmia, 2018).

Otro estudio realizado en ciervos en Hisar donde el 21.7% del total de 91 muestras dieron como positivas para *Moniezia expansa*, esta investigación se realizó en muestras fecales y se observó al microscopio mediante la técnica de flotabilidad (Gupta, 2018).

Estas investigaciones muestran que este parásito no solo se encuentra en animales domésticos sino también en algunos animales de vida salvaje como se encontró en esta investigación. Es importante la realización de estas investigaciones puesto que estos parásitos

pueden afectar los roles ecológicos de varias especies. Al igual para entender el rol que está cumpliendo este cestodo en los murciélagos pudiendo ser como parasitismo de tránsito o pueden afectar al individuo.

6. CONCLUSIONES

1. A nuestro conocimiento este es el primer reporte de *Moniezia expansa* en murciélagos *Anoura caudifer*, *Artibeus fraterculus*, *Stunira lilium*, *Artibeus obscurus*, *Amorphocilus schnablii*, *Noctilio albiventris* pertenecientes a diferentes gremios alimenticios
2. La cercanía a poblaciones humanas en las cuales existe animales de granja podría ser una de las causas por las cuales los murciélagos estén parasitados por este cestodo.
3. La visualización de huevos en guano o la obtención del parásito adulto de *M. expansa* descartaría un posible parasitismo de tránsito.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Burneo, S. F., Proaño, M. D., & Tirira, D. G. (2015). Plan de acción para la conservación de los murciélagos del Ecuador. Quito: Programa para la Conservación de los Murciélagos del Ecuador and Ministerio del Ambiente del Ecuador.
- Caspeta-Mandujano, J. M., Peralta-Rodríguez, J. L., Ramírez-Chávez, S. B., Ramírez-Díaz, S. E., Tapia-Osorio, M., & Juárez, U. M. G. (2017). Helminths parasites of bats in Mexico. *Journal of Parasitology*, 103(4), 338-342.
- Clarke-Crespo, E., de León, G. P. P., Montiel-Ortega, S., & Rubio-Godoy, M. (2017). Helminth fauna associated with three Neotropical bat species (Chiroptera: Mormoopidae) in Veracruz, México. *Journal of Parasitology*, 103(4), 338-342.
- Haukisalmi, V., Laaksonen, S., Oksanen, A., Beckmen, K., Halajian, A., Yanagida, T., & Nakao, M. (2018). Molecular taxonomy and subgeneric classification of tapeworms of the genus *Moniezia* Blanchard, 1891 (Cestoda, Anoplocephalidae) in northern cervids (*Alces* and *Rangifer*). *Parasitology international*, 67(2), 218-224.
- Johnrose, G., Rajan, S., & Raja, P. V. (2017). HISTOLOGICAL CRITERIA TO CLASSIFY DIFFERENT DEVELOPMENTAL PROGLOTTID STAGES OF A CESTODE, *MONIEZIA EXPANSA* RUDOLPHI, 1810, DURING GROWTH AND DIFFERENTIATION. *BIOJOURNAL*.
- Moravec, F. (1982). Proposal of a New Systematic Arrangement of Nematodes of the Family Capillariidae. *Folia Parasitologica*, 29, 119-132.
- Poon, R. W., Tam, E. W., Lau, S. K., Cheng, V. C., Yuen, K. Y., Schuster, R. K., & Woo, P. C. (2017). Molecular identification of cestodes and nematodes by *cox1* gene real-time PCR and sequencing. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 89(3), 185-190.

- Rojas, D., Warsi, O. M., & Dávalos, L. M. (2016). Bats (Chiroptera: Noctilionoidea) challenge a recent origin of extant neotropical diversity. *Systematic Biology*, 65(3), 432-448.
- Santana, V. F. L., Rocha, P. A., Silva, M. A. D., Beltrão-Mendes, R., Ramos, R. A. N., Giannelli, A., ... & Alves, L. C. (2018). Survey on helminths and protozoa of free-living Neotropical bats from Northeastern Brazil. *Acta tropica*, 185, 267-272
- Snehil, G., Sukhdeep, V., Sangwan, A. K., Satyavir, S., & Gupta, S. K. (2018). A preliminary study of gastrointestinal parasites in wild animals at Hisar (Haryana). *Haryana Veterinarian*, 57(1), 70-72
- Stunkard, H. W. (1961). *Cyclospkrjabinia taborensis* (Loewen, 1934), a cestode from the red bat, *Lasiurus borealis* (Müller, 1776), and a review of the Family Anoplocephalidae. *The Journal of parasitology*, 847-856. Poon, R, Tam, E., Lau, S., Cheng, V., Yuen, K.,
- Tirira, D. G., Burneo, S. F., Boada, C. E., & Lobos, S. E. (2016). Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae, *Lonchophylla hesperia* GM Allen, 1908: Second record of the western nectar bat in Ecuador after 70 years. *Check list*, 7(3), 315-318.

ANEXO A: TABLAS

Tabla 1. Master Mix Beta-actina

Reactivo	Concentración	Cantidad	Concentración final
H ₂ O	-	3.45	-
Buffer	5x	2	1x
MgCl ₂	25Mm	0.6	1.5Mm
dNTPs	2 mM	1	0.2mM
F	1mM	1	0.1mM
R	1mM	1	0.1mM
Taq	0.2 U	0.05	1x10 ⁻³ u

Tabla 2. Programa termociclador Beta-actina

	1	2	3	4	5	6	7
Temperatura	94°C	92°C	45°C	72°C	GO TO STEP 2	72°C	12°C
Tiempo	2:00	0:50	0:50	0:50	35X	2:00	∞

Tabla 3. Master Mix Cestodos

Reactivo	Concentración	Cantidad	Concentración
H ₂ O	-	4.08	
Buffer	5x	2	1X
MgCl ₂	25mM	0.4	1mM

dNTPs	2 mM	0.6	0.12mM
F	1uM	0.8	0.08Mm
R	1uM	0.8	0.08Mm
Taq	0.2 U	0.05	$1 \times 10^{-3}u$

Tabla 4. Programa termociclador Cestodos

	1	2	3	4	5	6	7
Temperatura	95°C	95°C	57°C	72°C	GO TO STEP 2	72°C	12°C
Tiempo	10:00	1:00	1:00	1:00	40X	10:00	∞

Tabla 5. Master Mix Nematodos

Reactivo	Concentración	Cantidad	Concentración final
H ₂ O	-	4.08	-
Buffer	5x	2	1X
MgCl ₂	25mM	0.55	1.4mM
dNTPs	2 mM	0.6	0.12mM
F	1uM	0.8	0.08Mm
R	1uM	0.8	0.08mM
Taq	0.2 U	0.05	$1 \times 10^{-3}u$

Tabla 6. Programa Termociclador Nematodos

	1	2	3	4	5	6	7
Temperatura	95°C	95°C	57°C	72°C	GO TO STEP 2	72°C	12°C
Tiempo	10:00	1:00	1:00	1:00	35X	10:00	∞

Tabla 7. Muestras positivas para Cestodos en Manabí

Gremio	Especie Murciélago	Lugar de recolección
Nectarívoro	<i>Anoura caudifer</i>	Pto. Rico- Azuluna
Frugívoro	<i>Artibeus fraterculus</i>	Pto. Rico- Azuluna
Frugívoro	<i>Sturnira lilium</i>	Pto. Rico- Azuluna
Insectívoro	<i>Amorphochilus schnablii</i>	Pto. Rico- Azuluna
Frugívoro	<i>Stunira spp</i>	Pto. Rico- Azuluna
Frugívoro	<i>Artibeus fraterculus</i>	Pto. Rico- Azuluna
Frugívoro	<i>artibeus obscurus</i>	Ayampe
Frugívoro	<i>Artibeus fraterculus</i>	Azuluna
Frugívoro	<i>Artibeus fraterculus</i>	Azuluna
Insectívoro	<i>Amorphochilus schnablii</i>	Azuluna
Insectívoro	<i>Amorphochilus schnablii</i>	Azuluna
Insectívoro	<i>Amorphochilus schnablii</i>	Azuluna
Frugívoro	<i>Artibeus fraterculus</i>	Azuluna
Frugívoro	<i>Artibeus fraterculus</i>	Azuluna
Insectívoro	<i>Amorphochilus schnablii</i>	Azuluna

Tabla 8 Muestras negativas para Nematodos en Manabí

Gremio	Especie Murciélago	Lugar de recolección
Nectarívoro	<i>Anoura caudifer</i>	Pto. Rico- Azuluna
Frugívoro	<i>Artibeus fraterculus</i>	Pto. Rico- Azuluna
Frugívoro	<i>Sturnira lilium</i>	Pto. Rico- Azuluna
Insectívoro	<i>Amorphochilus schnablii</i>	Pto. Rico- Azuluna
Frugívoro	<i>Stunira spp</i>	Pto. Rico- Azuluna
Frugívoro	<i>Artibeus fraterculus</i>	Pto. Rico- Azuluna
Frugívoro	<i>artibeus obscurus</i>	Aampe
Frugívoro	<i>Artibeus fraterculus</i>	Azuluna
Frugívoro	<i>Artibeus fraterculus</i>	Azuluna
Insectívoro	<i>Amorphochilus schnablii</i>	Azuluna
Insectívoro	<i>Amorphochilus schnablii</i>	Azuluna

Frugívoro	<i>Vampyressa videns</i>	Dosel campamento
Pescador	<i>Noctilio albiventris</i>	Yasuní 2 Río
Pescador	<i>Noctilio albiventris</i>	Yasuní 2 Río
Pescador	<i>Noctilio albiventris</i>	Yasuní 2 Río
Pescador	<i>Noctilio albiventris</i>	Yasuní 2 Río
Pescador	<i>Noctilio albiventris</i>	Yasuní 2 Río
Pescador	<i>Noctilio albiventris</i>	Yasuní 2 Río
Pescador	<i>Noctilio albiventris</i>	Yasuní 2 Río
Pescador	<i>Noctilio albiventris</i>	Yasuní 2 Río
Pescador	<i>Noctilio albiventris</i>	Yasuní 2 Río
Pescador	<i>Noctilio albiventris</i>	Yasuní 2 Río
Pescador	<i>Noctilio albiventris</i>	Yasuní 2 Río
Pescador	<i>Noctilio albiventris</i>	Yasuní 2 Río
Pescador	<i>Noctilio albiventris</i>	Yasuní 2 Río
Frugívoro	<i>Arthibeus obscurus</i>	Yasuní 2 Río
Frugívoro	<i>Sturnira lilium</i>	Yasuní 2 Río
Frugívoro	<i>Chiroderma trinitatum</i>	Yasuní 2 Río
Frugívoro	<i>Sturnira tildae</i>	Yasuní 2 Río
Frugívoro	<i>Sturnira tildae</i>	Yasuní 2 Río
Frugívoro	<i>Gardnerdnicterys crenulatum</i>	Yasuní 2 Río
Frugívoro	<i>Sturnira lilium</i>	Yasuní 2 Río
Frugívoro	<i>Sturnira lilium</i>	Yasuní 2 Río
Frugívoro	<i>Sturnira magna</i>	Yasuní 2 Río
Frugívoro	<i>Sturnira lilium</i>	Yasuní 2 Río
Frugívoro	<i>Sturnira lilium</i>	Yasuní 2 Río
Vampiro de aves	<i>Diphylla ecaudata</i>	Yasuní 1
Vampiro de aves	<i>Diphylla ecaudata</i>	Yasuní 1
Vampiro de aves	<i>Diphylla ecaudata</i>	Yasuní 1
Vampiro de aves	<i>Diphylla ecaudata</i>	Yasuní 1
Vampiro de aves	<i>Diphylla ecaudata</i>	Yasuní 1
Vampiro de aves	<i>Diphylla ecaudata</i>	Yasuní 1
Vampiro de aves	<i>Diphylla ecaudata</i>	Yasuní 1
Vampiro de aves	<i>Diphylla ecaudata</i>	Yasuní 1
Vampiro de aves	<i>Diphylla ecaudata</i>	Yasuní 1
Insectívoro	<i>Gardnerdnicterys crenulatum</i>	Guacamayo 200
Insectívoro	<i>Gardnerdnicterys crenulatum</i>	Guacamayo 200
Frugívoro	<i>Chiroderma trinitatum</i>	Sendero Harpía
Frugívoro/ Semillero	<i>Rhinophylla pumilio</i>	Guacamayo 700
Frugívoro/ Semillero	<i>Carollia brevicauda</i>	Guacamayo 700
Insectívoro	<i>Phyllostomus astatus</i>	Torres 1

Insectívoro	<i>Phyllostomus astatus</i>	Torres 1
Frugívoro/ Semillero	<i>Carollia brevicauda</i>	Torres 1
Frugívoro/ Semillero	<i>Artibeus spp</i>	Saladero Harpía
Frugívoro	<i>Artibeus spp</i>	Saladero Harpía
Frugívoro	<i>Artibeus spp</i>	Saladero Harpía
Frugívoro	<i>Artibeus spp</i>	Saladero Harpía
Frugívoro	<i>Artibeus spp</i>	Saladero Harpía

ANEXO B: FIGURAS

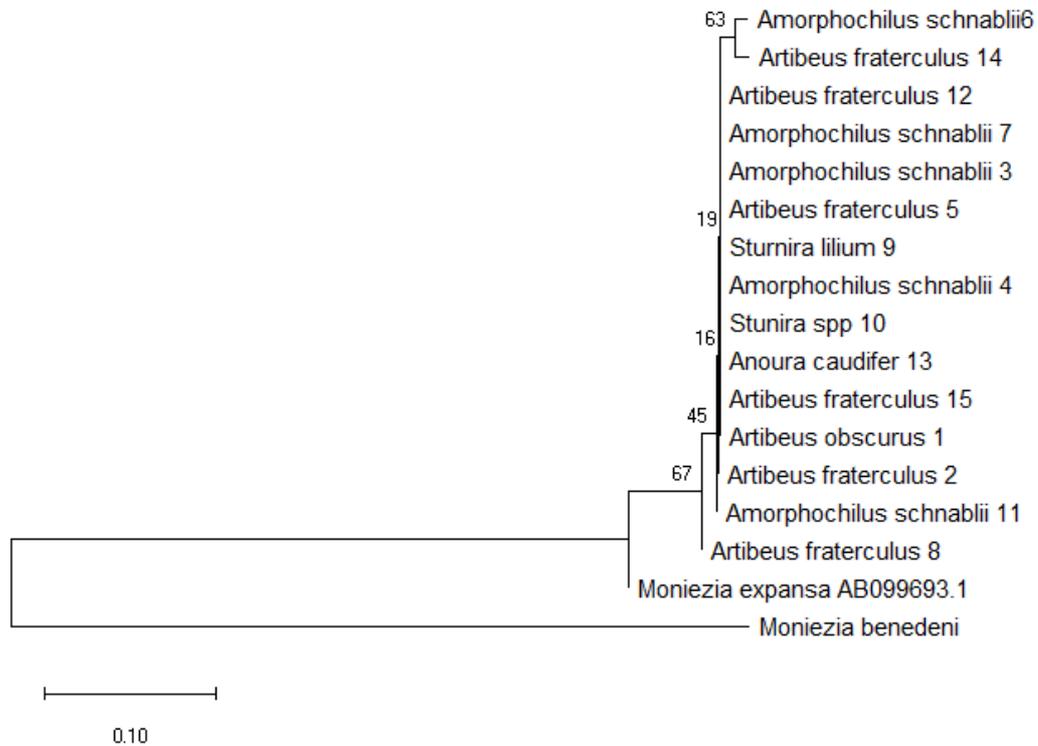


Figura 1. Árbol filogenético de *Moniezia expansa* en diferentes gremios de murciélagos en Manabí. Este árbol muestra la relación evolutiva que tiene una secuencia de *Moniezia expansa* (obtenida del GenBank) con las secuencias obtenidas de las diferentes especies de murciélagos. Observando que existe una estrecha relación a diferencia de *Moniezia benedeni* un grupo hermano.