

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Detección Molecular de Parásitos Intestinales del Filo  
Apicomplexa en Murciélagos de Dos Zonas del Ecuador  
(Manta y Estación de Biodiversidad Tiputini)**

**Proyecto de Investigación**

**María Begoña Zumárraga Rivera**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de titulación presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 22 de mayo de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Detección Molecular de Parásitos Intestinales del Filo Apicomplexa en  
Murciélagos de Dos Zonas del Ecuador (Manta y Estación de  
Biodiversidad Tiputini)**

**María Begoña Zumárraga Rivera**

Calificación:

Sonia Zapata Mena, Ph.D  
Director de Proyecto de Titulación

---

Quito, 22 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:

María Begoña Zumárraga Rivera

Código:

00107067

Cédula de Identidad:

1714599162

Lugar y fecha:

Quito, 22 de mayo de 2019

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por guiarme cada día en mi camino y darme la fortaleza para siempre seguir adelante.

A mis padres por su apoyo incondicional en cada decisión de mi vida y por sus enseñanzas, valores y amor a lo largo de toda mi vida.

A mis hijos, Sara y José María, por ser mi mayor motivación y fuerza para continuar luchando por lo que quiero cada día y a quienes debo toda mi felicidad.

A mi esposo, Sebastián, por todo su apoyo y amor en cada momento de mi carrera y mi vida.

A Sonia Zapata, directora de mi trabajo de titulación, por su paciencia, tiempo, recursos y conocimientos impartidos a lo largo del desarrollo de mi investigación.

Al Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito por permitir el uso de sus instalaciones, equipos y otros recursos para el desarrollo de mi proyecto.

A Ma. de Lourdes Torres, por su guía, apoyo, enseñanza y formación a lo largo de toda la carrera de biotecnología.

A Gabriel Trueba, Paúl Cárdenas y Juan Mosquera, miembros de mi comité de tesis, por su tiempo, por escucharme y por las enseñanzas impartidas.

## RESUMEN

Los murciélagos son reconocidos como potenciales reservorios naturales y vectores de patógenos de importancia médica y veterinaria (virus, bacterias, parásitos y hongos). Los murciélagos están directamente involucrados con la epidemiología de muchas enfermedades que afectan la salud humana y de animales domésticos. Los estudios en endoparásitos del orden Chiroptera están muy limitados a nivel mundial, sobre todo aquellos relacionados con protozoos intestinales. El presente estudio tiene como objetivo estudiar la diversidad de parásitos en murciélagos de dos zonas (costa y oriente) del Ecuador. Para ello se realizó una recolección de muestras de heces de murciélagos pertenecientes a distintas especies y gremios en zonas cercanas a la Ciudad de Manta (Azuluna y Ayampe) en la costa ecuatoriana y en la Estación de Biodiversidad Tiputini USFQ en el oriente ecuatoriano, desde agosto de 2017 hasta julio de 2018. Se colectaron un total de 60 muestras, 15 pertenecientes a la región costa y 45 pertenecientes a la región oriente. Se realizó un análisis molecular mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para una región del gen 18S ARNr del Filo Apicomplexa en las muestras de heces recolectadas. El estudio arrojó un porcentaje de positividad del 2% habiéndose detectado la presencia de *Eimeria spp.*, y *Hepatozoon spp.* El primero fue detectado únicamente en murciélagos de la región costa y el segundo en murciélagos del oriente. Estos hallazgos sugieren que en los murciélagos que viven en zonas mayormente urbanizadas o semi – urbanizadas, existe una mayor prevalencia de parásitos patógenos para seres humanos o animales domésticos. Igualmente se ha logrado conocer acerca de la fauna parasítica de estos murciélagos en el Ecuador.

Palabras clave: Murciélagos, parásitos (apicomplexa), zoonosis, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), 18S ARNr, secuenciamiento.

## ABSTRACT

Bats are known as potential natural reservoirs and vectors of pathogens of medical and veterinary importance (virus, bacteria, protozoa and fungi). Bats are directly involved in the epidemiology of many diseases that affect human and domestic animals health. Chiropteran endoparasites studies are very few and limited, especially those related with intestinal protozoa. The objective of this study is to study the diversity of parasites in bats of two different regions in Ecuador (coast and amazon). For this purpose, a total of 60 faecal samples of different bat species and guilds have been collected in zones near Manta city in the coastal region (Azuluna y Ayampe) and Tiputini Biodiversity Station USFQ in the amazon region between august 2017 and july 2018. Fifteen of the 60 faecal samples were collected in the coastal region and 45 in the amazon region. A molecular analysis by polymerase chain reaction (PCR) for the detection of 18S rDNA region for parasites of the phylum Apicomplexa was performed in the faecal samples previously collected. The positivity percentage was around 2%. Some apicomplexan parasites as *Eimeria spp.* and *Hepatozoon spp.* have been detected. The first one was just detected in bats of the coastal region. The second one was detected in bats of the amazon region. These findings suggest that in bats that live in urban and semi-urban zones, the prevalence of pathogenic and zoonotic parasites for humans and domestic animals is higher. This study also allows us to know more about the diversity of parasites in different species of bats that inhabit in Ecuador.

Key words: Bats, parasites (apicomplexa), zoonosis, PCR (polymerase chain reaction), 18S rDNA, sequencing, molecular analysis.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
1.1. Los Murciélagos.....	11
1.2. Parásitos en murciélagos.....	12
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>3. ÁREA DE ESTUDIO.....</b>	<b>18</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
4.1. Objetivo general.....	19
4.2. Objetivos específicos.....	19
<b>5. MATERIALES.....</b>	<b>19</b>
5.1. Recolección de muestras.....	19
5.2. Extracción de ADN.....	19
5.3. Cuantificación deADN.....	19
5.4. Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) del gen de la $\beta$ - actina.....	21
5.5. Amplificación por PCR de una región del gen 18S rRNA.....	21
5.6. Análisis molecular.....	22
<b>6. MÉTODOLÓGÍA.....</b>	<b>22</b>
6.1. Recolección de muestras.....	23
6.2. Extracción de ADN.....	23
6.3. Cuantificación de ADN.....	23
6.4. Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) del gen de la $\beta$ - actina.....	24
6.5. Amplificación por PCR de una región del gen 18S rRNA.....	25
6.6. Análisis molecular.....	27
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
7.1. Recolección de muestras.....	27
7.2. Cuantificación de ADN.....	29
7.3. Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) del gen de la $\beta$ - actina.....	30
7.4. Amplificación por PCR de una región del gen 18S rRNA.....	31
7.5. Análisis molecular.....	31
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>34</b>
<b>9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>53</b>

<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>59</b>
11.1. Protocolo de Extracción de ADN – Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc.).....	59
11.2. Imágenes de Electroforesis en Gel de Agarosa al 1.5% de los resultados obtenidos.....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla No. 1:</b> Especificaciones y datos de las muestras de heces de murciélago recolectadas.....	27
<b>Tabla No.2:</b> Resultados obtenidos del secuenciamiento de las muestras positivas para la amplificación por PCR de una región del gen 18S del ARN ribosomal para parásitos intestinales del Filo Apicomplexa.....	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura No. 1:</b> Árbol filogenético que muestra la relación entre las secuencias obtenidas mediante el análisis molecular realizado y las secuencias del GenBank de cada uno de los microorganismos identificados.....	33
--	----

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Los murciélagos

Con 18 familias y más de 1300 especies, el orden Chiroptera es el segundo grupo de mamíferos más diverso alrededor del mundo. Es por ello, que no es sorprendente que los murciélagos representen alrededor del 50% de la fauna en la región Neotropical (Santana-Lima et al, 2018). Los murciélagos viven comúnmente en grandes colonias y pueden volar largas distancias durante las migraciones estacionales. La diversidad biológica y ecológica de estos mamíferos, su variado y peculiar comportamiento alimenticio, su elevada esperanza de vida y el incremento en las interacciones que estos animales sostienen con los seres humanos y animales domésticos, hace de los murciélagos, potenciales reservorios y vectores de virus, bacterias, parásitos y hongos que pueden ser transmitidos al ser humano (Kvác et al, 2015). Estas características de los murciélagos, despiertan además, un enorme interés en la comunidad científica para la realización de investigaciones en diversos campos, incluyendo aquellos relacionados con los parásitos que infectan a estos animales y las interacciones parásito-hospedador (Santana-Lima et al, 2018). Los murciélagos se consideran importantes esparcidores de patógenos debido a que habitan en diferentes tipos de ambientes como cuevas, barrancos, nichos y edificaciones humanas. Se mueven de zonas selváticas hacia zonas más urbanizadas de forma frecuente en busca de alimento, y comparten abrigo con otras especies de murciélagos y animales (Santana- Lima et al, 2018). Algunas especies de murciélagos presentan una enorme afinidad por establecer sus colonias y vivir en proximidades urbanas. Este tipo de comportamientos facilita la dispersión y transmisión zoonótica de parásitos a las poblaciones humanas y de animales domésticos (Dodd et al, 2014). Debido a la habilidad de los murciélagos de mantener una vida social activa y de interactuar entre ellos, además de la capacidad de volar, contribuyen al mantenimiento, evolución y dispersión de patógenos (Wang

et al, 2013). Los murciélagos son animales importantes para la salud pública de muchos lugares alrededor del mundo debido a la diferencia de hábitats en los que viven, su elevada movilidad y migración y su comportamiento interactivo con los seres humanos y animales domésticos. Los murciélagos están directamente involucrados con la epidemiología de muchas enfermedades que afectan la salud humana y de animales domésticos (Cabral et al, 2013). Debido a la relevancia en el rol ecológico que cumplen los murciélagos, el número de estudios realizados en patógenos transmitidos por murciélagos ha incrementado, pero la información acerca de los parásitos gastrointestinales todavía es muy limitada (Santana-Lima et al, 2018).

## **1.2. Parásitos en murciélagos**

Los estudios en endoparásitos del orden Chiroptera están muy limitados a nivel mundial, lo que probablemente significa que la diversidad de parásitos en los murciélagos está muy subestimada (Falconaro et al, 2018). En algunos países de Latinoamérica, la mayoría de los estudios realizados en cuanto al parasitismo en los murciélagos, están basados en ectoparásitos; mientras que los estudios en endoparásitos son prácticamente inexistentes (Muñoz et al, 2011). El rol de los murciélagos en la transmisión de endoparásitos de importancia médica permanece sin ser estudiada en profundidad. En los últimos años se han realizado algunos estudios esperando poder describir la fauna de ecto y endo-parásitos en murciélagos. Este grupo de microorganismos es amplio e incluye algunos grupos de helmintos (céstodos, nemátodos y trematodos). Por otro lado, los datos de los protozoos intestinales que parasitan a los murciélagos no se conocen mucho. Sin embargo, algunas especies de coccidios y gregarinos (Criptosporidiidae y Eimeriidae) se han descrito en algunas especies del orden Chiroptera (Santana-Lima et al, 2018). En un estudio realizado en el Brasil, la fauna parasítica en los murciélagos resultó bastante diversa. Se encontraron parásitos como *Anchylostoma spp.*, *Eimeria spp.*, *Giardia spp.*, *Vampirolepsis spp.* y *Cryptosporidium spp.* (Santana-Lima et al,

2018). En las Filipinas, se realizó otro estudio en donde se determinó la prevalencia de *Eimeria spp.* y *Cryptosporidium spp.*, en los murciélagos de dicho territorio. De las 45 muestras analizadas 7 fueron positivas para *Eimeria spp.* y 4 para *Cryptosporidium spp.* (Murakoshi et al, 2017). En territorio británico, se realizó un estudio para determinar la prevalencia de *Toxoplasma gondii* en diversas especies de murciélagos cercanos a zonas urbanas (Dodd et al, 2014). En el 2013, Wang y colaboradores, realizaron una caracterización molecular de las diversas especies de *Cryptosporidium* que se podían encontrar en los murciélagos de provincia de Yunnan, en el Sudoeste de China. El estudio fue un éxito puesto que lograron genotipificar diversas especies de *Cryptosporidium* asociadas a diversas especies de murciélagos habitantes de la zona en estudio (Wang et al, 2013). En la República Checa y USA se realizó un estudio cuyo propósito fue la determinación de los genotipos de *Cryptosporidium spp.* existentes en los murciélagos de las zonas urbanas de algunas regiones de dichos países (Kvác et al, 2015). Como se puede observar, muchos estudios giran alrededor de determinar la diversidad de protozoos apicomplejos como parásitos gastrointestinales de los murciélagos. Uno de los principales motivos para esto es que se conoce muy poco acerca de los coccidios que parasitan a los murciélagos. Los estudios de parasitismo en estos mamíferos han descubierto parásitos de otros filos y órdenes que no son precisamente apicomplejos y coccidios. Endoparásitos pertenecientes al filo de los helmintos han sido los mayormente estudiados en estos mamíferos (Muñoz et al, 2011). Existen estudios que únicamente describen la fauna de parásitos eimerinos en murciélagos de diversas partes del mundo. En Bolivia, se realizó un estudio tratando de describir la diversidad de especies de eimerinos presentes en los murciélagos de la zona. En este estudio se había planteado que la ocurrencia de infecciones causadas por eimerinos en murciélagos tenía que ser menor a la de otros órdenes de mamíferos en base a los datos obtenidos de un estudio realizado por Scott y Duszynski (1997). Sin embargo, luego se planteó que, a medida que existen una mayor cantidad de estudios basados en examinar el parasitismo

causado por coccidios en murciélagos, se puede deducir que probablemente el porcentaje de ocurrencia de infecciones causadas por eimerinos en estos murciélagos registrada en estudios antiguos, puede deberse a una previa carencia de investigación en esta área. Se examinaron entonces 71 murciélagos bolivianos de diferentes especies y gremios, de los cuales, 3 presentaron ooquistes de parásitos eimerinos (Duszynski et al, 1999). Se conoce, gracias a un estudio realizado en el 2002 por Duszynski, que existen más de 31 especies de eimerinos que parasitan a murciélagos. Se sugiere en el mismo estudio, que hay alrededor de por lo menos 1 800 especies de coccidios por descubrir en las 925 especies de murciélagos existentes (McAllister y Upton, 2009). En un estudio realizado en diversos estados de los Estados Unidos de Norteamérica, McAllister y colaboradores (2001, 2004) describieron diversas especies de *Eimeria* en los murciélagos que habitaban en las áreas estudiadas (McAllister y Upton, 2009). Otros parásitos del filo Apicomplexa han sido detectados en murciélagos. El género *Hepatozoon* comprende parásitos sanguíneos apicomplejos que infectan a un amplio rango de hospedadores vertebrados, incluyendo mamíferos, marsupiales, aves, reptiles y anfibios. Todas las especies de este género tienen un ciclo de vida heteroxeno, que involucra la infección simultánea de uno o más hospedadores vertebrados intermediarios y la infección de un hospedador invertebrado definitivo donde los parásitos alcanzan su madurez sexual. El desarrollo merogónico tiene lugar en diversos órganos y tejidos del hospedador intermediario (Hodžić et al, 2018). Después del desarrollo merogónico se forman gamontes. Los gamontes son ingeridos por hospedadores definitivos invertebrados hematófagos (ácaros, mosquitos, garrapatas y moscas) durante un periodo de alimentación (Hodžić et al, 2018). La reproducción sexual y esporogonia se da entonces en el lumen intestinal de estos hospedadores para producir esporozoitos infectivos que se desarrollan en ooquistes maduros. Normalmente todas las especies de *Hepatozoon* comparten el mismo patrón de transmisión, con los animales vertebrados infectándose mediante la ingestión del hospedador definitivo que contiene los

ooquistes esporulados. Sin embargo, rutas de transmisión no vectoriales como transmisión transplacentaria o por depredación, han sido descritas en diversas especies de *Hepatozoon* (Hodžić et al, 2018). Diversas especies de *Hepatozoon* han sido recuperadas de muchos grupos taxonómicos de tetrápodos, y dentro de la clase de los mamíferos hay registros de especies de este parásito que parasitan a miembros de los siguientes órdenes: Rodentia, Carnivora, Lagomorpha, entre otras (Pinto et al, 2013). Existen muy pocos estudios en donde se hayan detectado parásitos de este género en murciélagos. Un estudio realizado en 2013 por Pinto y colaboradores, demuestra por primera vez la presencia de este parásito en murciélagos. No solamente se ha registrado la presencia de parásitos en murciélagos, si no que, debido a todas las características que tiene el grupo de los murciélagos y que han sido mencionadas anteriormente, son hospedadores y transmisores de algunas especies de hongos. Un estudio realizado en Brasil determina la presencia de un hongo patógeno, *Histoplasma capsulatum*, en murciélagos cercanos a las áreas urbanas en la ciudad de Sao Paulo (Galvao-Dias et al, 2010). Existen estudios que determinan la mycota asociada a murciélagos a pesar de que hay muy pocos de ellos. Estos estudios se basan en identificar la presencia de hongos potencialmente patógenos para los seres humanos o para otros animales salvajes. Investigaciones han determinado la existencia de hongos como *Cladosporium spp.*, *Fusarium spp.*, *Geomyces spp.*, *Mucor spp.*, *Penicillium spp.*, y *Candida spp.* (Vandelwolf et al, 2013).

La investigación de la parasitología en murciélagos, tiene para muchos como objetivo, además de determinar la diversidad de parásitos que utilizan a los murciélagos como hospedadores, analizar el potencial que tienen los murciélagos como hospedadores de microorganismos patógenos y cómo están involucrados en su transmisión y dispersión (zoonosis). La incidencia de las Enfermedades Infecciosas Emergentes (EIDs) ha incrementado de manera dramática en los últimos años. La mayoría de EIDs son enfermedades zoonóticas y gran parte de ellas originadas en animales de vida salvaje (Gay et al, 2014). Los grandes

eventos de EIDs se dan por cambios o alteraciones en el medio ambiente, incluyendo la intensificación de prácticas agrícolas y modificaciones de hábitat, e incremento en viajes e intercambios globales (Gay et al, 2014). Diversos estudios sugieren que el peligro de transmisión de enfermedades zoonóticas provenientes de la vida salvaje hacia los seres humanos incrementará con la pérdida de la biodiversidad y la expansión de las poblaciones humanas, a medida que dichas poblaciones entren en contacto con una enorme cantidad de patógenos zoonóticos conocidos y desconocidos provenientes de la vida salvaje. Los parásitos representan el 20.3% de los eventos de Enfermedades Infecciosas Emergentes de la población humana (Gay et al, 2014). El potencial de las interacciones humano – murciélago, sean directas o indirectas, suelen ser subestimadas y en la mayoría de los casos son mayores a las esperadas para algunas especies. Aunque, con normalidad, los murciélagos no buscan contacto directo con el ser humano, suelen dormir en o cerca de viviendas humanas, lo que puede llevar a un contacto accidental con su excremento. Mediante la investigación de la diversidad parasítica y microbiológica en diversas especies de murciélagos, se pueden identificar algunas especies que sean fuentes de reserva de una gran diversidad de patógenos y, se puede además, entender cuáles son los factores que influyen esta diversidad (Gay et al, 2014).

En el presente estudio, se colectaron muestras de heces de murciélagos en los alrededores de la ciudad de Manta (Azuluna y Ayampe, zonas cercanas al Parque Nacional Machalilla) y en la Estación de Biodiversidad Tiputini USFQ, en el Yasuní ecuatoriano, de diversas especies que pertenecen a diversos gremios entre los cuales están murciélagos nectarívoros, frugívoros y frugívoros-semilleros. El propósito de este estudio es detectar por métodos moleculares la presencia de parásitos intestinales protozoos pertenecientes al filo Apicomplexa para determinar la diversidad parasítica existente en estos animales y, si es el caso, relacionar los resultados obtenidos con la posible transmisión de enfermedades zoonóticas a los seres humanos y animales domésticos.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Existen muy pocos estudios de parásitos en murciélagos. Los pocos estudios realizados en distintas partes del mundo han definido una gran diversidad de parásitos que tienen como hospedador a los murciélagos. Tampoco existe un estudio publicado que investigue la diversidad parasítica de murciélagos en el Ecuador y mucho menos en una de sus regiones más biodiversas como lo es el Yasuní. Es importante entonces, dar a conocer la diversidad de parásitos intestinales que portan estos animales y hacer una comparación con otros estudios de parasitología realizados en murciélagos de zonas y ecosistemas distintos. Entre los parásitos encontrados en estudios realizados en otros países alrededor del mundo, existen parásitos tanto patógenos como no patógenos para los seres humanos. Es importante avanzar en cuanto al conocimiento de los parásitos que tienen como hospedador a los murciélagos y que pueden causar infección en diversas especies de los mismos. Esto puede ayudar a determinar y describir la importancia y aplicación de la información obtenida en temas de biodiversidad y conservación de las especies. Los murciélagos de igual manera pueden ser hospedadores de parásitos patógenos que infectan a otros animales salvajes, afectándose entonces, su ecología y conservación. El estudio de apicomplejos intestinales en los murciélagos que habitan en un ecosistema biodiverso (EBT) proporciona potencial información de la biodiversidad parasítica presente en dicho ecosistema, además de las interacciones entre los parásitos y sus hospedadores y la dinámica de transmisión de dichos parásitos entre los organismos que habitan en el ecosistema. Es importante investigar acerca de la fauna de parásitos de los cuales los murciélagos son reservorios y portadores, debido a que, estos animales juegan un papel muy importante como transmisores de enfermedades zoonóticas graves. Parásitos importantes y de gran preocupación para la salud pública mundial se han encontrado en diversas especies de murciélagos alrededor del mundo dentro de los pocos estudios realizados. Muchos animales salvajes son huéspedes de una enorme diversidad de parásitos al mismo tiempo. La pérdida de

diversidad está directamente relacionada con el riesgo de aparición de nuevos patógenos emergentes y su transmisión. Muchos ecosistemas alrededor del mundo y todas las especies que en ellos habitan se están viendo amenazadas por esta pérdida de diversidad y fragmentación de dichos ecosistemas. Se sabe muy poco acerca del rol que cumple la diversidad parasítica y el tamaño de la “piscina zoonótica” en el riesgo de aparición de nuevos patógenos. Investigar la diversidad parasítica de diversas especies de murciélagos, puede ayudar a identificar aquellas especies que son la fuente o reservorio de una enorme riqueza de patógenos y a entender los factores que influyen esta riqueza. Los determinantes de la diversidad parasítica en murciélagos están relacionados con la biogeografía. Para esto se pretende relacionar los diversos gremios y especies de murciélagos de donde se obtuvieron las muestras, con los parásitos encontrados. Es importante relacionar a una especie determinada que tiene sus propias características (alimentación, reproducción, hábitat) con el tipo de parásitos de los que puede ser hospedador y, con si estos parásitos son patógenos de transmisión zoonótica. De esta manera se conoce un poco más acerca de la interacción hospedador – microorganismo.

### **3. ÁREA DE ESTUDIO**

El presente proyecto de titulación se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito (Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales), en el Laboratorio de Vectores y Parasitología.

Las muestras de heces de murciélagos a partir de las cuales se realizaron los diversos experimentos para el desarrollo de la investigación, explicados más adelante, fueron recolectadas de los alrededores de la ciudad de Manta (Azuluna y Ayampe), en la Provincia de Manabí – Ecuador, y en la EBT (Estación de Biodiversidad Tiputini) en el Yasuní – Ecuador.

El secuenciamiento de ADN fue realizado en los Estados Unidos de Norteamérica por la empresa Functional Biosciences.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo principal:

Detectar por PCR y secuenciamiento protozoos del filo Apicomplexa a partir de muestras de heces de diferentes especies de murciélagos de dos poblaciones de dos diferentes zonas del Ecuador, Manta y Tiputini.

### 4.2. Objetivos secundarios:

- Extraer ADN de muestras de heces de murciélagos colectadas.
- Diseñar una PCR para amplificar una región del gen de la subunidad pequeña del ribosoma (SSU 18S) para la detección de parásitos pertenecientes al Filo Apicomplexa.
- Relacionar el tipo de alimentación de cada uno de los murciélagos estudiados con el tipo de parásitos encontrados y con la presencia o ausencia de los mismos.

## 5. MATERIALES

### 5.1. Recolección de muestras

- Paletas de madera.
- Hisopos.
- Frascos de recolección estériles.
- Contenedor frío (cooler y Friogel).
- Tubos de recolección tapa rosca de 2mL.
- Medio virocult
- Congelador a -80°C.

### 5.2. Extracción de ADN

- Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc.)
- Tubos Eppendorf 1.5mL.
- Columnas para extracción de ADN.
- Puntas para micropipetas.
- Micropipetas.
- Vortex.
- Microcentrífuga.

### **5.3. Cuantificación de ADN**

- Espectofotómetro.
- Puntas para micropipetas.
- Micropipetas.
- Muestras de ADN.
- Agua para PCR.

### **5.4. Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) del gen de la $\beta$ -actina (control de calidad)**

- Cámara de anticontaminación.
- Micropipetas.
- Puntas para micropipetas.
- Tubos Eppendorf de 0.6mL.
- Tubos Eppendorf de 0.2mL.

### **5.5. Amplificación por PCR de una región del gen 18S del rRNA (Filo Apicomplexa)**

- Kit para PCR (Invitrogen):

- Buffer (10X)
- $MgCl_2$  (50mM)
- Taq Polimerasa (5U/ $\mu$ L)
- dNTPs (2mM)
- Primer F (10mM)
- Primer R (10mM)
  
- ADN extraído de cada una de las muestras.
- Termociclador.
- Cámara de anticontaminación.
- Micropipetas.
- Puntas para micropipetas.
- Tubos Eppendorf de 0.6mL.
- Tubos Eppendorf de 0.2mL.
- Kit para PCR (Invitrogen):
  - Buffer (10X)
  - $MgCl_2$  (50mM)
  - Taq Polimerasa (5U/ $\mu$ L)
  - dNTPs (2mM)
  - Primer 18S F (10mM)
  - Primer 18S R (10mM)
  
- ADN extraído de cada una de las muestras.
- Termociclador.

**Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para revelar resultados de amplificación para  $\beta$ -actina y región del gen 18S del rRNA**

- Agarosa.
- Buffer TBE (Tris Borato EDTA) 1X
- Balanza
- Pesamuestras
- Probeta
- Frascos de Vidrio
- Blue Juice Invitrogen (10X)
- Productos crudos de PCR de cada muestra analizada.
- Cámara de electroforesis Labnet.
- Fotodocumentador BioRad Gel Doc XR (BIORAD).

### **5.6. Análisis molecular**

- PREGAP 4.0
- GAP 5.0
- NCBI Nucleotide BLAST

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1. Recolección de muestras**

Se recolectaron 65 muestras de heces de murciélagos (50 de la Estación de Biodiversidad Tiputini y 15 de la ciudad de Manta, Manabí – Ecuador) y se procedió a la realización de una base de datos con toda la información referente a los murciélagos de los cuales provenían las muestras (especie, gremio, sexo, lugar y fecha de recolección de la muestra, método de recolección de la muestra). Todas las muestras se transportaron desde la EBT y Manta hasta el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito bajo las siguientes condiciones: muestras individualmente transportadas en tubos de recolección o bolsas ziploc

estériles, dentro de un recipiente con hielo en gel para mantener temperaturas bajas durante el trayecto. Una vez que llegaron las muestras a dicho destino, se procedió a colocarlas en tubos de criopreservación con medio Virocult y a almacenarlas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador. Las muestras permanecieron en dichas condiciones hasta el momento de su procesamiento.

## **6.2. Extracción de ADN**

Para el procesamiento de muestras se realizó una extracción de ADN con el kit PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc.) y su respectivo protocolo (Anexo I).

## **6.3. Cuantificación de ADN**

Se llevó a cabo una cuantificación del ADN genómico extraído de las muestras de heces de murciélago mediante un espectrofotómetro GE NanoVue™ Plus y se utilizó agua de PCR como solución blanco. El procedimiento fue el siguiente: se realizó una calibración del espectrofotómetro previa al análisis de las muestras. Se colocaron  $2\mu\text{L}$  de agua para PCR como solución blanco en el lector del equipo. Se realizó una lectura de esta solución blanco con el objetivo de realizar una calibración adecuada. Se limpió el lector del equipo con papel Kimtech™. Se colocaron nuevamente  $2\mu\text{L}$  de agua para PCR en el lector del equipo y se realizó una segunda lectura a manera de calibración. Se limpió nuevamente el lector con papel Kimtech™. Finalmente se colocaron  $2\mu\text{L}$  de la muestra a analizar en el lector del equipo. Se realizó la lectura de cada una de las muestras. La lectura de la concentración de ADN en  $\text{ng}/\mu\text{L}$  y relación 260/280 y 260/230, aparecen en la pantalla del equipo. Se tomó nota de las lecturas y se ingresaron los valores en la base de datos de las muestras.

## **6.4. Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) del gen de la $\beta$ -actina (control de calidad)**

Una vez realizada la extracción de ADN de todas las muestras recolectadas, se procedió a realizar una amplificación del gen de la  $\beta$ -actina como control de calidad para comprobar la ausencia de inhibidores de amplificación en el ADN extraído. Para un volumen final por reacción de 10 $\mu$ L, el protocolo de amplificación utilizado fue el siguiente: 1 $\mu$ L de Buffer 10X, 0.5 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> a 50mM, 1 $\mu$ L de dNTPs a 2mM, 1 $\mu$ L de primer  $\beta$ -actinaF a 10mM, 1 $\mu$ L de primer  $\beta$ -actinaR a 10mM, 0,05 $\mu$ L de Taq polimerasa a 5U/ $\mu$ L, 3,45 $\mu$ L de agua para PCR y 1 $\mu$ L de ADN. Se utilizó como control positivo para este estudio una muestra positiva para  $\beta$ -actina. El programa utilizado en el termocilador para esta amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos; desnaturalización, annealing y extensión a 92°C, 45°C y 72°C respectivamente por 50 segundos por cada uno de los pasos; y extensión final a 72°C por 2 minutos. Posterior a la amplificación por PCR del ADN genómico de las 65 muestras para el gen de la  $\beta$ -actina, los resultados fueron revelados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Algunas de las muestras amplificadas presentaron bandas inespecíficas (distintas a la banda de 300 pares de bases esperada correspondiente a la  $\beta$ -actina). Esto indicaba que no había existencia de inhibición. Estas muestras no fueron consideradas negativas para  $\beta$ -actina y se procedió a un reprocesamiento de las mismas con pequeñas variaciones en el protocolo estándar (expuesto anteriormente). Los resultados de los reprocesamientos fueron revelados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

### **6.5. Amplificación por PCR de una región del gen 18S rRNA (Filo Apicomplexa)**

Una vez controlada la calidad del ADN, se procedió a la amplificación por PCR de una región del gen 18S que codifica para ARN ribosomal para parásitos del Filo Apicomplexa, de todas las muestras de ADN obtenidas.

Para esto se envió a sintetizar un set de primers adecuado para la amplificación. El mencionado set de primers se consiguió mediante la revisión de bibliografía y la herramienta

PRIMER BLAST que proporciona el NCBI. La secuencia de los primers utilizados se obtuvo de Yang et al, 2014.

El control positivo para el estudio se obtuvo a partir de ADN puro liofilizado de *Cryptosporidium parvum* (Coccidia: Apicomplexa) que debía ser previamente reconstituido antes de ser utilizado (AmpliRun® *Cryptosporidium parvum* DNA Control – VIRCELL Microbiologists). El ADN del control, de acuerdo a las especificaciones de la empresa fabricante, se obtuvo a partir de terneros infectados con el parásito y se utilizó un método comercial de extracción de ADN genómico.

Para la estandarización del protocolo se utilizó el control positivo antes mencionado y un control negativo (agua), en base a un protocolo expuesto en Yang et al, 2014. Finalmente, mediante dicha estandarización se llegó a una amplificación clara y específica del control positivo y se utilizó dicho protocolo para el análisis del ADN extraído de las muestras de heces de murciélagos. Para procesar las muestras de ADN se obtuvo un volumen final de reacción de 10µl. El protocolo a utilizar fue el siguiente: 1µL de Buffer 10X, 0,2µL de MgCl<sub>2</sub> a 50mM, 1µL de dNTPs a 2mM, 0,5µL de primer 18SF a 10mM, 0,5µL de primer 18SR a 10mM, 0,2µL de Taq polimerasa a 5U/µL, 4,6µL de agua para PCR y 2µL de ADN (0,01 a 1 ng/µL). El programa de amplificación en el termociclador fue el siguiente: una desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos; una desnaturalización, annealing y extensión a 94°C, 60°C y 72°C respectivamente durante 30 segundos para cada uno de los pasos por 40 ciclos; y una extensión final a 72°C por 7 minutos. El ADN amplificado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Se revelaron los resultados y se realizaron los correspondientes análisis con respecto a los mismos.

Al finalizar el procesamiento de todas las muestras de ADN extraído de heces de murciélago, se separaron las muestras de las cuales se obtuvieron resultados positivos. Dichas muestras fueron re-procesadas siguiendo el mismo protocolo mencionado anteriormente pero

con un volumen final de reacción de 25 $\mu$ L (2,5 $\mu$ L de Buffer 10X, 1 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> a 50mM, 2,5 $\mu$ L de dNTPs a 2mM, 1,25 $\mu$ L de primer 18SF a 10mM, 1,25 $\mu$ L de primer 18SR a 10mM, 0,2 $\mu$ L de Taq polimerasa a 5U/ $\mu$ L, 11,3 $\mu$ L de agua para PCR y 5 $\mu$ L de ADN (0,01 a 1 ng/ $\mu$ L). Los productos de la amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Esto se llevó a cabo para controlar y comprobar que no existan falsos positivos. Las muestras positivas reprocesadas de las cuales se obtuvieron bandas muy tenues en el gel de electroforesis, fueron re-amplificadas utilizando el mismo protocolo mencionado a un volumen final de 25 $\mu$ L. Los productos de re-amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Todo esto con el objetivo de controlar y comprobar que no fuesen falsos positivos. Una vez reprocesadas las muestras y reamplificadas ciertas de ellas, se comprobó con veracidad la positividad de las mismas.

Una vez obtenidos los amplicones positivos para cada una de las muestras, se los rotuló adecuadamente y se los envió a liofilizar para enviarlos a la empresa Functional Biosciences (Estados Unidos) para secuenciamiento.

## **6.6. Análisis molecular**

Una vez obtenidos los resultados del secuenciamiento, se utilizaron los programas computacionales PREGAP 4.0 y GAP 5.0 para la limpieza y unificación de secuencias forward y reverse de cada una de las muestras en una secuencia consenso. Dicha secuencia fue entonces introducida en el Nucleotide Blast del NCBI para detección y caracterización específica del microorganismo al cual representaba la secuencia obtenida en el proceso de amplificación. A partir de este BLAST se seleccionaron las secuencias de referencia para realizar un alineamiento de secuencias mediante el programa BioEdit. Posterior al alineamiento, se procedió a la realización de un árbol filogenético con el programa MEGA 6.0 con el objetivo de establecer una correlación real entre las secuencias encontradas y secuenciadas en el

laboratorio y las secuencias referenciales tomadas del GenBank posterior a la realización de un BLAST con las secuencias primeramente mencionadas. Mediante el árbol filogenético se establecieron relaciones filogenéticas verdaderas entre los distintos microorganismos encontrados y se establecieron igualmente relaciones entre estos microorganismos y las especies y gremios de murciélagos en los que fueron identificados.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Recolección de muestras

**Tabla No. 1:** Especificaciones y datos de las muestras de heces de murciélago recolectadas.

No. de Muestra	Especie de murciélago de la que fue colectada	Gremio de murciélago de la que fue colectada	Fecha de recolección	Lugar de recolección
1	<i>Choeroniscus minor</i>	Nectarívoro	5 Agosto de 2017	EBT
1.1	<i>Choeroniscus minor</i>	Nectarívoro	5 Agosto de 2017	EBT
3	<i>Rinophylla pumilio</i>	Frugívoro/Semillero	5 Agosto de 2017	EBT
4	<i>Carollia brevicauda</i>	Frugívoro/Semillero	5 Agosto de 2017	EBT
5	<i>Arthibeus obscurus</i>	Frugívoro	5 de agosto de 2017	EBT
6	<i>Phyllostomus elongatus</i>	Insectívoro	5 de agosto de 2017	EBT
6.1	<i>Phyllostomus elongatus</i>	Insectívoro	5 de agosto de 2017	EBT
9	<i>Choeroniscus minor</i>	Nectarívoro	5 de agosto de 2017	EBT
11	<i>Carollia perspicillata</i>	Frugívoro/Semillero/Nectarívoro/ Polinizador	6 de agosto de 2017	EBT
12	<i>Peropteryx pallidoptera</i>	Insectívoro	6 de agosto de 2017	EBT
16	<i>Carollia perspicillata</i>	Frugívoro/Semillero/Nectarívoro/ Polinizador	7 de agosto de 2017	EBT
18	<i>Carollia perspicillata</i>	Frugívoro/Semillero/Nectarívoro/ Polinizador	7 de agosto de 2017	EBT
19	<i>Chiroderma trinitatum</i>	Frugívoro	7 de agosto de 2017	EBT
24	<i>Sturnira ilium</i>	Frugívoro	7 de agosto de 2017	EBT
24.1	<i>Sturnira ilium</i>	Frugívoro	7 de agosto de 2017	EBT
41	<i>Sturnira ilium</i>	Frugívoro	7 de agosto de 2017	EBT
44	<i>Sturnira ilium</i>	Frugívoro	7 de agosto de 2017	EBT
50	<i>Uroderma bilobatum</i>	Frugívoro/Nectarívoro	7 de agosto de 2017	EBT

56	<i>Sturnira ilium</i>	Frugívoro	7 de agosto de 2017	EBT
64	<i>Diphylla ecaudata</i>	Vampiro de aves	7 de agosto de 2017	EBT
15	<i>Diphylla ecaudata</i>	Vampiro de aves	7 de agosto de 2017	EBT
3	<i>Diphylla ecaudata</i>	Vampiro de aves	7 de agosto de 2017	EBT
25x	<i>Diphylla ecaudata</i>	Vampiro de aves	7 de agosto de 2017	EBT
74	<i>Noctilio albiventris</i>	Pescador	8 de agosto de 2017	EBT
75	<i>Noctilio albiventris</i>	Pescador	8 de agosto de 2017	EBT
76	<i>Noctilio albiventris</i>	Pescador	8 de agosto de 2017	EBT
77	<i>Noctilio albiventris</i>	Pescador	8 de agosto de 2017	EBT
80	<i>Noctilio albiventris</i>	Pescador	8 de agosto de 2017	EBT
84	<i>Sturnira tildae</i>	Frugívoro	8 de agosto de 2017	EBT
89	<i>Sturnira ilium</i>	Frugívoro	8 de agosto de 2017	EBT
90	<i>Sturnira magna</i>	Frugívoro	8 de agosto de 2017	EBT
91	<i>Sturnira ilium</i>	Frugívoro	8 de agosto de 2017	EBT
94	<i>Sturnira ilium</i>	Frugívoro	8 de agosto de 2017	EBT
100	<i>Gardnerycteris crenulatum</i>	Insectívoro	9 de agosto de 2017	EBT
172	<i>Chiroderma trinitatum</i>	Frugívoro	10 de agosto de 2017	EBT
192	<i>Rhinophylla pumilo</i>	Frugívoro/Semillero	11 de agosto de 2017	EBT
193	<i>Carollia brevicauda</i>	Frugívoro/Semillero	11 de agosto de 2017	EBT
194	<i>Phyllostomus astatus</i>	Insectívoro	12 de agosto de 2017	EBT
194.1	<i>Phyllostomus astatus</i>	Insectívoro	12 de agosto de 2017	EBT
195	<i>Carollia brevicauda</i>	Frugívoro/Semillero	12 de agosto de 2017	EBT
8N	<i>Vampyressa melissa</i>	Frugívoro	27 de marzo de 2018	EBT
9N	<i>Carollia perspicillata</i>	Frugívoro/Semillero	27 de marzo de 2018	EBT
16N	<i>Artibeus glaucus</i>	Frugívoro	27 de marzo de 2018	EBT
36N	<i>Vampyressa melissa</i>	Frugívoro	28 de marzo de 2018	EBT
5N	<i>Vampyressa melissa</i>	Frugívoro	28 de marzo de 2018	EBT
38N	<i>Carollia perspicillata</i>	Frugívoro/Semillero/Nectarívoro/ Polinizador	28 de marzo de 2018	EBT
49N	<i>Vampyriscus bidens</i>	Frugívoro	28 de marzo de 2018	EBT

52N	<i>Vampyriscus bidens</i>	Frugívoro	28 de marzo de 2018	EBT
59N	<i>Platyrrhinus brachycephalus</i>	Frugívoro	28 de marzo de 2018	EBT
1M	<i>Artibeus obscurus</i>	Frugívoro	21 de julio de 2018	Ayampe
2M	<i>Artibeus fraterculus</i>	Frugívoro	20 de julio de 2018	Azuluna
3M	<i>Amorphochilus schnablii</i>	Insectívoro	22 de julio de 2018	Azuluna
4M	<i>Amorphochilus schnablii</i>	Insectívoro	22 de julio de 2018	Azuluna
5M	<i>Artibeus fraterculus</i>	Frugívoro	22 de julio de 2018	Azuluna
6M	<i>Amorphochilus schnablii</i>	Insectívoro	22 de julio de 2018	Azuluna
7M	<i>Amorphochilus schnablii</i>	Insectívoro	22 de julio de 2018	Azuluna
8M	<i>Artibeus fraterculus</i>	Frugívoro	22 de julio de 2018	Azuluna
9M	<i>Sturnira ilium</i>	Frugívoro	18 de julio de 2018	Azuluna
10M	<i>Sturnira spp.</i>	Frugívoro	18 de julio de 2018	Azuluna
11M	<i>Amorphochilus schnablii</i>	Insectívoro	18 de julio de 2018	Azuluna
12M	<i>Artibeus fraterculus</i>	Frugívoro	18 de julio de 2018	Azuluna
13M	<i>Anoura caudifer</i>	Nectarívoro	18 de julio de 2018	Azuluna
14M	<i>Artibeus fraterculus</i>	Frugívoro	22 de julio de 2018	Azuluna
15M	<i>Artibeus fraterculus</i>	Frugívoro	22 de julio de 2018	Azuluna

De acuerdo a la base de datos realizada posterior a la recolección de muestras de heces de murciélago, se identificaron aproximadamente 25 especies de murciélagos de donde éstas fueron obtenidas entre las cuales existían especies de los gremios frugívoro, insectívoro, nectarívoro, semillero e insectívoro. De las 65 muestras expuestas en la base de datos, 50 fueron recolectadas en la EBT y 15 en las localidades de Azuluna y Ayampe en Manta. Las muestras fueron recolectadas entre agosto de 2017 y julio de 2018.

## 7.2. Cuantificación de ADN

En las muestras de ADN se detectaron concentraciones de entre menos de 0.2 a 95.5 ng/μl. Se obtuvieron además relaciones 260/280 de entre 0.8 y 2.2 y relaciones 260/230 de 0.2 a 1.5.

### **7.3. Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) del gen de la $\beta$ -actina (control de calidad)**

De las 65 muestras de ADN genómico que fueron procesadas y amplificadas inicialmente por PCR para  $\beta$ -actina de acuerdo al protocolo de amplificación, se obtuvieron un total de 9 muestras positivas. Posterior a la amplificación por PCR y en el momento de revelar los resultados de dicha amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se mostraba una banda de aproximadamente 300 pares de bases para las muestras positivas (Fig.1, Anexo 2). Adicionales a las muestras que resultaron positivas después del primer proceso de amplificación, se obtuvieron muestras, en este mismo proceso, que no mostraban un amplicón único de 300 pares de bases en el gel de revelado, sino que, en su lugar, presentaban bandas inespecíficas de entre 300 y 600 pares de bases (Fig.2, Anexo 2). Esto determina que, a pesar de que se esperaba la obtención de este amplicón único de aproximadamente 300 pares de bases, no existía inhibición en las muestras en las cuales se obtuvieron bandas inespecíficas. Posterior al reprocesamiento mencionado anteriormente, se obtuvieron 4 muestras positivas que presentaron un amplicón único de 300 pares de bases. Después del reprocesamiento de las muestras que inicialmente resultaron negativas se obtuvieron 2 muestras positivas que presentaron un amplicón único de 300 pares de bases. Cabe recalcar que algunas de las muestras que resultaron negativas o con bandas inespecíficas para  $\beta$ -actina, resultaron positivas a la amplificación para la región 18S del ADN ribosomal. Al final, se obtuvo un total de 15 muestras positivas para  $\beta$ -actina.

### **7.4. Amplificación por PCR de una región del gen 18S rRNA (Filo Apicomplexa)**

Posterior a la amplificación del gen de la  $\beta$ -actina como control de calidad para las 65 muestras de ADN genómico analizadas, se procedió al procesamiento de la totalidad de las muestras (positivas o no para  $\beta$ -actina) mediante amplificación por PCR con un set de primers para detección de la región 18S del ADN ribosomal de parásitos intestinales del Filo Apicomplexa.

De las 65 muestras de ADN genómico procesadas y amplificadas, se obtuvieron un total de 7 muestras positivas para la amplificación de la región 18S del ADN ribosomal, de las cuales, 5 pertenecían a muestras de heces recolectadas de diversas especies de murciélagos en la EBT y 2 pertenecientes a muestras de heces recolectadas, en este caso, de una misma especie de murciélago, en la ciudad de Manta. Posterior a la amplificación por PCR, se revelaron los resultados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, en donde, en el gel, aparecía una banda de aproximadamente 300 pares de bases para las muestras positivas (Fig, 3, Anexo 2). En algunas de las muestras positivas fue notable la presencia de dímeros de primer, especialmente en aquellas en las cuales la concentración inicial de ADN para la amplificación era baja y se obtenía(n) una(s) banda(s) muy tenue(s) en el gel de electroforesis. En las muestras positivas en las que se obtuvo una banda clara y única, los dímeros de primer eran casi imperceptibles o inexistentes al igual que en los controles positivos. Las muestras negativas, por razones obvias (al no haber ADN molde para amplificación), presentaban dímeros de primer altamente notorios en el gel.

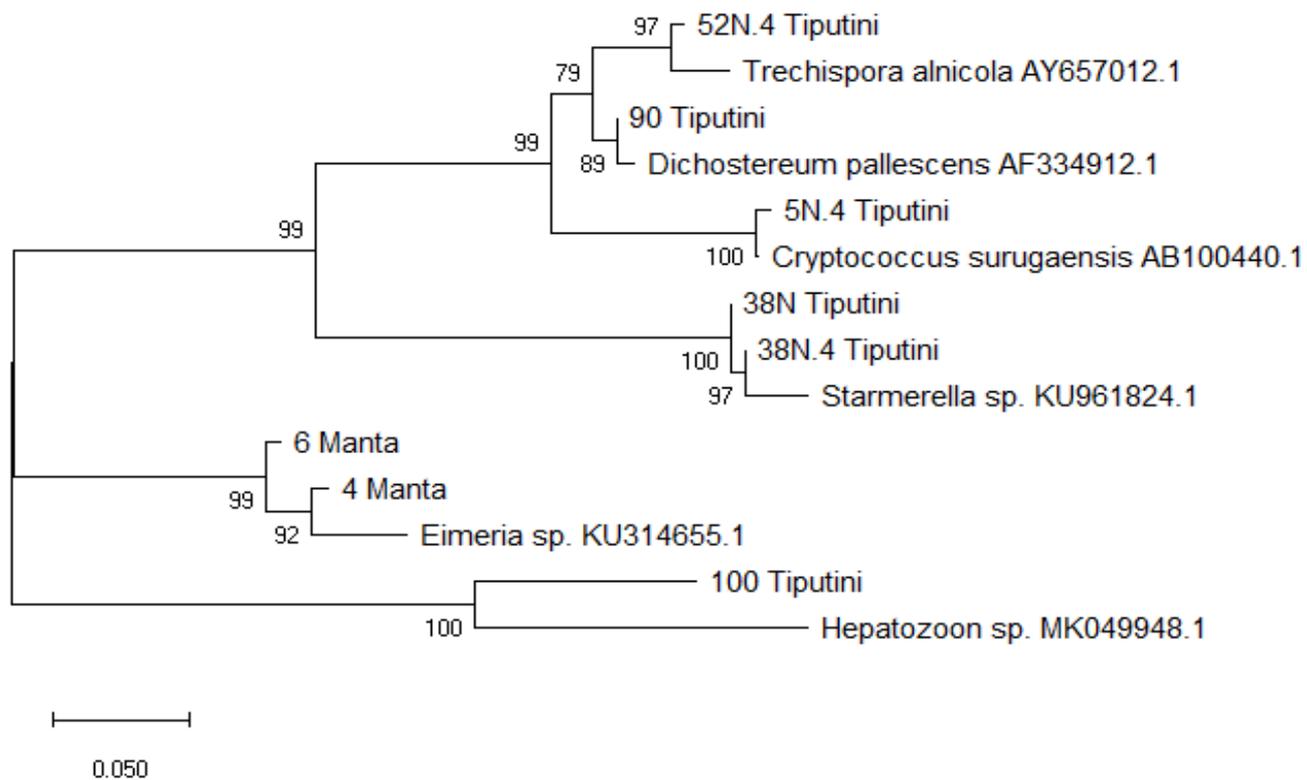
### 7.5. Análisis molecular

**Tabla No.2:** Resultados obtenidos del secuenciamiento de las muestras positivas para la amplificación por PCR de una región del gen 18S del ARN ribosomal para parásitos intestinales del Filo Apicomplexa.

Codificación de la muestra dentro del laboratorio, lugar de donde fue recolectada y fecha de recolección	Microorganismo detectado	Especie de murciélago al cual pertenece la muestra	Gremio de murciélago al cual pertenece la muestra
4 – Azuluna, Manta, Ecuador - 22 de julio de 2018	<i>Eimeria sp.</i> KU314655.1	<i>Amorphochilus schnablii</i>	Insectívoro
6 – Azuluna, Manta, Ecuador – 22 de julio de 2018	<i>Eimeria sp.</i> KU314655.1	<i>Amorphochilus schnablii</i>	Insectívoro
100 – Tiputini, Yasuní, Ecuador – 9 de agosto de 2017	<i>Hepatozoon sp.</i> MK049948.1	<i>Gardnerycteris crenulatum</i>	Insectívoro
5N – Tiputini, Yasuní, Ecuador – 28 de marzo de 2018	<i>Cryptococcus surugaensis</i> AB100440.1	<i>Vampyressa melissa</i>	Frugívoro

38N – Tiputini, Yasuní, Ecuador - 28 de marzo de 2018	<i>Starmerella</i> sp. KU961824.1	<i>Carollia perspicillata</i>	Frugívoro – Semillero – Nectarívoro – Polinizador
52N – Tiputini, Yasuní, Ecuador - 28 de marzo de 2018	<i>Trechispora alnicola</i> AY657012.1	<i>Vampyriscus bidens</i>	Frugívoro
90 – Tiputini, Yasuní, Ecuador – 8 de agosto de 2017	<i>Dichostereum pallescens</i> AF334912.1	<i>Sturnira magna</i>	Frugívoro

En la tabla No. 2 se indican los resultados del análisis molecular y secuenciamiento realizado a partir de los amplicones obtenidos en las muestras que resultaron positivas posterior a la amplificación por PCR de una región del gen 18S del ARN ribosomal para apicomplejos. De acuerdo a lo expuesto en la tabla, algunas de las secuencias obtenidas reflejan la presencia de parásitos del Filo Apicomplexa como *Eimeria spp.* y *Hepatozoon spp.*, en las muestras 4 y 6, y 100 respectivamente. Esto nos da como resultado un porcentaje de positividad del 2%. Por otro lado, las secuencias obtenidas para las muestras restantes (5N, 38N, 52N, 9N y 90), reflejan la presencia de diversos géneros y especies de hongos. Para observar las correlaciones entre las secuencias obtenidas en el laboratorio y las secuencias referenciales obtenidas del GenBank al realizar el NCBI Blast, ver el árbol filogenético presentado a continuación.



**Figura No. 1:** Árbol filogenético que muestra la relación entre las secuencias obtenidas mediante el análisis molecular realizado y las secuencias del GenBank de cada uno de los microorganismos identificados.

La longitud de las ramas en un árbol filogenético nos indican las variaciones genéticas entre grupos taxonómicos identificados. En este caso, la mayor variación genética la encontramos en el caso de la muestra 100 identificada como *Hepatozoon spp.* Esto quiere decir que hay diversas variaciones nucleotídicas entre la secuencia de lo encontrado en el laboratorio y la secuencia del GenBank para *Hepatozoon spp.* En este caso el porcentaje de acierto en la identificación es menor debido a estas variaciones marcadas. Para todo el resto de muestras, se observa claramente que la longitud de las ramas es bastante corta y no muy diferente entre las secuencias obtenidas en el laboratorio y las secuencias del GenBank para cada uno de los organismos. Esto indica poca variación genética y por ende un porcentaje mucho mayor de identificación.

## 8. DISCUSIÓN

El presente estudio provee resultados originales acerca de la fauna parasítica gastrointestinal de diversas especies de murciélagos, habitantes de dos distintas zonas en territorio ecuatoriano, la costa y el oriente. La positividad general de las muestras en este estudio está alrededor del 2%. Este porcentaje está por debajo de los valores de positividad en otros estudios de parasitología en murciélagos realizados en otros lugares del mundo. En un estudio realizado en China investigando la prevalencia de *Cryptosporidium sp.* en murciélagos de la provincia de Yunnan, se presentó un porcentaje de positividad de 7.7% (Wang et al, 2013). Otro estudio realizado en los Estados Unidos para la detección de *Eimeria sp.* en murciélagos rojos del Este, presentó un porcentaje de positividad de 13% (McAllister et al, 2009). Un estudio realizado con murciélagos de las Filipinas para la detección de parásitos apicomplejos como *Cryptosporidium sp.* y *Eimeria sp.* presentó un porcentaje de positividad del 20% (Murakoshi et al, 2016). Muchas de las especies de murciélagos estudiadas en la región Neotropical, pertenecen a un gremio insectívoro. Los murciélagos insectívoros resultan más susceptibles a infectarse por parásitos dioxenos (tiene dos hospedadores uno definitivo y otro intermediario), utilizando a los artrópodos como hospedadores intermediarios, paraténicos (sustitutos) o definitivos (Santana-Lima et al, 2018). Las muestras que resultaron en la identificación de parásitos del Filo Apicomplexa en este estudio, provenían de murciélagos insectívoros. La diversidad de parásitos gastrointestinales de los murciélagos ha sido ampliamente documentada en diversos estudios. Se han realizado estudios para la detección de parásitos apicomplejos como *Eimeria sp.* y *Cryptosporidium sp.* en Estados Unidos, Bolivia, Filipinas, República Checa, Brasil, entre otros países. En Brasil, Bolivia y Estados Unidos, los estudios se han basado en la detección e identificación de quistes, ooquistes y huevos de parásitos como *Cryptosporidium sp.*, *Eimeria sp.* y *Anchylostoma sp.* mediante técnicas de sedimentación por centrifugación, sedimentación espontánea y flotación y posterior tinción y microscopía. Los

resultados se exponen en base a la morfología de los quistes, ooquistes y huevos de cada uno de los parásitos en base a descripciones anteriores (Santa – Lima et al, 2018). En Filipinas, República Checa, China y Estados Unidos, los estudios realizados se basan en la detección molecular de material genético de parásitos apicomplejos como *Eimeria spp.* y *Cryptosporidium spp.* en muestras de heces de murciélagos realizando un posterior secuenciamiento para identificación específica del microorganismo presente y algunos estudios inclusive profundizan en técnicas moleculares de genotipificación utilizando marcadores moleculares como RFLPs y secuenciamiento para determinar especies específicas de estos géneros de apicomplejos presentes en murciélagos de las zonas en estudio. En este estudio, se ha demostrado la presencia de *Eimeria sp.* en muciélagos de la costa ecuatoriana mediante detección molecular. Mientras que no se ha detectado la presencia de *Crypstosporidium sp.* en ninguna de las muestras analizadas. En los Estados Unidos, se realizó la primera detección de un parásito apicomplejo del género *Hepatozoon* en murciélagos (Pinto et al, 2013). En el presente estudio, se realiza una nueva detección de este género de apicomplejos en murciélagos del oriente ecuatoriano. Cabe recalcar que, la riqueza y diversidad parasítica de los murciélagos está directamente relacionada con la presencia de estos animales en proximidades urbanas y peri-urbanas. Su movimiento o migración hacia dichas zonas, es el resultado de cambios ambientales y fragmentaciones de hábitat. Estos dos aspectos son determinantes en la diversidad parasítica gastrointestinal de los murciélagos (Santana-Lima et al, 2018).

Las dos muestras que resultaron positivas a la presencia de *Eimeria spp.* provienen de una misma especie de murciélago, *Amorphochilus schnablii*. A este murciélago se lo conoce comúnmente como el murciélago ahumando de Schnabl. Se distribuye en el occidente de América del Sur, desde las costas ecuatorianas hasta el norte de Chile. Sus principales ecosistemas son El Bosque Deciduo de la Costa, El Matorral Seco de la Costa y El Bosque Húmedo Tropical del Valle del Chocó. Este murciélago ha sido capturado en alcantarillas,

viviendas y túneles de irrigación. Es un murciélago insectívoro (Romero, V.; Vallejo, A. F.; Boada, C.; 2018). Las muestras pertenecientes a este murciélago, fueron recolectadas en Azuluna, Manta, provincia de Manabí, en las costas ecuatorianas. Por lo tanto, la información presentada, demuestra veracidad en la identificación del murciélago del cual se obtuvo la muestra analizada. El género *Eimeria* incluye numerosas especies, muchas de las cuales pueden ser causantes de coccidiosis en aves y otros animales vertebrados, especialmente en animales domésticos (Sharma et al, 2018). Los parásitos de este género son altamente reconocidos por ser una causa global de infección intestinal en este tipo de animales. Estos protozoos apicomplejos son los causantes de la conocida “coccidiosis”, que representa una enfermedad muy importante en animales vertebrados domésticos incluyendo rumiantes pequeños (Oliveira de Macedo et al, 2019). Animales como vacas, cerdos, ovejas, cabras, pollos, perros y gatos, se ven afectados por esta enfermedad. Es por ello, que los parásitos eimerinos son considerados de gran importancia médica veterinaria (Hnida y Duzsynski, 1999). Las infecciones por *Eimeria sp.* causan pérdidas económicas relevantes (Oliveira de Macedo et al, 2019). La gravedad de la enfermedad depende de la especie de *Eimeria* que la esté causando. Por ejemplo, en cerdos, hay ocho especies de *Eimeria* que comúnmente causan coccidiosis. Entre estas están *Eimeria spp.*, *Eimeria deblickei*, *Eimeria polita*, entre otras (Sharma et al, 2017). En rumiantes pequeños como cabras u ovejas, las especies que comúnmente causan la enfermedad son *Eimeria chistenseni*, *E.hirci*, *E.caprovina*, entre otras (Oliveira de Macedo et al, 2019). La identificación adecuada de la especie de *Eimeria* que causa la enfermedad, es fundamental para determinar la gravedad de la misma e implementar el tratamiento apropiado. La coccidiosis de animales domésticos tiene un alto nivel de letalidad. La transmisión del parásito se da por el consumo de alimento contaminado por ooquistes del mismo durante el pastoreo o mediante el consumo de agua contaminada con estos mismos ooquistes (Oliveira de Macedo et al, 2019). Como se ha mencionado en apartados anteriores, los murciélagos mantienen una vida social

que contribuye al mantenimiento, evolución y dispersión de patógenos. Los murciélagos están catalogados como reservorios naturales de potenciales patógenos tanto para seres humanos como para otros animales, (Wang et al, 2013). Los murciélagos están naturalmente infectados por diversos microorganismos como virus, bacterias, hongos y parásitos (Murakoshi et al, 2016). Por tanto, a los murciélagos como tal, este tipo de patógenos no les causa ningún tipo de sintomatología o enfermedad o al menos no existen reportes de enfermedad en murciélagos por estos microorganismos. Estos animales son prevalentes alrededor del mundo y es por ello que presentan enormes oportunidades de estar en contacto tanto con otros animales salvajes, animales domésticos y seres humanos (Murakoshi et al, 2016). Existe un incremento en la prevalencia de murciélagos en áreas urbanas y está prevalencia incrementa cada vez más (Kvác et al, 2015). Esto se debe principalmente a la destrucción de su hábitat natural y ecosistemas por la intervención humana (Cabral et al, 2013). Esto da aún más oportunidades a los murciélagos de estar en contacto con poblaciones humanas y de animales domésticos y por ende de ejercer un papel importante en la transmisión de enfermedades de las cuales ellos son reservorios. En el Matorral Seco de la Costa, hierbas para la crianza de ganado han sido introducidas, reemplazando a las plantas nativas de la zona destruyendo y fragmentando el ecosistema. Más del 60% del Bosque Deciduo de la Costa ha sido destruido por actividades antropogénicas, especialmente por agricultura y ganadería. El impacto humano ha sido severo en esta zona. El Bosque Húmedo Tropical del Valle del Chocó ha sido destruido en un 75% por actividades antropogénicas (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2013). *Amorphochilus schnablii* es una especie de murciélago amenazada puesto a que los tres ecosistemas donde principalmente habita han sido altamente destruidos. Las actividades agrícolas y ganaderas causantes de la destrucción de los ecosistemas e introducidas en los mismos, ponen en contacto a animales domésticos y seres humanos, con poblaciones de murciélagos que habitan en la zona. Esto incrementa entonces, la prevalencia de murciélagos en zonas semi-urbanas, lo que

incrementa a su vez, la probabilidad de transmisión de enfermedades de las cuales los murciélagos son portadores, a animales domésticos y seres humanos. Los murciélagos que, en ocasiones, cohabitan con animales domésticos, tienen una mayor probabilidad de estar infectados con los parásitos que a su vez, infectan a estos animales. *Eimeria spp.* es un parásito monoxeno. Los ooquistes no infectivos liberados al medioambiente mediante las heces de los hospedadores infectados, pasan por un proceso meiotico de esporogonia. Este proceso requiere oxígeno. Cuando la esporogonia finaliza, los ooquistes son entonces infectivos, y contienen 4 esporoquistes en su interior. Cada uno de estos esporoquistes tiene a su vez 2 esporozoitos infectivos. Cuando el hospedador vertebrado ingiere los ooquistes infectivos existentes en el medioambiente por consumo de alimento o agua contaminada con los mismos, estos ooquistes desenquistan en el lumen intestinal liberando a los esporoquistes, que a su vez, liberan a los esporozoitos infectivos. Este proceso está mediado por la presencia de tripsina, bilis y dióxido de carbono. Los esporozoitos liberados penetran las células del epitelio intestinal. Los esporozoitos de algunas especies de *Eimeria* se desarrollan dentro de las células en el lugar donde se produjo la penetración. Los esporozoitos de otras especies de *Eimeria* son transportados a otros sitios como por ejemplo el epitelio de las criptas intestinales, en donde se lleva a cabo el desarrollo (Allen y Fetterer, 2002). Dentro de las células huésped, los esporozoitos llevan a cabo reproducción asexual (esquizogonia o merogonia), en donde se produce una división nuclear y una diferenciación citoplasmática, resultando en la formación de merozoitos que destruyen a las células huésped y se tornan libres para infectar a otras células huésped. Existen varios ciclos o generaciones de merogonia (Allen y Fetterer, 2002). Posterior a la merogonia se produce la gametogonia en las nuevas células huésped. Los merozoitos entran en las nuevas células huésped y se desarrollan en microgamontes (macho) o macrogamontes (hembra). Los microgamontes forman entonces microgametos, que salen de estas estructuras, buscan y fertilizan a los macrogamontes formándose entonces un cigoto

diploide u ooquiste. El ooquiste se libera al lumen intestinal desde las células huésped y no es infectivo en este punto del ciclo de vida. El ooquiste no infectivo es liberado al ambiente mediante las heces (Allen y Fetterer, 2002). La infección de los murciélagos con quistes de *Eimeria spp.* puede darse principalmente porque, al existir una cohabitación entre animales domésticos y murciélagos, los murciélagos están de alguna manera en contacto con las heces de estos animales que pueden estar parasitados por diversas especies de *Eimeria*. Pueden de igual manera, estar consumiendo agua de alguna zona cercana que esté contaminada con quistes del parásito. Los animales domésticos suelen estar infectados con ectoparásitos como ácaros, garrapatas y pulgas. Existen ácaros coprófagos que de alguna de alguna manera pueden ingerir los ooquistes infectivos del parásito al alimentarse de las heces de animales domésticos infectados. *Amorphochilus schnablii* es un murciélago insectívoro, que, al alimentarse de estos artrópodos puede de alguna manera estar en contacto con *Eimeria spp.*

La zona de Azuluna, Manta, está cercana al Parque Nacional Machalilla, un área protegida constituida por Bosque Seco y Semi-seco (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2015). *Amorphochilus schnablii* vive en este tipo de zonas áridas y en estos ecosistemas. La destrucción e intervención antropogénica de estos ecosistemas es inminente. Las poblaciones de este murciélago que están fuera de los límites del área protegida del Parque Nacional Machalilla, pueden estar en contacto con zonas agrícolas y ganaderas causantes de la fragmentación y destrucción de las poblaciones de murciélagos y su hábitat (El Bosque Seco de zonas costeras ha sido destruido en más de un 50% por actividad humana). El contacto constante y prevalente de los murciélagos con animales domésticos es la explicación más clara

del por qué *Eimeria spp.*, causante de coccidiosis en dichos animales, ha sido detectado en los murciélagos de esta zona.

*Hepatozoon spp.* fue detectado en *Gardnerycteris crenulatum*. Esta especie de murciélago habita en las provincias de Esmeraldas, Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas, Los Ríos, Carchi, Morona Santiago, Pichincha, Cotopaxi, Sucumbíos, Napo, Orellana, Pastaza y El Oro. Sus regiones naturales incluyen el Bosque Húmedo Tropical del Chocó, el Bosque Deciduo de la Costa, el Matorral seco de la Costa, el Bosque Piemontano Oriental y el Bosque Húmedo Tropical Amazónico. Se lo conoce como el murciélago rayado de nariz peluda. El género *Gardnerycteris* es endémico de Sudamérica, y de amplia distribución en el Neotrópico. *G. crenulatum* ha sido reportado desde el sur de México y el Norte de Panamá hasta el sur de Brasil incluido el Ecuador (Romero, 2018). En Ecuador *Gardnerycteris crenulatum* habita principalmente en bosques húmedos de la amazonía y en menor grado en bosques secos de la costa. Se refugia principalmente en cavidades de árboles y es una especie principalmente insectívora (Romero, 2018). Todo lo mencionado concuerda con los datos de recolección de la muestra perteneciente a esta especie de murciélago. La muestra fue recolectada en la EBT, zona de bosque húmedo tropical amazónico, uno de los hábitats y ecosistemas donde reside este murciélago. De igual manera, la especie de murciélago descrita para la muestra en la que se encontró el parásito de género *Hepatozoon*, fue catalogada dentro del gremio insectívoro. El género *Hepatozoon spp.* es un parásito apicomplejo sanguíneo que parasita a una diversidad de vertebrados e invertebrados. En este caso, los animales vertebrados juegan el papel de hospedadores intermediarios, mientras que, los animales invertebrados, juegan el papel de hospedadores definitivos. Los quistes infecciosos se desarrollan dentro del hospedador definitivo, es decir, en el artrópodo, en donde los parásitos alcanzan madures sexual. El desarrollo merogónico tiene lugar en varios órganos y tejidos del hospedador intermediario. En los mamíferos y algunas aves, los gamontes se encuentran principalmente en leucocitos.

Los gamontes, estructuras productoras de gametos, son ingeridas por hospedador definitivo cuando éste se alimenta de la sangre del hospedador intermediario (ingiere los leucocitos infectados por los gamontes del parásito). La producción de gametos, reproducción sexual y esporogonia (formación de esporozoitos) ocurre en el lumen intestinal de los hospedadores definitivos para producir esporozoitos infecciosos que se desarrollan en quistes o esporoquistes maduros. Éstos se transmiten a otros hospedadores para continuar con la dispersión y ciclo de vida del parásito, cuando el hospedador definitivo es ingerido por otro organismo como alimento. *Hepatozoon spp.*, es un parásito heteroxeno, es decir, que infecta a uno o más hospedadores intermediarios y a un hospedador definitivo simultáneamente (Hodžić et al, 2018). Para fines de este estudio, *Hepatozoon spp.*, infecta a murciélagos y otros vertebrados y a diversas especies de artrópodos simultáneamente. *Gardnerycteris crenulatum* se alimenta principalmente de insectos y arácnidos (Romero, 2018). La presencia de *Hepatozoon spp.* en la muestra de heces recolectada de este murciélago, está directamente relacionada con el comportamiento alimenticio del murciélago (insectívoro) y con el hecho de que este parásito tiene como hospedador definitivo a los insectos y se transmite de un hospedador a otro a través del consumo de estos insectos que contienen los quistes esporulados (esporozoitos) del mismo. Como se ha mencionado anteriormente, los murciélagos insectívoros tienen una mayor propensión a infectarse con parásitos dioxenos que utilizan a los artrópodos como hospedadores intermediarios o definitivos. *Hepatozoon spp.*, no se comporta únicamente como parásito dioxeno, sino que parasita, en ocasiones, a más de dos hospedadores entre intermediarios (vertebrados) y definitivos (artrópodos) simultáneamente. Algunas especies de *Hepatozoon spp.*, como *Hepatozoon canis* causan infecciones graves en animales carnívoros domésticos y salvajes. La hepatozoonosis causada por *Hepatozoon canis* es una enfermedad transmitida por garrapatas, ácaros, pulgas y mosquitos. La transmisión de este parásito a sus hospedadores vertebrados se da por la ingestión del vector, en este caso las garrapatas, ácaros, pulgas o

mosquitos, que contiene los ooquistes maduros con esporozoitos infectivos (Hodžić et al, 2018). Cuando el hospedador vertebrado ingiere los esporoquistes con esporozoitos infecciosos, el quiste se rompe al contacto con sustancias gástricas y los esporozoitos se liberan en lumen intestinal. Estos esporozoitos penetran el intestino y se transportan a través del sistema linfático y sistema circulatorio hacia otros tejidos y órganos corporales (Parnell et al, 2008). En algunas especies de *Hepatozoon* los esporozoitos infecciosos forman quistes en el tejido muscular de sus hospedadores intermediarios. Los quistes que se mantienen intactos no producen inflamación. Los quistes que se rompen producen granulomas a nivel muscular. Cuando esto ocurre, la hepatozoonosis puede ser fatal. En otras especies de *Hepatozoon* los esporozoitos infectivos invaden el hígado, el bazo, los ganglios linfáticos, los pulmones, los riñones y la médula ósea (Parnell et al, 2008). La hepatozoonosis está frecuentemente asociada con una marcada y madurada leucocitosis neutrofilica. Las formas reproductivas del parásito (gamontes y gametos) han sido aisladas de células leucocitarias (neutrófilos y monocitos) del hospedador intermediario (Valenciano et al, 2014). En *Hepatozoon spp.* la merogonia seguida de la gametogonia ocurre en el hospedador intermediario vertebrado, mientras que la fecundación y esporogonia ocurre en el hospedador definitivo invertebrado (O'Dwyer, 2011). En perros, la infección por *Hepatozoon canis* causa diferentes manifestaciones clínicas- este parásito normalmente causa síntomas leves pero de igual manera puede llegar a producir manifestaciones potencialmente mortales. La enfermedad se caracteriza por fiebre, anorexia, letargia, hiperglobulemia, pérdida de peso y anemia en los casos más severos (Orkun y Nalbantoğlu, 2018). Se han realizado estudios en la detección de *Hepatozoon canis* en diversos animales vertebrados, especialmente en perros domésticos, en muchos países alrededor del mundo (Turquía, Argentina, Australia, Mauritius, entre otros). En Brasil se realizó un estudio para determinar la prevalencia de *Hepatozoon canis* en mamíferos salvajes. El parásito fue detectado en zorros, lobos, capibaras, chacales y ocelotes (De Azevedo Gomes et al, 2018). La

prevalencia de *Hepatozoon spp.*, en murciélagos del oriente ecuatoriano cuyas muestras fueron recolectadas en la EBT (Yasuní), no puede relacionarse con transmisión y causa de enfermedad en animales domésticos como perros puesto que, la región de bosque húmedo tropical ecuatoriano y especialmente la Reserva Natural y Área Protegida Yasuní ITT, no presenta influencias significativas de actividad humana. En este caso específico, los murciélagos no juegan un papel de dispersión y transmisión de parásitos patógenos para animales domésticos. Sin embargo, animales como ocelotes, capibaras y pecaríes pueden encontrarse en el bosque húmedo tropical amazónico. Se ha confirmado la presencia de algunas especies de *Hepatozoon* en estos animales (De Azevedo Gomes et al, 2018). *Gardnerycteris crenulatum* puede estar jugando un papel importante en la transmisión de este parásito a este tipo de mamíferos salvajes que cohabitan con él en el mismo ecosistema. Cabe recalcar que algunas especies de *Hepatozoon* causan hepatozoonosis severa en diversas especies de mamíferos, especialmente en mamíferos carnívoros, de los cuales existe diversidad y abundancia en ecosistemas de bosque húmedo tropical como lo es el Yasuní ITT. Por ende, los murciélagos pueden estar involucrados en la dispersión, transmisión y desarrollo de hepatozoonosis en algunos animales salvajes de este ecosistema. Desde otro punto de vista se puede inferir que *Hepatozoon spp.* causa enfermedad igualmente en los murciélagos. No existen estudios o referencias de que esto sea realmente un hecho, pero al ser este un parásito patógeno para algunos mamíferos vertebrados, puede serlo para los murciélagos.

Los resultados de esta investigación resultaron no únicamente en la detección de parásitos del Filo Apicomplexa en distintas especies de murciélagos tanto de la ciudad de Manta como de la EBT, sino que también, se pudieron detectar algunos tipos de hongos. Se conoce que el comportamiento alimenticio, la estructura social (colonias de gran tamaño y hábitats en diferentes ecosistemas) y el rango de dispersión mediante el vuelo de los

murciélagos, tienen una enorme influencia en la composición de la fauna microbiana gastrointestinal de los mismos (Santana-Lima et al, 2018).

*Cryptococcus spp.* son levaduras encapsuladas ampliamente distribuidas en suelos ambientales, especialmente en aquellos contaminados por excremento de ave. Las especies más comunes son *C. neoformans* y *C. gatti*, que pueden ser encontradas en las heces de aves salvajes. *C. neoformans* y *C. gatti* son microorganismos patógenos para seres humanos y animales domésticos, causando una enfermedad conocida como criptococosis (Maestrале et al, 2015). Se produce la infección cuando la levadura logra colonizar los pulmones de su hospedador mediante la inhalación de las células del microorganismo de fuentes ambientales, a partir de donde se dispersa a la sangre y otros órganos (SNC) (Faria et al, 2015). La mayoría de las infecciones por *Cryptococcus spp.* se producen en personas inmunocomprometidas aunque también pueden darse en personas inmunocompetentes. La enfermedad tiene un alto índice de mortalidad independientemente de la aplicación de un tratamiento o terapia antifúngica. *Cryptococcus neoformans* tiene una distribución geográfica mundial y está generalmente presente en excrementos de paloma. *Cryptococcus gatti*, tiene una distribución geográfica restringida a la región tropical y subtropical y está asociado a árboles como el eucalipto (Pakshir et al, 2018). Se han llevado a cabo estudios para la detección de *Cryptococcus spp.* en diferentes muestras ambientales tomadas de troncos y agujeros, flores y hojas de diversas especies de árboles incluido el eucalipto, excremento de aves y suelos. En dichos estudios se ha logrado la identificación de *Cryptococcus gatti* en hojas, suelo, flores y aire de alrededor de árboles de eucalipto y de *Cryptococcus neoformans* en diversas muestras de excremento de aves (Pakshir et al, 2018). A pesar de ser las dos especies mencionadas las más prevalentes y estudiadas del género *Cryptococcus*, la mayoría de especies del género se consideran no patógenas y no representan ninguna clase de riesgo ni para seres humanos ni para animales domésticos. Por ejemplo, *Cryptococcus laurentii* además de ser una especie no

patógena, es reconocida por la capacidad de inhibición que presenta en el desarrollo de otros hongos perjudiciales para diversos tipos de fruta. Frutos como tomates, peras, manzanas, melocotones y fresas que naturalmente albergan a *Cryptococcus laurentii* dentro de su microbiota, presentan resistencia a enfermedades fúngicas post-cosecha. Se conoce que *Cryptococcus laurentii* induce una sobre-expresión en los genes relacionados con la producción de etileno en las frutas, compuesto que promueve la protección e inmunización de la fruta contra otros microorganismos patógenos (Tong et al, 2019). *Cryptococcus surugaensis* fue aislado por primera vez en sedimento marino por Nagahama y colaboradores en 2003. Sin embargo, diversos estudios posteriores han logrado detectar al microorganismo y a otras especies del género, en suelos de distintos ecosistemas, desde suelos desérticos hasta suelos selváticos (Vishniac, 2006). Diversas especies de *Cryptococcus* han sido aisladas de colibríes, aves que se alimentan del néctar de las flores, nuevamente indicándose la presencia de algunas especies de este género en flores tropicales (Belisle et al, 2014). De acuerdo a lo mencionado, se puede inferir que el género *Cryptococcus* está conformado por microorganismos ambientales. Tanto las especies patógenas para seres humanos y animales domésticos, como aquellas que no lo son, han sido aisladas e identificadas en ecosistemas y ambientes naturales (árboles, flores, hojas, frutos, suelos). El murciélago del cual fue aislado este microorganismo en el presente estudio fue *Vampyressa melissa*. Esta especie de murciélago se distribuye en las estribaciones orientales de los Andes del Norte, en Colombia, Ecuador y Perú. En Ecuador se distribuye en la amazonía alta. La muestra de *Vampyressa melissa* en la cual se detectó *Cryptococcus surugaensis* fue recolectada en la EBT, amazonía ecuatoriana. Como todas las especies de este género, *Vampyressa melissa* es un murciélago frugívoro tal como se ha expuesto en la base de datos como resultado de la recolección y clasificación de muestras en apartados anteriores (Romero, 2018). *Vampyressa melissa* puede ingerir frutos contaminados con la levadura, que estén en las proximidades de un árbol, hojas o flores que contengan el

microorganismo (esta levadura se dispersa al ambiente, pues las especies patógenas se transmiten por inhalación del microorganismo en cuestión de fuentes naturales). Los frutos que ingieren estos animales pueden estar contaminados con excremento de ave que contenga la levadura, algo completamente probable en ambientes selváticos como lo es la EBT, y por ende, se produciría una ingestión accidental del mismo. Mediante las heces, los murciélagos podrían actuar como potenciales transmisores y dispersores de estas dos especies de *Cryptococcus* patógenas, al otros organismos estar en contacto con las mismas. El Yasuní ecuatoriano es una zona en donde la actividad y presencia humana está muy limitada, por ende, a pesar de existir riesgo de transmisión de criptococosis a humanos por las dos especies patógenas del microorganismo, ésta no puede darse con frecuencia o con alta probabilidad en esta zona, puesto que la presencia humana es casi inexistente. Otras especies de *Cryptococcus* antes mencionadas, se encuentran de manera natural en diversos tipos de frutos. Al el murciélago alimentarse de ellos, ingiere la levadura y se produce una detección del mismo a nivel gastrointestinal. *Cryptococcus spp.* ha sido aislada de flores tropicales. Si *Vampyressa melissa* se alimenta de frutos tropicales que provienen de una flor tropical o que estén cercanos a la misma, pueden estar en contacto con la levadura e ingerirla. Algunas otras especies de *Cryptococcus* han sido aisladas de suelos (*Cryptococcus surugaensis* siendo una de ellas). Si el murciélago se alimenta de frutos que están en contacto con el suelo, ingiere el hongo y de igual manera se produce su detección e identificación a nivel intestinal. En estos dos últimos casos las especies no son patógenas, por ende el riesgo de transmisión es inexistente. Como se habían mencionado, *Cryptococcus surugaensis* fue por primera vez aislado de sedimento marino. La muestra de heces en donde fue identificado este microorganismo fue recolectada en un saladero de la EBT. El suelo de los saladeros es rico en minerales, especialmente en sodio, hierro y calcio. La salinidad de estos suelos es elevada al igual que sucede con los suelos del fondo marino. *Cryptococcus surugaensis* puede ser una levadura tolerante a elevados

niveles de salinidad y que incluso requiera de estos niveles para vivir adecuadamente. *Vampyressa melissa* en el caso de esta muestra, vive en lugares próximos o en el mencionado saladero. Puede entonces, haberse establecido un contacto con la levadura si el murciélago se alimenta del saladero o simplemente por contacto con el microorganismo por fuentes ambientales.

*Starmerella spp.*, con su especie mayormente conocida *Starmerella bombicola* o *Candida bombicola* es una levadura perteneciente al orden Saccharomycetales, que fue por primera vez identificada en la miel de *Bombus sp.* (abejorros). En un estudio para determinar la diversidad de levaduras asociada a flores de la familia Convolvulaceae y sus insectos asociados, se identificaron siete cepas de levaduras haploides heterotálicas que producían una única ascospora con superficie compleja. Los análisis moleculares realizados determinaron que estas cepas de levaduras estaban estrechamente relacionadas con *Candida bombicola*. Se determinó que *Candida bombicola* formaba ascosporas viables cuando se mezclaba con la nueva especie descubierta. A partir de aquí, nace la especie *Starmerella bombicola* a manera de acomodar uno de los estados sexuales de *Candida bombicola*, que no estaba emparentada a ningún género de levaduras productoras de ascosporas (Rosa y Lachance, 1998). *Starmerella* es un género que en los últimos años ha desarrollado una importancia biotecnológica e industrial debido a su capacidad de producción de surfactantes soforolípidos (Amoikon et al, 2018). En el Guyana Francesa, se realizó un estudio con el objetivo de analizar la diversidad de levaduras en diversos tipos de flores de la zona. Para este estudio se recolectaron muestras de diversos substratos como plantas, flores, frutas, hongos, animales, insectos y el ambiente (aire, suelo, agua) (Amoikon et al, 2018). Se realizaron diversos análisis moleculares a partir de los cuales se aislaron dos cepas de levaduras nuevas de flores tropicales que se determinó pertenecían al género *Starmerella*. Estas dos cepas fueron descritas como *Starmerella reginensis* y *Starmerella kourouensis* (Amoikon et al, 2018). *Starmerella bombicola* fue

igualmente identificada en flores de *Calystegia sepium*, una especie de enredadera. Otras especies de *Starmerella* han sido aisladas de flores en países como China, Siria, Tailandia, Brasil, Costa Rica, Malasia e Irán. Algunas especies del clado *Starmerella* han sido aisladas de polen, miel y abejas (Amoikon et al, 2018). Sin embargo es difícil determinar si el origen de las levaduras proviene de las flores o de sus vectores, como insectos u otros animales que se alimentan de ellas o las polinizan (Amoikon et al, 2018). Unos pocos individuos del género *Trigona*, un género de abejas, recolectados de diversos tipos de flores, albergan diversas especies de levaduras entre las cuales están diversas especies del género *Starmerella* Teixeira et al, 2003). La especie de murciélago en la cual se identificó este microorganismo es *Carollia perspicillata*. Esta especie habita en América Central y del Sur en bosques húmedos tropicales y bosques deciduos secos. Son murciélagos primordialmente frugívoros (se alimentan de más de 50 especies diferentes de frutos), pero pueden consumir polen, néctar y en ocasiones insectos. Son importantes polinizadores y dispersores de semillas (Cloutier y Thomas, 1992). La muestra en donde fue detectada *Starmerella spp.* fue recolectada de la especie de murciélago antes mencionada en la EBT, ecosistema de bosque húmedo tropical, en donde existe elevada prevalencia de poblaciones de esta especie de murciélago. *Starmerella spp.* ha sido aislada de flores tropicales y otro tipo de flores en diversos países alrededor del mundo. *Carollia perspicillata* se alimenta principalmente de frutos, pero, como se ha mencionado puede alimentarse de polen y néctar de flores. En el momento en el que el murciélago se alimenta del néctar o polen de una flor y si existe la levadura o sus esporas en la flor de la que se alimenta, automáticamente, éste está consumiendo al microorganismo o a las ascosporas del mismo y es por ello que puede haberse dado la detección de este microorganismo a nivel intestinal en la muestra de heces del murciélago.

*Trechispora alnicola* y *Dischosterum pallescens* son dos especies de hongos macroscópicos que han sido identificadas en dos muestras procesadas de heces de murciélagos en el presente

estudio. Ambas especies son hongos ambientales que se han aislado, de acuerdo a lo expuesto en diversos estudios, de madera de árboles. Al parecer, cumplen un papel muy importante en la descomposición de la madera (Küffer y Senn-Irlet, 2005; Juutilainen et al, 2017; Irbe et al, 2012; Pearce y Malajzuk, 1990; Gilbertson y Bigelow, 1998). La especie de murciélago del cual fue aislada *Trechispora alnicola* fue *Vampyriscus bidens*. Este murciélago vive en bosques húmedos tropicales amazónicos y en bosques piemontanos orientales. Esta especie, al igual que las demás de su género, es frugívora y se refugia bajo hojas de arboles de gran tamaño y palmas (Romero, 2018). La especie de murciélago del cual fue aislado *Dichostereum pallescens* fue *Sturnira magna*. Este murciélago vive en bosques húmedos tropicales y en bosques piemontanos orientales. Esta especie, al igual que las demás de su género, son murciélagos frugívoros e importantes dispersores de semillas de los géneros *Piper* y *Solanum*. Se refugian en cuevas, túneles, alcantarillas, casas abandonadas, árboles huecos y hojas de palmas (Romero, 2018). Como se ha mencionado, ambas especies de murciélagos son frugívoros y se refugian en hojas de arboles, en el caso de *Vampyriscus bidens* y en árboles huecos en el caso de *Sturnira magna*. Se mencionan estos dos refugios debido a que pueden ser los mayormente relacionados con el hecho de haber identificado a *Trechispora alnicola* y *Dischostereum pallescens* en las muestras recolectadas de estas dos especies de murciélago respectivamente. *Trechispora alnicola* y *Dischostereum pallescens* producen esporas como mecanismo de reproducción y dispersión. Si *Vampyriscus bidens* se refugia en las hojas de un árbol cuya madera está colonizada por *Trechispora alnicola* puede tener contacto con las mismas e ingerirlas de manera accidental. De igual manera, si *Vampyriscus bidens* se alimenta de frutos de un árbol colonizado por *Trechispora alnicola*, los frutos pueden tener esporas del hongo y de esta manera el murciélago las ingiere haciéndose posible la detección a nivel intestinal del hongo. Lo mismo sucede para el caso de *Sturnira magna* y *Dichostereum pallescens*. Por otro lado, *Sturnira magna* se refugia en árboles huecos. Si el árbol en el cual

se refugia este murciélago tiene colonizada su madera por *Dichostereum pallescens*, el murciélago puede estar en contacto con las esporas del hongo e ingerirlas de manera accidental.

En el presente estudio se puede observar que, a pesar de haberse utilizado primers específicos para parásitos intestinales del Filo Apicomplexa, la mayoría de las muestras que presentan positividad después de haber sido analizadas molecularmente, arrojan resultados de identificación de microorganismos/organismos muy diferentes a lo que se esperaba encontrar. Los hongos están filogenéticamente muy distantes de eucariotas del Filo Apicomplexa. Los primers fueron sintetizados para su utilización en este estudio a partir de secuencias existentes publicadas en fuentes bibliográficas confiables (Yang et al, 2014). Por ello, deberían haber arrojado resultados con la especificidad que éstos indicaban. Al realizar un Nucleotide Blast en el NCBI de la secuencia de los primers forward y reverse por separado e independientemente para cada organismo detectado e identificado en este estudio, la secuencia de ambos primers muestra porcentajes de identidad superiores al 92%. Para *Eimeria spp.*, no existen variaciones entre la secuencia genética del microorganismo y el primer forward en el lugar en donde éste se pega (100% de identidad). Para el primer reverse existen dos variaciones (92% de identidad). Estos dos resultados arrojan un 96% de complementareidad e identidad entre ambos primers y la secuencia genética del microorganismo. Para *Cryptococcus surugaensis* existe tan solo una variación entre la secuencia genética del microorganismo y el primer forward, en el lugar en donde éste se pega (96% de identidad). Para el primer reverse existen dos variaciones (92% de identidad). Estos dos resultados arrojan un 94% de complementareidad e identidad entre ambos primers y la secuencia genética del microorganismo. Para *Starmerella spp.* existen dos variaciones entre la secuencia genética del microorganismo y el primer forward, en el lugar en donde éste se pega (92% de identidad). Para el primer reverse existen igualmente dos variaciones (92% de identidad). Estos dos resultados arrojan un 92% de complementareidad e identidad entre ambos primers y la secuencia genética del microorganismo. Para *Dichostereum*

*pallescens* y *Trechispora alnicola* existe tan solo una variación entre la secuencia genética de los organismos y el primer forward, en el lugar en donde éste se pega (96% de identidad). Para el primer reverse existen dos variaciones (92% de identidad). Estos dos resultados arrojan un 94% de complementareidad e identidad entre ambos primers y la secuencia genética del microorganismo. Para *Hepatozoon spp.*, no existen variaciones entre la secuencia genética del microorganismo y el primer forward en el lugar donde éste se pega (100% de identidad). Para el primer reverse existen dos variaciones (92% de identidad). Estos dos resultados arrojan un 96% de complementareidad e identidad entre ambos primers y la secuencia genética del microorganismo. Esto puede tener diversas explicaciones. La región de la subunidad pequeña del ADN ribosomal (18S) seleccionada para la amplificación por PCR en este estudio, está muy conservada. De acuerdo a los resultados obtenidos en el GenBank al hacer el BLAST de las secuencias obtenidas en el laboratorio para obtener una identificación acertada del microorganismo detectado, todas las secuencias correspondientes a las identificaciones resultaron ser de la región codificante del gen 18S (codifica para ARN ribosomal). La región codificante del 18S es una región muy conservada entre los eucariotes. Las regiones ITS (Internal Transcribed Spacers) son regiones más variables del 18S, posteriores a su región codificante. Estas regiones variables nos permiten realizar clasificaciones taxonómicas específicas debido a que esas variaciones evolutivas en las secuencias genéticas marcan la diferencia entre distintos tipos de organismos. Las diferencias entre las tasas evolutivas de las diferentes regiones del 18S, hacen que este marcador sea apto para inferir relaciones filogenéticas entre especies cercanas (variaciones indican cambio y diversidad) o linajes basales (regiones más conservadas (codificantes)). A pesar de esto el gen 18S sigue siendo una de las regiones más conservadas del genoma eucariote. La región codificante del 18S tiene diversos dominios, unos muy conservados entre eucariotes y otros menos. Probablemente los primers seleccionados están sintetizados en base a una secuencia genética de uno de estos

dominios muy conservados de la región codificante del 18S. Por otro lado, la región codificante del 18S para el Filo Apicomplexa tiene alrededor de 1800pb. Se amplificó un segmento pequeño de 300pb. Es claro que, en el caso de que la secuencia de los primers fuera sintetizada en base a uno de estos dominios muy conservados de la región codificante del 18S, estos primers servían para amplificar regiones internas (entre los primers) de dominios variables de la región codificante del 18S, por eso la enorme variabilidad de organismos que se logró amplificar con estos primers. Recordemos que las variaciones y la evolución es lo que marca las diferencias claras entre distintas especies. Cuando se realizaron los pasos pertinentes para la selección de los primers antes de comenzar con los ensayos, los primers fueron introducidos en el BLAST del NCBI para asegurar su fidelidad para amplificación de parásitos del Filo Apicomplexa. El primer forward se pegaba en algunos géneros y especies distintas del Filo Apicomplexa. El primer reverse por otro lado, era específico para *Cryptosporidium spp.*, un parásito apicomplejo. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, el porcentaje de complementareidad para los dos primers en cada una de las especies encontradas en este estudio es mayor al 92% para todas ellas. Esto implica que existe un máximo de dos variaciones para cada primer en cada uno de los organismos identificados. Esto nos lleva entonces, a un mal diseño de primers por parte de los investigadores que hicieron su síntesis o a condiciones inadecuadas de PCR. En cuanto a esto último, antes de estandarizar un protocolo de amplificación, se calcularon las temperaturas de melting de ambos primers, siendo para el forward 64°C y para el reverse 66°C. La temperatura de annealing ideal para un primer está unos 5°C por debajo de la temperatura de melting. Siendo así la temperatura ideal de annealing del primer forward de 59°C y del primer reverse de 61°C. Un promedio de ambas resulta en una temperatura de annealing para todo el protocolo de 60°C. Un solo mismatch en la complementareidad de los primers y la secuencia molde, produce una baja de la temperatura de annealing de 5°C aproximadamente. Existían hasta un máximo de dos mismatches entre los

primers y los moldes de acuerdo a lo obtenido y expuesto anteriormente en el primer BLAST para casa uno de los organismos identificados. Esto produce una baja de la T° de annealing produciéndose entonces reacciones inespecíficas.

## 9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Para los parásitos del Filo Apicomplexa identificados en las distintas especies de murciélagos, se ha establecido una relación entre el microorganismo encontrado y la ecología y biogeografía del murciélago en donde fueron detectados. De igual manera, se ha establecido una relación entre la enfermedad que puede causar el parásito identificado y en qué organismos puede causarla y la ecología y biogeografía del murciélago en el que fue detectado dicho parásito.
- La presencia de *Eimeria spp.* en una sola especie de murciélago de la costa ecuatoriana, sugiere que, a medida que los murciélagos viven más próximos a zonas urbanas o semi-urbanas la probabilidad de que sean portadores de parásitos patógenos para animales domésticos o seres humanos incrementa.
- *Hepatozoon spp* fue identificado en una sola especie de murciélago de la EBT. Este es un parásito apicomplejo que infecta a una enorme variedad de mamíferos, especialmente mamíferos carnívoros. El hallazgo de este parásito en un ambiente pristino como lo es la EBT nos da una pauta para deducir que, este parásito puede no solamente estar presente en animales domésticos sino también en mamíferos salvajes y puede estar causando cierto tipo de impacto en la fauna silvestre de este tipo de ecosistemas. Las levaduras y hongos hallados e identificados, son todos microorganismos y organismos ambientales lo que implica que, al ser la dieta de los murciélagos tan variada, pueden estar en contacto constante con este tipo de levaduras y hongos ambientales. De igual manera, trabajar con muestras de heces implica una

alta probabilidad de contaminación de las mismas con microorganismos ambientales. Las muestras de heces deberían ser tomadas con mayor dedicación y cuidado y sobretodo intentando recolectar para cada muestra una cantidad considerable de heces puesto que, las concentraciones de ADN posteriores a la extracción en aquellas muestras en donde era muy reducida la cantidad de heces recolectada, eran muy bajas y esto en cierto modo afecta los resultados de aplicaciones posteriores de análisis molecular

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, P y Fetterer, H. 2002. *Recent advances in Biology and Immunobiology of Eimeria Species and in Diagnosis and Control of Infection with these Coccidian Parasites in Poultry*. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 15 No. 1 pp 58-65
- Amoikon, T et al. 2018. *Starmerella reginensis f.a., sp. nov. and Starmerella kourouensis f.a., sp. nov., isolated from flowers in French Guiana*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. No. 68 pp 2299-2305
- Belisle, M; et al. 2014. *temporal variation in fungal communities associated with tropical hummingbirds and nectarivorous bats*. Fungal Ecology. No. 12 pp. 44-51
- Cloutier, D y Thomas, D.W. 1992. *Carolia perspicillata: Mammalian Species*. No 417. pp 1 - 9
- De Azevedo Gomes, L et al. 2018. *Genetic diversity of Hepatozoon spp. In Hydrochoerus hydrochaeris and Pecari tajacu from eastern Amazon*. Tick and Tick-borne Diseases. No.9. pp. 314-218
- Dodd, N et al. 2014. *Toxoplasma gondii: Prevalence in species and genotypes of British bats (Pipistrellus pipistrellus and P. pygmaeus)*. Experimental Parasitology Vol.1 No. 139. pp 6-11.

- Duszynski, D et al. 1999. *Eimeria from bats of Bolivia: Two new species from Vespertilionid bats*. Journal of Parasitology. Vol.3 No. 85. pp. 504-507
- Falconaro, A et al. 2018. *Helminth communities of two populations of Myotis chiloensis (Chiroptera:Vespertilionidae) from Argentinian Patagonia*. International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife. Vol 1 No. 7. pp 27-33.
- Faria, R et al. 2015. *Chapter 15: Opportunistic infection and Autoimmune diseases. Cryptococcus species*. Infection and Autoimmunity. Second edition. Academic Press. pp 251-277
- Galvao-Dias, M et al. 2011. *Isolation of Histoplasma capsulatum from bats in the urbana rea of Sao Paulo state, Brazil*. Epidemiol. Infect. Cambridge University Press. No. 139. pp. 1642-1644
- Gay, N et al. 2014. *Parasite and viral species richness of Southeast Asian bats: Frangmentation of área and distribution matters*. International Journal of Parasitology: Parasites and wildlife. Vol.1 No.3. pp.161-170.
- Gilbertson, R y Bigelow, D. 1998. *Annotated checklist of wood-rotting Basidiomycetes of Sky Islands in Southeastern Arizona*. Journal of the Arizona – Nevada Academy of Science. Vol 31. No. 1 pp. 13-36
- Irbe, I et al. 2012. *Biodeterioration of external wooden structures of the latvian cultural heritage*. Journal of Cultural Heritage. No. 13S. pp S79-S84
- Juutilainen, K et al. 2017. *Resource use of wood-inhabiting fungi in different boreal forest types*. Fungal Ecology. No. 27 pp 96-106
- Khan, A et al. 2018. *Genomics and molecular epidemiology of Cryptosporidium species*. Acta tropica. Vol. 1 No. 184. pp. 1-14.
- Küffer, N y Senn-Irley, B. 2005. *Diversity and ecology of wood-inhabiting aphylloroid basidiomycetes on fallen woody debris in various forest types in Switzerland*. Mycological Progress. Vol. 4. No.1 pp. 77-86

- Kvác, M et al. 2015. *Novel Cryptosporidium bat genotypes III and IV in bats from the USA and Czech Republic*. Parasitol Res Vol. 1 No. 114 pp. 3917-3921.
- Maestrone, C et al. 2015. *Genetic and pathological characteristics of Cryptococcus gattii and Cryptococcus neoformans var. neoformans from meningoencephalitis in autochthonous goats and mouflons Sardinia, Italy*. Veterinary Microbiology. No. 177 pp. 409-413
- McAllister, C y Upton, J. 2009. *Two new species of Eimeria (Apicomplexa: Eimeriidae) from Eastern red bats, Lasiurus borealis (Chiroptera: Vespertilionidae), Arkansas and North Carolina*. Journal of parasitology. Vol. 4 No. 95. pp. 991-993
- Ministerio de Ambiente del Ecuador. 2013. *Sistema de Clasificación de los Ecosistemas del Ecuador Continental*. Quito, Ecuador, Subsecretaría de Patrimonio Natural.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. 2015. *Sistema Nacional de Áreas Protegidas: Parque Nacional Machalilla*. Quito, Ecuador, Subsecretaría de Patrimonio Natural.
- Morrisette, N y Sibley, L. 2002. *Cytoskeleton of apicomplexan parasites*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 66. No.1 pp 21-38
- Murakoshi, F et al. 2016. *Detection and molecular characterization of Cryptosporidium and Eimeria species in Philippine bats*. Parasitol Res Vol. 1 No. 115 pp. 1863-1869.
- Muñoz, P et al. 2011. *Detección de Cryptosporidium spp. en terneras de lecherías de la Región Metropolitana mediante Ziehl Neelsen y confirmada por inmunocromatografía y ensayo molecular*. Archivos Médicos Veterinarios. Vol.1 No. 43 pp 111 – 116.
- Nagahama, T et al. 2003. *Cryptococcus surugaensis sp.nov., a novel yeast species from sediment collected on the deep sea floor of Suruga bay*. Internatioanl Journal of Sistematic and Evolutionary Microbiology. No. 53 pp. 2095-2098
- O'Dwyer, H. 2011. *Brazilian canine hepatozoonosis*. Revista Brasileira de Parasitología Veterinaria. Vol. 20 No. 3 pp 181-193

- Oliveira de Macedo, L et al. 2019. *Morphological and epidemiological data on Eimeria species infecting small ruminants in Brazil*. Small Ruminant Research. No. 17. pp. 37-41
- Orkun, O y Nalbantoğlu, S. 2018. *Hepatozoon canis in turkish red foxes and their ticks*. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports. No. 13. pp. 35-37
- Pakshir, K et al. 2018. *Molecular epidemiology of environmental Cryptococcus species isolates based on amplified fragment length polymorphism*. Journal de Mycologie Médicale. No. 28. pp. 599-605
- Parnell, N et al. 2008. *Protozoal infection*. Handbook of Small Animal Practice. Saunders. Fifth Edition.
- Pearce, M.H y Malajczuk, N. 1990. *Stump colonization by Armillaria luteobubalina and other wood decay fungi in an age series of cut-over stumps in karri (Eucalyptus diversicolor) regrowth forests in south-western Australia*. The New Phytologist. Vol 115. No. 1 pp. 129-138
- Pinto, M et al. 2013. *Hepatozoon parasites (Apicomplexa:Adeleorina) in bats*. Journal of Parasitology Vol. 4 No.99. pp. 722-724.
- Romero, V., Vallejo, A. F., Boada, C. 2018. *Amorphochilus schnablii*. Mamíferos del Ecuador. Versión 2018.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <https://bioweb.bio/faunaweb/mammaliaweb/FichaEspecie/Amorphochilus%20schnablii>,
- Romero, V. 2018. *Gardnerycteris crenulatum*. Mamíferos del Ecuador. Versión 2018.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <https://bioweb.bio/faunaweb/mammaliaweb/FichaEspecie/Gardnerycteris%20crenulatum>, acceso Martes, 16 de Abril de 2019. acceso Jueves, 11 de Abril de 2019.
- Romero, V 2018. *Vampyressa melissa*. Version 2018.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <https://bioweb.bio/faunaweb/mammaliaweb/FichaEspecie/Vampyressa%20melissa>, acceso Domingo, 21 de Abril de 2019.

- Rosa, C y Lachance, M.A. 1998. *The yeast genus Starmerella gen. nov. and Starmerella bombicola sp. nov. the teleomorph of Candida bombicola (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow.* International Journal of Systematic Bacteriology. No. 48. pp. 1413-1417
- Santana-Lima V, et al. 2018. *Survey of helminthes and protozoa of free-living Neotropical bats from Northeastern Brazil.* Acta Tropica. Vol.1 No. 185. pp 267-272
- Sharma, D et al. 2018. *Discrimination, molecular characterisation and phylogenetic comparison of porcine Eimeria spp. in India.* Veterinary Parasitology. No. 255. pp. 43 – 48
- Tang, Q et al. 2019. *Cryptococcus laurentii controls gray mold of cherry tomato fruit via modulation of ethylene-associated immune responses.* Food Chemistry. No. 278. pp 240-247
- Texeira, A et al. 2003. *Starmerella meliponinorium sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. No. 53. pp. 339-343
- Valenciano, A et al, 2014. *White Blood Cells: Atlas of Canine and Feline Peripheral Blood Smears.* Mosby. 1<sup>st</sup> edition.
- Vanderwolf, K et al. 2013. *Ectomycota associated with hibernating bats in Eastern Canadian caves prior to the Emergence of White-nose syndrome.* Northeastern naturalist. Vol.1 No. 20. pp. 115-130
- Vishniac, H. 2006. *A multivariate analysis of soil yeasts isolated from latitudinal gradient.* Microbial Ecology. Vol. 52 pp. 90 -103
- Wang, W et al 2013. *Molecular characterization of Cryptosporidium in bats from the Yunnan Province, Southwestern China.* Journal for Parasitology. Vol 6. No.99 pp. 1148-1150.
- Yang, R et al. 2014. *Comparison of next-generation droplet digital PCR (ddPCR) with quantitative PCR (qPCR) for enumeration of Cryptosporidium oocysts in faecal samples.* International Journal for Parasitology. Article in press. No of pages: 9.

## 11. ANEXOS

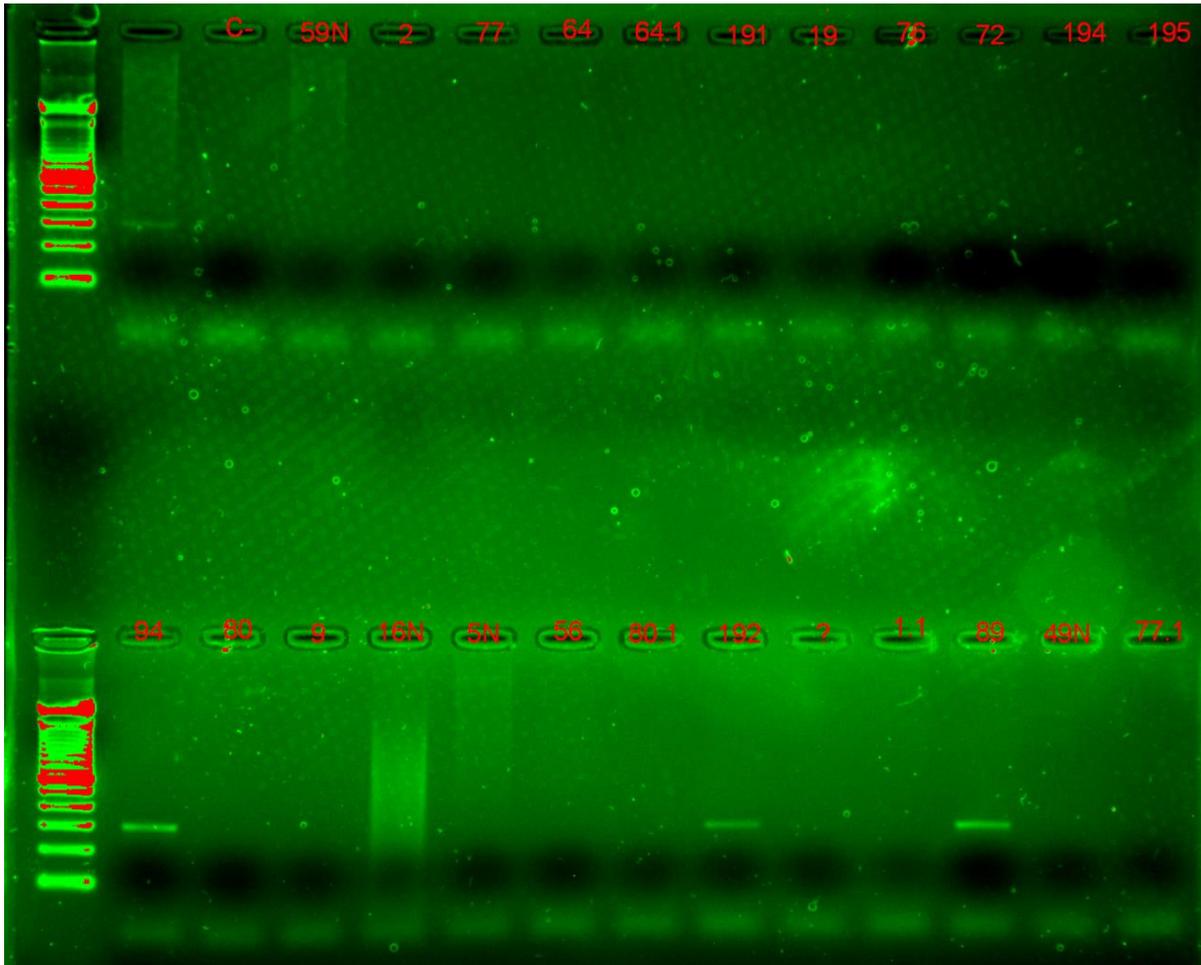
**ANEXO 1.- Protocolo de Extracción de ADN – Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc.)**

1. Se agregan 0.25 gramos de la muestra a extraer en tubos PowerBead provistos en el kit de extracción.
2. A continuación se colocan 750µl de Bead Solution dentro de los tubos PowerBead que contienen los 0.25 gramos de la muestra.
3. Se revisa la solución C1. Si la solución C1 está precipitada, se calienta a 60°C hasta que se disuelva por completo.
4. Se colocan 60µl de la solución C1 a cada uno de los tubos. Se colocan en el vortex por unos segundos.
5. Se colocan los tubos PowerBead horizontalmente en un vortex mediante un adaptador MO BIO. Se mezclan a máxima velocidad por 10 minutos.
6. Se colocan los tubos PowerBead en una microcentrífuga y se centrifugan a 10 000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente.
7. Se transfiere el sobrenadante a tubos nuevos de 2mL provistos en el kit.
8. Se añaden 250µl de la solución C2 a cada uno de los tubos y se colocan en el vortex por 5 segundos. Se incuban los tubos a 4°C por 5 minutos.
9. Se centrifugan los tubos nuevamente a 10 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
10. Se transfieren 600µl de sobrenadante a tubos nuevos de 2mL.
11. Se añaden 200µl de solución C3 y se mezclan brevemente los tubos. Se incuban a 4°C por 5 minutos.
12. Los tubos se centrifugan a 10 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
13. Se transfieren 750µl del sobrenadante a un nuevo tubo de 2mL.
14. Se mezcla la solución C4 y se añaden 1200µl de la misma a cada uno de los tubos. Se colocan los tubos en el vortex por 5 segundos.

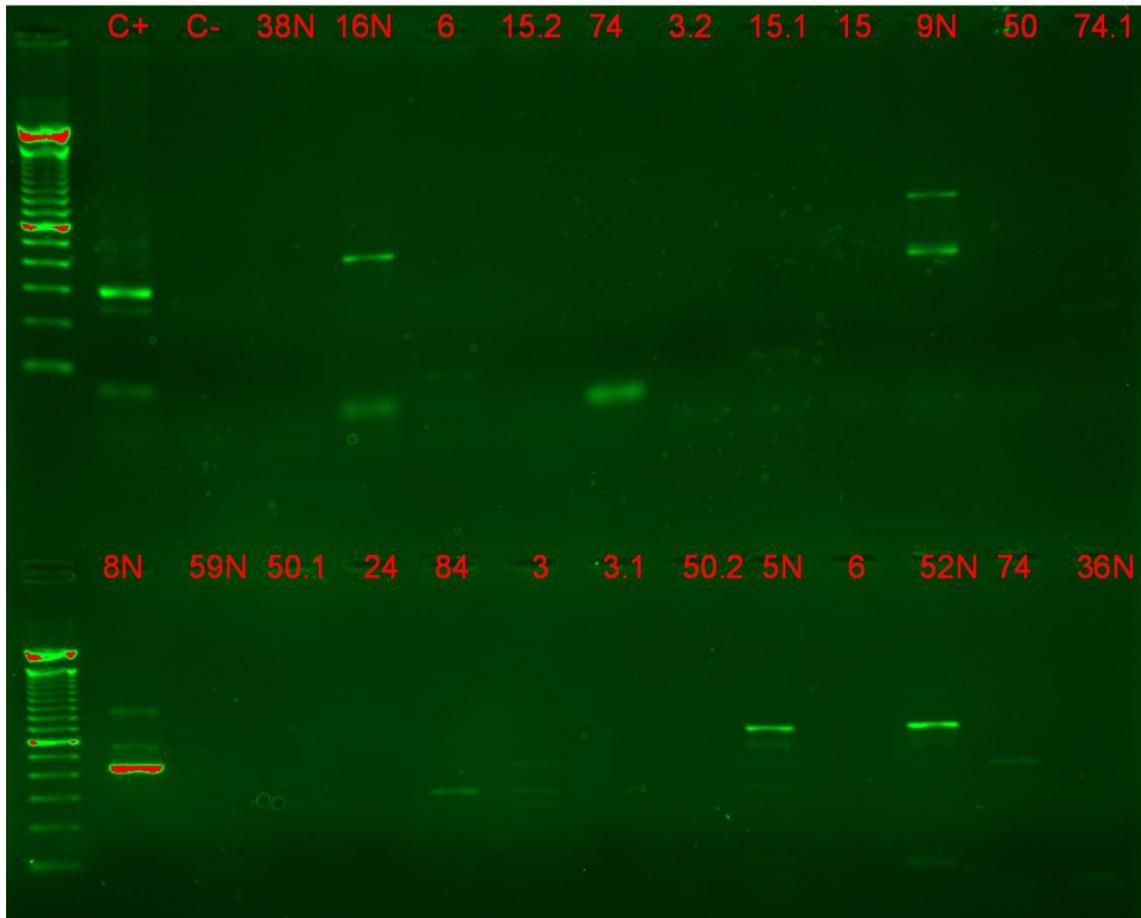
15. En una columna, se colocan aproximadamente 675µl de la solución del paso anterior, se centrifugan los tubos a 10 000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se descarta el flujo que queda en el tubo de recolección por debajo de la columna. Se repite este paso 3 veces o hasta que se haya terminado en su totalidad el contenido de cada uno de los tubos del paso anterior.
16. Se añaden en la columna 500µl de la solución C5 y se centrifuga a 10 000 x g y a temperatura ambiente por 30 segundos.
17. Se descarta el flujo.
18. Se centrifugan nuevamente los tubos a 10 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
19. Cuidadosamente, se coloca la columna en un nuevo y limpio tubo de 2mL. Se debe evitar salpicar cualquier cantidad de solución C5 a la columna.
20. Se colocan 100µl de solución C6 dentro de la columna justo en el centro del filtro de la misma.
21. Se centrifugan los tubos a temperatura ambiente a 10 000 x g durante 30 segundos.
22. Se descarta la columna. El ADN queda dentro del tubo listo para aplicaciones posteriores.

Nota: Usar guantes en todo momento. Materiales como tubos y puntas de micropipetas, deben ser autoclavados previamente a la realización del procedimiento.

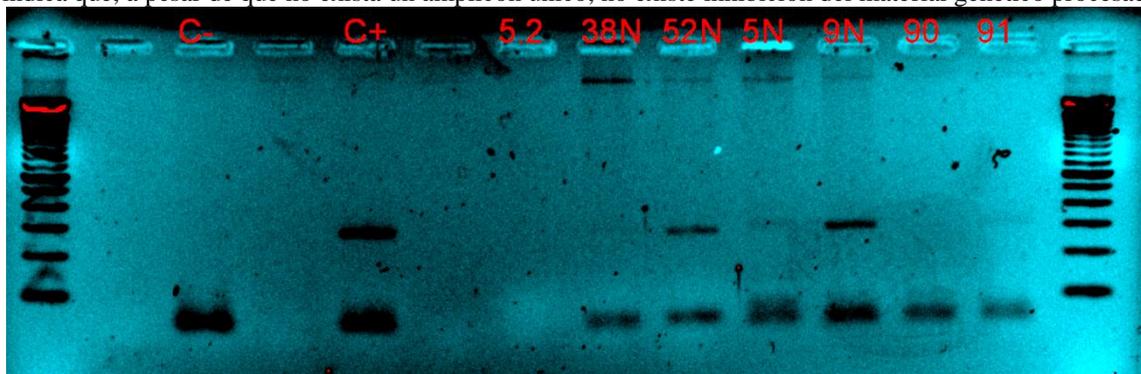
**ANEXO 2.- Imágenes de Electroforesis en Gel de Agarosa al 1.5% de los resultados obtenidos.**



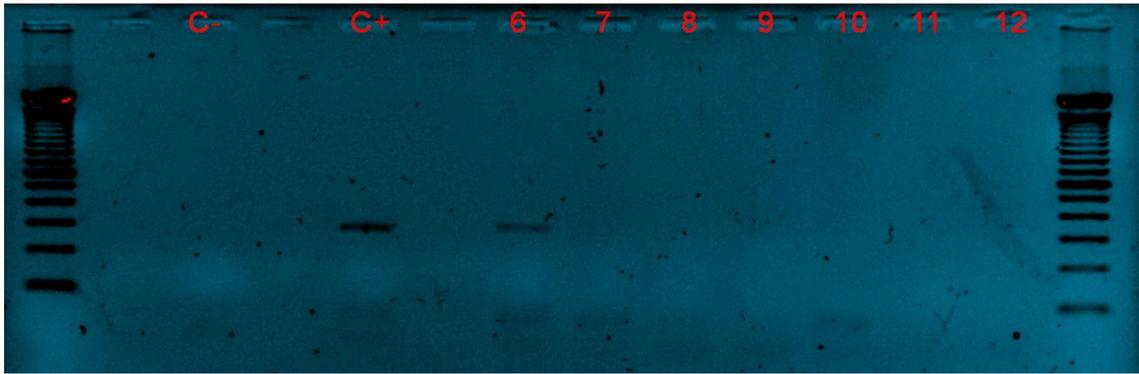
**Figura 1:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los resultados obtenidos para la amplificación por PCR del gen de la  $\beta$ -actina partir de muestras de heces de murciélagos. C-: control negativo, C+: control positivo, de 59N a 77.1: muestras de ADN genómico procesadas. Se muestra como resultado positivo una banda de aproximadamente 300pb.



**Figura 1:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los resultados obtenidos para la amplificación por PCR del gen de la  $\beta$ -actina partir de muestras de heces de murciélagos. C-: control negativo, C+: control positivo, de 59N a 77.1: muestras de ADN genómico procesadas. Se muestran bandas inespecíficas de entre 300pb y 600pb. Esto indica que, a pesar de que no exista un amplicón único, no existe inhibición del material genético procesado.



**Figura 3:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los resultados obtenidos para la amplificación por PCR de la región 18S del ADN ribosomal para parásitos del Filo Apicomplexa a partir de muestras de heces de murciélagos. C-: control negativo, C+: control positivo, de 5.2 a 9: muestras de ADN genómico procesadas. Se muestra como resultado positivo una banda de aproximadamente 300pb.



**Figura 4:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los resultados obtenidos para la amplificación por PCR de la región 18S del ADN ribosomal para parásitos del Filo Apicomplexa a partir de muestras de Heces de murciélagos. C-: control negativo, C+: control positivo, de 6 a 12: muestras de ADN genómico procesadas. Se muestra como resultado positivo una banda de aproximadamente 300pb.