

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Ambientales y Biológicas

Identificación de helmintos intestinales en lobos marinos (*Zalophus wollebaeki*) de la isla San Cristóbal, Galápagos.

Génesis Karina Villarreal Guevara

Biología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera Bióloga

Quito, 22 de diciembre de 2022

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Identificación de helmintos intestinales en lobos marinos (*Zalophus wollebaeki*)
de la isla San Cristóbal, Galápagos.

Génesis Karina Villarreal Guevara

Nombre del profesor, Título académico

Sonia Zapata Mena, PhD.

Quito, 22 de diciembre de 2022

© 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 la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Génesis Karina Villarreal Guevara

Código: 00206372

Cédula de identidad: 1500765985

Lugar y fecha: [OBJ] Quito, 22 de diciembre de 2022

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

La especie de lobo marino *Zalophus wollebaeki* es representativa de la fauna silvestre de las islas Galápagos, y un claro ejemplo de la interacción de ecosistemas marino y terrestre. En los últimos años, ha habido un preocupante decrecimiento de su población, y uno de los factores que influye en esto podría ser las parasitosis de estos animales. Por lo cual, el objetivo de este estudio fue identificar parásitos intestinales de los lobos marinos de San Cristóbal. Se analizó 48 muestras de heces a través de métodos coprológicos directos y de concentración, y se encontró una alta prevalencia de parásitos de la familia Diphylobothriidae (56%), seguido por Anisakidae (24%) y Ancylostomidae (20%). A la vez, se logró identificar por métodos moleculares helmintos adultos correspondientes a *Adenocephalus pacificus*, *Diphylobothrium sprakeri* y *Philophtalmus gralli*. Los cuales han sido reportados en pinnípedos del continente y a nuestro conocimiento, el último de ellos se reporta por primera vez a nivel de especie.

Palabras clave: Parasitosis, lobos marinos, Diphylobothriidae, Anisakidae, Ancylostomidae.

ABSTRACT

Zalophus wollebaeki is a sea lion specie which is representative of the wildlife on the Galápagos Islands. It is also a clear example of the interactions between land and sea ecosystems. In the last few years, we have evidenced an alarmingly decrease of their population. We suspect that one of the factors that could be affecting the population is the presence of intestinal parasites. Therefore, our objective was to identify intestinal parasites on sea lions from San Cristobal. We analyzed 48 feces samples through direct and concentrate coprological methods. We found a high prevalence of parasites from the family Diphylobothriidae (56%), followed by Anisakidae (24%) and Ancylostomidae (20%). In addition, using molecular methods we were able to identify the presence of adult helminths corresponding to *Adenocephalus pacificus*, *Diphylobothrium sprakeri* and *Philophtalmus gralli*. The last one mentioned has been previously reported on land pinnipeds, but it's the first time they have been identified as specie.

Key words: Parasitism, sea lion, Diphylobothriidae, Anisakidae, Ancylostomidae.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	11
MÉTODOS.....	13
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN.....	18
CONCLUSIONES	21
TABLAS.....	22
FIGURAS	25
REFERENCIAS	28
ANEXOS.....	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de los helmintos intestinales encontrados en las muestras.....	22
Tabla 2. Mediciones de parásitos céstodos adultos.	23
Tabla 3. Resultados de análisis molecular de los céstodos adultos.	23
Tabla 4. Resultados del análisis molecular de los tremátodos adultos.	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Huevos de Diphylobothriidae en muestras positivas.	25
Figura 2. Huevos de Anisakidae en muestras positivas.....	26
Figura 3. Huevos de Ancylostomidae en muestras positivas.	26
Figura 4. Parásitos adultos teñidos con Carmín ácido de Mayer.....	27
Figura 5. Porcentaje de muestras positivas por familia.	27

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Tabla de condiciones de PCR para los dos sets de primers.	32
--	----

INTRODUCCIÓN

El Ecuador se ubica entre los países con mayor biodiversidad del mundo, y es conocido por la gran interacción que existe entre la fauna silvestre y la población humana. Gran ejemplo de ello son las islas Galápagos, en la cual existen dos especies endémicas de lobo marino: *Arctocephalus galapagoensis*, comúnmente conocido como lobo de dos pelos, y *Zalophus wollebaeki*, lobo marino de las Galápagos, de las cuales se estima una población de alrededor de 25.000 individuos en total (Merlen, 1995).

Zalophus wollebaeki es una especie de mamífero pinnípedo de la familia Otariidae, que se encuentra relacionado con la especie *Zalophus californianus* que habita en el norte del Pacífico (Elorriaga, 2015). Existen 13 poblaciones descritas de esta especie alrededor de todas las islas del archipiélago de las Galápagos, principalmente en San Cristóbal e isla Española, sin embargo, actualmente se han registrado avistamientos en playas de Manabí (Auriolles y Trillmich, 2008) y en la Isla del Coco en Costa Rica (Halpin et al., 2009). La dieta de este animal se basa en peces pelágicos y bénticos como *Palabrax* y *Selar*, y en menor cantidad de cefalópodos y pequeños crustáceos (Salazar, 2005). Sin embargo, se han encontrado diferencias en la dieta de las especies que habitan en el oriente y occidente del archipiélago (Páez-Rosas y Auriolles-Gamboa, 2014).

A pesar de su relevante participación en los ecosistemas y las cadenas tróficas, es una especie que por diferentes factores de encuentra en la lista roja de las especies amenazadas de la IUCN, bajo el criterio A2ab (2015). El Ministerio del Ambiente Ecuatoriano menciona que los factores que influyen de forma directa en esta especie están relacionados con el deterioro y contaminación de su hábitat debido a actividades antropogénicas, depredadores naturales, el cambio climático y enfermedades (2014).

Los animales salvajes son comúnmente parasitados por una amplia variedad de helmintos, principalmente los grupos nemátodos, acantocéfalos, tremátodos y céstodos. Muchos de estos parásitos han sido documentados como causantes de enfermedades y mortalidad en aves y mamíferos silvestres. La mayoría de los helmintos tienen ciclos de vida complejos que involucran a más de un huésped, tal es el caso de los tremátodos que residen en los intestinos de reptiles, aves o mamíferos, y tienen uno o dos hospedadores intermedios y uno final, pero para que este ciclo sea completado, es necesario que todos los huéspedes estén disponibles. Dentro del huésped definitivo, los gusanos se aparean y producen huevos no embrionados que se vacían en las heces del huésped (Sepulveda y Kinsella, 2013). Por otro lado, los céstodos tienen un ciclo de vida que consta de 3 formas: huevos, larvas y adultos. Y en su forma adulta habitan en los intestinos de los huéspedes finales, que son mamíferos carnívoros, y propagan la infección mediante las heces excretadas que contienen huevos y luego estos son ingeridos por los huéspedes intermedios (Chelsea y Petri, 2022).

La detección de parásitos intestinales se puede realizar por medio de la observación de la materia fecal en el microscopio óptico para la evaluación morfológica de las formas que son eliminadas a través de las heces; huevos, quistes, ooquistes y larvas (Rosales, 2020). Las características morfológicas de estas estructuras permiten la identificación hasta especie en algunos casos y hasta género en otros. Por otro lado, los métodos serológicos y moleculares pueden brindar una mejor resolución diagnóstica (Lejeune, 2021).

Estudios previos de los lobos de San Cristóbal demostraron la presencia de diferentes parásitos como anisákidos, céstodos, pseudofílidos y coccidios en los cuales fueron identificados a través de método parasitológico directo (Walden, 2018).

El objetivo de esta investigación fue identificar parásitos intestinales de los lobos marinos de San Cristóbal a través de análisis coprológicos, morfométricos y moleculares.

MÉTODOS

Área de estudio y manejo de muestras

En el mes de octubre de 2021, las muestras fueron adquiridas de lugares de descanso frecuentados por los lobos marinos, en las playas de La Lobería (LO), Naval (NA), Astillero (AS), Puerto Marineros (MA), Puerto Oro (OR), Playa Mann (PM), Muelle de Pescadores (MP), Punta Carola (CA), y Puerto Baquerizo (BA); todas estas locaciones pertenecientes a la Isla San Cristóbal. Se obtuvo un total de 48 muestras fecales de lobo marino, las cuales fueron colocadas en paratest y tubos de recolección fecal DNA/RNA Shield (Ecogen, 2017) y Paratest (Freyman, 2017). Se recolectó también 20 ejemplares de parásitos adultos, 12 céstodos y 8 tremátodos, encontrados en las playas Naval (NA), Astillero (AS) y Muelle de Pescadores (MP); los cuales fueron almacenados en tubos de 50 ml (Thermo Fisher Scientific, 2022) con etanol al 96%. Posteriormente, de acuerdo con el protocolo de extracción de muestras biológicas, todas las muestras fueron transportadas al laboratorio de Parasitología y Vectores del Instituto de Microbiología de la USFQ en febrero de 2022.

Análisis coprológico y morfológico

Primero, se realizó un análisis parasitológico de las muestras conservadas en ParaTest, para esto se colocó dos gotas de heces en un portaobjetos, a la una gota se adición 1 gota de solución salina 0.9% y la otra una gota de Lugol (solución de I₂ (1%), yodo molecular, en equilibrio con KI (2%) en agua destilada), se colocó encima de cada gota un cubreobjetos y se visualizó en el microscopio óptico a 4x, 10x y 40x. Se realizó una evaluación coprológica, del color de las heces, presencia de moco y presencia de huevos y/o larvas de parásitos.

También se realizaron 2 métodos de concentración para el análisis coprológico. Primero el método de sedimentación, que consistió en colocar 1ml de heces y 0.5ml de éter etílico, luego se centrifugó el tubo a 3000 rpm por 3 minutos y con una pipeta Pasteur se colocó una gota del

sedimento generado y una gota de Lugol para observación al microscopio (Instituto Nacional de Salud, 2003a); y segundo, el método de flotación, para el cual se preparó una solución saturada de azúcar (50ml de agua destilada y 105.5g de azúcar), se colocó 2ml de heces en un tubo de ensayo de 5ml y se llenó hasta el tope con la solución saturada de azúcar, luego se agitó 3 veces y se dejó reposar durante 3 minutos, por último se colocó un cubreobjetos sobre el tubo de ensayo y se dejó por 3 minutos más, se pasó el cubreobjetos a una lámina portaobjetos con una gota de Lugol para observación al microscopio en 4x y 10x.

Finalmente, se observó las muestras de heces conservadas (DNA/RNA Shield) de forma directa con el mismo protocolo que se usó para las muestras de Paratest. Se tomaron fotografías de todas las estructuras parasitarias con la cámara de microscopio y software Amscope. También se realizaron mediciones del largo y ancho de los huevos de parásitos encontrados.

Tinción de parásitos adultos

Para los parásitos adultos, se realizó la tinción de Carmín Ácido de Mayer siguiendo el protocolo del manual de parasitología de UNAM (Salgado Maldonado, 2008). Primero, se colocó los especímenes en etanol al 70% durante 3 días. Luego, se realizaron picaduras del espécimen con alfileres entomológicos para permitir que el tinte ingrese de forma homogénea en todo el parásito. Después, se sumergió el espécimen en carmín (C.I. 75470) (Merck, s.f) en concentración 1:10 durante 24 horas, se procedió a diferenciar la tinción en alcohol al 70% acidulado con ácido clorhídrico al 4% durante 3 días, que se observó el espécimen de color rosa pálido. Posteriormente, se lavó en etanol al 75% 3 veces, y en la última se dejó reposar durante 24 horas. Se deshidrató en etanol al 85% y 95% dejando el espécimen sumergido en cada solución durante 24 horas. Después, se colocó en alcohol etílico absoluto durante 24 horas. Finalmente, se aclaró en mezclas graduales de alcohol absoluto con eugenol; la primera con 25% de eugenol y 75% de etanol, la segunda con 50% de eugenol y 50% de etanol, y la última

con 75% de eugenol y 25% de etanol. Para el montaje en placa, se usó Eukit[®] (O. Kindler GmbH, s.f) y posteriormente se observaron las estructuras en 4x y 10x.

Análisis molecular

Para el análisis molecular se extrajo ADN de todos los parásitos adultos, en el caso de los céstodos se realizó un pequeño corte de tejido, y en el de los tremátodos se usó dos ejemplares enteros lavados previamente con PBS 1x, y se siguió las instrucciones de acuerdo al fabricante del kit de extracción de ADN QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, 2022).

Para realizar PCR de las muestras de nemátodos adultos, se usó primers específicos para la región ITS del ARN ribosomal de la subunidad larga del gen 28S, el primer forward LSU5-F (5'-TAG GTC GAC CCG CTG AAY TTA AGC A-3') y el primer reverse 1500R-R (5'-GCT ATC CTG AGG GAA ACT TCG-3') (Olson et al, 2003). Los primers usados para los tremátodos adultos fueron los mismos mencionados previamente, LSU5 y 1500R, y otros específicos para el gen 18S del ARN ribosomal C-F (5'-ATGGCTCATTAATCAGCTAT-3') y A-R (5'-TGCTTTGAGCACTCAAATTTG-3') (Routtu et al, 2014). Las condiciones de cada PCR se muestran en la tabla 2. Posterior a la realización de PCR, se realizó electroforesis en gel de agarosa y se reveló el resultado en bio-render[®]. Se preparó las muestras para enviar a secuenciar el ADN en la empresa MacroGen, Inc. Se obtuvo las secuencias en formato FASTA y formato pdf los cromatogramas.

Una vez obtenidas las secuencias, se realizó la limpieza de las mismas con el software MEGA para obtener una secuencia consenso, y posteriormente se realizó BLAST de las mismas para encontrar coincidencias con otras secuencias en el GenBank de NCBI. En los mismos softwares se alineó las secuencias consenso junto con las obtenidas del BLAST para determinar similitudes y diferencias.

RESULTADOS

Análisis coprológico y morfométrico

No hubo diferencias entre la cantidad de huevos que se encontró en las muestras de Paratest bajo observación directa y después de los métodos de concentración. Se encontró presencia de huevos pertenecientes a la familia Diphylobothriidae en 6 muestras, Anisakidae en 3, Ancylostomidae en una muestra. Lo que representa 12,5%, 6,25% y 2.08% respectivamente.

En la observación directa de muestras de heces conservadas (DNA/RNA Shield) se encontró 16 muestras positivas, lo que corresponde al 31.25% tomando en cuenta el número total de muestras evaluadas. De las cuales 9 (56%) tenían presencia de huevos de Diphylobothriidae, 4 (24%) de la familia Anisakidae y 3 (20%) de la familia Ancylostomidae. Lo que nos indicó que las heces conservadas con este método dieron mejores resultados para este estudio (Figura 5). Las fotografías de todos los huevos encontrados se muestran en las figuras 1, 2 y 3, así como los detalles de sus características morfométricas.

La intensidad de parasitosis se evaluó en los resultados reflejados a partir del número de huevos observados por campo de visión, en este caso 10x, se encontró a partir de esto, 8 infecciones leves, 4 moderadas y 4 severas. La mayoría de las infecciones severas correspondieron a parásitos de la familia Diphylobothriidae.

Las mediciones de los parásitos adultos céstodos se muestran en la tabla 2, obteniendo una longitud de entre 6.2 y 16.3 cm; las medidas de escólex oscilan entre 0.8 y 1.3cm de largo y entre 1 y 3mm de ancho; las proglótides inmaduras miden alrededor de 0.35cm y los grávidos alrededor de 0.7 y 1.7cm.

Por otro lado, los tremátodos presentan una longitud de entre 0.4 y 0.6cm, y un ancho de 0.25 a 0.32cm, todos con las mismas medidas.

Análisis molecular

Tres individuos fueron identificados como *Adenocephalus pacificus* con 100% de homología y ocho como *Diphyllobothrium sprakeri* con una homología de 99.87%.

Se identificaron todos los individuos tremátodos como *Philophtalmus gralli* con una homología de 99.9%

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indican que existe una frecuencia total del 31.25% de parásitos, los cuales están divididos entre 9 (56%) *Diphyllobothriidae*, 4 (24%) de la familia *Anisakidae* y 3 (20%) de la familia *Ancylostomidae*, lo que comparado con los estudios de Scholz et al; Hermosilla et al; Marcus; se observa que existe una frecuencia de 64% de parásitos de la *Diphyllobothriidae* de un total de 37 especies conocidas de tenías anchas (Scholz, et al., 2019). Adicional, se encontró un 34,5% de huevos de *Anisakidae* en colonias de leones marinos (Hermosilla et al., 2018). Y 70% de prevalencia de infección en crías de lobos marinos en Australia de parásitos la familia *Ancylostomidae* (Marcus, 2015). Lo que indica que nuestros resultados presentan una frecuencia similar de parásitos en especies relacionadas a la de estudio en diferentes partes del mundo.

Se encontró que la presencia de parásitos de la familia *Diphyllobothriidae*, *Anisakidae* y *Ancylostomidae*. Rodríguez y Nascimento, indican que el género *Adenocephalus* (sin. *Diphyllobothrium*) ha sido reportado como el de mayor prevalencia y abundancia en un estudio realizado en Iquique y Talcahuano (Rodríguez & George-Nascimento, 2021). Un estudio de Gingrich y otros, registra presencia de *Ancylostoma* y *Toxocara* en perros domésticos de la isla San Cristóbal, a través de examinación microscópica; información que permite relacionar la transmisión de parásitos entre fauna de ecosistemas marinos y terrestres, es decir, que los parásitos, tal como explica el estudio, podrían estarse transmitiendo a partir de las heces de estos animales domésticos (2010). Los parásitos como los de la familia *Anisakidae* actúan generalmente como reguladores de las poblaciones acuáticas y pasan a lo largo de la cadena trófica, es por ello que las larvas de los parásitos llegan a los peces que son organismos intermediarios donde se alojan en las vísceras y músculos de los peces y al consumirlos los leones marinos se cierra el ciclo y terminan infectados por parásitos (Moles & Heintz, 2007).

De las dos especies de céstodos encontrados, que pertenecen a la misma familia, existen reportes como el de Mondragón y otros, que mencionan la identificación de dos especímenes adultos de *Adenocephalus pacificus* en leones marinos (*Otaria flavescens*) de la costa del Perú, a través de métodos morfológicos y moleculares (2021). La especie *Diphyllobothrium sprakeri* ha sido identificada en el año 2021 a través de screening y análisis molecular, propuesta como la primera especie de la familia Diphylobothriidae descrita en la especie *Zalophus californianus*, y previamente hallada en *O. flavescens* de Argentina, Chile y otras zonas de Perú (Hernández-Orts y otros, 2021). Por otro lado, los tremátodos fueron identificados como *Philophtalmus gralli*, lo cual es comparable con un estudio de Phillips y otros, que evalúa una enfermedad oftálmica de los lobos marinos de Galápagos que se presume es causada por un tremátodo ocular del mismo género, que fue clasificado como *Philophtalmus zalophi*. Los parásitos fueron encontrados adheridos a la membrana nictitante y conjuntiva del ojo, lo cual permite ratificar la amenaza que representa la parasitosis para la vida de estos animales. Este mismo estudio menciona que se ha registrado prevalencia de este género de parásitos en aves en regiones distintas a Sudamérica (2018).

El método más efectivo fue el parasitológico directo con heces extraídas de tubos DNA/RNA Shield, esto probablemente debido a que las heces que se conservan en Paratest se encuentran diluidas los métodos de concentración no resultaron efectivos para obtener mayor cantidad de muestras positivas, debido al efecto de dilución que tiene el envase Paratest al contener formalina al 5%. Un estudio de Rosales y Bautista compara la sensibilidad y especificidad del método parasitológico directo, la sedimentación simple, y el método de Ritchie modificado, encontrando que la sedimentación simple presentó una sensibilidad del 100%, significativamente igual al método de observación directa (2020). Por otro lado, las características morfométricas tanto en parásitos adultos como en huevos no muestran

diferencias significativas entre sí, lo que no permitió identificarlos a nivel de especie, sino únicamente a nivel de familia. A pesar de esto, las mediciones de los huevos de parásitos fueron útiles para conocer que la clasificación taxonómica de acuerdo con la familia fue certera.

Este estudio se realizó en una población de lobos marinos que se encuentra en constante contacto con los humanos. Se recomienda comparar la parasitosis de colonias de lobos con menor impacto antropogénico, así como tomar muestras a diferentes épocas del año, debido a que las corrientes oceánicas pueden tener gran impacto sobre las tasas de parasitosis al estar relacionadas con las condiciones y el alimento disponible para estos pinnípedos (Pardo et al, 2009). Así también, realizar un seguimiento a lo largo de la vida de estos animales para poder determinar cómo varían de acuerdo a las etapas de desarrollo.

CONCLUSIONES

1. Se encontró una frecuencia de parasitosis significativa del 31.25%, como mayor prevalencia de *Diphyllobothriidae* con un 56%, de *Anisakidae* con un 24% y *Ancylostomidae* con 20%. Sin embargo, no se midió el impacto de las parasitosis en el decrecimiento de la población de lobos de la isla San Cristóbal.
2. Las características morfométricas de los parásitos adultos y huevos no permitieron diferenciar a nivel de especie, pero, a pesar de las limitaciones, el método coprológico permitió realizar un monitoreo rápido y a bajo costo de la frecuencia parasitaria y nivel de infección en los lobos marinos,
3. A nuestro conocimiento, es el primer estudio que identifica el tremátodo *Philophthalmus gralli* en esta especie de pinnípedos mediante métodos moleculares, el cual se ha reportado en otros estudios en regiones costeras de países de Sudamérica.

TABLAS

Tabla 1. Resultados de los helmintos intestinales encontrados en las muestras.

Código de muestra	Familias de parásitos encontrados		
	Diphyllobothriidae	Anisakidae	Ancylostomidae
LO021021001	-	-	-
NA021021002	-	-	-
AS021021003	-	-	-
MA021021004	-	-	-
OR021021005	-	-	-
PM021021006	+	-	-
CA021021007	-	-	-
BA021021008	+	+	-
LO051021009	-	-	-
NA051021010	-	-	-
AS051021011	-	-	-
MA051021012	-	-	-
OR051021013	-	-	-
PM051021014	-	-	-
CA031021015	-	-	+
BA051021016	-	+	-
LO111021017	-	-	-
NA111021018	-	-	+
AS111021019	-	-	-
MA111021020	+	-	-
OR111021021	-	-	-
PM111021022	-	-	-
CA111021023	+	-	+
BA111021024	-	-	-
LO141021025	+	+	-
NA141021026	-	-	-
AS141021027	-	-	-
MA141021028	-	-	-
OR151021029	-	-	-
PM141021030	+	-	-
CA141021031	+	-	-
BA141021032	-	-	-
LO221021033	-	-	-
NA221021034	-	-	-
AS221021035	-	-	-
MA221021036	-	-	-
OR221021037	-	-	-

PM221021038	-	-	-
CA221021039	-	-	-
BA191021040	-	-	-
LO281021041	+	-	-
NA281021042	-	-	-
AS281021043	+	-	-
MA281021044	-	-	-
OR301921045	-	-	-
PM281021046	-	-	-
CA281021047	-	-	-
BA301021048	-	+	-

Tabla 2. Mediciones de parásitos céstodos adultos.

Número tenia	Origen	Estróbilo (cm)	Escólex (mm)		Proglótides inmaduras (cm)
		Longitud	Longitud	Ancho	Ancho
2	Muelle de Pescadores	13,2	1,2	0,8	0,36
3		15,8	2	1	0,4
4		14,2	1,2	1,1	0,39
6		16,3	3	1,3	0,4
7		8,5	1	1	0,31
8		6,5	1	1	0,29
9	Astillero	9,4	2	1	0,27
10		6,2	1	0,8	0,34
11		9	1	1	0,34
12		12,4	2	1,3	0,31
15		11,2	1,8	0,9	0,28

Tabla 3. Resultados de análisis molecular de los céstodos adultos.

ID muestra	Gen Target	Nombre de la especie	Código GenBank	Homología (%)
2	18S	<i>Diphyllobothrium sprakeri</i>	MW600336.1	99,87
3	18S	<i>Diphyllobothrium sprakeri</i>	MW600336.2	99,87
4	18S	<i>Diphyllobothrium sprakeri</i>	MW600336.3	99,87
6	18S	<i>Adenocephalus pacificus</i>	KY552808.1	100
7	18S	<i>Adenocephalus pacificus</i>	KY552808.2	100
8	18S	<i>Adenocephalus pacificus</i>	KY552808.3	100
9	18S	<i>Adenocephalus pacificus</i>	KY552808.4	100
10	18S	<i>Adenocephalus pacificus</i>	KY552808.5	100
11	18S	<i>Adenocephalus pacificus</i>	KY552808.6	100
12	18S	<i>Adenocephalus pacificus</i>	KY552808.7	100
15	18S	<i>Adenocephalus pacificus</i>	KY552808.8	100

Tabla 4. Resultados del análisis molecular de los tremátodos adultos.

ID muestra	Gen Target	Nombre de la especie	Código GenBank	Homología (%)
1	28S	<i>Philophthalmus gralli</i>	JQ246434.1	99,9
13	28S	<i>Philophthalmus gralli</i>	JQ246434.1	99,9
14	28S	<i>Philophthalmus gralli</i>	JQ246434.1	99,9
1	18S	<i>Philophthalmus gralli</i>	JQ627832.1	99,9
13	18S	<i>Philophthalmus gralli</i>	JQ627832.1	99,9
14	18S	<i>Philophthalmus gralli</i>	JQ627832.1	99,9

FIGURAS

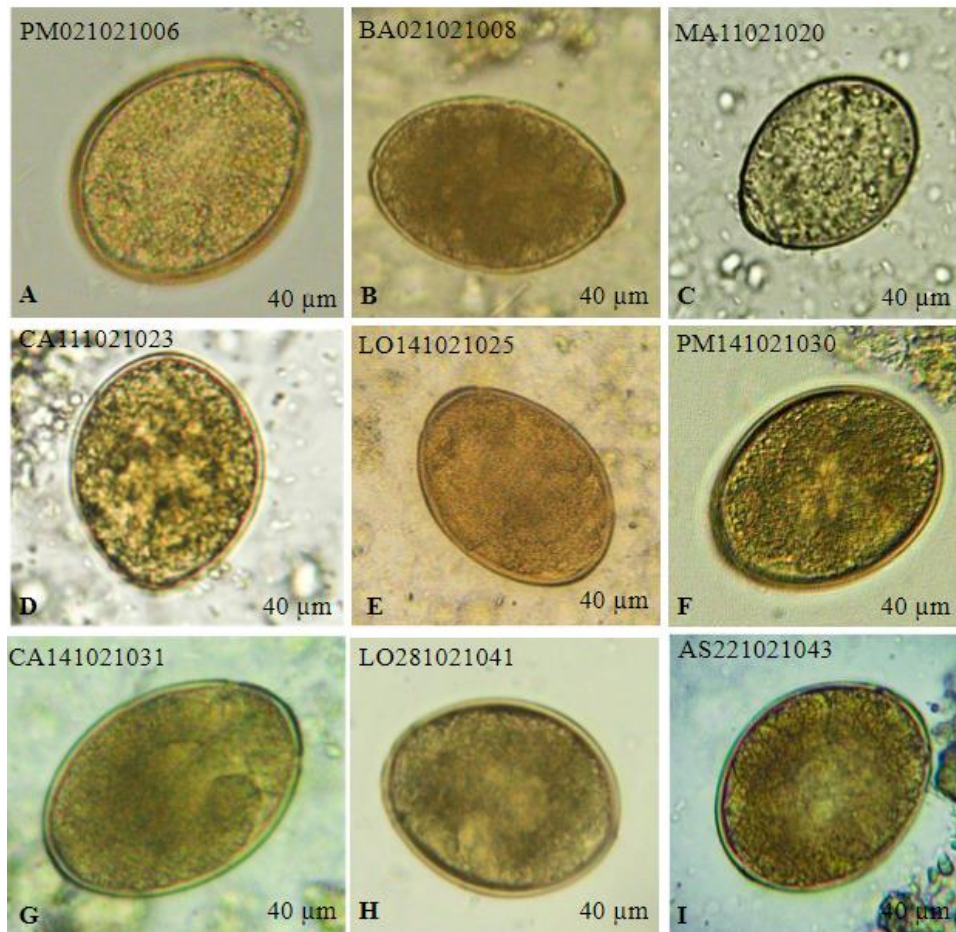


Figura 1. Huevos de Diphyllobothriidae en muestras positivas.

La **figura 1** muestra huevos de parásitos de la familia Diphyllobothriidae encontrados en las muestras de heces por medio de observación directa en 40x. Las medidas de los ejemplares son las siguientes: **1.A** 49.9µm x 39.3µm, **1.B** 51.4µm x 38.2µm, **1.C** 49.1µm x 38µm, **1.D** 48.3µm x 39.2µm, **1.E** 50.4µm x 37.2µm, **1.F** 51.6µm x 41.3µm, **1.G** 50.8µm x 39.7µm, **1.H** 48.1µm x 37.2µm, **1.I** 50.9µm x 41.5µm. Las medidas corresponden a largo x ancho.

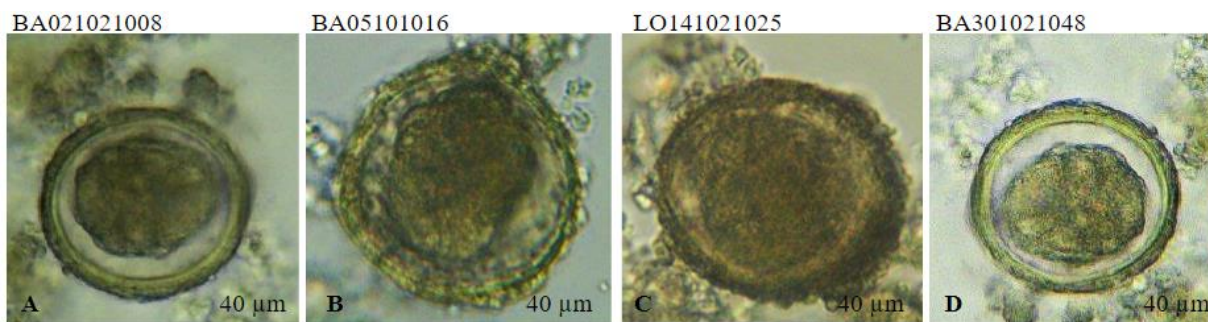


Figura 2. Huevos de Anisakidae en muestras positivas.

La **figura 2** muestra huevos de parásitos de la familia Anisakidae encontrados en las muestras de heces por medio de observación directa en 40x. Las medidas de los ejemplares son las siguientes: **2.A** 48.2µm x 39.3µm, **2.B** 52.6µm x 36.3µm, **2.C** 48.4µm x 37.4µm, **2.D** 47.8µm x 36.1µm. Las medidas corresponden a largo x ancho.

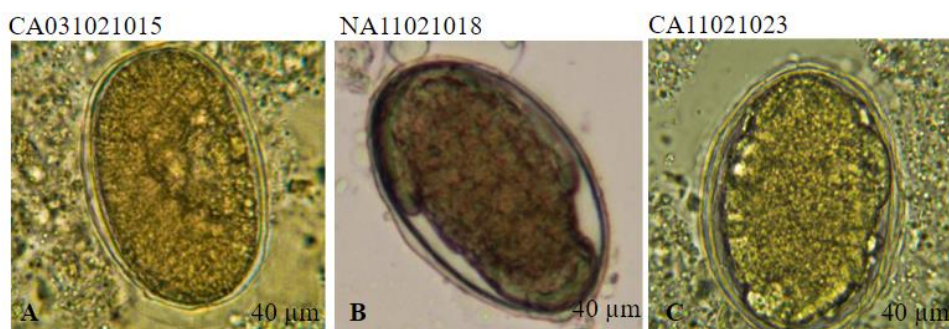


Figura 3. Huevos de Ancylostomidae en muestras positivas.

La **figura 3** muestra huevos de parásitos de la familia Ancylostomidae encontrados en las muestras de heces por medio de observación directa en 40x. Las medidas de los ejemplares son las siguientes: **3.A** 62.3µm x 37.2µm, **3.B** 66.6µm x 36.7µm, **3.C** 64.8µm x 40.1µm. Las medidas corresponden a largo x ancho.

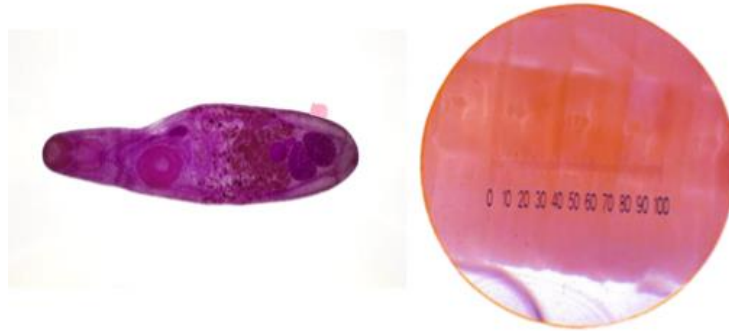


Figura 4. Parásitos adultos teñidos con Carmín ácido de Mayer.

La **figura 4** muestra un tremátodo y un céstodo luego de la tinción siguiendo el protocolo de Carmín Ácido de Mayer. En el tremátodo se observan los diferentes organelos, y en el céstodo los ovarios dentro de las proglótides.

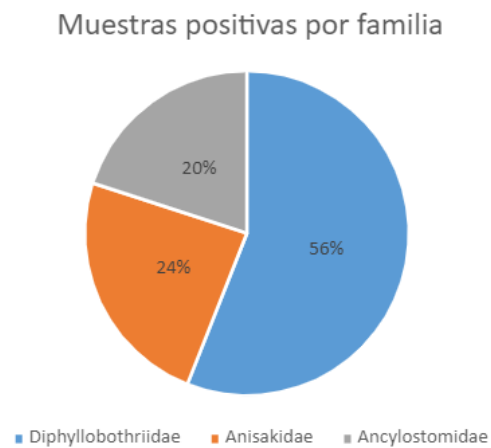


Figura 5. Porcentaje de muestras positivas por familia.

La **figura 5** muestra el porcentaje que representa cada familia en base al número total de muestras positivas que corresponde al 31.25% de infección.

REFERENCIAS

- Ecogen. (2017). *DNA/RNA Shield Fecal Collection Tube*.
<https://www.ecogen.com/es/P1/Dnarna-Shield-Fecal-Collection-Tube>.
- Elorriaga-Verplancken, Fernando R, Ferretto, Giulia, Angell, Olivia C, & Harris, Christine. (2015). *Estado actual del lobo marino de California (Zalophus californianus) y el elefante marino del norte (Mirounga angustirostris) en el archipiélago San Benito, México*. *Ciencias marinas*, 41(4), 269-281. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2545>
- Freyman. (2017). *PARATEST*. <http://www.freyman.com.ec/paratest/>
- Gingrich, E., Scorza, A., Clifford, E., Olea-Popelka, F., Lappin, M. (2010). *Intestinal parasites of dogs on the Galapagos Islands*. *Veterinary Parasitology* 169 (2010) 404–407. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.01.018
- Hernández-Orts, J. S., Kuzmina, T. A., Gomez-Puerta, L. A., & Kuchta, R. (2021). *Diphyllobothrium sprakeri n. sp. (Cestoda: Diphyllobothriidae): a hidden broad tapeworm from sea lions off North and South America*. *Parasites & vectors*, 14(1), 219. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04661-1>
- Hermosilla, C., Hirzmann, J., Silva, L., Scheufen, S., Prenger, E., Ewers, C., Häussermann, V., Försterra, G., Poppert, S., Taubert, A. (2018). *Gastrointestinal Parasites and Bacteria in Free-Living South American Sea Lions (Otaria flavescens) in Chilean Comau Fjord and New Host Record of a Diphyllobothrium scoticum-Like Cestode*. *Front. Mar. Sci.* <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00459>
- Instituto Nacional de Salud. (2003a). *Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre* (Vol. 37).
- Instituto Nacional de Salud. (2003b). *Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre*. 37, 17–18.
- Lauri, A., Mariani, P.O. (2009). *Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety*. *Genes Nutr* 4, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12263-008-0106-1>
- Lejeune, M. (2021). *Molecular Testing for Parasite Detection and Disease Diagnosis*. En *Today's Veterinary Practice*. Disponible en:

<https://todaysveterinarypractice.com/parasitology/molecular-testing-for-parasite-detection-and-disease-diagnosis/>

- Marcus, A. (2015). *Hookworm infection in the Australian sea lion (Neophoca cinerea)*. Universidad de Sydney.
- MAE. (2014). *MAE impulsa Plan de Manejo para la Conservación de Lobos Marinos en Galápagos*. Disponible en: <https://www.ambiente.gob.ec/mae-impulsa-plan-de-manejo-para-la-conservacion-de-lobos-marinos-en-galapagos/>
- Merlen, G. (1995). *A field guide to the marine mammals of Galapagos*. Charles Darwin Foundation.
- Moles, A., Heintz, R. (2007). *Parasites of forage fishes in the vicinity of steller sea lion (eumetopias jubatus) habitat in Alaska*. Journal of Wildlife Diseases 43(3), 366-375.
- Organización Panamericana de la Salud (2003). *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. Parasitosis. Tercera edición. Washington DC 20037, EUA.
- Olson, P. D., Cribb, T. H., Tkach, V. V., Bray, R. A., & Littlewood, D. T. J. (2003). *Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda)* | Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™, EMBL and DDBJ databases under the accession numbers AY222082–AY222285. International Journal for Parasitology, 33(7), 733–755.
[https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(03\)00049-3](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(03)00049-3)
- Pardo, S., Núñez, M., Barrios, R., Prieto, M., Atencio, V. (2009). *Índices parasitarios y descripción morfológica de Contracaecum sp. (Nematoda: anisakidae) en blanquillo Sorubim cuspidatus (Pimelodidae) del río sinú*. Universidad Nacional de Colombia. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682009000200008&lng=en&tlng=es.
- Phillips, B. E., Páez-Rosas, D., Flowers, J. R., Cullen, J. M., Law, J. M., Colitz, C., Deresienski, D., Lohmann, K. J., & Lewbart, G. A. (2018). *Evaluation of the ophthalmic disease and histopathologic effects due to the ocular trematode philophthalmus zalophi on juvenile galapagos sea lions (zalophus wolfebaeki)*.

- Journal of zoo and wildlife medicine: official publication of the American Association of Zoo Veterinarians, 49(3), 581–590. <https://doi.org/10.1638/2017-0096.1>
- Rodríguez, S. M., & George-Nascimento, M. (2021). *Geographical variation of enteroparasitism in the southern sea lion *Otaria flavescens* (shaw, 1800) off the coast of Chile as evidenced with coprological tests: implications for zoonotic risks*. The Journal of parasitology, 107(4), 547–553. <https://doi.org/10.1645/20-155>
- Rosales, J. & Bautista, K. (2020). *Comparación de tres métodos de concentración de enteroparásitos en muestras fecales humanas*. Revista Cubana de Medicina Tropical, 72(2), e494. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602020000200008&lng=es&tlng=es.
- Routtu J., Grunberg D., Izhar R., Dagan Y., Guttel Y., Ucko M., Ben-Ami F. (2014). Selective and universal primers for trematode barcoding in freshwater snails. Parasitol. Res. 2014; 113:2535–2540. doi: 10.1007/s00436-014-3903-z.
- Salgado Maldonado, G. (2008). *Manual de prácticas de Parasitología con énfasis en helmintos parásitos de peces de agua dulce y otros animales silvestres de México* (UNAM, Ed.; pp. 37–38). UNAM.
- Sepulveda, M. S., & Kinsella, J. M. (2013). Helminth collection and identification from wildlife. Journal of visualized experiments: JoVE, (82), e51000. <https://doi.org/10.3791/51000>
- Scholz, T., Kuchta, R., Brabec, J. (2019). *Broad tapeworms (Diphyllobothriidae), parasites of wildlife and humans: Recent progress and future challenges*. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife 9, 359-369. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.02.001>
- Trillmich, F. (2015). *Zalophus wollebaeki*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T41668A45230540*. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T41668A45230540.en>. Accessed on 21 December 2022.
- VetPraxis. (5 de marzo de 2012). *Mamíferos marinos icónicos están "nadando en mares enfermos" de agentes patógenos terrestres*. VetPraxis Media EIRL. Disponible en:

<https://www.vetpraxis.net/2012/03/05/mamiferos-marinos-unicos-estn-nadando-en-mares-enfermos-de-agentes-patogenos-terrestres/>

Walden, H., Grijalva, C., Páez-Rosas, D., Hernandez, J. (2018). *Intestinal Parasites in Galapagos Sea Lions (Zalophus wollebaeki) Sivertsen, 1953 on San Cristóbal Island, Galapagos, Ecuador*. En *Journal of Parasitology*, 104(6), 718-721.

ANEXOS

Anexo 1. Tabla de condiciones de PCR para los dos sets de primers.

Primer set	Temperatura annealing (°C)	Buffer	MgCl₂ (μM)	DNTPs (μM)	P. forward (μM)	P. reverse (μM)	Taq Pol (μL)	ADN (μL)
LSU5-1500R	56	10x	25	2	10	10	0.15	2
C-A	60	10x	25	2	10	10	0.15	2