

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Utilización de tres marcadores ribosomales para la identificación molecular de helmintos intestinales en lobos marinos (*Zalophus wollebaeki*) de San Cristóbal, Galápagos

Andrea Paola Ramírez Trávez

Ingeniería en Biotecnología

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

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

Utilización de tres marcadores ribosomales para la identificación molecular de helmintos intestinales en lobos marinos (*Zalophus wollebaeki*) de San Cristóbal, Galápagos

Andrea Paola Ramírez Trávez

Nombre del profesor, Título académico

Sonia Zapata Mena, Ph. D.

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: Andrea Paola Ramírez Trávez

Código: 00205700

Cédula de identidad: 1722956578

Lugar y fecha: 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UNPUBLISHED DOCUMENT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>.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia que me acompañó durante todo el trayecto y permitió que todo esto sea posible. Porque estuvieron a mi lado impulsándome a conseguir mis sueños, enseñándome que el cielo es el límite y siendo mi soporte en los momentos más difíciles.

A mi directora de tesis Sonia Zapata y Rosita Bayas por haber confiado en mí y haberme acompañado durante todo mi proyecto de titulación. Por haberme compartido todos sus conocimientos y haber aportado sustancialmente a mi formación personal y profesional.

A la Universidad San Francisco de Quito, el Instituto de Microbiología y el Laboratorio de Parasitología por haberme abierto sus puertas.

A todos mis profesores que fueron guía esencial para que pueda culminar con éxito mi carrera.

A todos mis amigos que fui conociendo a lo largo de mi estadía en la universidad y finalmente, se convirtieron en mi familia.

RESUMEN

Los lobos marinos de Galápagos (*Zalophus wollebaeki*) representan a una especie endémica de las islas. Esta especie se encuentra catalogada en peligro según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). Son muy propensos a ser infectados por una gran variedad de parásitos, entre los cuales se encuentran helmintos gastrointestinales. El objetivo del presente estudio fue la utilización de tres marcadores ribosomales para la identificación de helmintos intestinales mediante la amplificación y secuenciación de regiones específicas del gen 28S y del espaciador transcrito interno. En 21 de las 48 muestras fue posible la identificación molecular de helmintos lo cual representa un 41,66% de parasitosis en lobos marinos. Se logró la identificación de 6 especies de parásitos intestinales en las muestras de heces de lobos marinos de San Cristóbal, que corresponden a *Anisakis simplex*, *Anisakis pegreffii*, *Ancylostoma caninum*, *Strongyloides stercoralis*, *Parafilaroides decorus* y *Adenocephalus pacificus*. La información obtenida en esta investigación corresponde a un estudio piloto que muestra factores como la dieta y el contacto con perros como posibles vías de contagio de helmintos intestinales.

Palabras clave: *Zalophus wollebaeki*, helmintos intestinales, 28S, ITS.

ABSTRACT

Galapagos sea lions (*Zalophus wollebaeki*) represent a species endemic to the islands. This species is listed as endangered by the International Union for Conservation of Nature (IUCN). They are very prone to be infected by a wide variety of parasites, including gastrointestinal helminths. The aim of the present study was to use three ribosomal markers for the identification of intestinal helminths by amplification and sequencing of specific regions of the 28S gene and internal transcribed spacer. Molecular identification of helminths was possible in 21 of the 48 samples, which represents 41.66% of parasitosis in sea lions. Six species of intestinal parasites were identified in the stool samples of sea lions from San Cristóbal, corresponding to *Anisakis simplex*, *Anisakis pegreffii*, *Ancylostoma caninum*, *Strongyloides stercoralis*, *Parafilaroides decorus* and *Adenocephalus pacificus*. The information obtained in this research corresponds to a pilot study that shows factors such as diet and contact with dogs as the main routes of infection of intestinal helminths.

Key words: *Zalophus wollebaeki*, gastrointestinal helminths, 28S, ITS

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	11
Métodos.....	13
Resultados.....	16
Discusión	17
Conclusiones	20
Tablas.....	21
Figuras	25
Referencias bibliográficas	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuantificación de ADN de las muestras de heces analizadas.....	21
Tabla 2. Resultados del secuenciamiento para 3 marcadores moleculares de las muestras de heces.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gel referencial PCR. Marcador BD1-BD1.....	25
---	-----------

INTRODUCCIÓN

Las Islas Galápagos se encuentran localizadas en el Océano Pacífico a 1000 kilómetros de la costa del Ecuador y representan un foco importante de biodiversidad. Dentro de las principales islas se encuentran Fernandina, Santiago, Isabela, Santa Cruz, San Cristóbal. Y las islas más pobladas corresponden a las tres últimas mencionadas junto con Floreana y Baltra (Torres & Mena, 2018). Posee abundante vida silvestre submarina, la fauna marina de las islas cuenta con el 18.2% de endemismo y es lo que hace que Galápagos resulte atractivo para realizar estudios científicos (UNESCO, 2018). Las islas se caracterizan por la presencia de mamíferos marinos de la familia Otariidae, en particular, los lobos marinos que corresponden a la especie *Zalophus wollebaeki*.

Esta especie se encuentra en las islas principales de las Galápagos, como San Cristóbal y Santa Cruz, aunque también se reporta pequeñas poblaciones en otras islas como por ejemplo Santiago o islas más pequeñas (Trillmich, 2014). Esta especie se encuentra catalogada en peligro según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). Los lobos marinos basan su dieta casi exclusivamente de peces pelágicos y cuentan con la capacidad de adaptar su dieta a la presa más abundante. Entre los peces que más consume esta especie se encuentra *Sardinops sagax*, *Chlorophthalmus sp.* y *Trachurus symmetricus* (Dellinger & Trillmich, 1999).

Los mamíferos marinos son muy propensos a ser infectados por una gran variedad de parásitos. La mayoría de estos son helmintos gastrointestinales que comprometen la salud de los mamíferos marinos (Gullan et al., 2001). Lo que les convierte en potenciales hospedadores definitivos para miembros de la familia Anisakidae (*Anisakis spp.*, *Pseudoterranova spp.*, y *Contracaecum spp.*) y Diphyllbothriidae. Los cuales se encuentran en los peces llegan cuando son consumidos como parte principal de su dieta. (*Centers for Disease Control and Prevention*,

2019a). Los estudios sobre la presencia de parásitos en *Zalophus wollebaeki* son muy limitados. En el continente Sudamericano se han llevado a cabo investigaciones en el lobo marino sudamericano (*Otaria flavescens*) en donde reportan la presencia de *Adenocephalus pacificus* y la presencia de miembros de la familia Anisakidae. Así como también parásitos del género *Diphyllobothrium* y *Parafilaroides* (Markowski, 1952; Ebmer et al., 2020; Hermosilla et al., 2018).

En el Ecuador, los estudios sobre la presencia de parásitos en la especie *Z. wollebaeki* son escasos. Se ha reportado la presencia de *Anisakis* y *Ancylostoma* (Walden et al., 2018; Gregory et al., 2022). La literatura reporta el uso de marcadores ribosomales como LSU5-1500R, BD1-BD2 y NC5-NC2 para la detección de diferentes nematodos y cestodos mediante la amplificación del gen 28S y la región ITS. El primer marcador ha sido ampliamente utilizado para la detección de parásitos como Raphidascarididae y Diphylobothriidae (Pérez-García et al., 2015; Hernández-Orts et al., 2021b). Por otro lado, para el marcador ribosomal BD1-BD2 se ha reportado su uso para la detección de miembros de la familia Anisakidae y del género *Moniezia* sp (Suthar et al., 2021; Güiris-Andrade et al., 2017). Finalmente, el uso del tercer marcador se ha reportado para la identificación de Ancylostomidae, y Davaineidae (Silva et al., 2006; Van et al., 2019)

Por tanto, el presente estudio tiene como objetivo la utilización de tres marcadores ribosomales para la identificación de helmintos intestinales en lobos marinos (*Zalophus wollebaeki*) de San Cristóbal, Galápagos mediante la amplificación y secuenciación de regiones específicas del gen 28S y del espaciador transcrito interno (ITS, por sus siglas en inglés).

MÉTODOS

Colección de las muestras

Durante el mes de octubre del 2021, se colectaron 48 muestras de heces de lobos marinos que habitan en la isla San Cristóbal, Galápagos. Se tomaron muestras de ocho lugares: Puerto Baquerizo, Punta Carola, Playa Mann, Playa de oro, Playa de los marinos, Astillero, Zona Naval y Lobería.

Las muestras de heces se colocaron en *DNA/RNA Shield Fecal Collection Tube* (Zymo Research) y se mantuvieron a -20°C en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del *Galapagos Science Center* para su posterior traslado a Quito.

Todas las muestras fueron recolectadas siguiendo los lineamientos especificados por los permisos de investigación otorgados por el Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica del Ecuador (N° PC-31-21).

Las muestras fueron transportadas a Quito con el permiso de movilización número 011-2022 DPNG, manteniendo la cadena de frío, hacia la Universidad San Francisco de Quito, en donde también fueron mantenidas a -20°C en el Laboratorio de Parasitología del Instituto de Microbiología para su posterior análisis.

Extracción y amplificación de ADN

Para la extracción de ADN de todas las muestras, se usó el kit *Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit* (Zymo Research) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una vez realizada la extracción se procedió con la cuantificación del material genético para lo cual se usó el *Nanodrop 2000* (ThermoFisher Scientific) para determinar su concentración y calidad. Las muestras se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

Para la identificación molecular de los helmintos intestinales se seleccionaron tres pares de *primers* que amplifican regiones específicas del gen 28S y el ITS. Para la amplificación parcial

de los dominios D1-D3 del gen 28S se seleccionaron los *primers* LSU5 (TAGGTCGACCCGCTGAAYTTAAGCA) y 1500R (GCTATCCTGAGGGAAACTTCG) (Olson et al., 2003). Mientras que, para la amplificación de la región ITS (ITS1 e ITS2) incluyendo el gen 5.8 ARNr se eligieron los *primers* BD1 (GTCGTAACAAGGTTTCCGTA) y BD2 (TATGCTTAAATTCAGCGGGT) (Luton et al., 1992) y los *primers*.NC5 (GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT) y NC2 (TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT) (Zhu et al., 1999). El volumen final de la reacción fue de 25µL que contenía *Buffer* 1X, MgCl₂ [1.5 mM] para los *primers* LSU5-1500R y NC5-NC2 [1 mM] para los *primers* BD1-BD2, dNTPs [0.2 mM], primer forward y reverse [0.2 mM], Taq polimerasa (1U) (Promega) y ADN (7.92 ng-40 ng).

Las condiciones establecidas en el termociclador fueron las siguientes: una denaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de denaturalización a 94°C por 30 segundos, *annealing* por 30 segundos a 56°C, 57°C y 60°C para los *primers* LSU5-1500R, BD1-BD2 y NC5-NC2, respectivamente, y una extensión por 1 minuto a 72°C, seguida de una extensión final a 72°C por 10 minutos (Olson et al., 2003; Luton et al., 1992; Zhu et al., 1999).

Finalmente, para la visualización de los productos de PCR se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y para determinar el tamaño se usó el marcador de peso molecular *PCR Ranger100bp DNA Ladder (Norgen)*. Las condiciones determinadas de migración fueron a 100V por 45 minutos. Los productos de PCR se visualizaron mediante luz ultravioleta usando un fotodocumentador (BIORAD *Laboratories*, Inc.)

Análisis molecular

Todos los productos de PCR se enviaron a *Macrogen, Inc* (Corea del Sur) para su secuenciamiento, Las secuencias *forward* y *reverse* se alinearon, editaron y limpiaron con el programa MEGA X (MEGA, 2022) para la obtención de la secuencia consenso.

Posteriormente, se utilizó el programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) [Internet], 1988) para contrastar la secuencia obtenida con las secuencias disponibles en la base de datos *GenBank* con el fin de determinar la identidad de las secuencias obtenidas en el presente estudio.

RESULTADOS

Se analizó un total de 48 muestras de heces de lobos marinos en San Cristóbal. La concentración de ADN estuvo en un rango de 7.92 ng/μL-40 ng/μL (Tabla 1).

El tamaño de las secuencias obtenidas para el marcador LSU5-1500R fue de 726-1448 pb, para el caso del marcador BD1-BD2 el tamaño de las secuencias osciló entre 855-1216 pb y para el marcador NC5-NC2 se obtuvieron secuencias de 826-1194 pb.

En 21 de las 48 muestras fue posible la identificación molecular de helmintos lo cual representa un 41,66% de parasitosis en lobos marinos. De las 21 muestras 3 exhibieron positividad para 3 marcadores, que representa el 14.29% de las muestras. Mientras que 7 muestras mostraron positividad para 2 marcadores (33.33%), y finalmente, el 52.38% de las muestras, es decir 11, dieron positivo para un solo marcador.

Se encontró la presencia de *Anisakis simplex* y *Anisakis pegreffii* en el 52.38% de las muestras analizadas. Por otro lado, se encontró una frecuencia 14.29% *Adenocephalus pacificus* y 9.52% para *Strongyloides stercoralis*, *Parafilaroides decorus* y *Ancylostoma caninum*.

DISCUSIÓN

En esta investigación se identificó a nivel molecular parásitos de la familia Anisakidae, Strongyloididae, Diphylobothriidae, Filaroididae y Ancylostomidae (Tabla 2) en muestras de heces de lobos marinos de San Cristóbal. Que correspondieron a *Adenocephalus pacificus*, *Anisakis simplex*, *Anisakis pegreffii* y *Parafilaroides decorus*. Estos resultados son comparables con el estudio realizado por Walden et al., en donde se reporta la presencia de huevos y larvas sugestivos de parásitos de cestodos pseudofílideos, nemátodos y del género *Parafilaroides* en lobos marinos de San Cristóbal (2018). Los resultados encontrados en lobos marinos de Galápagos también son contrastables con los hallazgos en otros pinnípedos como el caso de *Zalophus californianus* en donde se detectó presencia de *Adenocephalus pacificus*. Así como también *Anisakis simplex* y *Anisakis pegreffii*. Lo que indica que por lo general estos parásitos si se encuentran infectando a pinnípedos (Kuzmina et al., 2018; Hrabar et al., 2021).

En esta investigación se reporta a *Parafilaroides decorus* en *Zalophus wolfebaeki*, el cual ha sido encontrado en *Zalophus californianus*. Así como también, un estudio adicional encontró que *Zalophus californianus* se parasita con *Parafilaroides decorus* debido al consumo de peces que se encuentran en aguas que presentan un alto grado de contaminación fecal (Dougherty & Herman, 1947; Dailey, 1970)

Por otro lado, los hallazgos de este estudio indicaron la presencia de *Anisakis simplex* y *Anisakis pegreffii* en el 57,14% de las muestras positivas, siendo los más abundantes en este estudio. Ahora, estos resultados son contrastables con investigaciones realizadas en *Otaria flavescens*, pinnípedos presentes en Argentina, en donde también se encontraron parásitos del género *Pseudoterranova* (*Pseudocattani terranova*). Estos mamíferos de la familia Otariidae se han reportado como hospedadores definitivos y se parasitan a través de su dieta al consumir peces infectados (Hernández-Orts et al., 2013a).

Por otro lado, se han realizado estudios a lo largo del mundo que destacan la presencia de *Ancylostoma caninum* en pinnípedos y afirman que posiblemente se transmiten desde cánidos domésticos (Ramos et al., 2013; Xie et al., 2017; Seguel & Gottdenker, 2017). Como antecedente de este estudio, se conoce que los lobos marinos de Galápagos comparten su hábitat con perros. En un estudio realizado por Gingrich et al., en las islas Galápagos se demostró que existe una alta prevalencia de *Ancylostoma caninum* en perros domésticos (2010). Por lo que la sobrepoblación de perros representa una amenaza para los mamíferos marinos por la cantidad de enfermedades que exhiben. Esta información respalda a los resultados de este estudio en donde se encontró *Ancylostoma caninum* en 14.29% de las muestras.

En esta investigación también se encontró *Strongyloides stercoralis*. Al buscar literatura que sustente la presencia de parásitos de la familia *Strongyloides* en pinnípedos, un estudio en Uruguay los reporta en *Arctocephalus australis* (Katz et al., 2012).

Por ello, es muy importante mencionar que hasta la actualidad no existen investigaciones a nivel molecular que estudien la infección de *Parafilaroides decorus* y *Strongyloides stercoralis* en *Zalophus wollebaeki*.

Por otro lado, en un estudio realizado por Pardo et al., los autores mencionan que especies de peces como el blanquillo (*Sorubim cuspicaudus*), presentan un alto grado de parasitismo de *Contracaecum sp.*(2009). Y se conoce que esta especie de pez es ingerida por mamíferos marinos como parte de su dieta. Asimismo, un estudio realizado por Scholz & Kuchta, en el año de 2016 indica que los pinnípedos son un hospedador definitivo de parásitos como *Adenocephalus pacificus*, y también que la principal vía de infección es a través de su alimentación. De esta manera, es posible concluir que la alimentación de los lobos marinos si representa una vía importante para la infección de parásitos como *Anisakis simplex*, *Anisakis pegreffii*, *Adenocephalus pacificus* y *Parafilaroides decorus*.

Por otro lado, la presencia de *Strongyloides spp.* y *Ancylostoma spp.* encontrados en lobos marinos de este estudio podría estar directamente relacionada con el ambiente que los rodea. Su principal vía de infección es a través de la penetración de la piel. Se ha observado una alta prevalencia de estos parásitos en mamíferos marinos que se encuentran más cerca de zonas altamente urbanizadas (McHuron et al., 2013). Esta información se respalda con la reportada por Páez-Rosas y Guevara en donde indican que colonias de lobos marinos presentes en Zona Naval, Playa de los marinos, Playa de Oro, Playa Mann, Puerto Baquerizo y Playa Punta Carola se encuentran en la zona más urbanizada de la isla San Cristóbal. Por ello, las colonias de lobos marinos que habitan estas zonas se encuentran más expuestas al contacto con animales domésticos y sus desechos, además de que estos lugares presentan mayor actividad antropogénica (2012).

Finalmente, los resultados permitieron concluir que los marcadores LSU5-1500R y NC5-NC2 presentaron una alta especificidad para la identificación de helmintos intestinales, debido a que con el uso del marcador BD1-BD2 se evidenciaron varias inconsistencias. Lo que lleva a concluir que este último fue el marcador menos selectivo utilizado en este estudio.

CONCLUSIONES

Se logró la identificación de 6 especies de parásitos intestinales en las muestras de heces de lobos marinos de San Cristóbal, que corresponden a *Anisakis simplex*, *Anisakis pegreffii*, *Ancylostoma caninum*, *Strongyloides stercoralis*, *Parafilaroides decorus* y *Adenocephalus pacificus*.

La información obtenida en esta investigación corresponde a un estudio piloto que muestra factores como la dieta y el contacto con perros como las principales vías de contagio de helmintos intestinales. La relación entre la parasitosis y la salud de los lobos debe ser objeto de estudios futuros en los lobos marinos de San Cristóbal.

TABLAS

Tabla 1. cuantificación de adn de las muestras de heces analizadas.

	Codificación	Lugar	Fecha	Extracción ADN			Secuenciamiento
				ng/ul	A260/280	A260/230	
1	LO021021001	LOBERÍA	02-oct-21	4.2	1.3	1.58	Si, secuencia legible
2	NA021021002	ZONA NAVAL	02-oct-21	3.3	1.7	0.37	Si, secuencia ilegible
3	AS021021003	ASTILLERO	02-oct-21	3.8	1.2	0.26	Si, secuencia legible
4	MA021021004	PLAYA DE LOS MARINOS	02-oct-21	11.4	1.72	0.58	Si, secuencia ilegible
5	OR021021005	PLAYA DE ORO	02-oct-21	3.7	1.9	0.37	Si, secuencia legible
6	PM021021006	PLAYA MANN	02-oct-21	13.7	1.7	1	Si, secuencia legible
7	CA021021007	PUNTA CAROLA	02-oct-21	2.4	2.98	0.38	No se envió
8	BA021021008	PUERTO BAQUERIZO	02-oct-21	3.6	1.2	0.69	Si, secuencia legible
9	LO051021009	LOBERÍA	05-oct-21	3.6	1.75	0.42	Si, secuencia legible
10	NA051021010	ZONA NAVAL	05-oct-21	3.9	1.53	0.29	Si, secuencia legible
11	AS051021011	ASTILLERO	05-oct-21	4.3	1.8	0.6	Si, secuencia legible
12	MA051021012	PLAYA DE LOS MARINOS	05-oct-21	28.6	1.87	1.69	Si, secuencia legible
13	OR051021013	PLAYA DE ORO	05-oct-21	19.6	1.77	0.75	No se envió
14	PM051021014	PLAYA MANN	05-oct-21	17.1	1.63	0.18	Si, secuencia legible
15	CA031021015	PUNTA CAROLA	03-oct-21	94.4	1.89	1.1	Si, secuencia legible
16	BA051021016	PUERTO BAQUERIZO	05-oct-21	4.1	1.41	0.19	Si, secuencia legible
17	LO111021017	LOBERÍA	11-oct-21	20.6	1.9	0.89	Si, secuencia ilegible
18	NA111021018	ZONA NAVAL	11-oct-21	5.9	1.14	0.06	Si, secuencia ilegible
19	AS111021019	ASTILLERO	11-oct-21	6.1	1.54	0.12	Si, secuencia legible

20	MA111021020	PLAYA DE LOS MARINOS	11-oct-21	4.5	1.79	0.23	Si, secuencia legible
21	OR111021021	PLAYA DE ORO	11-oct-21	2.2	1.93	0.27	Si, secuencia legible
22	PM111021022	PLAYA MANN	11-oct-21	42.3	1.83	1.51	Si, secuencia legible
23	CA111021023	PUNTA CAROLA	11-oct-21	10.4	2.05	0.15	Si, secuencia legible
24	BA111021024	PUERTO BAQUERIZO	11-oct-21	4.3	1.69	0.04	Si, secuencia legible
25	LO141021025	LOBERÍA	14-oct-21	11.8	1.4	0.02	Si, secuencia legible
26	NA141021026	ZONA NAVAL	14-oct-21	3.3	1.33	0.03	Si, secuencia ilegible
27	AS141021027	ASTILLERO	14-oct-21	4.4	1.4	0.05	Si, secuencia ilegible
28	MA141021028	PLAYA DE LOS MARINOS	14-oct-21	2.6	1.87	0.03	No se envió
29	OR151021029	PLAYA DE ORO	15-oct-21	7.3	1.75	0.14	Si, secuencia ilegible
30	PM141021030	PLAYA MANN	14-oct-21	4.3	1.5	0.07	Si, secuencia legible
31	CA141021031	PUNTA CAROLA	14-oct-21	3.5	1.59	0.09	Si, secuencia legible
32	BA141021032	PUERTO BAQUERIZO	14-oct-21	16.5	1.79	0.16	Si, secuencia legible
33	LO221021033	LOBERÍA	22-oct-21	21.9	1.85	0.26	Si, secuencia ilegible
34	NA221021034	ZONA NAVAL	22-oct-21	4.4	1.3	0.06	Si, secuencia ilegible
35	AS221021035	ASTILLERO	22-oct-21	72.3	1.85	0.39	Si, secuencia legible
36	MA221021036	PLAYA DE LOS MARINOS	22-oct-21	3.3	1.44	0.11	Si, secuencia ilegible
37	OR221021037	PLAYA DE ORO	22-oct-21	71.9	1.86	1.56	Si, secuencia legible
38	PM221021038	PLAYA MANN	22-oct-21	21.7	1.86	0.83	Si, secuencia ilegible
39	CA221021039	PUNTA CAROLA	22-oct-21	3.5	1.5	0.24	No se envió
40	BA191021040	PUERTO BAQUERIZO	19-oct-21	9.7	1.91	0.52	Si, secuencia legible
41	LO281021041	LOBERÍA	28-oct-21	12.2	1.7	0.26	Si, secuencia legible
42	NA281021042	ZONA NAVAL	28-oct-21	34.6	1.8	0.27	Si, secuencia legible
43	AS281021043	ASTILLERO	28-oct-21	10.1	1.61	0.7	Si, secuencia ilegible

44	MA281021044	PLAYA DE LOS MARINOS	28-oct-21	16.5	1.62	0.29	Si, secuencia ilegible
45	OR301921045	PLAYA DE ORO	30-oct-21	7.3	1.58	0.13	Si, secuencia ilegible
46	PM281021046	PLAYA MANN	28-oct-21	12.9	1.77	0.7	Si, secuencia legible
47	CA281021047	PUNTA CAROLA	28-oct-21	7.8	1.98	0.4	Si, secuencia ilegible
48	BA301021048	PUERTO BAQUERIZO	30-oct-21	15.2	1.73	1.05	Si, secuencia legible

Tabla 2. Resultados del secuenciamiento para 3 marcadores moleculares de las muestras de heces

Muestra	Marcadores			Identificación a nivel de especie	Porcentaje de identidad
	LSU5-1500R	BD1-BD2	NC5-NC2		
1		Anisakidae	Anisakidae	<i>Anisakis simplex</i>	89.99%
3		Anisakidae		<i>Anisakis simplex</i>	89.99%
4	Strongyloididae			<i>Strongyloides stercoralis</i>	99.72%
5	Strongyloididae			<i>Strongyloides stercoralis</i>	99.68%
6	Diphyllobothriidae	Diphyllobothriidae		<i>Diphyllobothrium pacificum</i>	100%
8		Anisakidae		<i>Anisakis simplex</i>	89.99%
9		Anisakidae	Anisakidae	<i>Anisakis simplex</i>	89.99%
12	Filaroididae	Anisakidae		<i>Parafilaroides decorus</i>	100%
15	Ancylostomidae	Sarcocystidae	Ancylostomidae	<i>Ancylostoma caninum</i>	98.12%
16		Anisakidae		<i>Anisakis simplex</i>	89.99%
18	Ancylostomidae			<i>Ancylostoma caninum</i>	98.12%
20	Diphyllobothriidae	Diphyllobothriidae	Diphyllobothriidae	<i>Diphyllobothrium pacificum</i>	100%
21		Anisakidae	Anisakidae	<i>Anisakis pegreffii</i>	100%
22	Filaroididae			<i>Parafilaroides decorus</i>	100%
23	Ancylostomidae	Sarcocystidae	Ancylostomidae	<i>Ancylostoma caninum</i>	98.32%
24		Anisakidae	Anisakidae	<i>Anisakis simplex</i>	89.99%
25		Anisakidae		-	-
31		Anisakidae	Anisakidae	<i>Anisakis pegreffii</i>	100%
32		Anisakidae		<i>Anisakis pegreffii</i>	89.80%
35	Diphyllobothriidae			<i>Adenocephalus pacificus</i>	100%
48			Anisakidae	-	-

FIGURAS

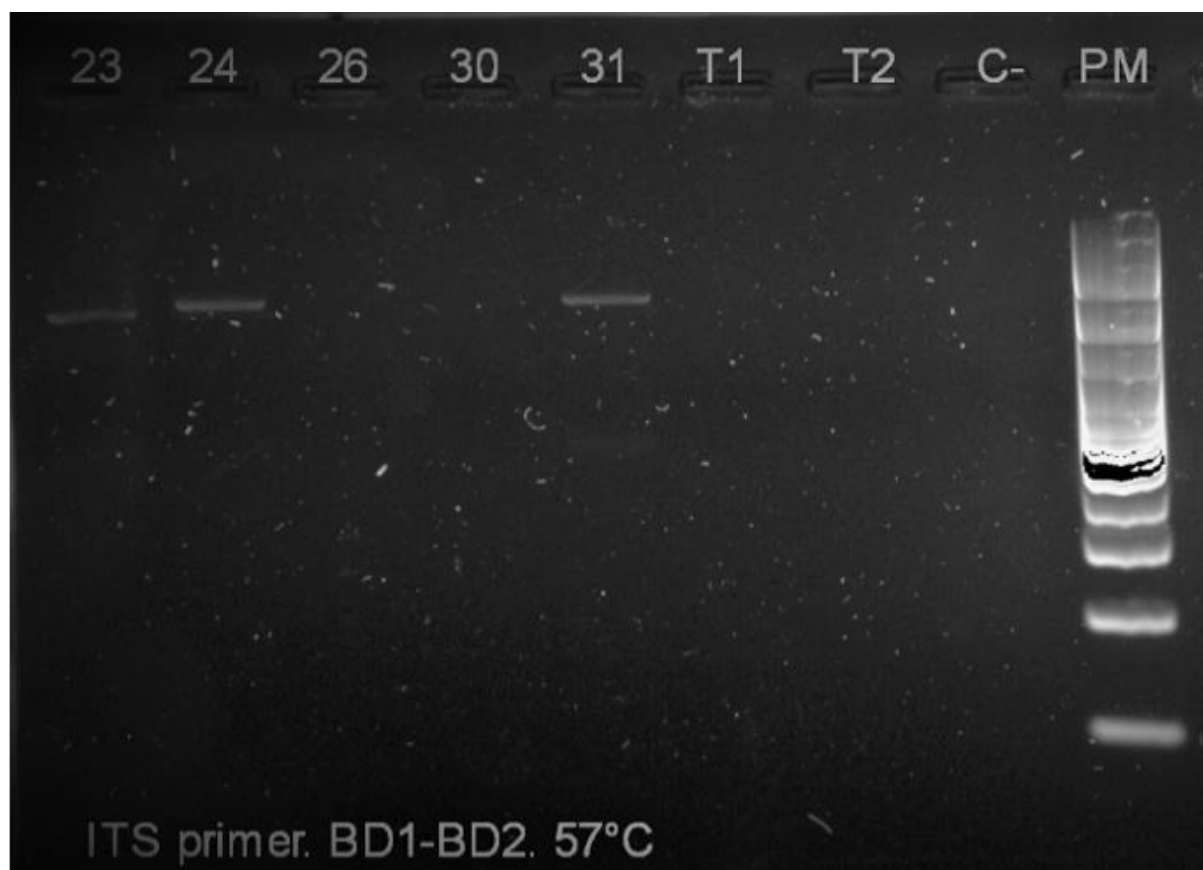


Figura 1: Gel referencial PCR. Marcador BD1-BD1.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CDC. (2019, May 16). CDC - DPDx - Anisakiasis. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dpdx/anisakiasis/index.html>
- CDC. (2019, May 14). CDC - Diphyllbothrium - Biology. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/parasites/diphyllbothrium/biology.html>
- CDC. (2019, September 17). CDC - DPDx - Zoonotic Hookworm. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dpdx/zoonotichookworm/index.html>
- Dailey, M. D. (1970, January). The transmission of *Parafilaroides decorus* (Nematoda: Metastrongyloidea) in the California sea lion (*Zalophus californianus*). In *Proc Helminthol Soc Wash* (Vol. 37, No. 215, p. 22).
- Dailey, M., Ellin, R., & Parás, A. (2005). First report of parasites from pinnipeds in the galapagos islands, ecuador, with a description of a new species of *philophthalmus* (digenea: *philophthalmidae*). *Journal of Parasitology*, 91(3), 614–617.
<https://doi.org/10.1645/ge-3425>
- Dellinger, T., & Trillmich, F. (1999, November). Fish prey of the sympatric Galapagos Fur Seals and Sea Lions: seasonal variation and niche separation. ResearchGate; NRC Research Press.
https://www.researchgate.net/publication/249542449_Fish_pre_y_of_the_sympatric_Galapagos_Fur_Seals_and_Sea_Lions_seasonal_variation_and_niche_separation
- Dougherty, E. C., & Herman, C. M. (1947). New species of the genus *Parafilaroides* Dougherty, 1946 (Nematoda: Metastrongylidae), from sea-lions, with a list of the lungworms of the Pinnipedia. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 14(2), 77-87.

- Ebmer, D., Navarrete, M. J., Muñoz, P., Flores, L. M., Gärtner, U., Brabec, J., Poppert, S., Taubert, A., & Hermosilla, C. (2020). Anthropozoonotic Parasites Circulating in Synanthropic and Pacific Colonies of South American Sea Lions (*Otaria flavescens*): Non-invasive Techniques Data and a Review of the Literature. *Frontiers in Marine Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.543829>
- Dellinger, T., & Trillmich, F. (1999). Fish prey of the sympatric galápagos fur seals and sea lions: Seasonal variation and niche separation. *Canadian Journal of Zoology*, 77(8), 1204–1216. <https://doi.org/10.1139/z99-095>
- Gibson, A. K., Raverty, S., Lambourn, D. M., Huggins, J., Magargal, S. L., & Grigg, M. E. (2011). Polyparasitism Is Associated with Increased Disease Severity in *Toxoplasma gondii*-Infected Marine Sentinel Species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(5), e1142. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001142>
- Gingrich, E. N., Scorza, A. V., Clifford, E. L., Olea-Popelka, F. J., & Lappin, M. R. (2010). Intestinal parasites of dogs on the Galapagos Islands. *Veterinary Parasitology*, 169(3-4), 404–407. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.018>
- Gregory, T. M., Parker, M., Deresienski, D., Alarcón-Ruales, D., Muñoz-Pérez, J. P., Torres, J., Gavilanes, G. I., Lewbart, G. A., & Páez-Rosas, D. (2022). Evaluating the Possibility of Transfusion Medicine, Through Crossmatching in Juvenile Galapagos Sea Lions (*Zalophus wollebaeki*). *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.830272>
- Güiris-Andrade, D. M., Ocegüera-Figueroa, A., Osorio-Sarabia, D., Pérez-Escobar, M. E., Nieto-López, M. G., Rojas-Hernández, N. M., & García-Prieto, L. (2017). *Tziminema unachin*, gen. n. sp. (Nematoda: Strongylidae: Strongylinae) parasite of Baird's tapir *Tapirus bairdii* from Mexico. *Journal of Helminthology*, 92(6), 752–759. <https://doi.org/10.1017/s0022149x17001055>

Gullan, P. J., Dierauf, L. A., & Dailey, M. (2001). Parasitic Diseases. In CRC Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, disease, and Rehabilitation (2nd ed., pp. 357–374). essay, CRC Press.

Hermosilla, C., Hirzmann, J., Silva, L. M. R., Scheufen, S., Prenger-Berninghoff, 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. *Frontiers in Marine Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00459>

Hernández-Orts, J. S., Aznar, F. J., Blasco-Costa, I., García, N. A., Villora-Montero, M., Crespo, E. A., Raga, J. A., & Montero, F. E. (2013). Description, microhabitat selection and infection patterns of sealworm larvae (*Pseudoterranova decipiens* species complex, nematoda: ascaridoidea) in fishes from Patagonia, Argentina. *Parasites & Vectors*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-252>

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). <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04661-1>

Hrabar, J., Smolaka, H., Rasouli-Dogaheh, S., Petrić, M., Trumbić, Ž., Palmer, L., Sakamaki, K., Pavelin, T., & Mladineo, I. (2021). Phylogeny and Pathology of Anisakids Parasitizing Stranded California Sea Lions (*Zalophus californianus*) in Southern California. *Frontiers in Marine Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.636626>

- Katz, H., Morgades, D., & Castro-Ramos, M. (2012). Pathological and parasitological findings in South American fur seal pups (*Arctocephalus australis*) in Uruguay. *International Scholarly Research Notices*, 2012.
- Kuzmina, T. A., Spraker, T. R., Kudlai, O., Lisitsyna, O. I., Zabludovskaja, S. O., Karbowski, G., Fontaine, C., & Kuchta, R. (2018). Metazoan parasites of California sea lions (*Zalophus californianus*): A new data and review. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 7(3), 326–334.
<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.09.001>
- Luton, K., Walker, D., & Blair, D. (1992). Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 56(2), 323–327.
[https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90181-i](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90181-i)
- Máca, O. (2020). Molecular identification of *Sarcocystis lutrae* (Apicomplexa: Sarcocystidae) from the raccoon dog, *Nyctereutes procyonoides*, and the common raccoon, *Procyon lotor*, in the Czech Republic. *Parasites & Vectors*, 13(1).
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04108-z>
- Markowski, S. (1952). The Cestodes of Pinnipeds in the Arctic and other Regions. *Journal of Helminthology*, 26(4), 171–214. <https://doi.org/10.1017/s0022149x00032612>
- McHuron, E. A., Miller, M. A., Gardiner, C. H., Batac, F. I., & Harvey, J. T. (2013). *PELODERA STRONGYLOIDES* INFECTION IN PACIFIC HARBOR SEALS (*PHOCA VITULINA RICHARDII*) FROM CALIFORNIA. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44(3), 799–802. <https://doi.org/10.1638/2013-0027.1>
- MEGA. (2022). MEGA Software. Megasoftware.net. <https://www.megasoftware.net/>
- NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers. (2022). Thermofisher.com.
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-2000#/ND-2000>

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) 11 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)

Padilla-Aguilar, P., Romero-Callejas, E., Osorio-Sarabia, D., Ramírez-Lezama, J., Cigarroa-

Toledo, N., Machain-Williams, C., Manterola, C., & Zarza, H. (2016). Detection and Molecular Identification of *Sarcocystis rileyi* (Apicomplexa: Sarcocystidae) From a Northern Shoveler (*Anas clypeata*) in Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 52(4), 931–935. <https://doi.org/10.7589/2016-01-004>

Páez-Rosas, D., & Guevara, N. (2012, December 13). *Management plan for the conservation of Galapagos sea lions*. ResearchGate; Galapagos National Park.

https://www.researchgate.net/publication/234095777_Management_plan_for_the_conservation_of_Galapagos_sea_lions

Pardo, S., Nuñez, M., Barrios, R., García, V., & Prieto, M. (2009, August). Parasitics index and morfological description of *Contracaecum* sp. (Nematoda: Anisakidae) in transandean... ResearchGate; unknown.

https://www.researchgate.net/publication/262448052_Parasitics_index_and_morfological_description_of_Contracaecum_sp_Nematoda_Anisakidae_in_transandean_shovel_nose_catfish_Sorubim_cuspicaudus_Pimelodidae_from_Sinu_river_basin

Pérez-García, D., Constenla, M., Padrós, F., Soler-Membrives, A., Solé, M., & Carrassón, M. (2015). Parasite communities of the deep-sea fish *Alepocephalus rostratus* Risso, 1820 in the Balearic Sea (NW Mediterranean) along the slope and relationships with enzymatic biomarkers and health indicators. *Deep Sea Research Part I*:

Oceanographic Research Papers, 99, 65–74.

<https://doi.org/10.1016/j.dsr.2015.01.009>

Ramos, P., Lynch, M., Hu, M., Arnould, J. P. Y., Norman, R., & Beveridge, I. (2013).

Morphometric and molecular characterization of the species of *Uncinaria* Frölich, 1789 (Nematoda) parasitic in the Australian fur seal *Arctocephalus pusillus doriferus* (Schreber), with notes on hookworms in three other pinniped hosts. *Systematic Parasitology*, 85(1), 65–78. <https://doi.org/10.1007/s11230-013-9407-x>

Rosenberg, J. F., Haulena, M., Hoang, L. M. N., Morshed, M., Zabek, E., & Raverty, S. A.

(2016). *Cryptococcus gattii* Type VGIIa Infection in Harbor Seals (*Phoca vitulina*) in British Columbia, Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 52(3), 677–681.

<https://doi.org/10.7589/2015-11-299>

Scholz, T., & Kuchta, R. (2016). Fish-borne, zoonotic cestodes (*Diphyllobothrium* and

relatives) in cold climates: A never-ending story of neglected and (re)-emergent parasites. *Food and Waterborne Parasitology*, 4, 23–38.

<https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2016.07.002>

Seguel, M., & Gottdenker, N. (2017). The diversity and impact of hookworm infections in

wildlife. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 6(3), 177–194.

<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2017.03.007>

Shahabi, S., Dehbashi, N., Sarkari, B., Arefkhah, N., Sedaghat, B., & Savardashtaki, A.

(2021). Detection and phylogenetic analysis of *Sarcocystis moulei* and *Sarcocystis* spp. (Sarcocystidae: Apicomplexa) from slaughtered sheep in southwest Iran. *Journal of Parasitic Diseases*, 46(1), 215–219. <https://doi.org/10.1007/s12639-021-01433-7>

Silva, L. M. C., Miranda, R. R. C., Santos, H. A., & Rabelo, É. M. L. (2006).

Differential diagnosis of dog hookworms based on PCR-RFLP from the ITS region of

their rDNA. *Veterinary Parasitology*, 140(3-4), 373–377.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.012>

Trillmich, F. (1979). *Galapagos Research Vol. 68 - Noticias de Galápagos Vol. 29*.

Fundación Charles Darwin. Retrieved October 13, 2022, from

<https://www.darwinfoundation.org/es/publicaciones/galapagos-research/galapagos-research-68/file/39-ng-29-1979>

Trillmich, F. (2014, October 26). IUCN Red List of Threatened Species: *Zalophus wollebaeki*. IUCN Red List of Threatened Species; Name.

<https://www.iucnredlist.org/species/41668/45230540>

Torres, M. de L., & Mena, C. F. (2018). Genetic Consequences of Invasive Species in the Galapagos Islands. In *Understanding invasive species in the Galapagos Islands: From the molecular to the landscape* (Vol. 1, pp. 22–22)., Springer International Publishing.

UNESCO. (2018). Galápagos Islands. Unesco.org. <https://whc.unesco.org/en/list/1/>

Van, N. T. B., Cuong, N. V., Yen, N. T. P., Nhi, N. T. H., Kiet, B. T., Hoang, N. V., Hien, V.

B., Thwaites, G., Carrique-Mas, J. J., & Ribas, A. (2019). Characterisation of gastrointestinal helminths and their impact in commercial small-scale chicken flocks in the Mekong Delta of Vietnam. *Tropical Animal Health and Production*, 52(1), 53–62. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01982-3>

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

<https://doi.org/10.1645/17-187>

Xie, Y., Hoberg, E. P., Yang, Z., Urban, J. F., & Yang, G. (2017). *Ancylostoma ailuropodae* n. sp. (Nematoda: Ancylostomatidae), a new hookworm parasite isolated from wild

giant pandas in Southwest China. *Parasites & Vectors*, 10(1).

<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2209-2>

Yonezaki, S., Kiyota, M., & Baba, N. (2008). Decadal changes in the diet of northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) migrating off the Pacific coast of northeastern Japan. *Fisheries Oceanography*, 17(3), 231–238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2419.2008.00475.x>

Zhu, X., Chilton, N. B., Jacobs, D. E., Boes, J., & Gasser, R. B. (1999). Characterisation of *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences. Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the *embl*, *GenBank*TM and *DDJB* databases under the accession numbers AJ000894–AJ000896, AJ001506, AJ001507 and Y09491. *International Journal for Parasitology*, 29(3), 469–478. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(98\)00226-4](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00226-4)