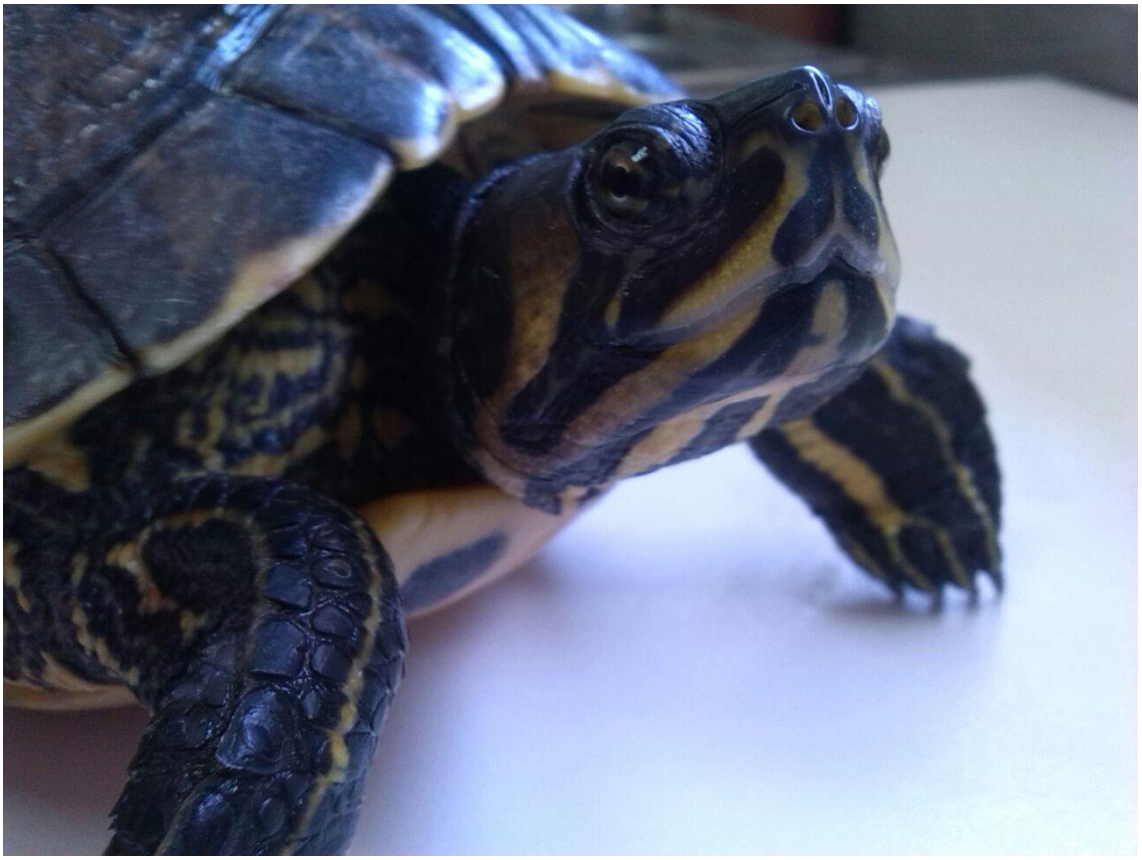
Trabajo Fin de Grado

Alumna: María Auxiliadora García de la Cruz Giménez

Director: Leandro Buffoni Perazzo

Departamento de Sanidad Animal
Facultad de Veterinaria
Universidad de Córdoba



ESTUDIO DE LA POBLACIÓN PARASITARIA EN GALÁPAGOS INVASORES DEL ZOOLÓGICO DE CÓRDOBA

STUDY OF THE PARASITIC POPULATION OF INVASIVE POND TURTLES OF THE ZOO OF CORDOBA

Curso 2015/2016

ÍNDICE **PÁGINAS**

1. Introducción y objetivos……..4

2. Revisión bibliográfica……..6

2.1. Especies estudiadas…….. 6

2.1.1. *Trachemys scripta*……..7

2.1.2. *Pseudemys nelsoni*……..9

2.2. Parque Zoológico de Córdoba…….10

2.3. Especies Exóticas Invasoras…….11

2.3.1. Definición de EEI y criterios para su identificación…….11

2.3.2. Efecto de los galápagos invasores sobre los ecosistemas…….12

2.4. Estado sanitario de los galápagos invasores……14

2.4.1. Helmintos…….14

2.4.2. Coccidios……..17

3. Materiales y métodos……..20

3.1. Animales y hábitat……...20

3.2. Muestras empleadas……..22

3.3. Estudio in vivo…….22

3.4. Estudio post mortem…….24

4. Resultados y discusión…….27

5. Conclusiones…….42

6. Resumen……43

7. Abstract…… 44

8. Bibliografía……45

1. Introducción y objetivos

La protección del medio ambiente y la conservación de la biodiversidad son cuestiones que han de ser entendidas como de vital importancia por toda la sociedad. Los zoológicos juegan un importante papel en esta tarea, tanto por su labor divulgativa como por su trabajo de investigación.

Los parques zoológicos acercan a personas de cualquier clase social a diversas especies de animales salvajes que de otro modo jamás podrían haber observado in vivo. Esto les da la capacidad de transmitir al visitante el valor de las especies y de sus hábitats, y los hace responsables de formar y concienciar al público sobre la importancia de la conservación del medio ambiente. Además, la investigación y el estudio de las distintas especies de fauna silvestre que estos centros albergan puede suponer una gran contribución a la conservación de la biodiversidad y a la protección del medio ambiente (Rodríguez-Guerra, 2010).

La Ley 31/2003 de conservación de la fauna silvestre en los parques zoológicos amplia los requisitos de carácter medio ambiental exigidos a los parques zoológicos. Establece que el mantenimiento en cautividad de la fauna salvaje y su exhibición en los parques zoológicos solo estarán justificados en caso de cumplirse los objetivos y condiciones establecidos en lo que a conservación de la biodiversidad se refiere (Rodríguez-Guerra, 2010).

Uno de los problemas más graves para la conservación de la biodiversidad a nivel mundial es la introducción de especies alóctonas. Una especie alóctona, o especie exótica invasora (EEI), es aquella que es introducida en un nuevo hábitat, natural o seminatural, en el que actúa como agente de cambio y amenaza para la biodiversidad nativa. La creciente expansión de especies exóticas invasoras es la segunda amenaza más relevante por detrás de la destrucción de hábitats (Capdevilla-Argüelles, 2006).

Entre los aspectos negativos de una especie invasora, es importante señalar que uno de los posibles daños que estas especies pueden ocasionar es la introducción de nuevos agentes patógenos con capacidad para colonizar a las especies autóctonas del medio en el que se introducen, entre los cuales se incluyen los parásitos. Asimismo, estos animales pueden actuar como foco de infección y reservorio de parásitos ya existentes en el nuevo medio colonizado.

Muchas especies autóctonas de la Península Ibérica se encuentran afectadas la creciente amenaza que suponen la introducción de especies exóticas. En España se ha elaborado el Catálogo Español de EEI (Real Decreto 630/2013) en el cual se incluyen, entre otras especies, galápagos del género *Trachemys*, una de las especies en las que se centra el presente trabajo. Este estudio también se refiere a la especie *Pseudemys nelsoni*, la cual, si bien no supone actualmente un peligro tan evidente como *Trachemys*, podría llegar a serlo por su creciente comercialización como mascota en sustitución de este último género, cuya comercialización ya está prohibida en Europa.

El objetivo del presente trabajo es determinar y analizar la población parasitaria y evaluar el estado sanitario de galápagos de las especies *Trachemys scripta* y *Pseudemys nelsoni*, procedentes del Parque Zoológico de Córdoba, y valorar de forma comparativa dicha población con la que puede encontrarse en especies de galápagos autóctonos, como son *Mauremys leprosa* y *Emys orbicularis*.

2. Revisión bibliográfica

2.1. Especies estudiadas

Las especies cuya parasitología se ha estudiado en el presente trabajo son *T. scripta* y *P. nelsoni*. Se trata de dos especies de quelonios pertenecientes al grupo de los galápagos y originarias de Estados Unidos. De entre ellas, *T. scripta* es considerada como una EEI y está incluida como tal en el Catálogo Español de EEI. Es más, *T. s. elegans*, subespecie de *T. scripta*, está considerada entre las 100 especies invasoras más extendidas (Real Decreto 630/2013) y su importación a la U.E. está prohibida desde finales de 1997 (CITES, Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora).

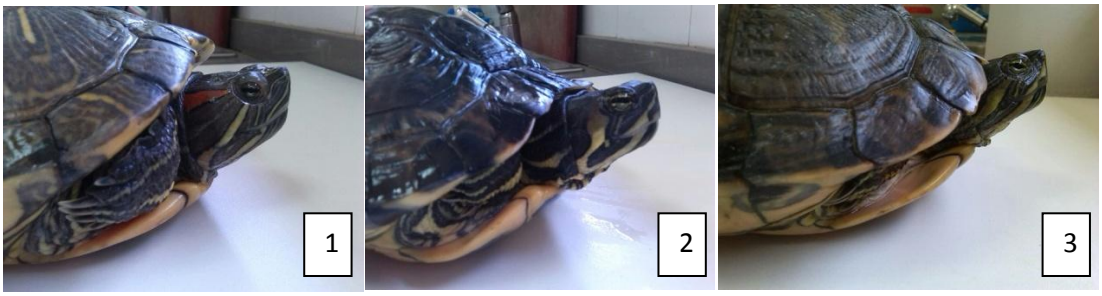
Los quelonios son uno de los 4 órdenes que integran el grupo de los reptiles. Se clasifican en 2 subórdenes, atendiendo al modo en que retraen la cabeza dentro del caparazón, el suborden *Pleurodira* y el *Cryptodira* (O'Malley, 2007). Los galápagos pertenecen al suborden *Cryptodira*.

Reino	• Animalia
Filo	• Chordata
Clase	• Sauropsida
Subclase	• Anapsida
Orden	• Testudines
Suborden	• Cryptodira
Superfamilia	• Testudinoidea
Familia	• Emydidae
Subfamilia	• Deirochelynae
Géneros	• *Deirochelys* • *Chrysemys* • *Graptemys* • *Malaclemys* • ***Pseudemys*** • ***Trachemys***

Esquema 1. Clasificación taxonómica de los géneros *Trachemys* y *Pseudemys*.

2.1.1. *Trachemys scripta*

Los quelonios de la especie *T. scripta* son galápagos de tamaño mediano, cuyo caparazón puede alcanzar una longitud de 309 mm en hembras y 235 mm en machos y que pueden llegar a pesar 2.700 g en el caso de las hembras y 1.470 g en el de los machos. Su rasgo más característico es la amplia y llamativa banda postorbital que presentan a cada uno de los lados de la cabeza (Imagen 1-3) y cuyo color difiere según la subespecie de que se trate (roja en *T. s. elegans*, amarilla en *T. s. scripta* y en *T. s. troosti*). Su piel es de color oliváceo a marrón, surcada por líneas amarillas, tanto en la cabeza como en las patas y la cola. En la cabeza, las bandas supratemporales y orbitomandibulares son muy llamativas y más aún las postorbitales (rojas o amarillas) mencionadas anteriormente y que, como ya se ha dicho, caracterizan a cada subespecie. Las líneas supratemporales se unen con la línea sagital sobre el hocico, apreciándose un dibujo en forma de flecha. El cuello también está surcado por líneas amarillas que convergen bajo la boca formando una "Y" (Martínez-Silvestre y cols., 2011).



Imágenes 1, 2, 3. Detalle de la banda postorbital de *T.s. elegans, T. s. scripta* y *T.s. troostii*. Ejemplares procedentes del Zoológico de Córdoba.

En cuanto al caparazón, presenta forma ovalada y es algo aquillado y aserrado en las escamas marginales posteriores; del mismo color que la piel, posee manchas y bandas longitudinales amarillas y negras que varían entre los distintos individuos. La parte inferior de las escamas marginales, que se unen en las suturas con el peto o plastrón, es de color amarillo con manchas negras, notablemente visibles sobre el fondo amarillo. La anchura del plastrón es mayor en la región anterior del animal, estrechándose hacia la región caudal (Martínez-Silvestre y cols., 2011).

La distribución de *T. scripta* en su región de origen varía según la subespecie. *T. s. scripta* se extiende desde Virginia a Georgia y norte de Florida. *T. s. troosti* se encuentra en Tennessee y Kentucky. El resto del área de distribución de la especie (por el norte hasta Illinois, Iowa y Nebraska y por el oeste hasta Texas y norte de México) está ocupada por *T. s. elegans* (Martínez-Silvestre y cols., 2011).

Actualmente, pueden encontrarse individuos de esta especie en numerosos países de Asia, África y Europa, abundando más en los países mediterráneos (Francia, Grecia, Italia, Portugal, además de España). *T. scripta* posee una gran capacidad de adaptación, por lo que puede encontrársela en todo tipo de masas de agua, incluso en aquellas en las que existe contaminación (Martínez-Silvestre y cols., 2011).

Si nos centramos en el caso de España, nos encontramos con que es posible hallar individuos de *T. scripta* en todo tipo de masas de agua dulce, desde ríos y embalses, hasta lagunas, charcas ó estanques urbanos (Egaña-Callejo, 2007). Su presencia es más acusada en marjales litorales con escasa salinidad. La distribución de *T. s. elegans* está relacionada de forma evidente con su vía de introducción, a través de la liberación de ejemplares en masas de agua localizadas en núcleos urbanos o próximas a ellos, o bien que reciben asiduamente visitantes (Díaz-Paniagua y cols., 2005).

Se trata de una especie en vías de expansión, con una presencia cada vez más amplia en el territorio español. En 2010 se describe su presencia en 32 provincias y 17 comunidades autónomas (Figura 1) (Catálogo Español de EEI).

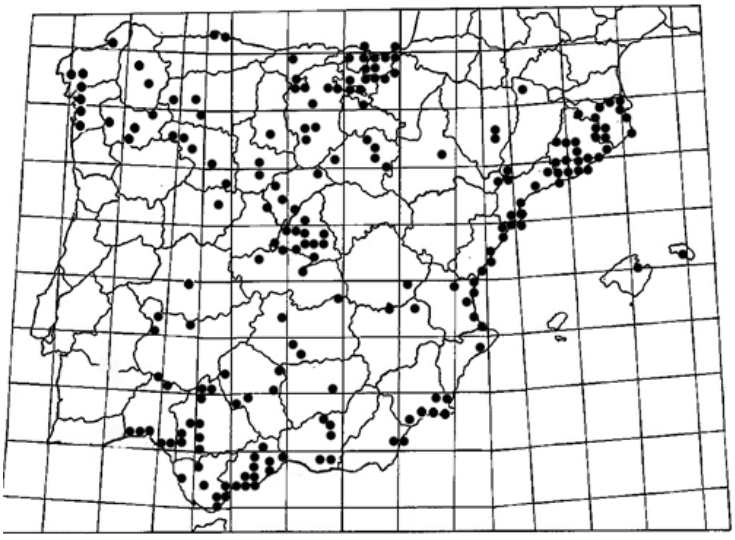
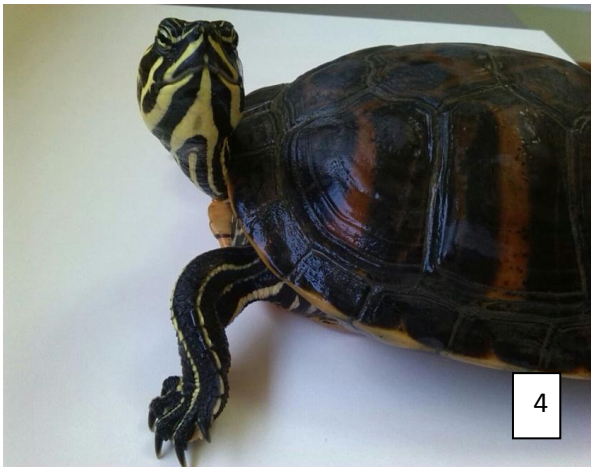


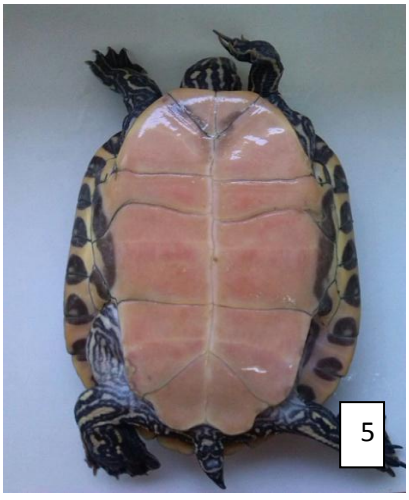
Figura 1. Distribución de *T. scripta* en España con recopilación de citas hasta el año 2010. (Martínez-Silvestre y cols., 2011)

2.1.2. *Pseudemys nelsoni*

En cuanto a *P. nelsoni*, se trata de un galápago de aspecto y ecología similar a *T. scripta.* A pesar de que, como esta última, también ha sido importada como mascota, su comercio no ha sido tan masivo y actualmente no posee el estatus de EEI, si bien existe riesgo potencial de que llegue a serlo, ya que se está convirtiendo en una de las especies de galápago sustitutas de *T. scripta* en el comercio de mascotas (Egaña-Callejo, 2007).

P. nelsoni, también conocida como tortuga de vientre rojo de Florida, es un galápago de tamaño mediano, algo mayor que *T. scripta*. Las hembras miden unos 305 mm de media, pudiendo llegar a medir hasta 375 mm, y pesan 4.000 g. Son notablemente más grandes que los machos, que miden alrededor de 250 mm y pesan 1.800 g. La cabeza es verde oscuro a negra, surcada por líneas amarillas, más gruesas y evidentes que las que se observan en *T. scripta*, y las cuales se extienden a lo largo del cuello. En la parte superior de la cabeza presenta una línea entre los ojos y en la frente las líneas amarillas forman un dibujo en forma de flecha. Las patas, de igual color que la cabeza, también aparecen surcadas por líneas amarillas. Lo más característico de esta especie es el color del plastrón, amarillo y rojo, hasta una tonalidad naranja, llegando a ser rosa oscuro en el centro (Imagen 5). Usualmente presentan una larga línea roja en cada segmento del caparazón, aunque en individuos de más edad dicha línea es inapreciable (Egaña-Callejo, 2007).





Imágenes 4 y 5. Ejemplar de *P. nelsoni* procedente del Zoológico de Córdoba. Se observan las evidentes rayas amarillas en cabeza, cuello y patas, y la característica tonalidad rojiza del plastrón.

Esta especie se encuentra distribuida por toda la Península de Florida. Normalmente habita en lagos y estanques con pequeñas corrientes de agua, además de canales de agua fresca, ciénagas y pequeñas charcas. En España se ha localizado en Gipuzkoa, en el parque de Murgia de Astigarraga, en el parque de Aiete y en la charca Errotatxo de Donostia-San Sebastián (Egaña-Callejo, 2007). En Barcelona se han encontrado individuos de *Pseudemys sp*., pero pertenecientes a la especie *P. concinna* (Martínez-Silvestre y cols., 2013).

2.2. Parque Zoológico de Córdoba

Los individuos empleados en el presente estudio procedían del Parque Zoológico de Córdoba. Dicho parque se encuentra situado en el núcleo urbano de la capital cordobesa. Posee una superficie cercana a las 4,5 hectáreas y aloja a 437 ejemplares de 102 especies diferentes entre mamíferos, aves y reptiles. El zoológico trabaja bajo una estrategia global para desempeñar las funciones de investigación científica, conservación de especies, educación y ocio que la Ley 31/2003 establece que debe cumplir un parque zoológico.

Dentro del parque, los galápagos se encuentran alojados en dos hábitats, uno para las especies autóctonas y otro para las alóctonas, sin que haya contacto entre individuos de uno y otro hábitat. El hábitat destinado a los galápagos alóctonos aloja a las siguientes especies: *T. s. scripta, T. s. elegans, T. s. troostii. P. nelsony* (todas ellas originarias de América) y *Pelodiscus sinensis* (originaria de Asia). Todos ellos han sido recogidos de particulares, por lo que no han tenido contacto con el medio natural.

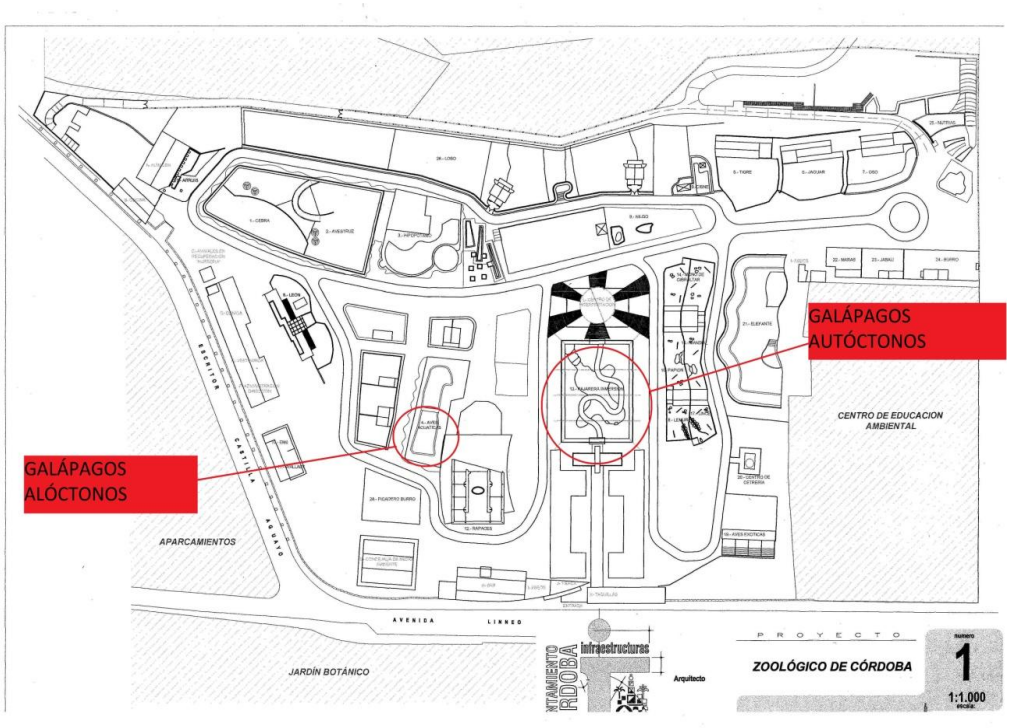


Figura 2. Plano del Parque Zoológico de Córdoba mostrando los hábitats para galápagos.

2.3. Especies Exóticas Invasoras

Las EEI suponen una de las principales causas de pérdida de biodiversidad, siendo la segunda amenaza más relevante por detrás de la destrucción de hábitats (Capdevilla-Argüelles, 2006). Son especialmente dañinas en ecosistemas vulnerables, como las islas y las aguas continentales. La introducción de estas especies invasoras también puede ocasionar pérdidas económicas, especialmente en la producción agrícola, ganadera y forestal, e incluso pueden suponer un riesgo para la salud pública (Real Decreto 630/2013).

2.3.1. Definición de especie exótica invasora y criterios para su identificación

Según el Real Decreto 630/2013, por el que se regula el Catálogo Español de EEI, una EEI es "aquella que se introduce o establece en un ecosistema o hábitat natural o seminatural, y que es un agente de cambio y amenaza para la diversidad biológica nativa, ya sea por su comportamiento invasor, o por el riesgo de contaminación genética".

La CBD (Convention of Biological Diversity) define a las EEI como “aquellas cuya introducción y propagación amenaza a los ecosistemas, hábitats o especies, produciendo daños ambientales”. En este sentido, de la definición básica de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza): “especie exótica que se establece en un ecosistema o hábitat natural o seminatural; es un agente de cambio y amenaza la diversidad biológica nativa” se extraen las bases para la identificación de EEI: 1) “agente de cambio” y 2) “amenaza para la diversidad biológica nativa” (Capdevilla-Argüelles, 2006).

Capdevilla-Argüelles, en un estudio realizado en 2006 sobre diagnóstico y bases para la prevención y el manejo de las EEI, establece 3 tipos de introducciones en función de la intencionalidad: las introducciones intencionales, las no intencionales y las introducciones negligentes. Las introducciones intencionales son aquellas que buscan de forma premeditada el establecimiento de una población en un ecosistema determinado o las derivadas de liberaciones intencionales, aunque éstas se hayan llevado a cabo sin el objetivo de establecer poblaciones alóctonas ni causar impactos negativos. Este sería el caso del abandono de mascotas, vía de entrada los galápagos exóticos invasores y otras muchas EEI, como la cotorra argentina (*Myiopsitta monachus)* o la cotorra de kramer (*Psittacula krameri*).

2.3.2. Efecto de los galápagos invasores sobre los ecosistemas

El potencial invasor de *T. scripta* es muy elevado, y es cada vez más evidente el impacto que estos animales producen dentro de los ecosistemas españoles. El efecto negativo de *T. scripta* se evidencia en todo tipo de poblaciones animales: peces, anfibios, aves y en especies de galápagos autóctonas.

En lo que se refiere a la fauna piscícola, se ha observado la depredación de *T. s. scripta* sobre puestas y adultos de carpas (*Cyprinus carpio*), especialmente durante el periodo de reproducción, a principios de verano. Los galápagos esperan a las carpas en el agua, cerca de la orilla. Cuando la hembra de carpa se dispone a comenzar la ovoposición, realiza el movimiento de "fregado" sobre el fondo fangoso de la orilla, y es este momento el que el galápago aprovecha para sumergirse y consumir los huevos (Martínez-Silvestre y cols., 2011).

En cuanto a su efecto sobre las poblaciones de anfibios, se ha podido observar que los renacuajos de rana común (*Pelophylax perezi*) y sapo de espuelas (*Pelobates cultripes*) tienen la capacidad innata de detectar las señales químicas producidas por los galápagos de especies autóctonas, reconociéndolos como depredadores. Sin embargo, parecen no ser capaces de reconocer estas señales en los galápagos alóctonos, posiblemente por no haber compartido una larga historia evolutiva con éstos. Esto hace que los renacuajos necesiten de un aprendizaje previo para reconocer a los galápagos exóticos como depredadores y este desajuste adaptativo podría representar una ventaja depredadora para las especies exóticas de galápagos sobre los anfibios (Martínez- Silvestre y cols., 2011).

La presencia de *T. scripta* parece producir también un efecto negativo en la reproducción de algunas especies de aves acuáticas. En concreto, se ha observado la expulsión de parejas adultas nidificantes de Zampullín chico (*Tachybaptus ruficollis*) de sus zonas de anidación, por parte de hembras de *Trachemys* al utilizarlos como lugares de asoleamiento (Martínez- Silvestre y cols., 2011).

En cuanto al efecto de estos galápagos invasores sobre las poblaciones de galápagos autóctonos, experimentos realizados con *T. s. elegans* y el galápago europeo, *Emys orbicularis*, demostraron la competencia entre ambas especies por los recursos de asoleamiento. Los resultados evidenciaron el efecto negativo de la especie exótica, la cual desplaza a *E. orbicularis* de sus lugares de asoleamiento predilectos y afecta negativamente a la tasa de supervivencia de esta especie (Cadi y Joly, 2004). En Doñana se han observado diferencias en las tasas de crecimiento en las especies autóctonas en áreas ocupadas por los galápagos invasores (Martínez- Silvestre y cols., 2011).

T. scripta es un buen competidor, ya que alcanza mayores tamaños que las especies de galápagos autóctonas, produce una mayor descendencia, tiene una madurez sexual más temprana y su dieta es más variada. A esto hay que añadir la capacidad de esta especie para adaptarse a vivir en condiciones naturales que los otros galápagos no toleran, como son la contaminación y la presencia humana (Catálogo Español de EEI).

2.4. Estado sanitario de los galápagos invasores

Estudios realizados en la Estación Biológica de Doñana (CSIC) ponen de manifiesto el deficiente estado sanitario de la mayoría de los galápagos exóticos, apareciendo éstos infectados por un gran número de serotipos de *Salmonella* y con presencia de diversos microorganismos patógenos, además de altas tasas de parasitación, lo que pudiera deberse a una falta de adaptación al medio en el que se liberan. Esto hace de los galápagos exóticos una fuente de contagio para la fauna autóctona y un reservorio para diversos microorganismos patógenos (Hidalgo-Vila, 2004). Sin embargo, no se han encontrado estudios que determinen la influencia que el estado sanitario de los galápagos invasores podría llegar a tener sobre los galápagos autóctonos (Cardells, 2012).

En los estudios sobre galápagos autóctonos y alóctonos en libertad, se han encontrado evidencias de infestaciones por diversos agentes patógenos, como enterobacterias, principalmente *Salmonella*, y *Herpesvirus*. Respecto a la fauna parasitaria, se describe la presencia de helmintos (*Serpinema microcephalus*, *Aplectana sp.*, *Falcaustra sp.*, *Spiroxys*, *Spironoura*, *Anisakis*, *Eustrongylides sp.* y *Capillariidae*; Hidalgo-Vila y cols., 2004; Acosta-García y cols., 2004; Martínez-Silvestre y cols., 2013) y la presencia de varias especies de *Eimeria* (Segade y cols., 2006).

2.4.1. Helmintos

La fauna helmíntica de *T. scripta* y, en menor medida de *P. nelsoni*, ha sido muy estudiada en sus áreas de origen. Sin embargo, son pocos los estudios realizados para determinar la fauna parasitaria de estos galápagos exóticos en España. La información disponible describe la fauna helmíntica de individuos de *T. s. elegans* de poblaciones establecidas en Andalucía (Hidalgo-Vila y cols., 2004; Acosta-García y cols., 2004), y de individuos capturados en varias localidades de Valencia (Martínez-Silvestre y cols., 2011). También se ha encontrado un estudio que describe la presencia de *Serpinema microcephalus* en galápagos naturalizados de las especies *T. scripta* y *Pseudemys sp.* (*P. concinna*) en Barcelona, capturadas durante acciones de erradicación en el año 2012 (Martínez-Silvestre y cols., 2013).

Sólo se han identificado cuatro especies de nematodos y una de trematodos parasitando a *T. s. elegans* en España, mientras que en su hábitat natural de distribución hay descritas hasta 17 especies de helmintos parásitos. *Serpinema trispinosus* y *Neoechinorrhynchus* son las especies que con más frecuencia se observan en Estados Unidos . Sin embargo, ninguna de etas especies ha sido detectada en individuos de *T. s. elegans* en España, sino que por el contrario, aparecen infectados por parásitos comunes de los galápagos autóctonos *Mauremys leprosa* y *E. orbicularis*. Esto puede deberse a que la mayoría de los galápagos exóticos importados a Europa han sido criados en cautividad y no han tenido contacto con su hábitat natural (Martínez-Silvestre y cols., 2013).

Serpinema microcephalus es la especie de nematodo más frecuentemente identificada en las poblaciones de galápagos alóctonos analizadas en España. Se trata de un helminto de ciclo de vida indirecto, común en galápagos de la Región paleártica (Baker, 1979), previamente descrito en *M. leprosa* y *E. orbicularis* (Lopez-Neyra, 1947).

Se trata de un parásito de ciclo heteroxeno que precisa el paso por hospedadores intermediarios antes de llegar al quelonio. El hospedador definitivo más habitual es *M. leprosa*, en el que puede llegar a producir grandes infestaciones (Villaran & Dominguez, 2009), aunque también está citado en *E. orbicularis* (Martínez-Silvestre y cols., 2013). Las larvas de primer estadio (L_1) eclosionan en el útero y son liberadas al medio con las heces o tras la ruptura de una hembra grávida. En los hospedadores intermedios se produce el desarrollo hasta L_3 (Martínez-Silvestre y cols., 2015). Los posibles hospedadores intermediarios son diversos vertebrados, como peces y anfibios anuros, y también invertebrados, como gasterópodos, microcrustáceos, e incluso larvas de odonatos, Todos estos hospedadores son habituales en la dieta de los galápagos omnívoros, como *Trachemys spp*. o *Pseudemys sp*. Una vez en el tracto digestivo del hospedador definitivo, el parásito se ancla en la mucosa digestiva, donde se alimenta (Martínez-Silvestre y cols., 2013).

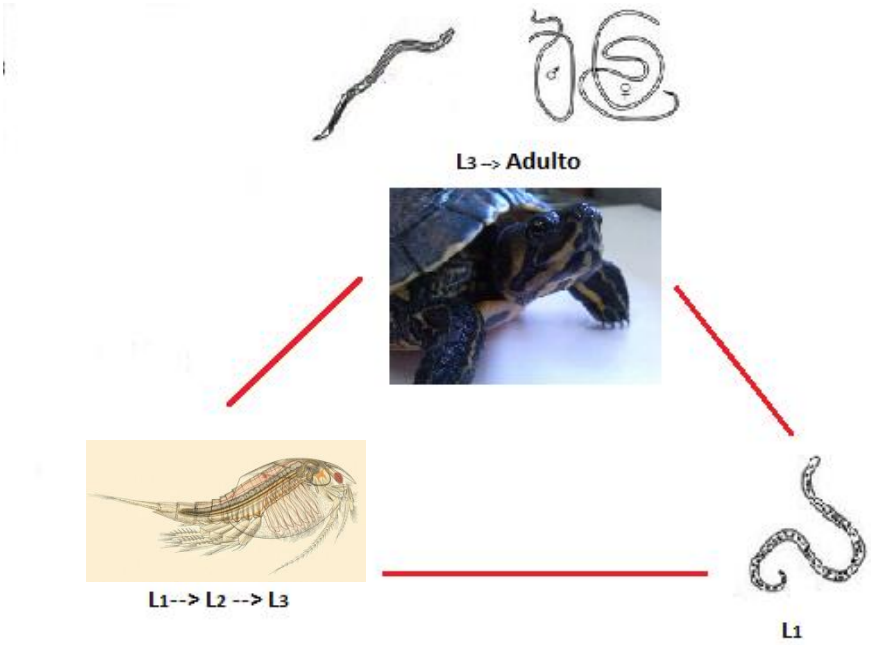


Figura 3. Ciclo biológico de *S. microcephalus*.

La identificación de *S. microcephalus* en *T. scripta* y *Pseudemys sp*., en esta última especie detectado por primera por Martínez-Silvestre y cols. en 2012, pone de manifiesto una nueva colonización del parásito, que ha ocupado en los galápagos exóticos el nicho ocupado por *S. trispinosum* en su área natural de distribución (Hidalgo-Vila y cols., 2004).

Falcaustra donanaensis también ha sido frecuentemente encontrado en galápagos exóticos capturados en Andalucía. La primera identificación de este nematodo de ciclo directo se realizó en poblaciones del galápago autóctono *M. leprosa*, de un área que no había sufrido la invasión por galápagos exóticos, la Reserva Biológica de Doñana, en Huelva (Hidalgo-Vila y cols., 2004), lo que indica que no se trata de un parásito exótico introducido por *T. s. elegans* y que su aparición en dichos galápagos, al igual que ha ocurrido con *S. microcephalus*, es el resultado de la colonización de un nuevo hospedador por parte del nematodo. Se han detectado otros nematodos pertenecientes al género *Falcaustra*, tanto en Andalucía como en Valencia, pero no se ha podido confirmar la especie (Martínez-Silvestre y cols., 2011).

La identificación de nematodos del género *Physaloptera* en un galápago exótico capturado en Andalucía, constituye también la primera cita de nematodos de este género

en galápagos exóticos procedentes del continente americano (Hidalgo-Vila y cols., 2004).

En cuanto a los trematodos, es frecuente la presencia del género *Telorchis* en los galápagos autóctonos *M. leprosa* y *E. orbicularis*. Sin embargo, su presencia en individuos *T. s. elegans* naturalizados en España fue citada por primera vez en Valencia en 2006 (Martínez-Silvestre y cols., 2011). En 2008 se confirmó la presencia del parásito *Telorchis annulata* en ejemplares de *T. s. elegans* capturadas también en Valencia (Martínez-Silvestre y Soler, 2009).

Otros parásitos que han sido identificados en las poblaciones de galápagos exóticos presentes en nuestro país han sido estrónglilos y anisakis tipo 1. La detección de estos parásitos en galápagos alóctonos se realizó por primera vez en un estudio llevado a cabo en individuos de *T. s. elegans* capturados en el Parque Nacional de Doñana. Se observó una larva de *Eustrongylides sp*. profundamente introducida en la mucosa gástrica de uno de los ejemplares de galápago de Florida que fueron sometidos a examen post mortem. Los nematodos de este género alcanzan la madurez en el proventrículo de aves piscívoras. Los estadios larvarios invaden una amplia variedad de peces y, ocasionalmente, anfibios, reptiles o mamíferos pueden actuar como hospedadores paraténicos. Esta fue la primera descripción de este parásito en un galápago. Una única larva de *Anisakis* tipo 1 fue recuperada del intestino de uno de los galápagos que formaron parte del estudio. Considerando que el hábitat natural de *T. s. elegans* son masas de agua dulce, la transmisión de *Anisakis* no está clara. Podría deberse al uso de peces marinos como cebo en las trampas empleadas para la captura de los individuos (Acosta-García y cols., 2004).

2.4.2. Coccidios

Los estudios referentes a la fauna coccidia de los quelonios concluyen que las especies del género *Eimeria* son las que con más frecuencia infectan a estos animales. El género *Eimeria*, perteneciente a la familia Eimeriidae, phylum Apicomplexa, infecta frecuentemente a vertebrados y se han descrito más de 120 especies que parasitan a reptiles. Si bien las infecciones que tienen lugar en la naturaleza suelen ser autolimitantes, en cautividad pueden llegar a causar alta mortalidad. Los ooquistes del

género *Eimeria* se caracterizan por ser de pared delgada y forma más o menos esférica, con 4 esporoquistes en su interior, conteniendo cada uno de ellos 2 esporozoitos (Gurri-Lloveras, 1991).

El ciclo biológico es directo, transmitiéndose la infección por vía fecal-oral, y teniendo lugar el desarrollo en 3 fases de reproducción: la fase sexual o fase de gametogonia, la cual tiene lugar en el epitelio intestinal; seguida de una fase asexual en el medio ambiente (fase de esporogonia); y, finalmente, una tercera fase de reproducción asexual en el intestino, llamada merogonia o esquizogonia, que comienza cuando los ooquistes resultantes de la segunda fase son ingeridos por un nuevo hospedador. La merogonia precede a la gametogonia, considerada la fase adulta. En la clase Reptilia, las infecciones afectan más frecuentemente al tracto gastrointestinal, la lámina propia del intestino y seguidamente a la vejiga, conductos biliares e hígado (Gurri-Lloveras, 1991).

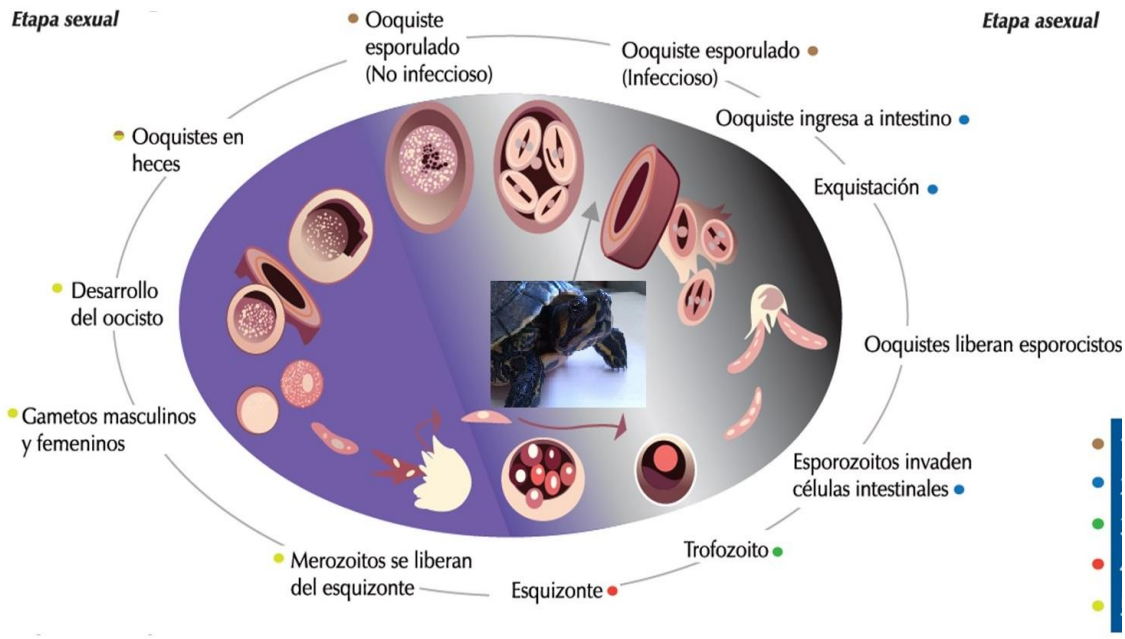


Figura 4. Ciclo biológico del género *Eimeria* (Pérez-Santigosa y cols., 2006).

En España se ha realizado un estudio sobre la fauna coccidia presente en galápagos autóctonos de la especie *E. orbicularis* en Galicia, encontrándose las siguientes especies: *E. gallaceaensi* y *E. emydis*, ambas descritas por primera vez, y *E. mitraria*, descrita por primera vez en esta especie (Segade y cols. 2006). Sin embargo, no se han encontrado trabajos previos sobre la fauna coccidia de los individuos de *T. scripta* o *P.*

nelsony naturalizados en España, si bien existen investigaciones referentes a estas especies en sus áreas de origen.

Así, Duszynski-Morro (2014), describe las distintas especies del género *Eimeria* encontradas en galápagos de distintas especies, incluyendo a *T. s. elegans* y *Pseudemys sp.*, obteniendo los siguientes resultados:

Coccidios encontrados en *T. s. elegans*	**Coccidios encontrados en *Pseudemys sp.***
Eimeria chrysemydis	*Eimeria marginata*
Eimeria graptemydos	*Eimeria somervellensis*
Eimeria lutotestudinis	*Eimeria cooteri*
Eimeria marginata	*Eimeria lutotestudinis*
Eimeria mitraria	*Eimeria mitraria*
Eimeria pseudemydis	*Eimeria pseudemydis*
Eimeria pseudogeographica	*Eimeria sp. (species inquirenda)*
Eimeria scriptae	*Eimeria somervellensis*
Eimeria stylosa	*Eimeria texana*
Eimeria tetradacrutata	
Eimeria trachemydis	

Tabla 1. Información extraída de Duszynski-Morro, 2014.

3. Materiales y métodos

3.1. Animales y hábitat

Para este estudio se ha trabajado con galápagos procedentes del Parque Zoológico de Córdoba. Éstos se encuentran alojados en un hábitat semiacuático destinado a galápagos alóctonos en el que conviven distintas especies: *T. s. scripta, T. s. elegans, T. s. troostii. P. nelsony* (procedentes de América) y *Pelodiscus sinensis* (originaria de Asia), además de híbridos de algunas de estas especies. La especie predominante es *T. scripta*, principalmente las subespecies *scripta* y *elegans*. El número total de animales es ≈250. El porcentaje de hembras es mucho mayor que el de machos, aproximadamente un 85%, y todos los individuos son mayores de 2 años, todos ellos habiendo sido recogidos de particulares.

El hábitat consiste en un estanque de agua dulce con un islote central y vegetación semiacuática, como juncáceas, y terrestre, entre ellas un sauce. Algunas aves anátidas comparten el estanque con los galápagos. La alimentación consiste en pienso, el cual se les aporta durante los meses de abril a octubre, ya que el resto del año entran en hibernación. El pienso está compuesto por una mezcla de proteínas animales y vegetales (MonsterDiets para tortugas acuáticas ™).

Imágenes 6 y 7. Hábitat para galápagos del Zoológico de Córdoba.

A la llegada de los animales al zoológico, el veterinario del parque realiza una inspección sanitaria de los mismos. Se realiza un examen clínico visual del animal y en caso de no detectar ninguna anomalía se introduce a éste en su nuevo hábitat. Los galápagos son inspeccionados de forma visual mientras están en el estanque de forma periódica, pero no existe ningún plan de saneamiento establecido para ellos.

Se establecieron 2 estudios: un estudio *in vivo* y un estudio postmortem. Para el estudio *in vivo* se capturaron 33 galápagos, los cuales fueron aislados durante la realización de este estudio, mientras para el estudio postmortem se emplearon 11 animales que habían sido encontrados muertos en el estanque o que murieron durante el estudio, pertenecientes a las especies *T. s. scripta* y *T. s. elegans*.

Los animales empleados para el estudio *in vivo* fueron capturados y alojados en un nuevo hábitat (Imagen 8) durante el tiempo en que se estuvo realizando la recogida de heces (de abril a junio). La época en la que se recogieron las muestras coincidía con la salida de hibernación de los animales, época en la que aún no están del todo activos y a penas se alimentan. Esto impidió que pudieran obtenerse muestras de los 33 animales capturados y finalmente solo se consiguieron recoger 17 muestras de heces. La identificación de estos animales se realizó mediante la implantación de un microchip en la pata trasera izquierda de cada uno de ellos (Imagen 9).

Imagen 8. Hábitat temporal de los galápagos empleados en el estudio *in vivo*.

Imagen 9. Implantación de un microchip a uno de los galápagos.

3.2. Muestras empleadas

Se establecieron dos categorías de muestras biológicas para el estudio: muestras de heces de animales vivos y contenido intestinal de animales muertos y debidamente conservados. El contenido intestinal era obtenido durante la necropsia del animal. Las heces fueron obtenidas de forma individual de cada uno de los galápagos.

3.3. Estudio *in vivo*

Toma de muestras

Para el examen coprológico se aisló a cada individuo en terrarios individuales (Imagen 10) para poder determinar a qué individuo pertenecía cada muestra. Las muestras se obtuvieron de galápagos de las especies *T. s. scripta*, *T. s. elegans*, *T. s. troostii*. *P. nelsony*, además de híbridos de estas especies. La recogida se realizó durante los meses de abril, mayo y junio. En la tabla 2 se ofrece una descripción de cada uno de los individuos. Tres de ellas murieron durante el estudio, por lo que se emplearon también en el estudio post mortem.

Imagen 10. Galápagos alojados en terrarios individuales.

Nº	Especie	Sexo	Peso (g)	Edad ≈	Observaciones
1	*T. scripta scripta*	M	904	6	Muerta 18/05
2	*T. scripta scripta*	H	1224	8	
3	*T. scripta troostii*	H	1655	6	
4	*T. scripta scripta*	H	829	8	
5	*T. scripta scripta*	H	1802	5	
6	*Pseudemys nelsoni*	H	1698	7	
7	*T. scripta elegans*	H	1464	5	
8	*T. scripta scripta*	H	1219	4	
9	*T. scripta scripta*	H	1313	7	
10	*Pseudemys nelsoni*	H	1310	8	
11	*Pseudemys nelsoni* (híbrido)	H	2986	20	
12	*T. scripta híbrido*	H	1390	5	Muerta 25/05
13	*T. scripta scripta*	H	1631	6	
14	*T. scripta scripta*	M	823	9	
15	*T. scripta scripta*	H	1270	6	
16	*Pseudemys nelsoni*	H	1609	4	
17	*T. scripta scripta*	H	1781	5	
18	*T. scripta scripta*	H	1850	15	
19	*T. scripta híbrido*	H	983	8	
20	*T. scripta scripta*	H	1257	9	
21	*T. scripta scripta*	H	1298	7	
22	*T. scripta scripta*	M	778	5	
23	*T. scripta scripta*	H	1035	9	
24	*Pseudemys nelsoni*	H	1201	5	
25	*T. scripta scripta*	H	1958	11	
26	*T. scripta scripta*	H	1510	6	
27	*T. scripta scripta*	H	1382	6	Muerta 25/05
28	*T. scripta scripta*	H	2001	15	
29	*T. scripta scripta*	H	2260	15	
30	*T. scripta troostii*	H	2191	15	
31	*T. scripta scripta*	H	2052	11	
32	*T. scripta elegans*	H	2109	8	
33	*T. scripta scripta*	H	1661	6	

Tabla 2. Relación de individuos empleados para el examen coprológico.

Análisis de muestras

Las heces han sido analizadas mediante observación directa de la muestra al microscopio y una segunda observación tras haber procedido a la filtración y sedimentación de las mismas. Este método permitió detectar larvas de nematodos y ooquistes de protozoos.

La sedimentación permite concentrar huevos, quistes y larvas en un menor volumen de muestra fecal, lo que facilita su detección e identificación. En este caso se utilizaron heces frescas, las cuales se filtraron, mezclándose con agua el filtrado obtenido, y se sometieron a una centrifugación ligera.

Las muestras se sometieron también a la tinción de Kinyoun para detectar la presencia de *Cryptosporidium*. Para ello, se prepararon y fijaron con etanol extensiones delgadas de las distintas muestras y se colorearon siguiendo la técnica de tinción de ácido-alcohol resistencia o técnica de Kinyoun modificada, que consiste en:

- Teñir con fuchina durante 2 minutos. Lavar con agua.
- Decolorar con etanol-HCI. Lavar con agua.
- Teñir con azul de metileno durante 1 minuto. Lavar con agua. Observar al microscopio con objetivo de 100X empleando aceite de inmersión.
- Resultado: los microorganismos ácido-alcohol resistentes (como los ooquistes de *Cryptosporidium*) se observan como estructuras esféricas de color violeta-fucsia sobre un fondo de tonalidad azulada y los microorganismos no acido-alcohol resistentes de color azul.

3.4. Estudio postmortem

Toma de muestras

Para el estudio postmortem se emplearon un total de 11 animales, 3 de ellos murieron durante el período de realización del presente estudio y se procedió a su necropsia de forma inmediata, otros 8 fueron hallados muertos en el estanque con anterioridad al estudio y sometidos a conservación por congelación hasta el momento de la necropsia. En la tabla 3 se muestra una relación de los individuos analizados.

Nº necro.	Especie	Sexo	Peso (g)	Edad ≈
1	*T. scripta scripta*	M	904	6
2	*T. scripta*	H	1800	-
3	*T. scripta hibrido*	H	1390	-
4	*T. scripta scripta*	H	800	8
5	*T. scripta scripta*	H	1382	6
6	*T. scripta elegans*	H	1900	8
7	*T. scripta elegans*	H	500	7
8	*T. scripta scripta*	H	1200	6
9	*T. scripta scripta*	H	400	6
10	*T. scripta scripta*	H	2800	-
11	*T. scripta scripta*	H	600	5

Tabla 3. Relación de individuos empleados en el examen post mortem.

Para la necropsia se comenzó cortando el puente o unión entre el plastrón y el espaldar mediante segueta (Imagen 11). Se retiró el plastrón y abrieron las serosas empleando un bisturí. Se extrajo el tracto digestivo, desde el esófago hasta la cloaca, utilizando bisturí y tijeras. Éste se dividió en estómago, intestino delgado e intestino grueso (Imágenes 12 y 13). Posteriormente se realizó una inspección visual, un lavado con agua, raspado e inspección de la mucosa de cada una de las porciones.

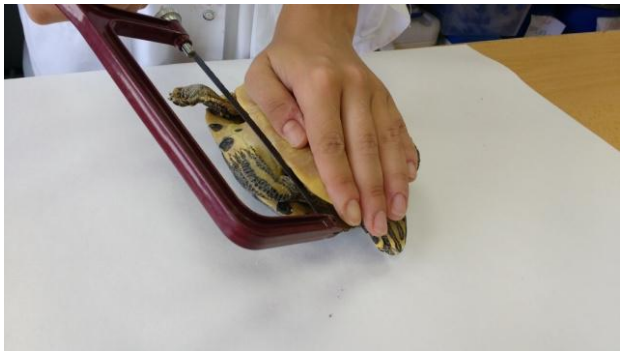


Imagen 11. Corte del puente.

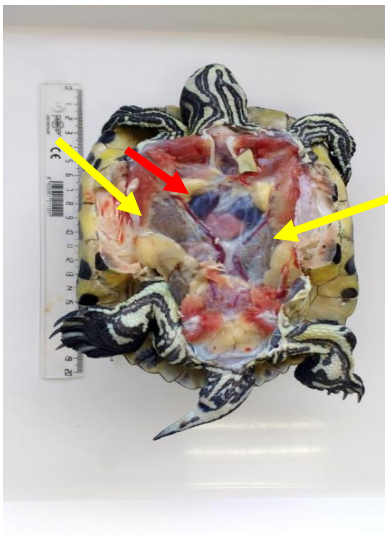


Imagen 12. Galápago una vez retirado el plastrón (flecha roja: corazón; flechas amarillas: hígado).

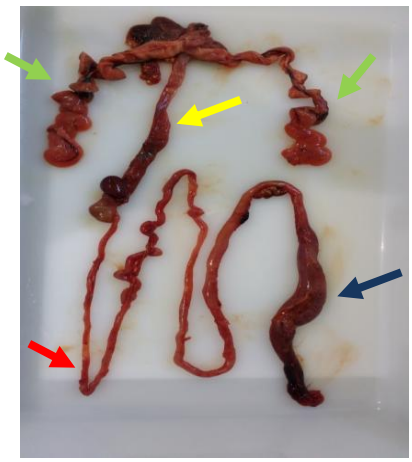


Imagen 13. Tracto gastrointestinal (flecha azul: estómago; flecha roja: intestino delgado; flecha amarilla: intestino grueso; flechas verdes: ciegos).

Análisis de muestras

Se comenzó con una observación directa con lupa de la mucosa de cada una de las porciones en que se había dividido el tracto digestivo. Después se realizó un raspado de la mucosa de las primeras porciones del intestino delgado y del grueso, extensión del material obtenido y observación al microscopio. Por último, se realizó un lavado para extraer el contenido de las distintas secciones, el cuál fue sometido a una inspección directa con lupa y posteriormente se sometió a sedimentación. En este caso no se realizó centrifugación de la muestra, si no que se dejó sedimentar por gravedad durante 2-3 horas. El sedimento se observó mediante microscopio.

4. Resultados

4.1. Resultados del estudio *in vivo*

Se analizó un total de 17 muestras de heces recogidas de la población de 33 galápagos que se aisló para el estudio. Mediante el estudio coprológico de las heces por observación directa y sedimentación se detectó en 10 de las muestras la presencia de ooquistes esporulados del género *Eimeria* y en 5 se observaron larvas L_1 de *Serpinema microcephalus*. La tabla 4 recoge la relación de muestras analizadas y los resultados obtenidos de su análisis.

Muestra	Especie	Sexo	Fecha recogida	Resultados
1	*T. scripta*	H	26/04/2016	Negativo
2	*T. scripta*	H	26/04/2016	Negativo
3	*T. scripta*	H	26/04/2016	Negativo
4	*T. scripta*	H	12/05/2016	Negativo
5	*T. scripta*	H	12/05/2016	Negativo
6	*T. scripta*	H	12/05/2016	Negativo
7	*T. scripta*	H	12/05/2016	Positivo a *E. graptemydos*
8	*T. scripta*	H	23/05/2016	Positivo a *E. graptemydos*
9	*P. nelsoni*	H	26/04/2016	Positivo a *S. microcephalus* y *E. graptemydos*
10	*P. nelsoni híbrido*	H	10/05/2016	Positivo a *S. microcephalus*, *E. marginata* y *E. graptemydos*
11	*T. scripta scripta*	H	24/05/2016	Positivo a *S. microcephalus* y *E. marginata*
12	*T. scripta scripta*	H	23/05/2016	Positivo a *S. microcephalus* y *E. graptemydos*
13	*T. scripta scripta*	H	24/05/2016	Positivo a *E. marginata*, *E. graptemydos* y *E. trachemydis*
14	*T. scripta scripta*	H	31/05/2016	Positivo a *E. marginata*
15	*T. scripta scripta*	H	30/05/2016	Positivo a *E. chrysemydis*, *E. trachemydis* y *E. graptemydos*
16	*T.scripta scripta*	H	02/06/2016	Positivo a *E. chrysemydis*, *E. trachemydis*, *E. graptemydos* y *S. microcephalus.*
17	*T.scripta scripta*	H	02/06/2016	Negativo

Tabla 4. Relación de muestras empleadas y resultados obtenidos.

El análisis de los parámetros morfológicos permitió identificar 4 de las 5 especies de *Eimeria* observadas, las cuales se describen a continuación:

- ***Eimeria graptemydos:*** (Imágenes 14 y 15) en esta especie los ooquistes son elipsoides a subesféricos, ocasionalmente ovoides, midiendo 12,6x11,4 µm, con una superficie lisa y pared de una sola capa y 0,5 µm de grosor. No se observa micropilo pero sí gránulo

polar. El residuo del ooquiste (Imagen 17) es esférico y posee una membrana que contiene numerosos gránulos esféricos. Los esporocistos son elipsoides, con un cuerpo de Stieda delgado y convexo y un residuo del esporocisto esférico, consistente en una membrana que rodea algunos gránulos esféricos. Los esporozoitos presentan un gran cuerpo refráctil, elipsoide o esférico, en su extremo más ancho, y uno más pequeño en su extremo más estrecho. El núcleo es indistinguible. El hospedador habitual es *Graptemys geographica* (Wacha and Christiansen, 1976). Otras especies en las que se ha identificado son *Chrysemys picta belli, Chrysemys picta dorsalis, Graptemys caglei, Graptemys versa, Kinosternon flavescens flavescens, Kinosternon subrubrum hippocrepis, Trachemys gaigeae* y *T. s. elegans* (Duszynski-Morro, 2014). Todas estas especies pertenecen a la familia Emydidae y son originarias del continente americano.

Imagen 14. Ooquiste esporulado de *E. graptemydos* encontrado en el galápago 11 (100X, con contraste de interferencia).

Imagen 15. Ooquiste esporulado de *E. graptemydos* encontrado en el galápago 11 (100X, con contraste de interferencia). La flecha señala el residuo del ooquiste.

- ***Eimeria marginata:*** (Imagen 16) los ooquistes de esta especie son piriformes, midiendo 22,1x17,6 µm , con el extremo polar redondeado y superficie lisa, pared de una sola capa con porción interior característicamente más oscura que la exterior. No presentan micropilo y el gránulo polar puede estar presente o ausente. El residuo del ooquiste es esférico, rodeado por una membrana y conteniendo numerosos gránulos esféricos; se localiza normalmente en el extremo polar. Los esporocistos son elipsoides, normalmente agrupados en el extremo antipolar del ooquiste, con un cuerpo de Stieda delgado y convexo del que parten 2 o más prolongaciones filamentosas. El residuo del esporocisto es elipsoide a esférico, rodeado por una membrana y conteniendo gránulos esféricos. Los esporozoitos contienen un cuerpo refráctil elipsoide o esférico en el extremo más ancho y otro más pequeño en el extremo más estrecho. El núcleo puede visualizarse en la región media del esporozoito (Wacha and Christiansen, 1976). El hospedador de *E. marginata* es *Chrysemis picta belli* (Deeds and Jahn, 1939). También se ha identificado en *Graptemys geographica, Graptemys pseudogeographica, Pseudemys concinna, Trachemys gaigeae* y *T. s. elegans* (Duszynski-Morro, 2014). Todas estas especies pertenecen a la familia Emydidae y son originarias del continente americano.

Imagen 16. Ooquiste esporulado de *E. marginata* encontrado en el galápago 12 (100X, microscopio con contraste de interferencia). La fecha señala las 2 prolongaciones que parten del cuerpo de Stieda.

- ***Eimeria chrysemydis:*** (Imágenes 17 y 18) los ooquistes son piriformes, con el extremo polar ligeramente curvado y de superficie lisa. La pared (1,0 µ de grosor) está constituida por una sola capa. . Presenta un opérculo difícil de percibir, detectable por una fina línea de fractura alrededor de la circunferencia del ooquiste cerca del extremo

polar. El gránulo polar puede estar presente o ausente. El residuo del ooquiste es elipsoide o esférico y contiene un área vacuolar claramente definida, rodeada de numerosos gránulos esféricos (Imagen 20). Los esporocistos son elipsoides, normalmente agrupados en el extremo antipolar, conteniendo un cuerpo de Stieda delgado y convexo. El residuo del esporocisto es romboidal, elipsoidal o esférico, consistiendo en una membrana que contiene gránulos esféricos. Se observa un gran cuerpo refráctil, esférico a elipsoide, normalmente en el extremo más estrecho. Los esporozoitos están ampliamente cubiertos por el residuo del esporocisto y el núcleo no se distingue (Wacha and Christiansen, 1976). *E. chrysemydis* había sido anteriormente descrita en *Chrysemis picta belli, Graptemys geographica, Trachemys gaigeae* y *T. s. elegans* (Duszynski-Morro, 2014). Todas estas especies pertenecen a la familia Emydidae y son originarias del continente americano.

Imagen 17. Ooquiste esporulado de *E. chrysemydis* encontrado en el galápago 15 (100X, microscopio con contraste de interferencia). La flecha señala el residuo del ooquiste.

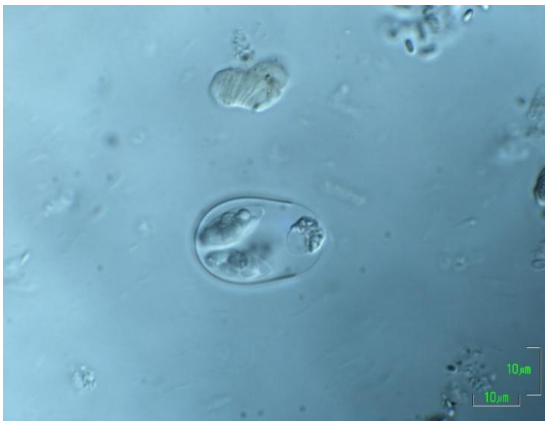


Imagen 18. Ooquiste esporulado de *E. chrysemydis* encontrado en el galápago 15 (100X, microscopio con contraste de interferencia).

- ***Eimeria trachemydis:*** (Imagen 19) los ooquistes son elipsoides, midiendo 25,0x13,6 µ , con pared lisa, fina (0,6 µm de grosor) y aparentemente de una sola capa. Presentan un solo gránulo polar elipsoide a esférico, adherido a la capa interna de la pared del ooquiste. No posee micropilo. Se observa un residuo del ooquiste de 6,8x6,0µm, consistente en un conjunto de gránulos localizados por todo el ooquiste; los gránulos residuales intactos suelen rodear una gran área vacuolar. Los esporocistos son elongados (14,4x5,6 µm), con una pared lisa, fina y de una sola capa. El cuerpo de Stieda se localiza en uno de los extremos del esporocisto, consistiendo en una región ligeramente aplanada y de la cual parten 2 a 5 filamentos. El residuo del esporocisto (4,0x3,0 µm) consiste en un conjunto de gránulos. Los esporozoitos son elongados (12,2x2,7 µm) y cada uno contiene un cuerpo refráctil anterior, esférico a elipsoidal, y un cuerpo refráctil localizado en la mitad posterior. Entre ambos cuerpos refráctiles se localiza un núcleo. *E. trachemydis* ha sido anteriormente descrita en *T. s. elegans* (McAllister and Upton, 1988). Otras especies en las que ha sido identificada son *Chrysemys picta belli*, *Graptemys caglei* y *Trachemys gaigeae* (Duszynski-Morro, 2014). Estas especies pertenecen a la familia Emydidae y son originarias de América.

Imagen 19. Ooquiste esporulado de *E. trachemydis* encontrado en el galápago 15 (100X, microscopio con contraste de interferencia). La flecha señala los filamentos que parten del cuerpo de Stieda.

- ***Eimeria sp:*** (Imagen 20) se observan ooquistes ovoides ligeramente arqueados y esporulados. Presentan un diámetro de 22,9x11,1 µm. Carecen de opérculo y micropilo,

no se aprecia cuerpo residual del ooquiste ni filamentos del cuerpo de Stieda. Sus parámetros morfológicos visibles no permiten su identificación a nivel de especie.

Imagen 20: ooquistes esporulado *Eimeria sp*. (100X microscopio con contraste de interferencia).

Al analizar de forma global los hallazgos resultantes en lo que respecta a la población parasitaria de *Eimeria* en los animales analizados, se ha observado que en 4 de las 10 muestras positivas a *Eimeria*, existía una infección mixta, con la presencia de hasta 3 especies diferentes en el mismo animal. Las infecciones mixtas observadas estaban constituidas por las siguientes especies:

- *E. marginata* y *E. graptemydos.* Esta infección se observó en uno de los animales.
- *E. marginata, E. graptemydos* y *E. trachemydis*. Esta combinación se observó en solo uno de los galápagos.
- *E. chrysemydis, E. graptemydos* y *E. trachemydis*. La infección mixta por estos tres coccidios se observó en 2 animales.

E. graptemydos ha sido la especie más frecuentemente identificada, apareciendo en 8 de los 10 animales positivos a la presencia de *Eimeria* y en todas las infecciones mixtas.

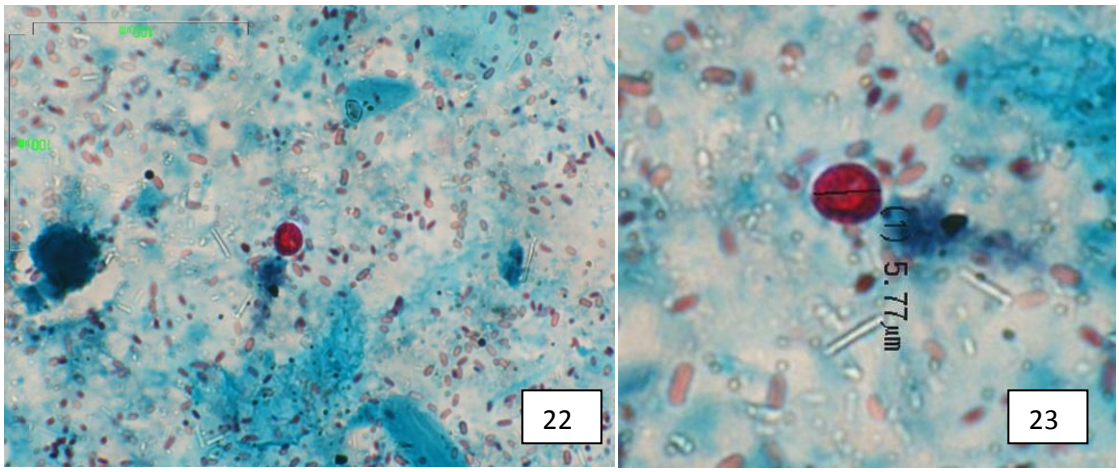
Hay que resaltar el hecho de que todos los ooquistes observados estaban esporulados, a pesar de tratarse de muestras extraídas de heces frescas. Esto indica que la esporulación habría tenido lugar de forma intraorgánica y no en el medio externo, como se describe para *Eimeria* (Gurri-Lloveras, 1991).

En cuanto a la presencia de elementos de diseminación parasitaria de helmintos, se ha observado la presencia de L_1 de nematodos, las cuales fueron identificadas como *Serpinema microcephalus* (Imagen 21), en 5 de las 17 muestras analizadas. Todos estos animales presentaban, además, infección por *Eimeria*. Las L_1 suelen observarse como formas espiroides, con esófago distinguible, un poro excretor bien acusado y muy móviles (López-Neyra, 1947).

Imagen21. L_1 de *S. microcephalus* en heces (100X microscopio con contraste de interferencia).

La tinción de Kinyoun para la observación de microorganismos ácido-alcohol resistentes fue realizada en extensiones de las 17 muestras de heces, encontrándose en 2 de ellas estructuras teñidas de violeta (ácido-alcohol resistentes) compatibles con ooquistes de *Cryptosporidium* por su tamaño y morfología (Imágenes 22 y 23). Los ooquistes de *Cryptosporidium* suelen presentar un tamaño de entre 4 a 8 µm y forma esférica.

Cryptosporidium spp. ha sido previamente descrito en *Apalone spinifera hartwegi, Chelonia mydas, Chelonoidis carbonaria, Geochelone elegans, Glyptemys muhlenbergii, Kinixys sp., Testudo keinmanni* y *Chelonoidis denticulata* (Duszynski-Morro, 2014).



Imágenes 22 y 23. Ooquiste de *Cryptosporidium* sp. observado en extensión sometida a la tinción de Kinyoun (100X).

4.2. Resultados del examen post mortem

De los 11 animales que formaron parte del estudio postmortem, 8 fueron positivos a algún tipo de parasitación. En la tabla 5 se recogen los resultados obtenidos en dicho estudio.

Nº necro.	Especie	Sexo	Eimeria	S. microcephalus
1	*T. scripta scripta*	M	*E. marginata* y *E. graptemydos*	Negativo
2	*T. scripta*	H	Negativo	3 H
3	*T. scripta hibrido*	H	*E. mitraria*	Negativo
4	*T. scripta scripta*	H	*E. mitraria*	Negativo
5	*T. scripta scripta*	H	*E. trachemydis* y *E. marginata*	2 H, 1 M, 4 menor tamaño
6	*T. scripta elegans*	H	Negativo	3 H, 1 M
7	*T. scripta elegans*	H	Negativo	Negativo
8	*T. scripta scripta*	H	Negativo	Negativo
9	*T. scripta scripta*	H	Negativo	4 H, 1 M
10	*T. scripta scripta*	H	Negativo	1 H, 1 M
11	*T. scripta scripta*	H	Negativo	Negativo

Tabla 5. Resultados obtenidos en el estudio postmortem (H=hembra; M=macho).

El análisis de las muestras puso de manifiesto en 5 de los 11 animales que formaron parte del estudio postmorten la presencia de ejemplares adultos de nematodos a nivel

del estómago e intestino delgado (Imagen 24), que fueron identificados en base a sus características morfológicas como *Serpinema microcephalus*. Se trataba de infecciones con baja carga parasitaria. En prácticamente todos los casos el número de hembras era mayor que el de machos, encontrándose un total de 13 hembras y 4 machos. También se observaron 4 ejemplares de menor tamaño cuyo sexo no puedo ser determinado.

S. microcephalus es un nematodo de la familia Camallanidae. Estos parásitos presentan una abertura bucal alargada dorsoventralmente, sin labios, con la cápsula bucal formada por dos valvas laterales quitinosas, cuya superficie interna está reforzada por engrosamientos longitudinales a modo de varillas de abanico, frecuentemente terminadas en el margen bucal en forma de dientes o ganchos (Imagen 25) (de 8 a 11dientes; Baker, 1978). El esófago está dividido en dos partes, la anterior muscular y menor que la posterior, glandular y ensanchada posteriormente. En los machos la extremidad caudal está enrollada ventralmente, con dos alas laterales delgadas y espículas desiguales, sin gubernáculo (Imagen 27). En las hembras la vulva se localiza en la región media (Imagen 26); son de mayor tamaño que los machos y vivíparas (López-Neyra, 1947).

S. microcephalus ha sido descrito en *M. leprosa* (Lopez-Neyra, 1947) y en *E. orbicularis* (Baker, 1979). También ha sido descrito en individuos de *T. s. elegans* en España (Hidalgo-Vila y cols., 2004; Martínez-Silvestre y cols., 2011). La primera evidencia de este parásito en un galápago de la especie *Pseudemys sp*. fue reportada por Martínez-Silvestre y cols. en 2012.

Imagen 24. Individuos de *S. microcephalus* en la mucosa intestinal de un ejemplar *T. scripta.*

Imagen 25. Detalle de la cápsula bucal de *S. microcephalus* (100X, microscopio con contraste de interferencia).

Imagen 26. Detalle de la vulva de una hembra de *S. microcephalus* (100X, microscopio con contraste de interferencia).

Imagen 27. Detalle de la extremidad caudal de un macho de *S. microcephalus* (100Xcontraste de interferencia).

En 4 de los 11 animales que formaron parte del estudio postmortem se encontraron ooquistes de *Eimeria* de distintas especies. En todos los casos se encontraron ooquistes en el contenido del intestino delgado. En 2 de ellos también en intestino grueso. Las especies encontradas fueron *Eimeria marginata, Eimeria trachemydis* y *Eimeria graptemydos,* identificadas también en el estudio *in vivo,* y *Eimeria mitraria*, la cual no había sido observada durante el análisis de heces.

- ***E. mitraria:*** (Imagen 28) los ooquistes tienen forma de mitra, con la pared lisa, fina y transparente, formando una prolongación cónica en uno de los extremos y 2 a 3 en el contrario. Miden 12,2x9,5µm y carecen de micrópilo, gránulo polar y residuo del ooquiste. Los esporocistos son elipsoides, de pared lisa y de una sola capa. Se observa un pequeño cuerpo de stieda en uno de los extremo de cada esporocisto. El residuo del esporocisto es esférico, rodeado de una membrana y conteniendo algunos gránulos. Los esporozoitos son elongados, con cuerpos refráctiles y núcleo no discernibles (Segade y cols., 2006). Esta especie ha sido descrita con anterioridad en *T. scripta* (Duszynski-Morro, 2014) y en *E. Orbicularis* (Segade y cols., 2006). También se ha identificado en *Chelydra serpentina serpentina, Chrysemys picta belli, Emydoidea blandingii, Graptemys geographica, Graptemys pseudogeographica, Graptemys versa, Heosemys depressa, Kinosternon flavescens flavescens, Kinosternon flavescens spooneri, Mauremys reevesii, Mesoclemmys heliostemma, Pseudemys texana* y *Terrapene carolina tringuis* (Duszynski-Morro, 2014).

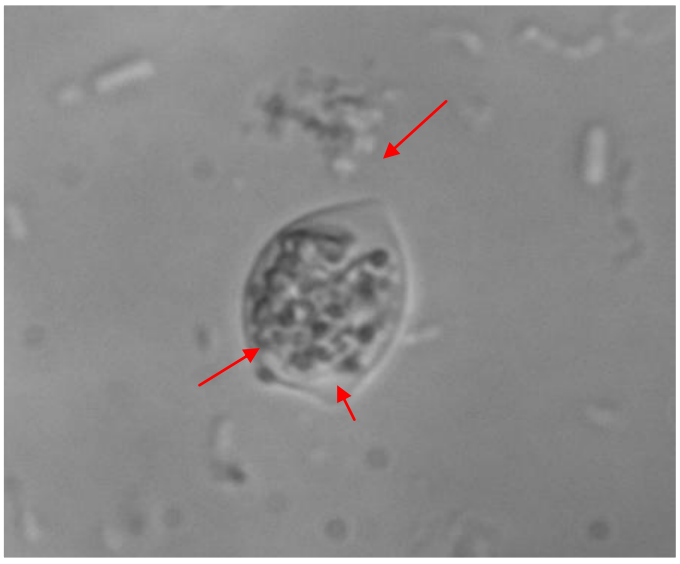


Imagen 28. Ooquiste de *E. mitraria* (100X, microscopio con contraste de interferencia). flechas señalan las prolongaciones cónicas.

En 2 de los 4 animales en los que se identificaron ooquistes de *Eimeria* se observaron infecciones mixtas con presencia de varias especies distintas:

- *E. marginata* y *E. graptemydos* en uno de los casos.
- *E. marginata* y *E. trachemydis* en otro de los animales.

En el sedimento procedente del contenido del intestino grueso del galápago 5 (Tabla 5), se encontraron ooquistes esporulados, y algunos iniciando la esporulación, de las especies *E. trachemydis* y *E. mitraria.* El resto de ooquistes observados eran no esporulados. En las especies del género *Eimeria* la esporulación suele ocurrir en el medio externo (Gurri-Lloveras, 1991) y no se ha descrito anteriormente la presencia de ooquistes esporulados de esta especie en el contenido intestinal.

De los 28 animales que en total se analizaron, 10 fueron negativos tanto a coccidios como a nematodos y los 18 restantes fueron positivos a coccidios, a nematodos o a ambos. A pesar de que gran parte de los animales presentaban parasitación, la carga parasitaria fue interpretada como baja e insuficiente para desarrollar un proceso clínico evidente, estando los animales aparentemente sanos durante el período de estudio, a excepción de aquellos que murieron al inicio del trabajo, y cuya causa de muerte, en base a los resultados parasitológicos detectados en nuestro trabajo, no puede atribuirse a un origen parasitario.

En 14 de los 28 animales se evidenció la presencia de coccidios del género *Eimeria.* La especie más frecuentemente identificada en el estudio *in vivo* fue *E. graptemydos*, apareciendo en 8 de los 10 animales en los que se encontraron ooquistes de *Eimeria*. Sin embargo, en el examen postmortem esta especie solo se observó en uno de los animales, en el que también se identificó la presencia de *E. marginata*. En este estudio fueron las especies *E. marginata* y *E. mitraria* las más frecuentes, apareciendo cada una de ellas en 2 de los 4 animales positivos.

En 6 de los animales que formaron parte del estudio se observaron infecciones mixtas, con hasta 3 especies diferentes de *Eimeria*. La combinación más frecuentemente encontrada fue *E. marginata* con *E. graptemydos*, hallándose estas 2 especies juntas en 3 de los animales que presentaban una infección mixta. La presencia de infecciones mixtas pone de manifiesto la alta parasitación que suelen presentar los galápagos exóticos cuando son liberados al medio natural o, en este caso, un medio controlado

pero compartido con otros animales. Así pues, cuando esta especie exótica es liberada en un ecosistema natural, puede convertirse en fuente de contagio para los quelonios autóctonos y reservorio de gran número de microorganismos patógenos (Hidalgo-Vila, 2006).

Si bien la esporulación de los ooquistes de las especies del género *Eimeria* tiene lugar en el medio externo (Gurri-Lloveras, 1991), durante este estudio se han observado ooquistes esporulados presentes en muestras de heces, lo que indicaría que la esporulación habría tenido lugar de forma intraorgánica. Asimismo, durante el estudio postmortem se hallaron ooquistes esporulados o iniciando la esporulación en el sedimento del contenido recogido del intestino grueso.

En 10 de los 28 animales se observaron nematodos de la especie *S. microcephalus*, aunque la carga parasitaria era baja en todos los casos. Este helminto es común en galápagos de la Región paleártica (Baker, 1979). No ha sido identificado en galápagos de los géneros *Trachemys* ni *Pseudemys* en su región de origen, pero sí en individuos de estas especies capturados en España. Ha sido descrito en individuos de *T. s. elegans* de poblaciones establecidas en Andalucía (Hidalgo-Vila y cols., 2009) y en varias localidades de Valencia (Martínez-Silvestre y cols., 2013). También en galápagos naturalizados de las especies *T. scripta* y *Pseudemys sp.* (*P. concinna*) capturadas en Barcelona durante acciones de erradicación (Martínez-Silvestre y cols., 2013). En el estudio *in vivo* se detectó la presencia de L_1 de esta nematodo en 5 de las 17 muestras analizadas. Todos estos animales presentaban, además, infección por *Eimeria*. En 4 de los casos *S. microcephalus* apareció junto con *E. graptemydos*. En el examen postmortem se encontraron ejemplares adultos de nematodos a nivel del estómago e intestino delgado en 5 de los 11 animales que formaron parte del estudio. Se identificó un mayor número de hembras que de machos (13 hembras frente a 4 machos).

Si se compara la fauna coccidia identificada en los galápagos alóctonos que han formado parte del estudio con la de galápagos autóctonos, se observa que las especies *E. graptemydos*, *E. trachemydis*, *E. marginata* y *E. chrysemydis* han sido descritas en galápagos de la familia Emydidae, originarios del continente americano (Duszynski-Morro, 2014; Wacha and Christiansen, 1976), pero no en galápagos de los géneros *Mauremys* y *Emys*. Así pues, los galápagos exóticos podrían actuar como vía de entrada para estos coccidios, posibilitando que llegaran a colonizar a especies autóctonas. Los

galápagos autóctonos, al no haber estado expuestos anteriormente a coccidios de estas especies, podrían ser más vulnerables a ellos, al no estar su sistema inmune preparado para combatirlos.

La especie *E. mitraria* ha sido descrita tanto en especies de galápago americanas como en especies autóctonas, como *E. orbicularis* (Duszynski-Morro, 2014; Segade y cols., 2004). En este caso, los galápagos exóticos no suponen una vía de entrada para nuevos parásitos, ya que esta especie ya ha sido identificada en especies autóctonas, pero sí pueden actuar como focos de transmisión para los galápagos autóctonos y reservorios de este coccidio.

S. microcephalus es la especie de nematodo más frecuentemente identificada en las poblaciones de galápagos alóctonos capturados en España. Se trata de un nematodo que se encuentra frecuentemente parasitando tanto a *M. leprosa* como a *E. orbicularis*. Así pues, no ha sido introducido por especies exóticas, si no que su identificación en *T. scripta* y *Pseudemys sp*., demuestra una nueva colonización del parásito, que ha ocupado en los galápagos exóticos el nicho ocupado por *S. trispinosum* en el área natural de distribución de estos animales (Hidalgo-Vila et al., 2004).

El número de especies de nematodos descritas en individuos de *T. s. elegans* en España es mucho menor que en sus países de origen (4 frente a 17). Allí, *Serpinema trispinosum* y *Neoechinorrhynchus* son las especies más frecuentemente identificadas. Ninguna de estas especies ha sido detectada en individuos de *T. s. elegans* en España, sino que, aparecen infectados por parásitos comunes de los galápagos autóctonos *Mauremys leprosa* y *E. orbicularis,* como el ya mencionado anteriormente *S. microcephalus*. La explicación podría radicar en el hecho de que la mayoría de los galápagos exóticos importados a Europa han sido criados en cautividad y no han tenido contacto con su hábitat natural (Martínez-Silvestre y cols., 2013).

5. Conclusiones

1. Las tortugas galápagos de los géneros *Trachemys* y *Pseudemys* del Zoológico de Córdoba presentan una parasitación por coccidios de los géneros *Eimeria* y *Cryptosporidium*, y por nematodos del género *Serpinema*. Se detectó una especie de nematodo: *Serpinema microcephalus* y cinco especies de *Eimeria*: *Eimeria graptemydos*, *Eimeria trachemydis*, *Eimeria marginata*, *Eimeria chrysemydis y Eimeria mitraria* siendo *Eimeria graptemydos* la especie más frecuentemente hallada.

2. De forma general el nivel de parasitación fue bajo y de carácter mixto, estando los animales en algún caso, afectados por los 3 organismos parasitarios.

3. De la población parasitaria detectada en el presente estudio, se describen cuatro especies de *Eimeria* no previamente observadas en galápagos autóctonos, lo que puede constituir a los animales del presente estudio como una fuente de infección para las especies autóctonas.

6. Resumen

El objetivo del presente trabajo es analizar las poblaciones parasitarias y el estado sanitario de galápagos de las especies *Trachemys scripta* y *Pseudemys nelsoni*, procedentes del Parque Zoológico de Córdoba, y comparar dichas poblaciones con las que pueden encontrarse en especies de galápagos autóctonos. Para ello se realizaron dos estudios, un estudio *in vivo* utilizando muestras de heces de 17 animales y un estudio postmortem analizando el contenido intestinal de 11 galápagos, obtenido mediante lavados. Los resultados evidenciaron un alto número de animales parasitados, aunque con carga parasitaria insuficiente para producir síntomas patológicos. Se encontraron ooquistes de coccidios del género *Eimeria*, así como L_1 y adultos de un nematodo que fue identificado como *Serpinema microcephalus*.

7. Abstract

The point of this study is to analize the parasitic population and sanitary condition of pond turtles *Trachemys scripta* and *Pseudemys nelsoni* at Cordoba's Zoo, and to compare it with the parasitic population of european pond turtles. For this purpose, 2 studies have been done: first one *in vivo*, using faeces samples from 17 animals, and a postmortem study, using gastrointestinal content of 11 pond turtles. The results were a large number of animals affected by one or various parasites but not in enought quantity to produce pathologic symptons. Coccidia of the genera *Eimeria* have been found, as well as L_1 and adults from a nematode identified as *Serpinema microcephalus*.

8. Bibliografía

1. I. Acosta-García, L. Buffoni, F. J. Martínez-Moreno, M. E. Galka , P. Fernández-Rodríguez, J. Hidalgo-Vila (2004). Helminth parasites of invasive red-eared turtle (*Trachemys scripta elegans*) in Spain. IX Multicoloquio Europeo de Parasitología.
2. M. R. Baker (1978). *Serpinema* spp. from turtles of North America and Europe. Journal of Protozoology; vol. 57:934-939.
3. Cadi, A. & Joly, P (2004). Impact of the introduction of the red-eared slider (Trachemys scripta elegans) on survival rates of the European pond turtle (Emys orbicularis). Biodiversity and Conservation, vol. 13: 2511.
4. Laura Capdevilla Argüelles, Ángela Iglesias García, Jorge F. Orueta, Bernardo Zilletti (2006). Especies exóticas invasoras: diagnóstico y bases para la prevención y el manejo. Editado por Organismo Autónomo Parques Nacionales.
5. Jesús Cardells Peris (2012). Estado sanitario de *Trachamys scripta elegans* y *Testudo hermanni hermanni* en la Comunidad Valenciana. Universidad Cardenal Herrera. Facultad de Veterinaria. Departamento de Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos.
6. C. Díaz-Paniagua, N. Pérez-Santiagosa, J. Hidalgo-Vila y A. Portheault. Manual de identificación de galápagos autóctonos y exóticos. Convenio CSIC/Consejería de medio Ambiente-Junta de Andalucía.
7. Donald W. Duszynski, Johnica J. Morrow (2014). The Biology and Identification of the Coccidia (Apicomplexa) of Turtles of the World.
8. Aitziber Egaña-Callejo (2007). Presencia y Distribución de los Galápagos Exóticos en Guipuzkoa. Campaña 2007. Editado por Sociedad de Ciencias Aranzadi en colaboración con Herpetologia behatokia, observatorio.
9. Albert Gurri Lloveras (1991). La coccidiosis. Guía sobre cunicultura publicada por la Universidad Autónoma de Barcelona, págs.. 297-305.
10. J. Hidalgo-Vila, C. Díaz-Paniagua, A. Ribas, M. Florencio, N. Pérez-Santigosa, J.C.Casanova (2004). Helminth communities of the exotic introduced turtle, *Trachemys scripta elegans* in southwestern Spain: Transmission from native turtles.
11. López Neyra, C. R. (1947). Helmintos de los vertebrados ibéricos. 3vol.. Impreso por Urania, Granada.
12. Albert Martínez-Silvestre Joaquim Soler (2009). Depredación del galápago americano (*Trachemys scripta*) sobre puestas de carpa *(Cyprinus carpio*) en Cataluña. Boletín de la Asociación de Herpetología Española; vol. 20:105-107.
13. Albert Martínez-Silvestre, Judit Hidalgo-Vila, Natividad Pérez-Santigosa, Carmen Díaz-Paniagua (2011). Galápago de Florida – *Trachemys scripta* (Schoepff, 1792). Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles.
14. Albert Martínez-Silvestre, David Guinea, Joaquim Soler y David Ferrer (2013). Presencia del parásito autóctono *Serpinema microcephalus* (Nematoda: *Camallanidae*) en las tortugas

Trachemys scripta y *Pseudemys concinna* asilvestradas en Barcelona. Boletín de la Asociación de Herpetología Española; vol. 24:1-3.

15. Albert Martínez-Silvestre, David Guinea, David Ferrer, Nikola Pantchev (2015). Parasitic enteritis associated with de camallanid nematode *Serpinema microcephalus* in wild invasive turtles (*Trachemys, Pseudemys, Graptemys* and *Ocadia)* in Spain. Journal of Herpetological Medicine and Surgery; vol. 25:48-52.
16. Chris T. McAllister and Steve J. Upton (1988). *Eimeria trachemydis* and other eimerians from de red-eared slider, *Trachemys scripta elegans*, in northern Texas. Journal of Parasitology; vol. 74:1014-1017.
17. Bairbre O'Malley (2007). Anatomía y Fisiología Clínica de Animales Exóticos. Editorial Servet.
18. Myriam Rodríguez-Guerra, Federico Guillén-Salazar (2010). El parque zoológico, un nuevo aliado de la biodiversidad. Guía para la aplicación de la Ley 31/2003 de conservación de la fauna silvestre en los parques zoológicos. Editado por Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
19. P. Segade, C. Crespo, C. Ayres, A. Cordero, M. C. Arias, J. M. García-Estévez, y R. M. Iglesias Blanco (2006). *Eimeria* species from the european pond turtle *Emys orbicularis* in Galicia, with descriptopn of two new species. Journal of Parasitology; vol. 92:69-72.
20. Alfonso Villarán y Juan Domínguez (2009). Infestación múltiple de *Mauremys leprosa* por nematodos. Boletín de la Asociación de Herpetología Española, vol. 20:37-40.
21. Richard S. Wacha and James L. Christiansen (1976). Coccidian parasites from Iowa turtles: systematics and prevalence. Journal of Protozoology; vol. 23:57-63.
22. Ley 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad.
23. Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras. Norma: Real Decreto 630/2013, de 2 de agosto. Fecha: (BOE nº 185): 03.08.2013.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a la Universidad de Córdoba y al Departamento de Sanidad Animal, así como al Parque Zoológico de Córdoba, la oportunidad de realizar una investigación en un campo tan poco estudiado como es la parasitología en galápagos exóticos invasores introducidos en España.

Mi agradecimiento a Rafael Guerra, veterinario del Zoológico de Córdoba, por proporcionarme los animales y materiales necesarios para este estudio, así como por su paciencia y dedicación hacia los alumnos.

A Leandro Buffoni Perazzo, por guiarme y enseñarme la manera de plasmar toda la información recogida durante la investigación de manera científica y correcta, de forma que pueda resultar útil e interesante.

A María Isabel Acosta García, por su entrega y dedicación a la investigación y también hacia los alumnos, y por su contagiosa pasión por la parasitología.