

Prevalencia de parásitos intestinales en tortugas terrestres en cautividad y análisis de factores de riesgo

Prevalence of intestinal parasites in captive tortoises and analysis of risk factors

O. Miñana-Morant,¹ F. Ponce-Gordo²

¹Clínica Veterinaria Babioca. c/ Miramar, 20, bajo. Gandía. Valencia.

²Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. Plaza de Ramón y Cajal, s/n, 28040 Madrid.

Resumen

En el presente trabajo identificamos, mediante métodos no invasivos, los parásitos presentes en varias especies de tortugas mantenidas como mascotas y analizamos, además, los factores epidemiológicos que pueden estar implicados en la presencia de dichos parásitos. El estudio se ha realizado sobre una población de 112 tortugas pertenecientes a cuatro especies. Las muestras fecales fueron analizadas mediante observación directa, tinción y concentración. En algunos casos concretos también se realizaron análisis genéticos para la identificación de protozoos. Los parásitos encontrados incluyen ciliados de los géneros *Nyctotheroides* y *Balantidium*, amebas del género *Entamoeba*, protozoos flagelados pertenecientes a los tricomonádidos y metamonádidos, y nematodos oxiúridos y ascáridos. En nuestro estudio hay diferencias respecto de cada grupo de parásitos: la proporción de individuos de *T. graeca* infectados por protozoos es menor y la de infectados por nematodos es mayor que en las demás especies. El análisis de la importancia de las condiciones ambientales en relación con la presencia de parásitos, realizado solo con los datos de *T. graeca*, indica que los factores de mayor riesgo son la tenencia de los animales en instalaciones con suelos de tierra o una mayor densidad de animales mantenidos juntos (para todos los parásitos encontrados, menos los ascáridos).



Palabras clave: tortugas de tierra, protozoos, ciliados, flagelados, amebas, oxiúridos, ascáridos.
Keywords: tortoises, protozoa, ciliates, flagellates, amoebae, oxyurids, ascarids.

Clin. Vet. Peq. Anim, 2018, 38 (2): 79 -90

Introducción

En condiciones naturales, los reptiles disfrutan de territorios extensos en los que no se determina una zona específica para las deyecciones. El uso de un mayor espacio donde defecar, junto con la lluvia y la luz solar (ultravioleta) que ejercen de desinfectantes del suelo,¹ suponen una menor exposición a los parásitos y una menor probabilidad de reinfestación que en condiciones de cautividad.

En cautiverio se presentan, además, factores de estrés que no existen en las poblaciones silvestres, siendo los más habituales los siguientes: manejo incorrecto (temperatura, falta de exposición a luz ultravioleta, ciclos de luz inadecuados, mala alimentación, falta de enriquecimiento ambiental), contacto forzado con congéneres dentro del recinto, presencia de actividades molestas en el entorno (perros ladrando, olores periféricos) o excesiva manipulación por parte de los propietarios. Todos estos factores tienen, probablemente, un papel importante en la salud del animal¹ y condicionan

la presencia de parásitos en los reptiles en cautividad.

En el caso de las tortugas de tierra, la presencia de protozoos es habitual, siendo los más frecuentes los coccidios (incluido *Cryptosporidium*), las amebas, los ciliados y los flagelados. En tortugas de tierra también es frecuente encontrar varios tipos de helmintos, sobre todo nematodos. Cabe destacar que, aunque a partir de ahora denominemos a estos protozoos y helmintos como parásitos en general, muchos de ellos se comportan, en función de las condiciones, como verdaderos parásitos o simplemente como comensales, no siendo por tanto patógenos² y llegando incluso a ser alguno de ellos beneficioso para el hospedador.¹

El objetivo del presente estudio es establecer la prevalencia de estos parásitos en las heces de tortugas terrestres mantenidas como mascota en el área de Valencia (España) e identificar los factores epidemiológicos que puedan explicar los resultados obtenidos.

Contacto: oscarvet68@gmail.com



Material y métodos

Se analizaron un total de 112 tortugas de 14 propietarios diferentes, de ambos sexos y edades comprendidas entre 1 año y más de 20 años, pertenecientes a las siguientes especies: tortuga mora (*Testudo graeca*, n=85), tortuga mediterránea (*Testudo hermanni*, n=13), tortuga leopardo (*Stigmochelys pardalis*, n=6) y tortuga rusa (*Agrionemys horsfieldii*, n=8). Todos los individuos fueron criados en cautividad y mantenidos como mascotas en la provincia de Valencia (área de influencia mediterránea). Cada propietario solo poseía tortugas de una misma especie, salvo un propietario que poseía tres ejemplares de *T. hermanni* y uno de *T. graeca*. En todos los casos, las tortugas vivían durante todo o parte del año en el exterior. Todas las tortugas estudiadas hibernaban y la dieta consistía en frutas y verduras variadas. Exceptuando dos animales (un ejemplar de *T. graeca* y otro de *T. hermanni*) que presentaban signos de enfermedad en el momento de la revisión (anorexia, deshidratación y diarrea), los demás ejemplares estaban aparentemente sanos. Los animales fueron llevados a revisión por sus propietarios y fueron ingresados para realizar su valoración; se tomaron datos de las tortugas (tamaño, peso, sexo, estado general) y se recogieron muestras fecales recientes, a partir de las cuales se realizó el estudio. En el momento del ingreso, los propietarios también proporcionaron información sobre los animales y las condiciones de mantenimiento (edad, tipo de sustrato, densidad de población, alimentación, etc.).

Todas las muestras fueron estudiadas al microscopio óptico mediante observación directa en solución salina, tinción temporal con lugol y flotación con solución sobresaturada de cloruro de sodio (NaCl). En caso de apreciarse flagelados en la observación en solución salina, se realizaron frotis fecales para tinción con Giemsa. En las muestras en las que se identificaron quistes de *Entamoeba* o trofozoítos de flagelados, y considerando los antecedentes clínicos de revisiones anteriores, se realizaron análisis genéticos para realizar la identificación específica de los protozoos encontrados. En estos casos, las muestras fueron remitidas, a temperatura ambiente y sin fijar, al Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, en donde fueron procesadas en un plazo de 24-36 horas desde que la muestra fuera recogida de los animales. En las muestras con quistes de *Entamoeba* se realizó una concentración mediante el método tampón acetato-acético/éter etílico (método de Bailenger) y a partir del sedimento obtenido se realizó la extracción del ADN con el kit "Speedtools Tissue DNA Extraction Kit" de Biotools (B & M Labs, S.A., Madrid), siguiendo las instrucciones del fabricante para muestras de heces. En el caso de los flagelados,

el ADN se extrajo directamente a partir de un volumen de ~100 µl de la muestra, utilizando el mismo kit anterior. A partir del ADN extraído se realizó la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen que codifica para la subunidad pequeña del ARNr; los cebadores y condiciones de PCR son los mismos descritos en la bibliografía para quistes de *Entamoeba*³ o trofozoítos de flagelados,⁴ utilizando en cada caso 5 µl de la disolución de ADN molde.

Por último, en algunas muestras se hallaron larvas o adultos de nematodos expulsados espontáneamente; en estos casos, los parásitos fueron lavados en solución salina y guardados en alcohol 70 % hasta su identificación posterior, utilizando los protocolos descritos y las claves morfológicas apropiadas.⁵⁻⁷

Para el análisis estadístico se evaluaron la especie de tortuga, su edad, peso y sexo, así como las condiciones en que son mantenidas (tipo de suelo, densidad de población) en relación con la presencia de los grupos de parásitos que se identificaron y con la riqueza parasitaria (número de parásitos diferentes encontrados). El método estadístico empleado ha sido el análisis de regresión logística (univariante y multivariante), por lo que las variables continuas (edad y peso) se han transformado en variables categóricas estableciendo rangos (edad: <5 años, 5-10 años, >10 años; peso: <500 g, 500-1000 g, >1000 g). Los tests estadísticos se han realizado con el programa IBM SPSS Statistics versión 21 (IBM Corp., Armonk, New York).

Resultados

Los parásitos encontrados fueron ciliados, amebas, flagelados, oxiúridos y ascáridos. Por especies de tortuga, en todos los casos ha habido ejemplares positivos a protozoos y nematodos, y solo ha habido cuatro tortugas (todas ellas *T. graeca*, pertenecientes a tres propietarios diferentes) en las que no se ha observado ningún parásito intestinal. Los resultados han sido los siguientes: *T. hermanni*, 92,3 % positivas a protozoos y 30,8 % a nematodos; *T. graeca*, 30,6 % positivas a protozoos y 82,4 % a nematodos; *A. horsfieldii*, 100 % positivas a protozoos y 50 % a nematodos, y *S. pardalis*, 100 % positivas a protozoos y 66,7 % a nematodos. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Aunque se han encontrado ciliados en todas las especies de tortuga analizadas, la prevalencia en *T. graeca* ha sido menor (significación estadística: p<0,000) que en las demás especies de tortugas. Los ciliados encontrados pertenecen a los géneros *Nyctotheroides* y *Balantidium*. En el caso de *Nyctotheroides* (*Gemania* según otros autores),⁸ se han encontrado trofozoítos y quistes de dos especies distintas, cuyas características morfológicas coinciden con las de *N. kyphodes* y *N. teleacus*,

Tabla 1. Parásitos encontrados según especie de tortuga, edad, sexo, sustrato y densidad de cría

Especie	Tamaño muestral	Ciliados		Amebas (<i>Entamoeba</i>)	Flagelados ^(b) Total	Protozoos Total	Nematodos		Presencia de parásitos	
		<i>Balantidium</i>	<i>Nyctotheroides</i>				Oxiúridos	Ascáridos		Total ^(a)
Especie	112									
<i>T. graeca</i>	85	26 (23,2)	17 (15,2)	7 (6,3)	39 (36,1)	52 (46,4)	79 (70,5)	52 (46,4)	82 (73,2)	108 (96,4)
<i>T. hermanni</i>	13	8 (61,5)	8 (61,5)	1 (7,7)	9 (69,2)	12 (92,3)	4 (30,8)	0 (0,0)	4 (30,8)	13 (100,0)
<i>S. pardalis</i>	6	0 (0,0)	4 (66,7)	0 (0,0)	5 (83,3)	6 (100,0)	1 (16,7)	3 (50,0)	4 (66,7)	6 (100,0)
<i>A. horsfieldii</i>	8	4 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (100,0)	8 (100,0)	4 (50,0)	0 (0,0)	4 (50,0)	8 (100,0)
Peso	111									
<500 g	81	16 (19,8)	4 (4,9)	5 (6,2)	23 (29,9)	32 (39,5)	67 (82,7)	43 (53,1)	67 (82,7)	79 (97,5)
500-1000 g	22	8 (36,4)	7 (31,8)	2 (9,1)	10 (45,5)	12 (54,5)	11 (50,0)	5 (22,7)	11 (50,0)	20 (90,9)
>1000 g	8	2 (25,0)	6 (75,0)	0 (0,0)	5 (62,5)	7 (87,5)	1 (12,5)	4 (50,0)	4 (50,0)	8 (100,0)
Edad	100									
< 5 años	62	9 (14,5)	3 (4,8)	6 (9,7)	11 (18,6)	18 (29,0)	53 (85,5)	37 (59,7)	53 (85,5)	60 (96,8)
5-10 años	14	6 (42,9)	7 (50,0)	0 (0,0)	10 (71,4)	13 (92,9)	5 (35,7)	3 (21,4)	7 (50,0)	14 (100,0)
>10 años	24	7 (29,2)	5 (20,8)	1 (4,2)	8 (33,3)	10 (41,7)	14 (58,3)	10 (41,7)	14 (58,3)	22 (91,7)
Sexo	94									
Macho	67	17 (25,4)	11 (16,4)	6 (9,0)	23 (35,9)	33 (49,3)	48 (71,6)	27 (40,3)	49 (73,1)	64 (95,5)
Hembra	27	9 (33,3)	6 (22,2)	1 (3,7)	4 (53,8)	17 (63,0)	14 (51,9)	9 (33,3)	16 (59,3)	26 (96,3)
Sustrato	112									
Tierra	61	26 (42,6)	17 (27,9)	7 (11,5)	37 (60,7)	50 (82,0)	20 (45,9)	7 (11,5)	31 (50,8)	57 (93,4)
Hormigón	51	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 ^(c) (4,3)	2 ^(c) (4,3)	51 (100,0)	45 (88,2)	51 (100,0)	51 (100,0)
Densidad de cría	90									
<2 ind./m ²	63	7 (11,1)	6 (9,5)	0 (0,0)	15 (25,4)	15 (23,8)	54 (85,7)	47 (74,6)	57 (90,5)	62 (98,4)
>2 ind./m ²	27	10 (37,0)	5 (18,5)	7 (25,9)	13 (48,1)	22 (81,5)	12 (44,4)	1 (3,7)	12 (44,4)	25 (92,6)

Se indica el número de animales positivos y, entre paréntesis, el porcentaje de animales positivos en cada categoría.

(a) Datos agrupados de individuos con al menos uno de los parásitos de cada categoría (*Balantidium/Nyctotheroides*, oxiúridos/ascáridos).

(b) Datos agrupados de tricomonádidos + metamonádidos.

(c) En 4 muestras de *T. graeca* mantenidas en sustrato de hormigón no se pudo realizar la observación en fresco para identificar flagelados; en la columna de flagelados, el porcentaje se calcula sobre 47 tortugas mantenidas en sustrato de hormigón, mientras que en la columna de valores totales de protozoos, el dato se considera sobre los 51 animales mantenidos en hormigón, ya que en todos ellos sí se realizó la búsqueda de quistes de otros protozoos.

descritas en tortugas^{8,9} (Figs. 1, 2 y 3). Ambas especies han sido halladas en *T. graeca*, *T. hermanni* y *S. pardalis*. En el caso de *Balantidium* (probablemente, *B. testudinis*)^{8,10} (Figs. 4 y 5), se han encontrado trofozoítos y quistes en *T. graeca*, *T. hermanni* y *A. horsfieldii*.

Respecto a las amebas, se han encontrado quistes tetranucleados de tamaño compatible con *Entamoeba* en *T. hermanni* y *T. graeca*, en ambos casos con una prevalencia similar (significación estadística: $p=0,783$), aunque las especies encontradas en cada hospedador son distintas: en *T. hermanni* se ha encontrado *E. insolita*, fácilmente identificable por su peculiar morfología



Figura 1. Imagen de trofozoito de *Nyctotheroides kyphodes* (Lugol, 100 x).



Figura 2. Imagen de trofozoito de *Nyctotheroides teleacus* (Lugol, 100 x).

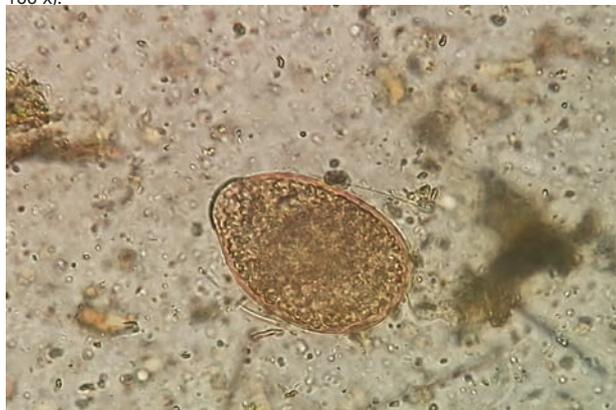


Figura 3. Imagen de quiste de *Nyctotheroides* sp. (Lugol, 100 x).

(con una envuelta de aspecto gelatinoso rodeando el quiste)⁹ (Fig. 6), mientras que en las muestras positivas de *T. graeca*, los quistes no poseían ninguna envuelta accesoria y su morfología no permite diferenciar entre otras especies descritas en tortugas (Fig. 7). En este caso, además, los resultados de los análisis genéticos no han sido concluyentes, por lo que la identificamos como *Entamoeba* sp. "no insolita".

Los flagelados están presentes en todas las especies de tortugas, aunque con menor prevalencia en *T. graeca* (significación estadística: $p<0,000$). Solo se han encontrado trofozoítos, siendo en la mayoría de los casos tricomonádidos, aunque también se han encontrado flagelados metamonádidos (nos referiremos a los flagelados de manera informal como tricomonádidos y metamonádidos, ya que la taxonomía dentro de algunos de estos grupos está en revisión, o no está totalmente aceptada por los expertos). Aunque las características del movimiento *in vivo* de los trofozoítos permiten hacer una primera identificación del grupo al que pertenecen (vídeos 1 y 2 accesibles en la versión online de la publicación), la identificación del género (y, en ocasiones, incluso del grupo: tricomonádido o metamonádido) solo se puede realizar con las tinciones. Sin embargo, esto no fue siempre posible debido, sobre todo, a la abundante presencia de bacterias que se superponían sobre los trofozoítos, impidiendo apreciar las características morfológicas de los mismos. Para evitar errores de identificación y sesgos en los datos, los flagelados, a efectos estadísticos, se han considerado como un grupo único.



Figura 4. Imagen de trofozoito de *Balantidium testudinis* (sin teñir, 100 x).



Figura 5. Imagen de quiste de *Balantidium* sp. (Lugol, 100 x).



Figura 6. Imagen de quiste de *Entamoeba insolita* (Lugol, 100 x).

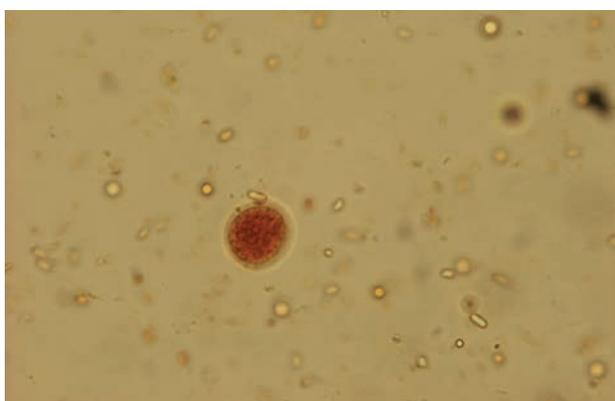


Figura 7. Imagen de quiste de *Entamoeba* sp. de 4 núcleos "no *insolita*" (Lugol, 100 x).

En las muestras en las que sí ha sido posible hacer una identificación morfológica de las células, se han encontrado flagelados compatibles con los géneros *Tetratrichomonas*, *Trichomitus*, *Chilomastix*, *Histomonas*, *Retortamonas*, y *Spiroucleus/Hexamita* (Fig. 8). En una muestra de *T. graeca*, el análisis genético reveló la presencia de *Hexamastix mitis*, no identificada morfológicamente en las tinciones de esa muestra.

En relación con los nematodos, se han encontrado oxiúridos y ascáridos en las cuatro especies de tortuga estudiadas, aunque la prevalencia (global y por tipo de parásito) ha sido superior en *T. graeca* que en las demás especies (significación estadística en los tres casos (nematodos en conjunto, oxiúridos y ascáridos): $p < 0,000$).

Se encontraron huevos de oxiúridos (Fig. 9) en las cuatro especies de tortugas, pero la ausencia de caracteres diferenciales no permite identificar la especie a la que pertenecen. No obstante, en algunos individuos de *T. graeca* se encontraron también algunas larvas y adultos expulsados de forma espontánea, que han podido ser identificados como *Tachigonetria* sp. Respecto a los ascáridos, solo se han encontrado en *T. graeca* y *T. hermanni*. Las características de los huevos no permiten

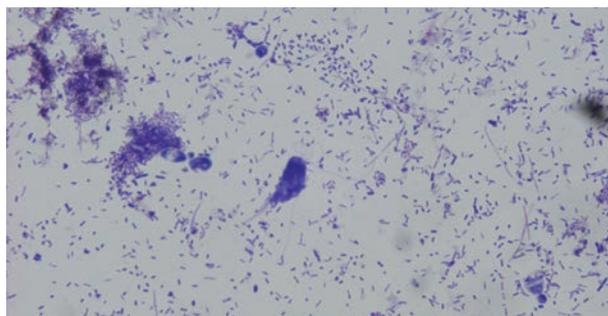


Figura 8. Imagen de *Trichomitus* sp. (Giemsa, 100 x ampliada, 3 flagelos anteriores libres y 1 recurrente).



Figura 9. Imagen de huevo de oxiúrido (Lugol, 40 x).

una identificación más específica (Fig. 10), pero los adultos expulsados de forma espontánea en algunos individuos de *T. graeca* han sido identificados como *Angusticaecum holopteryum*.

Las dos tortugas que presentaban sintomatología mostraban un cuadro compatible con la presencia de parásitos intestinales. En un caso (el ejemplar de *T. hermanni*) se encontró una gran cantidad de trofozoítos y quistes de *Balantidium* (vídeo 3 accesible en la versión online de la publicación), y en el otro (el ejemplar de *T. graeca*) se observó un alto número de flagelados compatibles con metamonádidos (*Hexamita/Spiroucleus*) (ví-

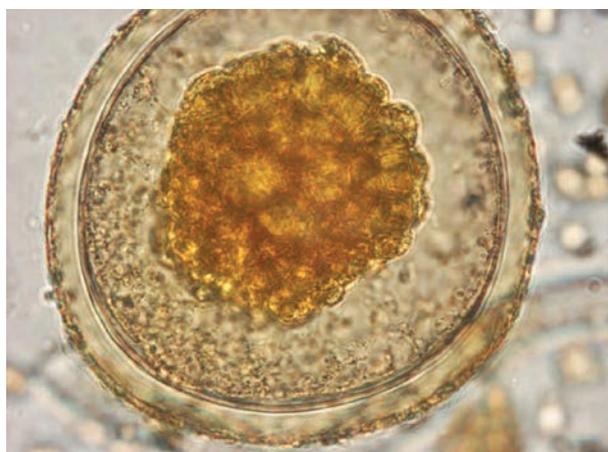


Figura 10. Imagen de huevo de ascárido (Lugol, 100 x).

deo 2 accesible en la versión online de la publicación). Ambos animales mejoraron notablemente después del tratamiento antiparasitario administrado. En el primer caso se administró metronidazol 100 mg/kg vía oral (PO), repitiendo a los 10 días¹¹ (Flagyl® 125 mg/5 ml, Lab. Sanofi-Aventis S.A., Barcelona); en el segundo caso, paromomicina 75 mg/kg PO al día durante 4 días¹ (Humatin® 125 mg/5 ml, Lab. Parke Davis S.L., Grupo Pzifer, Alcobendas, Madrid).

Se trataron también todos los animales positivos a ascáridos con una dosis de pamoato de pirantel 10 mg/kg PO, repitiendo a los 14 días¹² (Trilombrin® 250 mg/5 ml, Lab. Farmasierra S.L., San Sebastián de los Reyes, Madrid). A los que presentaban una presumible cantidad elevada de oxiúridos (valorada de forma subjetiva por la presencia en el examen en fresco de más de 5 huevos por campo a 40x¹³ o por la expulsión de larvas/adultos), se aplicó una dosis única de pamoato de pirantel con la finalidad de reducir dicha cantidad de parásitos.

No se encontraron diferencias significativas en la riqueza parasitaria (número de distintos taxones de parásitos presentes) para ninguno de los criterios considerados (especie de tortuga, peso, sexo, tipo de sustrato o densidad de población) (Tabla 2). No obstante, sí se han encontrado diferencias respecto a la presencia de determinados parásitos en función de las variables consideradas. Para el análisis de los factores que pueden estar relacionados con estas diferencias, únicamente hemos analizado los datos obtenidos de *T. graeca* debido a que solo en esta especie había datos disponibles para todas las categorías de las distintas variables consideradas en este trabajo y, además, el tamaño muestral era lo suficientemente elevado (n=85). Los resultados obtenidos con estos datos (Tabla 3) muestran que los factores más importantes a tener en cuenta son el tipo de sustrato y la densidad de cría, aunque con efectos distintos según el tipo de parásito.

En las infecciones por protozoos, mantener a los animales en un sustrato de tierra aumenta más de 111 veces el riesgo de que estén infectados en comparación con mantenerlos en un sustrato de cemento; por otro lado, el riesgo es 68 veces superior con densidades de población más altas. Sin embargo, con los helmintos se obtienen resultados contradictorios: el riesgo de presentar nematodos es 55 veces mayor con densidades de población más bajas. Respecto al tipo de sustrato, los resultados también son contradictorios, porque si bien el riesgo de presentar nematodos es casi 2 veces superior en el suelo de tierra respecto al de hormigón, hay claras diferencias según el grupo de nematodos: en oxiúridos el riesgo es algo más del doble en tierra que en hormigón, pero en ascáridos el riesgo es 58 veces mayor en hormigón que en tierra.

Tabla 2. Biodiversidad parasitaria (número de taxones distintos de parásitos) por individuo, en relación con la especie de tortuga, el peso, la edad, el sexo, el sustrato y la densidad de cría

Variable	Categorías	Parásitos distintos media (rango)	Significación
Especie	TOTAL (n=112)	1,98 (1,83-2,14)	0,423
	<i>T. hermanni</i> (n=13)	2,31 (1,79-2,82)	
	<i>T. graeca</i> (n=85)	1,92 (1,75-2,09)	
	<i>S. pardalis</i> (n=6)	2,17 (1,13-3,20)	
	<i>A. horsfieldii</i> (n=8)	2,00 (1,11-2,89)	
Peso	TOTAL (n=111)	1,99 (1,84-2,15)	0,655
	<500 g (n=81)	1,98 (1,80-2,15)	
	500-1000 g (n=22)	1,95 (1,53-2,38)	
	>1000 g (n=8)	2,25 (1,51-2,99)	
Edad	TOTAL (n=100)	1,96 (1,80-2,12)	0,413
	<5 años (n=62)	1,94 (1,76-2,11)	
	5-10 años (n=14)	2,21 (1,70-2,73)	
	>10 años (n=24)	1,88 (1,48-2,27)	
Sexo	TOTAL (n=94)	1,99 (1,81-2,17)	0,858
	Machos (n=67)	2,00 (1,78-2,22)	
	Hembras (n=27)	1,96 (1,61-2,32)	
Sustrato	TOTAL (n=112)	1,98 (1,83-2,14)	0,804
	Hormigón (n=51)	1,96 (1,84-2,09)	
	Tierra (n=61)	2,00 (1,73-2,27)	
Densidad	TOTAL (n=90)	1,99 (1,83-2,15)	0,089
	<2 animales/m ²	2,08 (1,92-2,24)	
	>2 animales/m ²	1,78 (1,83-2,15)	

Discusión

En el presente estudio, el 96,4 % de las tortugas fueron positivas a al menos un tipo de parásito (protozoo o nematodo) (Tabla 1). El grupo de parásitos más comúnmente encontrado es el de los oxiúridos, lo que coincide con otros estudios epidemiológicos realizados en Alemania, Italia, Eslovenia, Estados Unidos y Reino Unido.¹⁴⁻¹⁹ Con respecto a los protozoos, se han detectado en el 46,4 % de las tortugas, un valor muy superior al de otros trabajos publicados,¹⁸ probablemente por haber realizado nuestro estudio en muestras más frescas (Tabla 1).

Tabla 3. Análisis de los factores de riesgo asociados a la presencia de parásitos en *T. graeca*

Tipo de parásitos	Factor	p	Categorías	Riesgo ("odds ratio", OR)	Intervalo de confianza OR (95%)
PROTOZOOS					
	Edad	0,033	<5 años	Referencia	
			5-10 años	0,760	0,245-2,353
			>10 años	9,333	0,854-101,952
	Sexo	0,568	Hembra	Referencia	
			Macho	1,392	0,447-4,335
	Peso	0,359	<500 g	Referencia	
			500-1000 g	0,198	0,017-2,313
			>1000 g	0,250	0,018-3,467
	Sustrato	0,000	Tierra	Referencia	
Hormigón			58,800	11,934-289,723	
Densidad de cría	0,000	<2 animales/m ²	Referencia		
		>2 animales/m ²	68,000	13,786-335,423	
NEMATODOS					
	Edad	0,091	<5 años	Referencia	
			5-10 años	3,061	0,885-10,590
			>10 años	0,643	0,085-4,889
	Sexo	0,081	Hembra	Referencia	
			Macho	0,341	0,099-1,178
	Peso	0,002	<500 g	Referencia	
			500-1000 g	17,143	1,373-214,103
			>1000 g	3,000	0,220-40,931
	Sustrato	0,000	Tierra	Referencia	
Hormigón			1,789	1,327-2,412	
Densidad de cría	0,000	<2 animales/m ²	Referencia		
		>2 animales/m ²	0,018	0,002-0,0157	

Los valores de la columna de riesgo se dan respecto a la categoría de referencia o, cuando hay varias categorías, respecto a la categoría inmediatamente anterior.

Dentro de los protozoos, los que, por su mayor tamaño, se detectan más fácilmente son los ciliados. Tanto *Nyctotheroides* como *Balantidium* son protozoos que se encuentran comúnmente en muchas especies de reptiles herbívoros, en particular en las tortugas. En nuestro estudio no hemos hallado *Nyctotheroides* en *A. horfieldii* ni *Balantidium* en *S. pardalis*, pero el bajo número de in-

dividuos estudiados de estas especies de tortugas no permite concluir que no puedan ser susceptibles de ser infectadas por estos protozoos. En el caso de *Balantidium*, las prevalencias registradas por otros autores en distintas especies de tortugas varían entre el 1,85 % en *T. hermanni* y el 62,9 % en *Cheloneidis denticulata*;^{20,21} en el caso de *Nyctotheroides*, los porcentajes oscilan entre

el 33,3 % en *Trachemys scripta* y el 80,9 % en *C. denticulata*.²¹ Otros autores refieren prevalencias conjuntas de ciliados del 28% al 38%,^{18,22} un valor similar al 29,5 % obtenido en este estudio. Normalmente los ciliados son considerados comensales, estando en ocasiones presentes en gran número y en distintas formas y tamaños sin causar sintomatología alguna.²³ Sin embargo, hay un trabajo en el que se considera que *Nyctotheroides* puede ser responsable de patología intestinal en tortugas.²⁴ En el presente estudio todos los animales positivos a *Nyctotheroides* fueron asintomáticos (0/17). Respecto a *Balantidium* se considera un patógeno facultativo,² que en cantidades excesivas o cuando la mucosa intestinal está dañada por otras enfermedades puede ocasionar una enteritis localizada que cursa con anorexia y diarrea,²⁵ como en uno de los ejemplares de *T. hermanni* analizados por nosotros (1/39). *Balantidium* también se ha llegado a encontrar dentro del hígado produciendo abscesos.^{1,2}

Habitualmente, no se realiza la identificación específica de los ciliados de tortugas,¹⁸⁻²² aunque no presenta problemas. Hay dos especies de *Nyctotheroides* descritas en tortugas terrestres (*N. kyphodes* y *N. teleacus*) con tamaños y características morfológicas fácilmente diferenciables (Figs. 1, 2 y 3), pero habitualmente se identifican como *Nyctotherus* sp. (lo correcto es *Nyctotheroides* sp.).^{21,22,24,26} Una situación similar se produce con la identificación de *Balantidium* en tortugas; aunque solo se ha descrito la especie *B. testudinis* en tortugas de tierra, habitualmente los hallazgos se indican como *Balantidium* sp.^{18,20-22}

La identificación de los flagelados suele ser problemática. Aunque suelen ser relativamente comunes en las heces de los reptiles,²⁶ su pequeño tamaño (habitualmente en torno a o por debajo de las 15 μm), la necesidad de realizar tinciones para poder determinar el género y la especie, y la dificultad en observar los caracteres diferenciales hacen que en la mayor parte de los estudios solo se cite la presencia de "flagelados".^{17,18,26} Es relativamente fácil detectarlos en heces frescas y las características de su movimiento pueden ayudar a orientar la identificación (vídeos 1 y 2 accesibles en la versión online de la publicación).

Los tricomonádidos no tienen demasiado interés clínico por no estar descrita su patogenicidad en tortugas.^{2,27,28} Esto se pone también de manifiesto en nuestro estudio donde ninguna tortuga con presencia de flagelados compatibles con tricomonádidos ha presentado sintomatología clínica. No obstante, es interesante identificarlos para diferenciarlos del resto de protozoos.

Los metamonádidos forman quistes²⁹ y los quistes de cada uno tienen una morfología diferente; *Giardia* no

tiene demasiado interés clínico en las infestaciones por protozoarios en reptiles,^{1,2} mientras que *Spiro-nucleus/Hexamita* puede llegar a producir alteraciones significativas en tortugas, dañando el tracto intestinal y otros órganos.²³

En muchas ocasiones, según la bibliografía consultada, se cita a *Hexamita* como responsable de infecciones en tortugas,^{1,2,30} incluso se describe la especie *Hexamita parva*,^{1,31} pero las especies de este género son de vida libre, coprofílicas.³² Su parecido morfológico con *Spiro-nucleus* ocasiona que muchas veces se describan como géneros sinónimos,²⁷ y con frecuencia (sobre todo en la bibliografía veterinaria) se habla de *Hexamita* y no de *Spiro-nucleus*. Hay mucha confusión en la determinación de estos dos géneros,³² en parte debido al pequeño tamaño de estos flagelados (10-20 μm) unido a otros factores (preparaciones no bien teñidas, alteración después de la muerte y fijación,³⁰ dificultad en poder apreciar los caracteres diferenciales). Para no entrar en una discusión de tipo taxonómico sobre cuál es el género correcto, en este trabajo nos referimos a él como *Spiro-nucleus/Hexamita*. A nivel práctico y con la finalidad de identificar un posible causante de enfermedad, ambos se pueden diferenciar bien de *Giardia* (mayor tamaño y presencia de disco ventral^{9,30} y movimiento característico)³³⁻³⁵ que es apatógena para las tortugas.^{1,2}

En varias especies de tortugas terrestres se ha descrito la presencia de *Spiro-nucleus/Hexamita* produciendo infestaciones de la vejiga, los riñones, los intestinos, la vesícula biliar y el hígado, con anomalías significativas identificadas en estos órganos;^{1,2,30} sin embargo, es infrecuente encontrar este género en serpientes y otros reptiles.² La sintomatología de uno de nuestros casos compatible con *Hexamita/Spiro-nucleus* (1/39 positivos a flagelados) corresponde, probablemente, a una afección solo a nivel intestinal. La rápida respuesta al tratamiento con paromomicina y la ausencia de síntomas posteriores podría confirmar este hecho. Las tortugas se infestan ingiriendo los quistes que se encuentran en la comida o agua contaminada con heces u orina; en el paso de las heces con parásitos a través de la cloaca, los trofozoítos pueden ascender hasta los riñones, pudiendo aparecer la orina de los animales afectados con aspecto mucoso o gelatinoso.² La lesión de los riñones puede desencadenar una alteración en la activación de la vitamina D₃ que cause enfermedad ósea metabólica.²

Los trofozoítos de las amebas son difíciles de ver en observaciones en fresco por su lento movimiento y por ser pleomórficos, pudiéndose encontrar solo en heces diarreicas. Lo más común es encontrar los quistes en heces formes (no diarreicas) que tienen forma esferoidal (Figs. 6 y 7). Dentro del género *Entamoeba*, las especies se agrupan por el número de núcleos que posee

el quiste maduro³⁶ (uno, cuatro u ocho núcleos, dependiendo de la especie). En tortugas solo se han descrito especies formadoras de quistes tetranucleados, de las cuales la única que se puede diferenciar a nivel morfológico es *E. insolita*⁸ por tener una pared con una envuelta gelatinosa que le da el aspecto irregular, mientras que para la identificación de las demás especies (*E. invadens*, *E. testudinis*, *E. terrapinae* y *E. knowlesi*) es necesario la realización de análisis genéticos; en ausencia de estos análisis, las amebas han sido identificadas por otros autores como *Entamoeba* sp. o como *E. invadens-like*,²⁶ mientras que nosotros preferimos identificarlas como *Entamoeba* sp. “no *insolita*” para evitar sugerir que puedan ser patógenas (como *E. invadens*). Aunque es posible diferenciar las distintas especies genéticamente, los análisis que hemos realizado no han sido concluyentes debido a la obtención de secuencias demasiado cortas, presencia de ambigüedades en las mismas y/o amplificación inespecífica de ADN de otros microorganismos. Por este motivo, la identificación solo se ha podido realizar como *Entamoeba* sp. “no *insolita*”. Otros autores han obtenido resultados fallidos similares a partir de muestras fecales.^{37,38} Una alternativa es cultivar las muestras fecales para obtener trofozoítos con los que efectuar los análisis, pero es un método lento, delicado (por posibles contaminaciones de los cultivos) y que excluye las muestras donde solo hay quistes.³⁸ Esta opción no se ha planteado en el presente estudio debido a la ausencia de sintomatología asociada a la presencia de las amebas (0/7).

En general, se considera que ninguna especie es patógena en tortugas, aunque *E. invadens* sí causa patología en otros reptiles (ofidios)^{39,40} y se ha indicado que también puede afectar a tortugas inmunodeprimidas² o en cautiverio.³¹ *Entamoeba invadens* puede causar una enteritis membranosa que puede llegar a invadir el hígado a través de la vena porta causando verdaderos infartos hepáticos.¹ También se han descrito brotes epizooticos en tortugas en cautiverio asociados a amebiasis compatible con *E. invadens* con sintomatología inespecífica (anorexia, apatía, diarrea acuosa); en las necropsias se han observado importantes lesiones en hígado e intestino con presencia de numerosas amebas en dichos órganos.³¹ A pesar de estos hallazgos, se tiende a considerar a las tortugas y cocodrilos como portadores con escasos efectos patológicos.

Respecto a los nematodos, en la mayoría de las muestras la identificación se realizó por la morfología de los huevos, que presentan características similares en las distintas especies de cada grupo y es relativamente fácil identificar si pertenecen a oxiúridos o a ascáridos. Los de los oxiúridos suelen ser elipsoides aplanados unilateralmente (asimétricos)^{5-7,28} (Fig. 9) y los de los

ascáridos, esféricos u ovoides y de cáscara gruesa^{5-7,28} (Fig. 10). La alta prevalencia encontrada en nuestro estudio para los oxiúridos (71,4 % global) coincide con otros estudios realizados.¹⁴⁻¹⁹ Asimismo, el porcentaje de infestaciones concomitantes con oxiúridos y ascáridos, que asciende a un 44,64 % (50/112) (Tabla 1), es considerable, lo cual es relativamente común.²

El ciclo de vida directo de los oxiúridos y la resistencia de los huevos puede conducir a infestaciones masivas que pueden producir, en condiciones de cautividad, inapetencia y diarrea.² En muchos casos, los oxiúridos pueden tener un efecto beneficioso en la agitación de la materia fecal y la prevención del estreñimiento,¹⁸ pero también se ha descrito que infestaciones altas pueden producir prolapsos de la cloaca o de pene en machos, pérdidas de peso lentas o deficiencias nutricionales que, a menudo, pasan desapercibidas en las tortugas;² además, se ha observado que un elevado número de oxiúridos puede asociarse incluso con la muerte.⁴¹

Las infestaciones masivas por ascáridos, por su lado, no solo ocurren en cautiverio, sino también en la naturaleza,² aunque en España parecen restringidas mayoritariamente en *T. graeca* a individuos en cautividad.⁴² El gran tamaño que pueden alcanzar estos nematodos puede producir obstrucciones intestinales con solo signos de estreñimiento, pero también puede haber migración de larvas a través del cuerpo llegando a producir daños a grandes vasos sanguíneos o perforaciones intestinales.² El hecho de que los animales infestados por ascáridos en nuestro estudio no mostraran sintomatología puede ser debido a la baja intensidad parasitaria que presentaban.¹⁶

En relación con los factores que pueden condicionar la presencia y prevalencia de los distintos parásitos encontrados, el análisis se ha realizado únicamente con los datos de *T. graeca*, tal y como hemos señalado anteriormente. Los resultados obtenidos indican que los factores ambientales (sustrato y densidad de población) sí están estadísticamente relacionados ($p < 0,000$ en todos los casos) con la prevalencia de los parásitos encontrados, mientras que las características biológicas del hospedador (edad, tamaño, sexo) no presentan asociación estadística significativa (salvo para el peso de la tortuga en relación con la presencia de nematodos, y para la edad en relación con la presencia de protozoos, aunque en este caso con un valor de significación marginal, $p = 0,033$). La ausencia de relación entre la parasitación por nematodos y el sexo o el estado general del animal ha sido puesta en evidencia por otros autores.¹²

Es de destacar que la presencia de protozoos está claramente condicionada por el tipo de sustrato, siendo más frecuentes en las tortugas mantenidas sobre tierra

que en las tortugas mantenidas sobre sustrato de hormigón. Esto puede ser debido tanto a que la supervivencia de las formas de transmisión (trofozoítos / quistes) es mayor en un suelo de tierra (por la humedad y la posibilidad de escapar a la exposición directa a los rayos del sol), como a la mayor dificultad en limpiar este tipo de suelos en comparación con los de hormigón. La importancia del sustrato en relación con la presencia de protozoos ha sido puesta de manifiesto por otros autores en un estudio realizado en el Reino Unido,¹⁸ en el que también se indica que la presencia de oxiúridos es menor en los animales mantenidos en suelo de tierra. Sin embargo, los motivos anteriores (humedad e insolación en suelo de tierra, limpieza) no permiten explicar los resultados observados con los nematodos, ya que la mayoría de las tortugas positivas a estos (oxiúridos y, especialmente, ascáridos) vivía en sustrato de hormigón. Esto podría explicar el bajo porcentaje de animales que hemos encontrado parasitados por nematodos y protozoos conjuntamente. Cabe mencionar el hecho de que los resultados obtenidos respecto a la parasitación por ascáridos en sustrato de hormigón (55 veces superior en hormigón que en tierra) no deja de ser sorprendente, pudiendo estar implicado algún otro factor que no se haya tenido en cuenta en el presente estudio.

Los resultados obtenidos con las tortugas más jóvenes (<5 años) que muestran un mayor porcentaje de parasitación por nematodos, aunque sin ser estadísticamente significativo, coinciden con los de otros estudios en los que se observan mayores valores de parasitación en animales de 1-5 años¹⁶ o de menos de 10 años¹⁸ en comparación con los individuos de más edad; sin embargo, en tortugas de menos de 1 año no se han encontrado parásitos.¹⁶ Para explicar estos resultados en tortugas jóvenes se ha propuesto la transferencia inicial de inmunidad desde la madre y su posterior pérdida, junto con la mayor tendencia a la coprofagia en individuos jóvenes.¹⁶ En nuestro caso, la mayoría de los propietarios no mantenía a los animales claramente separados y compartían espacio, lo que facilitaría la transmisión de parásitos de los adultos a los jóvenes.

En las tortugas de mayor edad, en las que puede descender la parasitación (sobre todo por oxiuros),^{16,18} se ha propuesto que los parásitos van perdiendo capacidad de adaptación a medida que van pasando los periodos de hibernación.⁴³ Sin embargo, el motivo en este caso podría ser que la respuesta inmune de las tortugas fuera cada vez mejor y esto las hiciera más resistentes a las infestaciones.

Por último, cabe señalar que la densidad de población de animales no tiene el mismo efecto sobre las infecciones por protozoos que por nematodos, circunstancia que puede explicarse por las diferencias en el ciclo de ambos tipos de parásitos; aunque se trata en ambos casos de parásitos de ciclo directo, los quistes de los protozoos (o los trofozoítos, en el caso de algunos flagelados) son directamente infectantes para los nuevos hospedadores; con una transmisión directa fecal-oral, a mayor densidad de población, mayor probabilidad de contacto de las tortugas con las formas infectantes liberadas en las heces. Sin embargo, en los nematodos, los huevos deben pasar un tiempo en el exterior para que se complete el desarrollo de la larva infectiva en su interior; dado que los huevos recién excretados con las heces no son infectantes, la transmisión se debe más bien a entornos contaminados, por lo que la densidad de población no es, en este caso, un factor tan relevante como en los protozoos. Sin embargo, esto no puede explicar por qué en la población de *T. graeca* estudiada el grado de infestación por ascáridos es mayor con densidades de población más bajas. Es necesario realizar nuevos muestreos y analizar más características ambientales para poder explicar estos resultados aparentemente contradictorios y que no pueden explicarse con los datos disponibles.

En conclusión, los parásitos intestinales son frecuentes en los exámenes fecales de las tortugas terrestres examinadas, sin estar relacionados con problemas de salud en la gran mayoría de los casos. En general, los protozoos son el grupo de parásitos más comúnmente encontrado en todas las especies de tortugas analizadas, salvo en *T. graeca*, en la que los nematodos fueron los parásitos más prevalentes.

Fuente de financiación: los autores no han recibido ninguna financiación externa, ni pública, ni del sector privado.

Conflicto de intereses: los autores no tienen ningún potencial conflicto de interés.

Summary

In this work, we use non-invasive methods to identify the parasites infecting different species of pet tortoises and we analyze the epidemiological factors that could be involved in the presence of these parasites. The study is based on the analysis of 112 tortoises belonging to four species. Fecal samples were examined by direct observation, in stained smears and after concentration techniques. In some specific cases, genetic analyses were made for the identification of protozoa. The parasites found in our study include the ciliates *Nyctotheroides* and *Balantidium*, amoebae of the genus *Entamoeba*, and several different flagellated protozoa belonging to the trichomonads and metamonads; nematode oxyurids and ascarids have been also found. We have found differences according to the parasite groups: in *T. graeca*, the proportion of individuals infected by protozoa is lower, and by nematodes is higher, than in the other host species. The analysis of the environmental conditions in relation to parasite infection, carried out with the data from *T. graeca*, showed that the most important risk factors are the type of substrate and, for all parasite groups except ascarids, a higher population density.

Bibliografía

1. Maas AK. Considerations and Conditions Involving Protozoal Inhabitation of the Reptilian Gastrointestinal Tract. *Vet Clin of North Am: Exotic Anim Prac*, 2014; 17: 263–297.
2. Schneller P, Pantchev N. Parasitology in Snakes, Lizards and Chelonians. Ed Chimaira, Frankfurt am Main, 2008: 90- 172.
3. Ponce Gordo F, Martínez Díaz RA, Herrera S. *Entamoeba strutionis* n.sp. (Sarcocystidophora: Endamoebidae) from ostriches (*Struthio camelus*). *Vet Parasitol*, 2004; 119: 327-335.
4. Ibañez-Escribano A, Nogal-Ruiz JJ, Delclaux M, Martínez-Navado E, Ponce-Gordo F. Morphological and molecular identification of *Tetratrichomonas* flagellates from the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*). *Res Vet Sci*, 2013; 95: 176-181.
5. Bouamer S, Morand S, Bourgat R. Redescription of *Mehdiella microstoma* and description of *Mehdiella petterae* sp. N., with a new definition of the genus *Mehdiella* Seurat, 1918 (Nematoda: Pharyngodonidae). *Folia Parasitol*, 2001a; 48: 132-138.
6. Bouamer S, Morand S, Bourgat R. Oxyuroids of Palearctic Testudinidae – new definition for *Alaeruis* Saeurat, 1918 (Nematoda: Pharyngodonidae) and redescription of *Alaeruis numidica* (Seurat, 1918). *J Parasitol*, 2001b; 87: 128-133.
7. Bouamer S, Morand S, Kara M. Redescription of four species of *Mehdiella* from Testudinidae, with a key to the species and discussion on the relationships among the species of this genus. *Parasite*, 2003; 10: 333-342.
8. Geimann QM, Wichterman R. Intestinal protozoa from galapagos tortoises (with descriptions of three new species). *J Parasitol*, 1937; 23 (4): 331- 347
9. Albaret JL. Étude systématique et cytologique sur les ciliés hétérotriches endocommensaux. *Bull Mus Hist Nat, Serie A Zoologie*, 1975; 89: 1-114.
10. Chagas C. Sobre as variações cíclicas do cariozoma em duas especies de ciliados parasitos. *Mem Instituto Oswaldo Cruz*, 1911; 3:136-144.
11. Carpenter JW. Reptils in: Exotic Animal Formulary. Elsevier Saunders. Missouri, 2013; 96.
12. Montesinos A, Ardiaca M. Guía de Terapéutica en Animales Exóticos. Multimédica Ediciones Veterinarias. Sant Cugat del Vallés (Barcelona), 2017: 217.
13. Wright K. Differentiation of Reptilian Parasites and Pseudoparasites. *NAVC Clinician's Brief*. 2009: 28- 32.
14. Panini R, Menetti C, Mancianti F. Coprological survey in pet reptiles in Italy. *Vet Rec*, 2011; 169, 207.
15. Pasmans F, Blahak S, Martel A, Pantchev N. Introducing reptiles into a captive collection: The role of the veterinarian. *Vet J*, 2008; 175, 53–68.
16. Traversa D, Capelli G, Iorio R, et al. Epidemiology and biology of nematofauna affecting *Testudo hermanni*, *Testudo graeca* and *Testudo marginata* in Italy. *J Parasitol Res*, 2005; 98: 14–20.
17. Rataj AV, Lindtner-Knific R, Vlahovic K, Mavri U, Dovc A. Parasites in pet reptiles. *Acta Vet Scand*, 2011; 53, 33.
18. Hedley K, Eatwell D, Shaw J. Gastrointestinal parasitic burdens in UK tortoises: a survey of tortoise owners and potential risk factors. *Vet Rec*, 2013; 173: 525.
19. McGuire JL, Miller EA, Norton TM, et al. Intestinal parasites of the gopher tortoise (*Gopherus Polyphemus*) from eight populations in Georgia. *J Parasitol Res*, 2013; 112: 4205-4210.
20. Cervone M, Fichi G, Lami A, et al. Internal and external parasitic infections of pet reptiles in Italy. *J Herpetol Med Surg*, 2016; 26: 122-130.
21. Chávez L, Serrano-Martínez, E, Tantaléan M, Quispe M, Casas GC. Parásitos gastrointestinales en reptiles en cautiverio en Lima metropolitan. *RIVEP*, 2015; 26: 127-134.
22. Sátorhelyi T, Sréter T. Studies on internal parasites of tortoises. *Parasit Hung*, 1993; 26: 51-55.
23. Hedley J. A review of gastrointestinal parasites in tortoises. *Testudo*, 2013; 7: 1-11.
24. Satbige AS, Kasaralikal VR, Halmandge SC, Rajendran C. *Nyctotherus* sp. infection in pet turtle: a case report. *J Parasit Dis*, 2017; 41 (2): 590 - 592.
25. Baker DG. Flynn's Parasites of Laboratory animals, second edition. Blackwell Publishing. Iowa, 2007; 183- 184.
26. Wolf D, Globokar V, Failing K, et al. Diagnosis of gastrointestinal parasites in reptiles: comparison of two coprological methods. *Acta Vet Scand*, 2014; 56 (1): 44.
27. Taylor MA, Coop RL, Wall RL. Parasites of exotics in Veterinary Parasitology. Blackwell Publishing. Oxford, 2007; 1523- 1543.
28. Mehlhorn H, Düwel D, Raether W. Parásitos de reptiles y anfibios en: Atlas de Parasitología Veterinaria. Grass ediciones. Barcelona, 1992; 394- 406.
29. Levine ND. The amoeba in Protozoan parasites of domestic animals

- and of man. Burgess Publishing Company. Minnesota, 1961; 129-158.
30. Juan-Sallés C, Garner M, Nordhausen RW, *et al.* Renal flagellate infections in reptiles: 29 cases. *J Zoo Wildl Med*, 2014; 45(1): 100-109.
 31. Jacobson ER. Parasites and parasitic diseases of reptiles in: Infectious disease and Pathology of Reptiles. Taylor & Francis Group. Boca Raton, 2007; 572-575.
 32. Poynton SL, Sterud E. Guidelines for species descriptions of diplomonad Flagellates from fish. *J Fish Dis*, 2002; (25): 15-31.
 33. Brooke M, Melvin DM, Healy GR. Protozoarios comunes en humanos: esquemas de ciclos biológicos. U.S. Department of HHS, Atlanta, 1983; 11-18.
 34. Alparo-Herrera I. Giardiasis y desnutrición. *Rev Soc Bol Ped*, 2005; 44 (3): versión on-line.
 35. Uribarren Berrueta T. Giardiasis o giardiosis. Dep de Microbiología y Parasitología- Recursos en Parasitología. Universidad Autónoma de México. México, 2011. www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/giardiasis.html. Visitado el 9 de julio de 2016.
 36. Silberman JD, Graham Clark C, Diamond LS, Sogin ML. Phylogeny of the Genera *Entamoeba* and *Endolimax* as Deduced from Small-Subunit Ribosomal RNA sequences. *Mol Biol Evol*, 1999; 16(12): 1740-1751.
 37. Brewer LA, Denver MC, Whitney M, Eichinger DJ. Analysis of commercial *Entamoeba histolytica* ELISA kits for the detection of *Entamoeba invadens* in reptiles. *J Zoo Wildl Med*, 2008; 39: 493-495.
 38. Garcia C, Ramos F, Gutiérrez Pérez, R, *et al.* Molecular epidemiology and genetic diversity of *Entamoeba* species in a chelonian collection. *J Med Microbiol*, 2014; 63: 271-283.
 39. Donaldson M, Heyneman D, Dempster R, García L. Epizootic of fatal amebiasis among exhibited snakes: epidemiologic, pathologic, and chemotherapeutic considerations. *Am J Vet Res*, 1975; 36: 807-817.
 40. Osman Hill, WC, Neal RA. An epizootic due to *Entamoeba invadens* at the Gardens of the Zoological Society of London. *Zool J Linn Soc*, 1954; 123: 731-738.
 41. Martínez Silvestre A. Infestación masiva por *Tachigonetria (Oxyuridae)* en una tortuga mediterránea (*Testudo hermanni*). *Cons Dif Vet*, 2011; 183 (19): 57-61.
 42. Chávarri M, Berriatua E, Giménez A *et al.* Differences in helminth infections between captive and wild spur-thighed tortoises *Testudo graeca* in southern Spain: a potential risk of reintroductions of this species. *Vet Parasitol*, 2012; 187: 491-497.
 43. Esch GW, Gibbons WJ. Seasonal incidence of parasitism in the painted turtle, *Chrysemys picta marginata* Agassiz. *J Parasitol*, 1967; 53: 818-821.