

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



## TESIS DOCTORAL

Evaluación del estado sanitario de las tortugas gigantes de las Islas Galápagos  
desde una perspectiva de *One Health*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ainoa Nieto Claudín

DIRECTORES

Dra. Sharon Lynn Deem  
Dr. Fernando Esperón Fajardo

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

Evaluación del estado sanitario de las tortugas gigantes de las Islas Galápagos desde una perspectiva de One Health

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Ainoa Nieto Claudín

DIRECTORES

Dra. Sharon Lynn Deem  
Dr. Fernando Esperón Fajardo









La **Dra. Sharon Lynn Deem**, directora del Instituto de Medicina de la Conservación del Zoológico de Saint Louis y el **Dr. Fernando Esperón Fajardo**, profesor adjunto de la Facultad de Ciencias Biomédicas y de la Salud de la Universidad Europea de Madrid.

## CERTIFICAN

Que **Doña Ainoa Nieto Claudín**, Licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: “Evaluación del estado sanitario de las tortugas gigantes de las Islas Galápagos desde una perspectiva de *One Health*”, que presenta como Tesis para alcanzar el grado de Doctora por la Universidad Complutense de Madrid en formato de publicaciones, incluyendo los siguientes trabajos ya publicados:

- **Nieto-Claudín, A.**, Palmer, J.L., Esperón, F. & Deem, S.L. (2021). Haematology and plasma biochemistry reference intervals for the critically endangered western Santa Cruz Galapagos tortoise (*Chelonoidis porteri*). *Conservation Physiology*, 9(1), coab019; <https://doi.org/10.1093/conphys/coab019>.
- **Nieto-Claudín, A.**, Esperon, F., Apakupakul, K., Peña, I., Deem, S.L. (2021). Health assessments uncover novel viral sequences in five species of Galapagos tortoises. *Transboundary and Emerging Diseases*.
- **Nieto-Claudín, A.**, Esperón, F., Blake, S. & Deem, S.L. (2019). Antimicrobial resistance genes present in the faecal microbiota of free-living Galapagos tortoises (*Chelonoidis porteri*). *Zoonoses and Public Health*, 66(8), 900-908. <https://doi.org/10.1111/zph.12639>
- **Nieto-Claudín, A.**, Deem, S.L., Rodríguez, C., Cano, S., Moity, N., Cabrera, F. & Esperón, F. (2021). Antimicrobial resistance in Galapagos tortoises as an indicator of the growing human footprint. *Environmental Pollution* 284, 117453. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117453>

Para que conste a efectos oportunos, expiden y firman el presente documento, a 24 de marzo de 2022.



**Fdo. Dra. Sharon Lynn Deem**

Directora



**Fdo. Dr. Fernando Esperón Fajardo**

Director



## PRESENTACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL EN FORMATO DE PUBLICACIONES

La presente Tesis Doctoral es un compendio de cuatro trabajos publicados en revistas científicas indexadas, en los que se recogen los resultados obtenidos a partir de la investigación realizada dentro del Programa de Doctorado en Veterinaria. La presentación de esta Tesis Doctoral en Formato de Publicaciones se ha realizado cumpliendo con los criterios de idoneidad requeridos por la Comisión de Doctorado y el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

La publicación de estos resultados en revistas cuyo índice de impacto se sitúa en la primera mitad (Q1 y Q2) de la relación de revistas del *Journal Citation Reports* (JCR) para su área o áreas afines, constituye un indicador de la calidad del trabajo realizado, a la vez que favorece su divulgación en el ámbito científico internacional.

A continuación, se enuncian las referencias completas (formato APA) de las publicaciones recogidas en esta Tesis Doctoral:

- **Nieto-Claudín, A.**, Palmer, J.L., Esperón, F. & Deem, S.L. (2021). Haematology and plasma biochemistry reference intervals for the critically endangered western Santa Cruz Galapagos tortoise (*Chelonoidis porteri*). *Conservation Physiology*, 9(1), coab019; <https://doi.org/10.1093/conphys/coab019>.
- **Nieto-Claudín, A.**, Esperon, F., Apakupakul, K., Peña, I., Deem, S.L. (2021). Health assessments uncover novel viral sequences in five species of Galapagos tortoises. *Transboundary and Emerging Diseases*.
- **Nieto-Claudín, A.**, Esperón, F., Blake, S. & Deem, S.L. (2019). Antimicrobial resistance genes present in the faecal microbiota of free-living Galapagos tortoises (*Chelonoidis porteri*). *Zoonoses and Public Health*, 66(8), 900-908. <https://doi.org/10.1111/zph.12639>
- **Nieto-Claudín, A.**, Deem, S.L., Rodríguez, C., Cano, S., Moity, N., Cabrera, F. & Esperón, F. (2021). Antimicrobial resistance in Galapagos tortoises as an indicator of the growing human footprint. *Environmental Pollution* 284, 117453. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117453>



## FINANCIACIÓN

Esta memoria de Tesis Doctoral se ha realizado bajo la supervisión de la Dra. Casilda Rodríguez Fernández, del Departamento de Farmacología de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). El trabajo ha estado dirigido por la Dra. Sharon Lynn Deem, directora del Instituto de Medicina de la Conservación del Zoológico de Saint Louis (ICM) en Missouri (EE. UU.), y el Dr. Fernando Esperón Fajardo, científico titular del Centro de Investigación en Sanidad Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CISA) de Madrid. Esta investigación se enmarca dentro del Programa de Ecología de Movimiento de Tortugas de Galápagos (GTMEP), mismo que se encuentra adscrito a la Fundación Charles Darwin (FCD), la Dirección del Parque Nacional Galápagos (DPNG) y el Instituto de Medicina de la Conservación del Zoológico de Saint Louis (ICM). Durante el desarrollo de esta tesis se realizaron dos estancias (2017 y 2019) en el Zoológico de Saint Louis (Missouri, EE. UU.), bajo la supervisión de la Dra. Deem, y tres periodos de estancias (2018, 2019 y 2020) en el laboratorio del INIA-CISA en Madrid, bajo la supervisión del Dr. Esperón.

Los recursos económicos fueron aportados principalmente por el *Saint Louis Zoo Institute for Conservation Medicine*, *Saint Louis WildCare Institute Center for Chelonian Conservation* y la Fundación Charles Darwin, así como de la concesión de varias propuestas de investigación sometidas al *Cleveland Metroparks Zoo (Scott Neotropical Fund)*, *Saint Louis Zoo's Field Research for Conservation Program (FRC # 2018.03)* y *American Association of Zoo Veterinarians Wild Animal Health Fund (WAHF # 37)*. El Zoológico de Houston, *Galapagos Conservation Trust*, Ecoventura e *International Watch Company Schaffhausen* contribuyeron de manera directa o indirecta financiando el trabajo de campo, el personal de apoyo y/o el análisis de las muestras. Dña. Karen Lo y Dña. Linda Esler contribuyeron también con fondos para salarios y trabajo de campo, a través de la Fundación Charles Darwin. Esta publicación cuenta con el número de contribución 2460 correspondiente a la Fundación Charles Darwin para las Islas Galápagos.





*Wildlife is telling us the state of our planet. We listen. We take action.*



*A mis padres, por todo*  
*A Clari, por darme la veterinaria*



Aclaración sobre lenguaje inclusivo:

Con el objetivo de facilitar la fluidez y lectura del presente trabajo, cualquier referencia a un género en particular a lo largo del documento (femenino, masculino, neutro) será asumida como alusiva a cualquier persona, sin distinción ni presunción de sexo, género, raza, orientación sexual, religión u otros.



## AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo enormemente a la Dra. Casilda Rodríguez Fernández. Sin ella, esta tesis no hubiera sido posible, es la “tercera directora” de esta tesis. Muchas gracias, Casilda, por todo lo que me has enseñado, por tu pasión y tu motivación, tu buen humor perpetuo y tus enseñanzas, no solo profesionales sino de vida, que son las más valiosas, las más importantes. Desde aquellos primeros años en la facultad siempre me has acompañado y asesorado, siempre has confiado en mí, en lo que ya era, pero sobre todo en lo que podía llegar a ser. Siempre has contado conmigo y me has abierto las puertas de tu seminario, de tantas charlas y encuentros con estudiantes y mentores. Y siempre me has animado a seguir adelante, “al tran tran”, incluso en los momentos más difíciles (y ha habido algunos). No tengo palabras para expresar mi agradecimiento por todo el apoyo que me has dado para lograr culminar esta tesis, sin ti no hubiera podido.

A Casilda le debo también el haber conocido al que sería codirector de mi tesis, el Dr. Fernando Esperón Fajardo. Gracias Fernando por todas las enseñanzas a lo largo de tantos años, desde los primeros meses en el CISA, cuando me quejaba de la cantidad de basura que genera el trabajo de laboratorio, hasta los días previos a la entrega de esta tesis. Gracias por estar ahí durante este largo camino, por tu paciencia, por guiarme y asesorarme durante años en mis incansables búsquedas, por creer siempre en mí y hacérmelo saber, y por secundar siempre mis locas ideas de más y más proyectos y muestras. Gracias Fer.

To Dr. Sharon Deem. Thank you for trusting me since the very beginning in Galapagos when you barely knew me years ago. Thank you for saying yes when I proposed you to be my director with no funding and no project. You made me a One Health practitioner, a better scientist, a better wildlife veterinarian, a better woman. Thanks Sharon, for the opportunity to work for the GTMEP and to grow with your team, for the immense support throughout all these years. I also must thank you for infecting me with your love for tortoises, I never thought they will become one of my favorite animals. For being my mentor, my boss, my supervisor, but also my friend. And for showing me with your example the vet I would love to become. Thank you.

Quiero agradecer inmensamente a todo el GTMEP por acogerme en su equipo. To Dr. Stephen Blake for having me on his team and taught me in 2017 how fast a scientist can walk while making jokes. Thanks Steve, all learning experiences with the GTMEP team made me a much better scientist and person. Thanks for the opportunity, for your kind words during difficult times, and of course, for all those beers.

Si hay alguien a quién quiero agradecer especialmente es a la persona que me enseñó todo sobre las tortugas gigantes de Galápagos, al “Viento”, que me dejó seguirle en todas sus andanzas en busca de las tortugas aunque a duras penas conseguía mantenerle el paso. Gracias Freddy, por mostrarme algunos de los lugares más hermosos del mundo, Alcedo se ha convertido en mi lugar favorito. Gracias por tantos y tantos viajes de campo, por estar siempre dispuesto a muestrear una tortuga más. Gracias por tu creatividad para resolver todos los problemas que surgieron en estos años, por encontrar siempre la solución y conseguir las muestras que necesitábamos, y muchas más. Por *acolitar*me en mis locas ideas, por escucharme y enseñarme la importancia de aquello que no se ve y que no se dice. Gracias por todo.

Otra persona tremendamente valiosa a la que debo agradecer es Anne Guezou. Amiga, compañera, profesora. Gracias Anne por tu apoyo durante todos estos años, por tantos buenos consejos, por tu ayuda en el campo, en el laboratorio, en la vida. Por la pasión y la alegría que demuestras en todo lo que haces. Por transmitirme tanta paz, seguridad y confianza, solo con estar ahí. Gracias por ser un modelo a seguir, por tu fortaleza y tu delicadeza, por tantas risas y por las mejores clases de yoga a las que he asistido. Me has dado todo. Muchas gracias.

Gracias a todo el equipo de tortugas, a José Haro, por su ayuda en la recolección de muestras en los lugares más remotos; a Kyana Pike, compañera de fatigas doctorales, gracias por tu apoyo y tu alegría, por fin las dos vemos la luz al final del túnel; a Irene Peña, por su ayuda en el campo y en el laboratorio, por tantas muestras analizadas y por tenerme paciencia; a todas las voluntarias y estudiantes de antes y de ahora, que me habéis ayudado y me habéis enseñado: Karina, Surya, Cristina, Laura, Gislayne.

Thank you so much to the ICM team. Jamie, Maris, Kathleen, Kathy, Keri, Mary, Paulo, Fernando, Lilian. I have learnt so much from you. Your hard work and truly passion for

conservation and One Health inspires me every day. Thanks so much for your friendship and support since the very first day, for the amazing work you do, for all the supplies you always sent me Jamie, even if I asked something at the very last minute. This work can't have happened without you. You rock!!

Un agradecimiento especial a todas las compañeras y compañeros de la Fundación Charles Darwin, no os nombro para no dejarme a nadie. Gracias por abrirme las puertas de esta institución, por el apoyo a lo largo de los años, por enseñarme y acompañarme durante este aprendizaje para llegar a ser PI del proyecto. A Diego, compañero de oficina; han sido años de muchas alegrías. Gracias. A los científicos y científicas, staff, colaboradores y visitantes, que me han inspirado cada día a seguir trabajando por la conservación de este trocito del planeta.

Gracias también al equipo de la Dirección del Parque Nacional Galápagos, por los permisos y la ayuda en el campo. Especialmente a Andrea Loyola, por compartir penas y alegrías con tantos y tantos animales rescatados. Haces un trabajo muy importante y espero que un día sea valorado en su justa medida.

Agradezco mucho a los coautores y coautoras de los artículos que conforman esta tesis. Gracias a vuestras contribuciones el trabajo mejoró significativamente y creo que hemos logrado contribuir, con un pequeño granito de arena, al conocimiento y la conservación de este archipiélago remoto.

Agradezco a la Universidad Complutense de Madrid y especialmente a la Facultad de Veterinaria, por tantos años de enseñanzas. Gracias a Carmen, Santiago y Manuela, sin vosotros este camino habría sido mucho más difícil de recorrer. A los donantes y colaboradores de este trabajo, que han hecho posible subir volcanes, contratar embarcaciones, viajar con muestras por medio mundo y hacer muchos (muchos!) análisis en el laboratorio. A special thank you to the whole GCT team, it has been a pleasure to work with you all.

Gracias a todo el equipo del CISA, por vuestro apoyo y por poner siempre el laboratorio a mi disposición. Gracias a Ana, Irene, Marisa, Encarna, Elena, Olga. Gracias a los hermanos Sacristán, Irene y Carlos, amigos y compañeros de profesión, por ayudarme con las muestras, con tantas y tantas dudas, y por mostrarme que sí es posible sobrevivir al

doctorado. Debo agradecer también a alguien que no se lo espera, Javier Millán, porque hace años, en un congreso, hizo un comentario que seguro no recuerda, pero que sembró la semilla del doctorado que ahora ha dado sus frutos. Gracias.

A special acknowledgment goes to Dr. Nicole Stacy, for all your help and expertise with tortoise hematology.

A mis amigas y amigos, de aquí y de allí. A las que me han acompañado y aguantado durante este largo proceso y han seguido ahí durante los últimos años, los más duros y difíciles; sabéis quiénes sois, aunque no os nombre. Gracias a Nathalie y Carol, las *galapagueñas* que han estado y están ahí cada día, a pesar de todo. Gracias Carol por tu ayuda, tus consejos y los mejores mapas; Paula, amiga de profesión y aventuras; Courtney, I wish you the best now with your PhD. Os quiero! A las que ya volaron de Galápagos, Malena, Karol, David... Gracias por los buenos consejos, por vuestro cariño y por encontrar siempre un momento para reencontrarnos. Gracias Nico, por tu creatividad y tus buenas ideas, siempre mejoras los proyectos en los que participas. Gracias por ese paréntesis que me dio el impulso para seguir.

A Miguel, por esta amistad que dura ya muchos años, pero nunca suficientes. Por ser un referente, un amigo incondicional y una persona increíble. Por compartir tu sabiduría y tu experiencia conmigo, por tener siempre el consejo adecuado, las palabras precisas. Por dejarme los apuntes de la carrera hace tantos años, ¡y ahora la tesis! Por visitarme en Costa Rica, en Galápagos... Y lo que esté por venir! Gracias por quererme, acompañarme, asesorarme, cuidarme y tenerme paciencia infinita.

A las veterinarias y veterinarios, por tantos años de alegrías. Blanca, amiga del alma. A las del Lourdes, especialmente a Ana, Zaida y Ali, por acompañarme tantos años y rescatarme en los momentos difíciles. A Adri, por conseguir (casi) que me guste la estadística, y por los sabios consejos en los momentos críticos de la tesis. A Javi, por verme siempre con los mejores ojos y seguir ahí después de tantos años. A Luis, por ese optimismo con el que afrontas la vida y por tener siempre tiempo para tomar algo en el barrio.

Gracias a Laura, el salvavidas que me mantuvo (casi) a flote durante los últimos años.

En memoria de Roberto Pépolas, amigo y compañero, que se fue demasiado pronto.

A Galápagos, que ha sido mi hogar durante los últimos 10 años. Y a las tortugas gigantes, que me siguen inspirando cada día en mi trabajo y me han ayudado a ver las cosas con más perspectiva.

A mi familia, especialmente a mi madre y a mi padre. Por enseñarme a luchar, a no rendirme nunca y perseguir mis sueños. Por creer siempre en mí y por apoyarme, aunque esos sueños me llevarán tan lejos de casa. Os debo todo. A Amaya, la mejor hermana del mundo, por tu cariño y tu amistad, tu confianza y por ser la persona que más me hace reír. A Iris, que va a heredar todo lo bueno y lo malo que hagamos con este planeta. Por ella me esfuerzo cada día un poco más. A Clari, que me enseñó desde tan pequeña a cuidar y querer a los animales, sin ella probablemente no hubiera estudiado veterinaria. A Isabel, Manuel y Joaco, por quererme y apoyarme incondicionalmente. Os quiero.



# ÍNDICE



RESUMEN .....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Las Islas Galápagos: un laboratorio viviente.....	3
1.1.1 Breve historia del Archipiélago de Colón .....	3
1.1.2 Las tortugas de las Islas Galápagos: de la explotación a la conservación .....	8
1.2 Evaluación sanitaria de las tortugas gigantes de Galápagos .....	15
1.2.1 El paradigma de One Health.....	15
1.2.2 Patógenos de importancia para la conservación de quelonios silvestres.....	19
1.2.3 Resistencias antimicrobianas: la pandemia invisible .....	24
1.3 Antecedentes del proyecto de investigación.....	31
1.3.1 Programa de Ecología de Movimiento de las Tortugas de Galápagos.....	31
1.3.2 Estado del arte: salud de las tortugas gigantes de las Galápagos.....	35
2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	43
2.1 Justificación .....	45
2.2 Formulación de preguntas de investigación e hipótesis.....	47
2.3 Objetivo general y objetivos específicos.....	48
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	49
3.1 Adquisición de permisos .....	51
3.2 Zonas de estudio .....	52
3.3 Diseño del muestreo .....	54
3.3.1 Tamaño muestral por especie .....	54
3.3.2 Categorización de las zonas de muestreo .....	57
3.4 Recolección de las muestras .....	59
3.5 Determinación de los intervalos de referencia de hematología y bioquímica sanguíneas.....	62

3.6 Determinación e identificación de agentes infecciosos.....	64
3.7 Determinación y cuantificación de genes de resistencia a antimicrobianos.....	66
4. RESULTADOS .....	71
4.1 Capítulo I.....	73
4.2 Capítulo II.....	89
4.3 Capítulo III.....	107
5. DISCUSIÓN .....	137
6. CONCLUSIONES .....	157
7. BIBLIOGRAFÍA.....	163

## LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Balleneros y filibusteros extrayendo tortugas gigantes de las Galápagos. Imágenes cedidas por la Academia de Ciencias de California, Archivo de la FCD.....	4
Figura 2. Mapa de las Islas Galápagos y su ubicación geográfica en relación con el continente americano. Mapa cedido por Byron Delgado, FCD. ....	5
Figura 3. Suma normalizada en una escala de 0-1 de las especies introducidas en Galápagos (AS), residentes (Residents), turistas (Tourist), pasajeros de aerolíneas comerciales (PAX), vuelos comerciales (Flights), embarcaciones de carga y turismo (Boat) y mercancías (Cargo) por década, desde 1830s hasta 2010s. Adaptado de Toral et al. (2017).....	6
Figura 4. Turismo en las Islas Galápagos desde 1980 hasta 2019 y Tasa Anual de Crecimiento Compuesto (CAGR) por décadas. Se incluye el turismo total y el turismo categorizado por tipo (turismo de tierra y turismo de a bordo). Adaptado de Cajiao et al. (2020).....	8
Figura 5. Exterminio de tortugas gigantes de Galápagos a manos de piratas y balleneros. Imágenes cedidas por la Academia de Ciencias de California, Archivo de la FCD.....	10
Figura 6. Proyecto de cría en cautividad de tortugas terrestres en Santa Cruz. A la izquierda, recolección e identificación de huevos de tortuga a manos del guardaparque D. Fausto Llerena. A la derecha, tortugas neonatas en el Centro de Crianza Fausto Llerena. ....	12
Figura 7. Tortuga juvenil entre las patas de un chivo o cabra introducida (izquierda) y manada de chivos introducidos junto a una tortuga (derecha). Imágenes cedidas por el Archivo de la FCD. ....	13
Figura 8. Tortuga encontrada en la isla de Fernandina en 2019, mantenida en cautividad en el Centro de Crianza Fausto Llerena, Santa Cruz. Imagen de archivo personal. ....	14
Figura 9. Tortuga gigante cruzando la carretera principal en Santa Cruz (izquierda) y atravesando el cercado de una finca ganadera en Santa Cruz (derecha). Imágenes cedidas por Stephen Blake, GTMEP. ....	15

Figura 10. Nueva definición de One Health, incorporando lo diversos sectores y disciplinas, así como el conjunto de la sociedad civil, haciendo hincapié en la comunicación, coordinación, colaboración y capacitación para impulsar la salud desde un enfoque integrador. Adaptado del Panel de Expertos en One Health (OHHLEP) publicado en diciembre de 2021 (<https://www.who.int/news/item/01-12-2021-tripartite-and-unep-support-ohhlep-s-definition-of-one-health>).....18

Figura 11. Tortuga de Santa Cruz (*C. porteri*) en una zona periurbana con una elevada contaminación por residuos antropogénicos, mayoritariamente plásticos (izquierda) y tortuga ingiriendo un plástico (derecha). Imágenes cedidas por Karina Ramón, GTMEP. ....277

Figura 12. Recomendaciones para una respuesta integral a la crisis global de las resistencias antimicrobianas y su relación con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030. Adaptado del Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance (IACG) Report, 2019. ....30

Figura 13. Monitoreo de tortugas terrestres empleando una antena de radio- telemetría (Freddy Cabrera, izquierda) y primera tortuga marcada con un dispositivo GPS en 2009. Imágenes cedidas por Stephen Blake, GTMEP. ....32

Figura 14. Patrones de movimiento de las tortugas gigantes de Galápagos en las diferentes islas. Cada color refleja el movimiento de un individuo diferente. En el volcán Alcedo (A) y en las dos especies de Santa Cruz (B) predomina la migración estacional, mientras que en Española (C) predomina el sedentarismo. Adaptado de Bastille-Rousseau et al. (2017). 33

Figura 15. Realización de ecografías en el campo (Dra. Sharon Deem, Freddy Cabrera y Freddy Villalba) (izquierda). Neonato marcado con dispositivos de radio seguimiento (derecha). La Reserva, Santa Cruz. Imágenes cedidas por Samuel Rowley, GTMEP.....344

Figura 16. Lesiones de coloración blanquecina en el caparazón de una tortuga adulta (izquierda) y una juvenil (derecha) de Santa Cruz (*C. porteri*). Lesión compatible con el hongo *Aphanoascus galapagosensis*. Imagen de archivo personal (izquierda) y cedida por Jorge Carrión, GTMEP (derecha). ....377

Figura 17. Tumorción de gran tamaño en extremidad posterior derecha de un macho adulto de tortuga terrestre de Santa Cruz (*C. porteri*) encontrado en 2017. Vista caudal

del individuo (arriba), vista ventral donde se observa la masa creciendo por encima del plastrón (abajo izquierda) y vista ventrocaudal, posterior a la escisión parcial realizada por Ainoa Nieto y Andrea Loyola (abajo derecha). Imágenes de archivo personal.....	39
Figura 18. Hembra adulta de tortuga terrestre de Santa Cruz ( <i>C. porteri</i> ) con inflamación edematosa en la región ventrocaudal del cuello de etiología desconocida. Imágenes de archivo personal.....	400
Figura 19. Trauma producido por perros en una hembra subadulta de Santa Cruz ( <i>C. porteri</i> ) con lesiones en los escudos marginales de las regiones craneolateral y caudal del caparazón (arriba). Abajo dos atropellos por vehículos en Santa Cruz. Fractura de escudos marginales craneales con hemorragia severa (izquierda) y politraumatismo en un individuo adulto ocasionando la muerte del animal (derecha). Imágenes de archivo personal e imagen cedida por Andrea Loyola, DPNG (abajo derecha). ....	411
Figura 20. Tortugas terrestres del este (arriba izquierda) y oeste (arriba derecha) de Santa Cruz, volcán Alcedo en la isla Isabela (abajo izquierda) e isla Española (abajo derecha). Se puede apreciar la diferente morfología del caparazón de la tortuga de Española (forma “silla de montar”). Imagen de archivo personal y cedidas por Jorge Carrión, GTMEP (arriba derecha) y Juan Manuel García, FCD (abajo).....	533
Figura 21. Representación de las localidades de muestreo de la especie <i>C. porteri</i> en la isla Santa Cruz. Cada círculo blanco corresponde con un individuo muestreado. Se puede apreciar en el mapa que las tortugas fueron muestreadas dentro y fuera de la zona agropecuaria, delimitada en rojo. Mapa cedido por Carolina Carrión, FCD. ....	555
Figura 22. Zonas de muestreo del estudio piloto realizado en la isla Santa Cruz, categorizadas por uso de suelo: zona agropecuaria (verde), zona protegida (naranja) y zona urbana y periurbana (rosa). Mapa cedido por Carolina Carrión, FCD. ....	577
Figura 23. Toma muestras de las tortugas silvestres. Pesaje (arriba derecha), toma de muestra de sangre (centro izquierda), hisopado ocular (centro derecha), colocación de microchip (abajo izquierda) y recolección de muestra fecal (abajo derecha). Imágenes cedidas por Joshua Vela y Juan Manual García, FCD.....	611
Figura 24. Procesamiento de las muestras de sangre en el campo. Elaboración de frotis sanguíneos inmediatamente después de la toma de muestra en el volcán Alcedo (arriba)	

y realización de hematocrito y sólidos totales en campo (abajo; izquierda isla Española y derecha volcán Alcedo). Imágenes cedidas por Jorge Carrión y Francisco Laso (GTMEP), y Juan Manuel García y Joshua Vela (FCD). .....633

Figura 25. Mapa de prevalencias obtenidas para adenovirus (verde) y herpesvirus (azul) en las diferentes islas y especies de tortuga terrestre. Adaptado de Nieto-Claudín et al. (2021). .....1477

Figura 26. Tortuga del volcán Wolf (*C. becki*) mantenida en cautividad en el Centro de Crianza Fausto Llerena y con sintomatología compatible con un cuadro severo de herpesvirus, con resultado PCR positivo a CheHV1. Se observa letargia, blefaritis (izquierda) y descarga nasal (derecha). Imágenes de archivo personal. ....14949

Figura 27. Tortuga gigante de Alcedo (*C. vandenburghi*) y pinzón de Darwin (*Geospiza* sp.), dos especies endémicas e "ingenieras" de los ecosistemas del archipiélago. Imagen cedida por Juan Manuel García, FCD. ....1544

Figura 28. Tortuga gigante de Galápagos recién nacida. Imagen cedida por Joshua Vela, FCD. ....1566

Tabla 1. Tipo de estudio, especies, número de individuos y localidades de muestreo.....56

Tabla 2. Genes de resistencia a antimicrobianos incluidos en el estudio, clasificados de acuerdo con las familias antimicrobianas a que pertenecen y la referencia bibliográfica correspondiente.....67

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>ABG</b>	Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos
<b>ABS</b>	Valores absolutos
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AdV</b>	Adenovirus
<b>Alb</b>	Albúmina
<b>AMR</b>	Resistencias antimicrobianas
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>ARGs</b>	Genes de resistencia a antimicrobianos
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosómico
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>ASVCP</b>	<i>Quality Assurance and Standards for Veterinary Clinical Pathology</i>
<b>AVMA</b>	Asociación Americana de Medicina Veterinaria
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>CAGR</b>	Tasa Anual de Crecimiento Compuesto
<b>CCL</b>	Largo Curvo del Caparazón
<b>cells/<math>\mu</math>l</b>	Células por microlitro
<b>cells/L</b>	Células por litro
<b>CheAdV1</b>	<i>Chelonoidis adenovirus 1</i>
<b>CheAdV2</b>	<i>Chelonoidis adenovirus 2</i>
<b>CheHV1</b>	<i>Chelonoidis herpesvirus 1</i>
<b>CheHV2</b>	<i>Chelonoidis herpesvirus 2</i>
<b>CITES</b>	Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres
<b>CK</b>	Creatina quinasa
<b>ct</b>	Ciclo umbral
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>DPNG</b>	Dirección del Parque Nacional Galápagos
<b>EAMI</b>	Red de Autoridades de Medicamentos en Iberoamérica
<b>ECCD</b>	Estación Científica Charles Darwin
<b>EE. UU.</b>	Estados Unidos
<b>EMA</b>	Agencia Europea del Medicamento
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>FDA</b>	Agencia de Administración de Medicamentos y Alimentos
<b>FCD</b>	Fundación Charles Darwin
<b>FV3</b>	Ranavirus tipo 3
<b>G</b>	Diámetro externo del tubo de la aguja
<b>Glob</b>	Globulinas
<b>GLU</b>	Glucosa

<b>GPS</b>	Sistema de Posicionamiento Global
<b>GREFA</b>	Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat
<b>GTMEP</b>	Programa de Ecología de Movimiento de Tortugas de Galápagos
<b>H:L</b>	Proporción heterófilos/linfocitos
<b>HV</b>	Herpesvirus
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>ICM</b>	Instituto de Medicina de la Conservación del Zoológico de Saint Louis
<b>In</b>	Integrones
<b>INIA-CISA</b>	Centro de Investigación en Sanidad Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
<b>IR</b>	Intervalos de referencia
<b>IS</b>	Secuencias de inserción
<b>IUCN</b>	Unión Internacional de Conservación de la Naturaleza
<b>MGE</b>	Elementos genéticos móviles
<b>nt</b>	Nucleótidos
<b>ODS</b>	Objetivos del Desarrollo
<b>OHHLEP</b>	Panel de Expertos en <i>One Health</i>
<b>OIE</b>	Organización Mundial de Sanidad Animal
<b>OMS (WHO)</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ONU</b>	Organización de la Naciones Unidas
<b><i>p</i></b>	Probabilidad estadística
<b><i>pb</i></b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PCV</b>	Hematocrito
<b>RefVal</b>	<i>Reference Value Advisor</i>
<b>rtPCR</b>	PCR a tiempo real
<b>sp.</b>	Especie
<b>spp.</b>	Especies
<b>TeHV</b>	<i>Testudinid herpesvirus</i>
<b>Tn</b>	Transposones
<b>TP</b>	Proteínas totales
<b>TS</b>	Sólidos totales
<b>UA</b>	Ácido úrico
<b>UICN</b>	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
<b>UNESCO</b>	Organización de la Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura
<b>URTD</b>	Enfermedad del tracto respiratorio superior
<b>WBC</b>	Recuento total de leucocitos
<b>WBC Diff %</b>	Recuento diferencial de leucocitos
<b><i>z</i></b>	Poder estadístico

**RESUMEN**

***ABSTRACT***



La tortuga gigante de las Islas Galápagos (*Chelonoidis* spp.) es uno de los animales más emblemáticos de todo el mundo. Los reptiles que dan nombre a uno de los archipiélagos mejor conservados del planeta enfrentan hoy en día numerosas amenazas, vinculadas a los cambios antropogénicos que están afectando a sus ecosistemas y causando un potencial impacto sobre su ecología, su fisiología y su estado de salud. De las 14 especies de tortuga gigante que un día poblaron las islas, dos están consideradas extintas debido a la depredación humana, y las otras 12 especies se encuentran registradas bajo algún grado de amenaza, de acuerdo con la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). El incremento del turismo, el cambio climático y la presencia de especies invasoras son algunos de los factores que están contribuyendo al deterioro de la salud de los ecosistemas de Galápagos y su biodiversidad (entendido desde un enfoque de *One Health*), pero hay otros muchos factores que no han sido estudiados en detalle. El presente trabajo propone generar conocimiento científico sobre el estado de salud de las tortugas gigantes de Galápagos, centrandolo en tres objetivos específicos: establecer los valores de referencia de hematología y bioquímica de la especie *Chelonoidis porteri*, determinar la presencia de agentes infecciosos de importancia sanitaria en quelonios (herpesvirus, adenovirus, micoplasma y ranavirus) y establecer la presencia y prevalencia de genes de resistencia a antimicrobianos (ARGs) y su potencial correlación con las actividades humanas del archipiélago. Para ello, se recogieron muestras de un total de 454 tortugas gigantes pertenecientes a tres islas y cinco especies (*C. porteri*, *C. donfaustoi*, *C. vandenburghi*, *C. hoodensis* y *C. becki*). En cada uno de los

estudios realizados se empleó un diferente tipo y número de muestras y especies, en función de la metodología y la hipótesis a probar. Se utilizaron un total de 208 muestras de sangre de las tortugas de Santa Cruz (*C. porteri*) obtenidas de la vena braquial, para establecer los intervalos de referencia de hematología y bioquímica sanguínea. Para cada individuo, se determinaron el hematocrito (PCV) y los sólidos totales (TS), el recuento total y diferencial de leucocitos en frotis, se estudió la morfología celular y se realizó un perfil bioquímico. Se empleó la herramienta *Reference Value Advisor* para el cálculo de los intervalos de referencia (IR 95 %) y los intervalos de confianza (IC 90 %) de cada variable, siguiendo los estándares internacionales. Se evaluó la influencia del sexo, edad y estacionalidad para cada uno de los parámetros fisiológicos. Se recogieron hisopados orales, conjuntivales y cloacales de 454 individuos, que fueron empleados para la detección de herpesvirus, adenovirus, micoplasma y ranavirus mediante técnicas moleculares de PCR y rtPCR. Las muestras positivas fueron secuenciadas con el método Sanger y las secuencias resultantes sometidas a una búsqueda en BLAST. Los árboles filogenéticos de nucleótidos y aminoácidos fueron elaborados empleando el algoritmo de máxima verosimilitud (Mega 7.0). Se recogieron heces directamente de la cloaca de 270 tortugas de las especies *C. porteri* y *C. vandenburghi*, para determinar la presencia y prevalencia de ARGs. Tras un primer estudio exploratorio con 30 muestras, se procedió a analizar el total de muestras mediante rtPCR, para un total de 21 ARGs que codifican resistencia para ocho clases antimicrobianas (tetraciclinas, aminoglucósidos, polimixinas,  $\beta$ -lactámicos, fenicoles, macrólidos, quinolonas y sulfonamidas). Se estableció un gradiente antropogénico en función de la localización de las muestras analizadas, para realizar comparaciones entre los perfiles de resistencia, empleando métodos estadísticos no paramétricos, y un análisis espacial para establecer las zonas con mayor prevalencia de ARGs. Se establecieron los IR e IC en 164 tortugas adultas y 46 tortugas subadultas de Santa Cruz, encontrando diferencias significativas entre sexos (hembras con hematocrito más bajo y valores más elevados de calcio y potasio), edades (adultos con valores más elevados de hematocrito, sólidos totales y albúmina, y valores más bajos de leucocitos totales, aspartato aminotransferasa y creatina quinasa) y estaciones del año (linfocitos más elevados en la época seca y basófilos, eosinófilos, potasio, fósforo y sólidos totales aumentados en la época de lluvias). Se identificaron dos nuevas secuencias de adenovirus (CheAdV1 y CheAdV2) y dos de herpesvirus (CheHV1 y CheHV2). Las dos secuencias de

adenovirus se agrupan en un mismo clado, dentro del árbol filogenético, siendo el *Red footed adenovirus* el más cercano en la clasificación. En cuanto al herpesvirus, se identificaron cuatro secuencias nucleotídicas, tres de las cuáles tradujeron a la misma secuencia aminoacídica, siendo consideradas como una única variedad vírica (CheHV1), mientras que la cuarta secuencia tradujo en una diferente secuencia aminoacídica no emparentada con la anterior (CheHV2). Ambas secuencias aminoacídicas de herpesvirus no se agrupan en el mismo clado, estando CheHV1 próxima a *Terrapene herpesvirus 2* y CheHV2 a *Loggerhead oro-cutaneous herpesvirus*. La distribución de estos nuevos virus no es homogénea, siendo las tortugas del oeste de Santa Cruz (*C. porteri*) y Alcedo (*C. vandenburghi*) las únicas en las que están presentes ambos virus, mientras que en Wolf (*C. becki*) solo se detectó CheHV, en el este de Santa Cruz (*C. donfaustoi*) solo CheAdV y en la isla Española (*C. hoodensis*) no se detectó ninguno de los cuatro virus. Se identificaron resistencias antimicrobianas en todas las muestras analizadas, sin embargo, los resultados cualitativos y cuantitativos fueron más elevados en la especie más afectada por las actividades humanas (*C. porteri*), en comparación con las tortugas del remoto volcán Alcedo. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en la carga de ARGs que codifican resistencia para las tetraciclinas y los aminoglucósidos, además de una mayor proporción de microbiomas multirresistentes en las tortugas de Santa Cruz. Aquellas tortugas muestreadas en las zonas más antropizadas (fincas agroganaderas y zonas urbanas) presentaron un número significativamente mayor de ARGs y multirresistencia que aquellas pertenecientes a zonas menos antropizadas dentro de la misma isla. Esta tesis doctoral constituye el primer esfuerzo integrado enfocado en generar información sanitaria sobre las tortugas gigantes de Galápagos, contribuyendo así a desarrollar una línea base sobre el estado de salud de estas especies y sus ecosistemas, desde un enfoque holístico e integrador de la medicina veterinaria y la salud humana y ambiental. Este trabajo describe por primera vez, los intervalos de referencia de hematología y bioquímica en tortugas de Galápagos, la detección de cuatro nuevos agentes infecciosos y la presencia de bacterias resistentes y multirresistentes asociadas a las actividades humanas de las islas. Proponemos el uso de esta información como una herramienta diagnóstica en los proyectos de cría en cautividad y reintroducción de tortugas que se llevan a cabo en el archipiélago, así como para la implementación de programas de vigilancia epidemiológica de enfermedades emergentes y reemergentes en

las fauna silvestre de Galápagos, pudiendo emplear a las tortugas terrestres como especies centinelas de la salud de los ecosistemas que habitan, dada su amplia distribución en el archipiélago, sus características ecológicas y su estrecha convivencia con animales domésticos y seres humanos. Por último, ponemos de manifiesto potenciales nuevas amenazas, no solo para la salud de las tortugas terrestres sino para otras especies animales (silvestres y domésticas) y para los seres humanos que habitan el archipiélago, proponiendo a las autoridades ambientales que integren esta información en los planes de manejo y conservación, para contribuir a la protección de las tortugas gigantes de Galápagos y sus ecosistemas, mitigando el impacto de las actividades humanas sobre la salud de todo el conjunto.

The Galapagos giant tortoise (*Chelonoidis* spp.) is one of the most emblematic animals on Earth. The reptiles named for one of the best-preserved archipelagos on the planet are facing several challenges today. Anthropogenic activities are severely changing Galapagos ecosystems which have potential impacts to the ecology, physiology, and health status of these giants. Of the 14 tortoise species that once inhabited the islands, two are considered extinct due to human predation, and the remaining 12 are considered endangered according to the International Union for Conservation of Nature (IUCN). The increase of tourism, together with climate change and the presence of invasive species are some of the main factors affecting the health of Galapagos ecosystems and biodiversity. However, many other factors have not been studied in detail. The present work proposes to generate scientific knowledge about the health status of the Galapagos giant tortoise from a One Health approach, focusing on three specific objectives: 1) to establish hematology and biochemistry reference intervals (RI) for Western Santa Cruz tortoise species (*Chelonoidis porteri*); 2) to determine the presence and prevalence of infectious agents of importance for chelonian conservation (herpesvirus, adenovirus, mycoplasma, and ranavirus); and 3) to establish the presence and prevalence of antimicrobial resistance genes (ARGs) and their potential association with human activities in the archipelago. To conduct this research, we collected samples from a total of 454 giant tortoises from three islands and five species (*C. porteri*, *C. donfaustoi*, *C. vandenburghi*, *C. hoodensis*, and *C. becki*). For each research component, a different type and number of samples and species were used, based on the methodology and the

hypothesis to be tested. A total of 208 blood samples from the Santa Cruz tortoises (*C. porteri*) obtained from the brachial vein were used to establish RI. Hematocrit (PCV), total solids (TS), white blood cell counts (WBC), differentials, cellular morphology, and a biochemical profile was described and performed for each individual. We calculated 95 % RI with 90 % confidence intervals (CI) for each variable, following international standards and using Reference Value Advisor. The influence of sex, age, and seasonality was evaluated for each of the physiological parameters. Oral, conjunctival, and cloacal swabs were collected from 454 individuals for the detection of herpesviruses, adenoviruses, mycoplasma, and ranavirus using PCR and real time PCR (rtPCR). Positive samples were sequenced with the Sanger method and the resulting sequences were subjected to a BLAST search. Phylogenetic nucleotide and amino acid trees were performed using the maximum likelihood algorithm (Mega 7.0). Feces were collected directly from the cloaca of 270 tortoises from Santa Cruz (*C. porteri*) and Alcedo Volcano (*C. vandenburghi*), to determine the presence and prevalence of ARGs. After a pilot study using 30 samples, a broader exploratory study was conducted on all 270 samples using rtPCR to test 21 ARGs that codify resistance to eight different antimicrobial classes (tetracyclines, aminoglycosides, polymyxins,  $\beta$ -lactams, phenicols, macrolides, quinolones, and sulfonamides). An anthropogenic gradient was established based on the sample collection area and comparisons were performed using non-parametric statistical methods and spatial analysis. Hematology and plasma biochemistry RI and CI were established for 164 adult tortoises and 46 subadult tortoises from Santa Cruz. Significant differences were found between sexes (females with lower PCV value and higher calcium and potassium), ages (adults with higher PCV, TS, and albumin, and lower WBC, aspartate aminotransferase, and creatine kinase) and seasons (higher lymphocytes during the dry season and increased basophils, eosinophils, potassium, phosphorus, and TS during the rainy season). Two novel adenovirus sequences (CheAdV1 and CheAdV2) and two herpesviruses (CheHV1 and CheHV2) were identified. The two adenovirus sequences grouped in the same clade within the phylogenetic tree, with the *Red footed adenovirus* being the most closely related. Four nucleotide sequences of herpesvirus were identified. Three of these sequences translated into the same amino acid sequence, being considered as a single viral strain (CheHV1) whereas the fourth sequence translated into a different amino acid sequence not related to the previous one (CheHV2). Both

herpesvirus amino acid sequences did not group in the same clade, with CheHV1 being most related to *Terrapene herpesvirus 2* and CheHV2 to Loggerhead oro-cutaneous herpesvirus. The distribution of these new viruses varied between islands. Both adenovirus and herpesvirus were found in Western Santa Cruz and Alcedo Volcano, in Wolf Volcano only CheHV was detected, in eastern Santa Cruz only CheAdV, and no viruses were found on Española Island. Antimicrobial resistance was identified in all analyzed samples; however, qualitative and quantitative data were higher in the species most affected by human activities compared to tortoises from the remote and isolated Alcedo Volcano. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) were found in the load of ARGs encoding resistance to tetracyclines and aminoglycosides, in addition to a higher proportion of multi-resistant microbiomes in Santa Cruz tortoises. Tortoises sampled within the most anthropized areas (farmland and urban areas) presented a significantly higher number of ARGs and multi-resistant patterns than those from less anthropized areas (touristic and park areas) within the same island. This doctoral dissertation constitutes the first comprehensive effort to generate health information for Galapagos tortoise species, thus contributing to generate a baseline of the health status of these species and their ecosystems, using a One Health approach. This work describes for the first time, hematology and biochemistry RI in Galapagos tortoises, four novel viruses, and the presence of resistant and multi-resistant bacteria in tortoises, associated with human impacts. This information may be used as an important diagnostic tool for captive breeding and tortoise restoration projects carried out in the archipelago, as well as for the implementation of epidemiological surveillance programs for emerging and re-emerging diseases in Galapagos wildlife. Galapagos tortoises are key species that may act as sentinels of ecosystem health given their wide distribution in the archipelago, their ecological characteristics, and their interactions with domestic animals and humans. Lastly, we highlight potential new threats in Galapagos, not only for the health of tortoises but for the health of wildlife, domestic species, and humans inhabiting the archipelago. This information should be considered for current and future management and conservation action to ensure the protection of the Galapagos tortoise health as well as the health of the entire archipelago.



# INTRODUCCIÓN

*Las tortugas de Galápagos: de la explotación a la conservación*



## 1.1 LAS ISLAS GALÁPAGOS: UN LABORATORIO VIVIENTE

### 1.1.1 BREVE HISTORIA DEL ARCHIPIÉLAGO DE COLÓN

El archipiélago de las Galápagos, conformado por 123 islas e islotes de origen volcánico, se encuentra ubicado en el Pacífico Este Tropical, a casi 1.000 km del continente sudamericano. Con una superficie terrestre de 8.010 km<sup>2</sup> y una reserva marina de 138.000 km<sup>2</sup>, Galápagos constituye uno de los archipiélagos oceánicos mejor preservados del mundo (Snell et al., 1996). El primer occidental que dejó testimonio de haber visitado el archipiélago fue Fray Tomás de Berlanga, Obispo de Panamá, en marzo de 1535. Desde entonces, las islas fueron visitadas de manera esporádica y accidental por aventureros y colonizadores, hasta la llegada de corsarios y piratas ingleses en el siglo XVII, que encontraron en el archipiélago un lugar estratégico donde reparar los buques y aprovisionarse de agua y comida (Latorre, 1999). Si el siglo XVII estuvo marcado por la presencia de piratas a lo largo del océano Pacífico, el siglo XVIII se convirtió en la era de los balleneros, con el primer registro oficial de la presencia de cazadores de ballenas en las Galápagos en 1788. Comenzó entonces una época de exterminio, no solo de los mamíferos marinos de toda la región, sino de las tortugas gigantes que poblaban las islas, que fueron cazadas y sacrificadas para usar su aceite y consumir su carne (Figura 1). Octavio Latorre menciona en su libro: “si los piratas terminaron con cientos [de tortugas], los balleneros lo hicieron con miles” (Latorre, 1999).



*Figura 1. Balleneros y filibusteros extrayendo tortugas gigantes de las Galápagos. Imágenes cedidas por la Academia de Ciencias de California, Archivo de la FCD.*

Al comenzar el siglo XIX las Islas Galápagos continuaban sin estar habitadas, solamente sometidas a la administración colonial de España, a través de la Real Audiencia de Quito (Latorre, 1999). El 12 de febrero de 1832 el archipiélago fue anexado al Gobierno del Ecuador, constituyendo desde 1973 una de las 24 provincias del país. Aunque el nombre oficial es Archipiélago de Colón, las islas son administrativamente conocidas como Provincia de Galápagos (Latorre, 2001).

La primera misión científica que visitó las Islas Galápagos fue la expedición Malaspina, una expedición española dirigida por Alejandro Malaspina que llegó en 1790 y cuyos registros nunca fueron publicados. La expedición más célebre y que puso a las Islas Galápagos en el mapa mundial fue la expedición británica capitaneada por Robert Fitzroy y en la cual viajaba el joven naturalista Charles Darwin, en 1835. Los estudios y muestras resultantes de este viaje fueron decisivos para la publicación del libro *El Origen de las Especies* (1859), que cambiaría para siempre el rumbo de la ciencia e inspiraría desde entonces a científicos de todo el mundo a visitar el archipiélago. A finales del siglo XIX y principios del XX, numerosos investigadores, seguidores y detractores de Darwin, encontraron en el archipiélago un lugar privilegiado donde realizar estudios de biología y evolución que probaran las teorías evolucionistas, a la vez que creacionistas y catastrofistas visitaban las islas para refutar esos mismos argumentos. En estos años, numerosas expediciones científicas recolectaron cientos de especímenes que serían estudiados y exhibidos en zoológicos y museos de todo el mundo (Quiroga, 2009a). Según crecía la reputación de Galápagos como “laboratorio viviente”, crecía también la

preocupación de un buen número de científicos por proteger sus especies y su biodiversidad, que había sido diezmada por el extractivismo de piratas y balleneros en siglos pasados, y por las recientes expediciones científicas. En 1959, cien años después de la publicación del Origen de las Especies, se creó la Estación Científica Charles Darwin (ECCD), en un esfuerzo conjunto entre investigadores, universidades internacionales y la Organización de la Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) (Quiroga, 2009b). Ese mismo año, el gobierno de Ecuador estableció el Parque Nacional Galápagos, que da protección al 97 % de la superficie terrestre del archipiélago (7.700 km<sup>2</sup>). Tan solo un 3 % de la superficie corresponde a las zonas urbanas y rurales de las cinco islas habitadas: Santa Cruz, San Cristóbal, Isabela, Floreana y Baltra (Figura 2). La UNESCO declaró al archipiélago como Patrimonio Natural de la Humanidad en 1979, en 1985 como Reserva de la Biosfera y en 2001 como Humedal de Importancia Internacional de acuerdo con el Convenio Ramsar. Sin embargo, en 2007 la misma organización declaró a las Islas Galápagos como Patrimonio de la Humanidad en riesgo medioambiental, y estuvo incluida en la Lista del Patrimonio de la Humanidad en peligro hasta 2010, debido al significativo incremento del turismo y las especies invasoras.

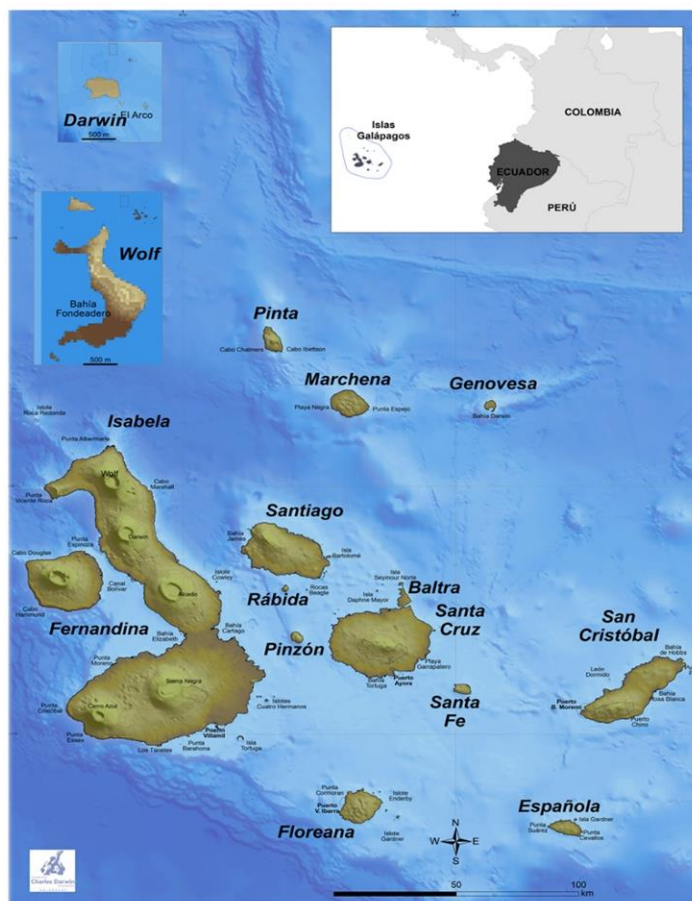
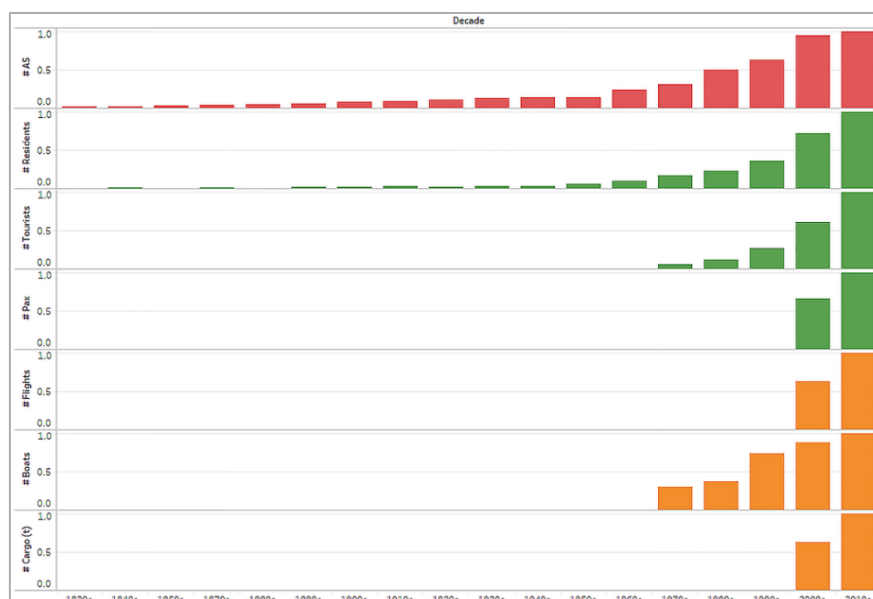


Figura 2. Mapa de las Islas Galápagos y su ubicación geográfica en relación con el continente americano. Mapa cedido por Byron Delgado, FCD.

Los ecosistemas insulares se caracterizan por poseer un elevado nivel de endemismo, si bien la diversidad biológica suele ser reducida (Fordham & Brook, 2010; Veron et al., 2019). Estas islas oceánicas son muy susceptibles a la degradación ocasionada por las actividades antropogénicas, que conllevan, entre otras cosas, la presencia de especies introducidas que alteran seriamente los ecosistemas nativos y provocan en numerosas ocasiones la extinción de las especies nativas y endémicas (Sadler, 1999; Tye, 2018). El estudio más completo publicado hasta la fecha acerca de la abundancia de especies introducidas e invasoras en el archipiélago contabiliza un total de 1.579 especies que llegaron de manera accidental o intencional hasta el año 2017, de las cuales un 93 % se habrían establecido en las islas y al menos 52 de ellas serían consideradas invasoras (p. ej. mora, guayaba, cedrela, cerdos, cabras, ratas, gatos) (Toral-Granda et al., 2017). Estudios más recientes indican que al menos existen 53 especies marinas introducidas en el archipiélago (Carlton et al., 2019) y nuevas muestras están siendo actualmente procesadas para su identificación (I. Keith, comunicación personal). El incremento del turismo y la conectividad en el archipiélago a partir de los años 70 favoreció la entrada de especies introducidas (Figura 3), lo que resultó en la creación de una institución gubernamental encaminada a controlar la entrada de bienes y productos: la actualmente conocida como ABG (Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos) que ha impuesto numerosas medidas restrictivas e incluso la prohibición de ingreso de productos, alimentos y materiales al archipiélago (ABG, 2019).

Figura 3. Suma normalizada en una escala de 0-1 de las especies introducidas en Galápagos (AS), residentes (Residents), turistas (Tourist), pasajeros de aerolíneas comerciales (PAX), vuelos comerciales (Flights), embarcaciones de carga y turismo (Boat) y mercancías (Cargo) por década, desde 1830s hasta 2010s. Adaptado de Toral et al. (2017).



La población de la provincia evolucionó desde los primeros colonos, que apenas contabilizaban 1.300 personas en la década de 1950, hasta una población estimada en más de 30.000 personas, de acuerdo con las proyecciones realizadas en el último censo (INEC, 2015). Este incremento poblacional corresponde también con un aumento de la demanda de bienes y servicios por parte de la industria turística, que ha crecido exponencialmente desde el año 2000, llegando a un récord histórico en el año 2018 con la llegada de 276.000 turistas al archipiélago (Observatorio de Turismo, 2018). A partir del año 2009 sucede además un cambio en el modelo turístico predominante en el archipiélago, que deja de estar dominado por el turismo *de a bordo* para enfocarse en un modelo donde los turistas pernoctan en los núcleos poblados (Figura 4). Esto conlleva un notable incremento en la demanda de infraestructura y servicios, especialmente en cuanto al consumo de agua potable, de electricidad y de combustible, y un aumento significativo en el volumen de desechos producidos en los núcleos poblados (Naula et al., 2018; Cajiao et al., 2020). En los últimos años, el incremento de estas actividades de origen antropogénico (p. ej. urbanismo, agricultura, ganadería, turismo) constituye la principal causa de degradación de los ecosistemas terrestres de Galápagos y la mayor amenaza para la conservación de su biodiversidad (Toral-Granda et al., 2017; García-Carrasco et al., 2020; Watson et al., 2010).

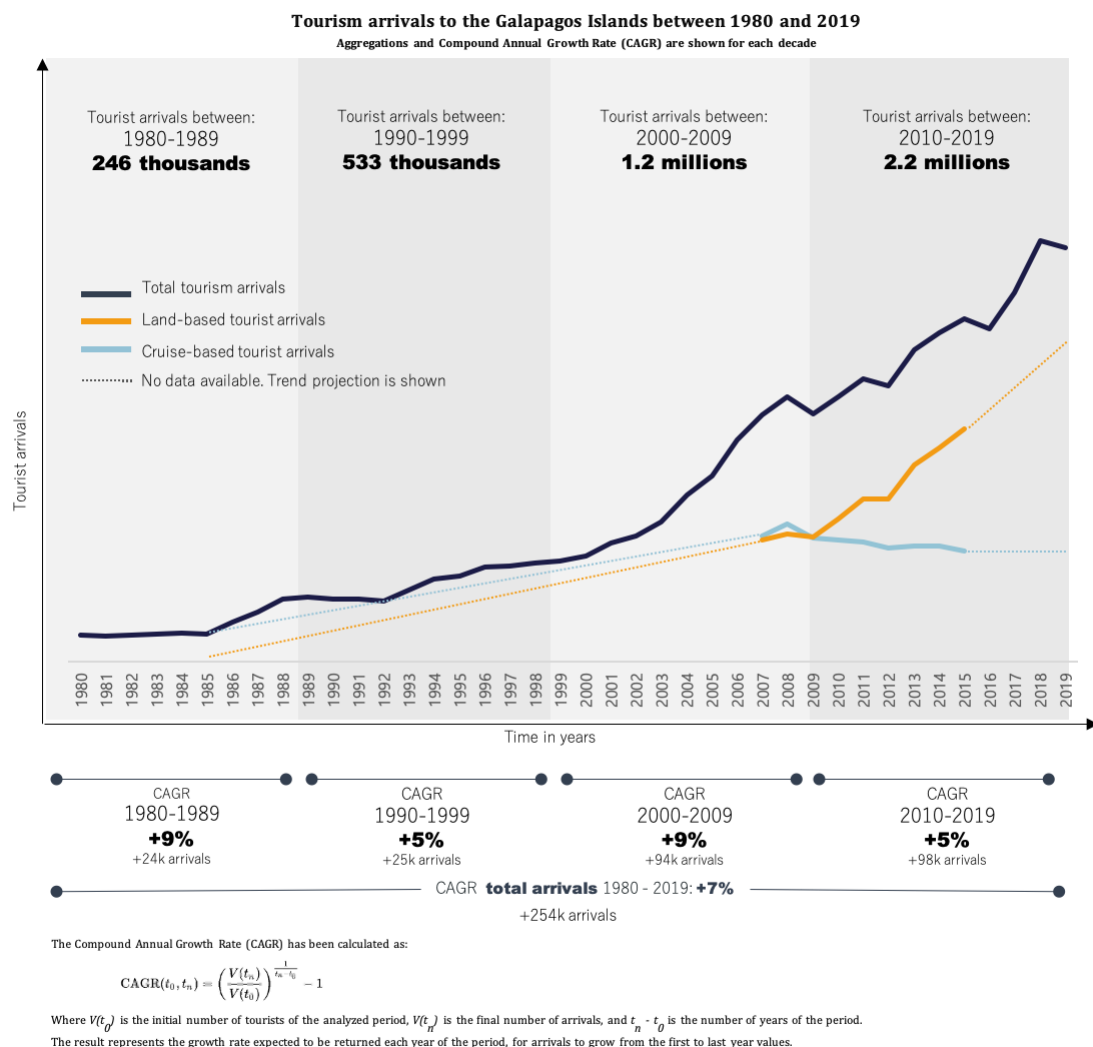


Figura 4. Turismo en las Islas Galápagos desde 1980 hasta 2019 y Tasa Anual de Crecimiento Compuesto (CAGR) por décadas. Se incluye el turismo total y el turismo categorizado por tipo (turismo de tierra y turismo de a bordo). Adaptado de Cajiao et al. (2020).

### 1.1.2 LAS TORTUGAS DE LAS ISLAS GALÁPAGOS: DE LA EXPLOTACIÓN A LA CONSERVACIÓN

La definición de lo que es considerado una “tortuga gigante” ha generado un gran debate en la comunidad científica. Aunque no existe un consenso, numerosos autores se refieren a las tortugas gigantes como aquellas especies cuyas dimensiones alcanzan los 100 cm de largo recto del caparazón, donde definitivamente se encuentran las tortugas terrestres de Galápagos (Frazier, 2021a). Como tal, estas especies están consideradas *megavertebrados* debido a su gran tamaño y peso (superior a 100 cm de largo y 100 kg de peso) y por tanto se encuentran incluidas dentro del grupo de *megafauna* (Vlachos & Rabi,

2018). Al igual que otras muchas especies de este grupo de grandes animales (aves, reptiles, mamíferos y anfibios), las tortugas gigantes que una vez habitaron en todos los continentes, a excepción de Australia y Antártica, sufrieron extinciones masivas durante el Pleistoceno, cuando comenzó la expansión poblacional de los humanos prehistóricos (Gill, 2014). En la actualidad, no existen tortugas gigantes en ninguna masa continental, siendo las únicas especies supervivientes de tortuga gigante las que se encuentran en el Archipiélago de Aldabra, en el océano Índico, y en el Archipiélago de Colón, en el océano Pacífico (Frazier, 2021a). No existen registros de extinciones prehistóricas de tortugas gigantes en Galápagos, hasta la llegada de los colonizadores humanos, momento en que comenzó la explotación de estas especies y la introducción de plantas y animales invasores (Frazier, 2021ab).

Desde el “descubrimiento” del archipiélago en 1535, la explotación de las tortugas gigantes de Galápagos tuvo lugar en dos grandes fases: la explotación llevada a cabo por marineros (mayoritariamente cazadores de ballenas) que emplearon a las tortugas como fuente de comida y aceite; y la llevada a cabo por los primeros colonos, así como por zoológicos, museos y coleccionistas privados, que estaban no solo motivados por sus cualidades culinarias sino por un interés pseudocientífico (Slevin, 1959).

La época más trágica comenzó en el siglo XVIII, donde se calcula que, en apenas dos siglos de explotación humana, hasta un 90 % de la población originaria de tortugas terrestres fue sacrificada a manos de balleneros y cazadores de focas y leones marinos, que encontraron en estos reptiles un excelente recurso alimenticio para nutrir sus largas expediciones oceánicas. La eco-fisiología de estas especies las hizo especialmente vulnerables a la depredación humana, al ser animales inofensivos, fáciles de capturar, transportar y almacenar y provistos de gran cantidad de carne y grasa. Las especies de tortuga más vulnerables fueron aquellas de menor tamaño (morfotipo *silla de montar*) y las hembras (que son por lo general más pequeñas), escogiendo aquellos animales que se encontraban en lugares e islas más accesibles al ser humano (p. ej. Floreana, Pinta, Española y San Cristóbal) (Conrad & Gibbs, 2021). Las expediciones balleneras documentaban de manera exhaustiva sus viajes, lo que ha permitido recopilar en ciertos periodos el número de tortugas que fueron extraídas. A modo de ejemplo, Charles Townsend sintetizó el número de tortugas extraídas por 79 balleneros de la flota de

Estados Unidos, que entre 1831 y 1868 realizaron 189 visitas al archipiélago de Galápagos, cazando 13.013 tortugas en menos de cuatro décadas (Townsend, 1925). La extrapolación de estos datos al número de barcos y flotas balleneras que visitaron las Galápagos en el siglo XIX arroja el escalofriante dato de más de 100.000 tortugas cazadas para aprovisionar las expediciones balleneras de la época (Conrad & Gibbs, 2021) (Figura 5).



Figura 5. Exterminio de tortugas gigantes de Galápagos a manos de piratas y balleneros. Imágenes cedidas por la Academia de Ciencias de California, Archivo de la FCD.

Debido a esta depredación sin precedentes, la especie *Chelonoidis niger*, que habitaba en la isla Floreana y cuya población preexplotación está estimada en 12.500 individuos, desapareció entre 1846 y 1850, apenas dos décadas después de la llegada de los primeros colonos a la isla (Stahl, 2020; Cayot & Hunter, 2021). En la isla Pinta, de las 9.800 tortugas que se estima poblaron la isla, sobrevivió un único individuo de la especie *Chelonoidis abingdonii*, el “Solitario Jorge”, que murió en junio del 2012 en cautividad, sin haber dejado descendencia (Cayot & Hunter, 2021). En 1959, año de la creación del Parque Nacional Galápagos, solo 14 individuos de la especie *Chelonoidis hoodensis* sobrevivían en Española, mientras que en Pinzón quedaban menos de 200 individuos

adultos (*Chelonoidis duncanensis*) y no existía reclutamiento debido a la depredación de huevos y neonatos por parte de las ratas introducidas, probablemente de manera accidental (MacFarland et al., 1974a; Cayot, 2021ab).

Tras la creación del Parque Nacional Galápagos y la Fundación Charles Darwin (FCD) en 1959, comenzaron los esfuerzos de conservación para preservar y/o restaurar los ecosistemas de Galápagos y su biodiversidad. En un esfuerzo conjunto entre ambas instituciones, comenzó en la década de los 60 la búsqueda de información y los monitoreos para establecer el estado poblacional de las diferentes especies y las prioridades de manejo y conservación de estas, resultando evidente que las tortugas gigantes habían sido las especies más afectadas por la explotación humana y la presencia de especies invasoras (MacFarland & Reeder, 1975; Vries, 1984). Mientras se desarrollaban las herramientas para establecer los límites del Parque Nacional Galápagos y los mecanismos de control y monitoreo, en la isla Santa Cruz se estableció en 1964 La Reserva, un área de 166 km<sup>2</sup> ubicada en el suroeste de la isla, lugar de distribución del grueso de la población de tortugas de la especie *Chelonoidis porteri*. A pesar de ser un área de grandes dimensiones y no estar cercada, se prohibieron todo tipo de actividades humanas y se restringió el acceso, lo que resultó en la protección de las principales zonas de anidación de tortugas y se evitó en cierta medida la caza furtiva de tortugas y la extracción de juveniles para su comercialización en las redes de tráfico ilegal (Snow, 1964). En 1969 se establecieron los límites del Parque Nacional Galápagos y comenzó a funcionar el sistema de guardaparques que opera hasta el día de hoy, realizando las labores de control, manejo y conservación (Corley-Smith, 1990).

A mediados de los años 60 y como resultado de los crecientes esfuerzos de conservación, comenzó el programa de reintroducción de tortugas gigantes, con la cría en cautividad de las tortugas de la isla Pinzón. Empleando incubadoras rudimentarias se logró la primera eclosión de huevos de tortuga en cautividad, proceso que se iría tecnificando a lo largo de los años (Cayot, 2021b). En años posteriores, comenzó el programa de cría en cautividad de las tortugas de la isla Española, cuya población contaba con tan solo 14 individuos silvestres (12 hembras y 2 machos), a los que se uniría un macho mantenido en cautividad en el Zoológico de San Diego (el famoso Diego) al que se le atribuye ser el padre biológico de una gran proporción de las 2.000 tortugas que a lo largo de las últimas cinco

décadas han sido repatriadas en la isla. El proyecto de reintroducción de tortugas de Española se dio por finalizado en junio de 2020, con la repatriación de los últimos 16 adultos reproductores (incluido Diego) (Cayot, 2021ac; Tapia, 2021a). Entre 1970 y 2019, un total de 8.261 tortugas juveniles de ocho especies diferentes fueron criadas en cautividad y repatriadas con éxito (Cayot, 2021c) (Figura 6).



*Figura 6. Proyecto de cría en cautividad de tortugas terrestres en Santa Cruz. A la izquierda, recolección e identificación de huevos de tortuga a manos del guardaparque D. Fausto Llerena. A la derecha, tortugas neonatas en el Centro de Crianza Fausto Llerena.*

Los esfuerzos de conservación de las tortugas gigantes no se centraron únicamente en los proyectos de cría en cautividad, sino en el control y erradicación de las especies invasoras (p. ej. cerdos, cabras, ratas, burros) y en la protección de las zonas de anidación (protegiendo los nidos de la depredación de cerdos, hormigas o ratas) (MacFarland et al., 1974b). El proyecto de erradicación de especies invasoras de mayor envergadura del archipiélago, y que duraría casi una década, fue el denominado Proyecto Isabela, que concluyó en 2006 con la erradicación de más de 200.000 cabras introducidas en Santiago, Pinta e Isabela, además de la erradicación de cerdos en Santiago y la erradicación de burros en Isabela y Santiago (Lavoie et al., 2007ab; Carrion et al., 2011) (Figura 7). Al igual que ha sucedido en Pinzón con la erradicación de las ratas introducidas (Cayot, 2021b), la erradicación de mamíferos invasores en islas como Isabela, Pinzón y Santiago ha permitido la recuperación de muchas especies, incluyendo las tortugas

terrestres, cuyas poblaciones han crecido significativamente en los últimos años como resultado del esfuerzo combinado de todas estas iniciativas (Cayot, 2021cd; Tapia, 2021b).



Figura 7. Tortuga juvenil entre las patas de un chivo o cabra introducida (izquierda) y manada de chivos introducidos junto a una tortuga (derecha). Imágenes cedidas por el Archivo de la FCD.

Debido al éxito obtenido en estos programas de conservación y reintroducción de especies, a partir del 2005 la Dirección del Parque Nacional Galápagos (DPNG) estableció una nueva estrategia de conservación, centrada en proteger y restaurar la integridad ecológica de los ecosistemas, en vez de estar basada fundamentalmente en la recuperación de especies clave. El éxito de los programas de cría en cautividad y reintroducción de tortugas se ha visto sin embargo empañado en las últimas décadas por el incremento en el tráfico ilegal de tortugas (mayoritariamente neonatos o juveniles) y la caza furtiva para consumo, que si bien puede resultar relativamente anecdótica a día de hoy, sigue sucediendo con mayor o menor frecuencia en todas las islas pobladas del archipiélago donde coexisten las tortugas terrestres y los seres humanos (Santa Cruz, Isabela y San Cristóbal) (Cayot & Louis, 1994; Márquez et al., 2007; Cayot, 2021c).

En la isla Fernandina, la más joven y occidental del archipiélago, las tortugas gigantes de la especie *Chelonoidis phantasticus* se consideraban extintas debido al vulcanismo, hasta el descubrimiento en 2019, de una hembra adulta de dicha especie en un pequeño parche de vegetación de la isla (Figura 8). En el volcán Wolf, ubicado el norte de la isla Isabela, se han hallado recientemente tortugas híbridas que portan genes de las especies extintas de Floreana y Pinta. Estos animales están siendo actualmente

estudiados y se contempla la realización de programas de cría en cautividad y selección genética (Tapia, 2019; Cayot, 2021d).



*Figura 8. Tortuga encontrada en la isla de Fernandina en 2019, mantenida en cautividad en el Centro de Crianza Fausto Llerena, Santa Cruz. Imagen de archivo personal.*

A pesar de los impactos ocasionados por los seres humanos en los últimos 400 años, las Islas Galápagos han conservado la mayor parte de sus especies endémicas, con un total de 58 especies de reptiles descritas en el archipiélago (Arteaga et al., 2019), siendo sin duda alguna la tortuga gigante el reptil más icónico y emblemático de las islas que llevan su nombre. En décadas recientes, la taxonomía de las tortugas terrestres de Galápagos ha sufrido sucesivas revisiones, estando actualmente aceptado por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) la presencia de 14 especies de tortuga gigante en el archipiélago (2 extintas, 6 críticamente amenazadas, 3 en peligro y 3 vulnerables) (IUCN, 2022).

Las tortugas gigantes de Galápagos constituyen el único megavertebrado terrestre del archipiélago, ampliamente distribuido por casi todas las islas, ocupando tanto aquellos ecosistemas naturales como aquellos modificados por las actividades humanas (zonas agropecuarias y urbanas). A pesar de los numerosos esfuerzos que realizan las entidades públicas y privadas, las y los investigadores y guardaparques, estos gigantes siguen enfrentando amenazas para su conservación, todas ellas ligadas a actividades antropogénicas: pérdida y fragmentación de hábitat, tráfico ilegal, pérdida de diversidad genética, especies introducidas e invasoras, cambio climático, enfermedades, caza furtiva y colisión con vehículos (Figura 9) (Blake et al., 2012a; Ellis-Soto et al., 2017; Bastille-

Rousseau et al., 2019; Frazier, 2021b). Conocer el estado de salud de estos reptiles, y las potenciales consecuencias que las crecientes actividades antropogénicas pueden ocasionar en su bienestar, constituye hoy en día una prioridad para el manejo y conservación de estas especies y su hábitat natural.



Figura 9. Tortuga gigante cruzando la carretera principal en Santa Cruz (izquierda) y atravesando el cercado de una finca ganadera en Santa Cruz (derecha). Imágenes cedidas por Stephen Blake, GTMEP.

## 1.2 EVALUACIÓN SANITARIA DE LAS TORTUGAS GIGANTES DE GALÁPAGOS

### 1.2.1 EL PARADIGMA DE ONE HEALTH

A pesar de lo novedoso del término *One Health* (“Una Salud” en castellano), sus raíces se remontan atrás en el tiempo a lo largo de toda la historia antigua del ser humano. Este concepto, entendido como la interrelación entre la salud humana, animal y ambiental, ha sido descrito tanto por la medicina oriental como por la occidental, y ha formado parte de los saberes ancestrales de numerosas culturas desde la historia antigua. El concepto de la medicina tradicional China de las Cinco Fases y de la importancia del ambiente es similar a las ideas científicas griegas de los Cuatro Elementos (tierra, agua, aire y fuego) postulados por Empédocles (495-444 a. de C.) y a las antiguas ideas indias de los Cinco Elementos (tierra, agua, fuego, aire y éter) (Tseui, 1978; Brun, 2003; Lu et al., 2004). Han tenido que pasar más de 2.000 años para que un enfoque integrador de la

medicina sea reconocido y asumido en occidente por (al menos) una parte de la comunidad científica moderna y por una pequeña parte de la comunidad gobernante. Dentro de la historia de la medicina occidental, Hipócrates (460-370 a. de C.) ya mencionó la importancia de contar con un ambiente limpio y saludable para asegurar la salud humana. Años después, Aristóteles (384-322 a. de C.) escribió acerca de la interconexión entre la salud animal y la salud humana, así como hizo Galeno (129-216 d. de C.). Tuvieron que pasar sin embargo varios siglos de oscurantismo y olvido, hasta que estos conceptos fueran retomados después del Renacimiento (Kahn, 2016). La primera vacuna no se desarrolló en occidente hasta el siglo XVIII, a manos del investigador inglés Edward Jenner (1749-1823) y el término *zoonosis* fue acuñado años después por Rudolf Virchow (1821-1902), un patólogo prusiano que es considerado por muchos autores como “el padre moderno” del concepto de One Health, al reiterar la importancia e interrelación entre la salud humana y animal con el medio ambiente. Virchow fue un paso más allá, introduciendo las dimensiones sociales, económicas y políticas en la toma de decisiones relativas a la Salud Pública (Kahn, 2016; Zunino, 2018; Deem et al., 2019). La mayoría de estos descubrimientos a manos de médicos tuvieron lugar estudiando las enfermedades animales, o en el interfaz animal-ser humano, lo que contribuyó a que existiera una estrecha colaboración y sinergia entre los campos de la medicina veterinaria y la humana. Lamentablemente, con el paso de los años la medicina humana se fue especializando cada vez más, adquiriendo un enfoque mucho más individualista sobre el concepto de enfermedad, dejando de lado en gran medida el enfoque holístico e integrador de la salud (Kahn, 2016).

Hace ahora 100 años, la Asociación Nacional de Veterinaria Española (antecesora del actual Consejo General de Colegios Veterinarios de España) adoptó el lema *Higia pecoris, salus populi* (la higiene del ganado, la salud del pueblo) que sigue vigente hoy en día y es parte del escudo de la profesión veterinaria en España. Si bien este concepto no incluye la salud del medio ambiente, sí incorpora la interrelación entre la salud animal y humana, a la vez que emplea la palabra *higiene*, que hace una clara referencia a la importancia de la prevención de las enfermedades (Durán, 2008).

En la década de los 60 del siglo XX, el veterinario y epidemiólogo Calvin Schwabe acuñó el término *Una Medicina (One Medicine)* (Schwabe, 1984) que en los años 90

evolucionaría hacia el concepto de *Medicina de la Conservación*. Ambos conceptos, a pesar de englobar la interrelación entre la salud animal y el medio ambiente, en cierta manera omitían, de forma no intencionada, la salud humana y su importancia dentro de este concepto global de salud (Deem et al., 2019). En 2007, en una iniciativa liderada por la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA), aparece finalmente el concepto de One Health con la intención de incluir todos los conceptos pasados y llevar la salud planetaria un paso más allá, estableciendo una innegable conexión entre la salud humana, animal y medioambiental, que viene a llamarse *La Triada de Una Salud (the One Health Triad)*. En 2008, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) asumen formalmente el concepto de One Health y se comprometen a desarrollar estrategias y acciones conjuntas para afrontar los desafíos de salud a escala global (WHO, 2008; Lee & Brumme, 2013).

En diciembre de 2021, FAO, OIE y OMS publican una definición actualizada sobre el concepto de One Health (Figura 10), descrita por el Panel de Expertos en One Health (OHHLEP). La definición dice así:

*“One Health es un enfoque integrador y unificador que tiene como objetivo equilibrar y optimizar la salud de las personas, los animales y los ecosistemas. Este enfoque reconoce que la salud de los seres humanos, los animales domésticos y salvajes, las plantas y el medio ambiente (incluidos los ecosistemas), están estrechamente vinculados y son interdependientes. El enfoque moviliza múltiples sectores, disciplinas y comunidades en diferentes niveles de la sociedad para trabajar juntos, fomentando el bienestar y haciendo frente a las amenazas para la salud y los ecosistemas, al tiempo que aborda la necesidad colectiva de agua, energía y aire limpios y alimentos nutritivos, tomando medidas sobre el cambio climático y contribuyendo al desarrollo sostenible.”*

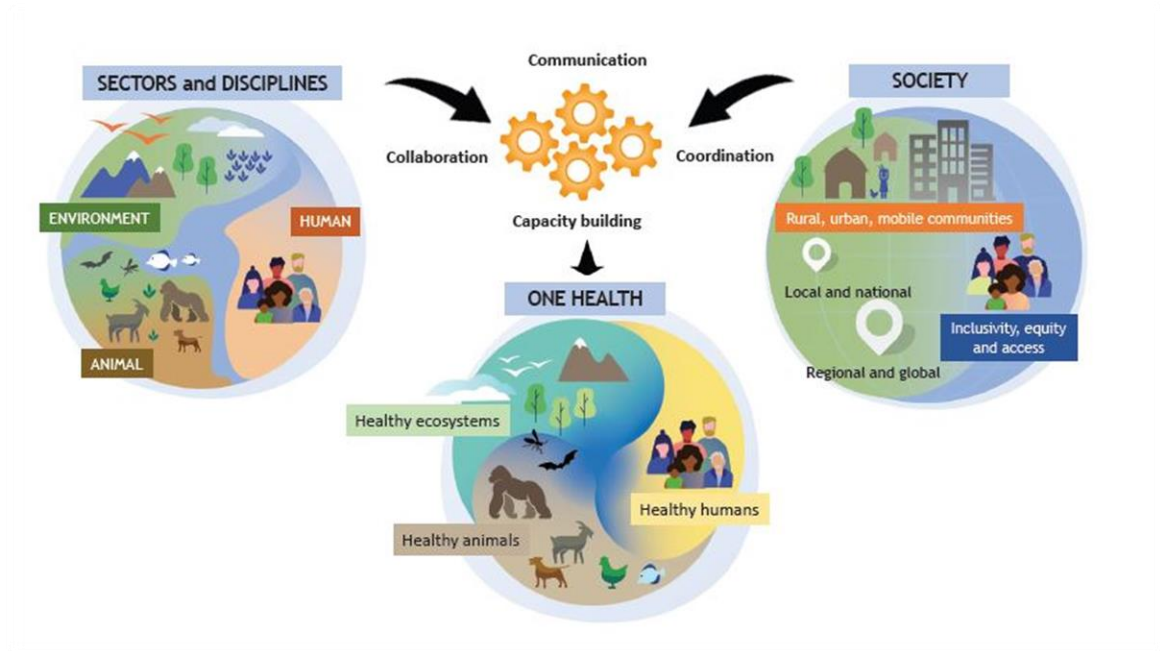


Figura 10. Nueva definición de *One Health*, incorporando lo diversos sectores y disciplinas, así como el conjunto de la sociedad civil, haciendo hincapié en la comunicación, coordinación, colaboración y capacitación para impulsar la salud desde un enfoque integrador. Adaptado del Panel de Expertos en *One Health* (OHHLEP) publicado en diciembre de 2021 (<https://www.who.int/news/item/01-12-2021-tripartite-and-unep-support-ohhlep-s-definition-of-one-health>).

Bajo este enorme paraguas, como así definen algunos autores el marco conceptual de *One Health*, se engloban numerosas disciplinas entre las que destacan tres grandes áreas de especial interés y relevancia: 1) seguridad alimentaria, 2) zoonosis y enfermedades emergentes y reemergentes, y 3) resistencias a los antimicrobianos (OMS, 2021).

Dentro de las estrategias que se han establecido para abordar la prevención, detección y control de enfermedades emergentes y reemergentes, así como la dispersión de la resistencias antimicrobianas desde una perspectiva de *One Health* destacan: los planes de vigilancia activos y pasivos (que engloban a la fauna silvestre, los animales domésticos y los seres humanos); la investigación basada en especies centinela (especies clave de los ecosistemas que pueden proporcionar abundante información acerca del estado de salud de todo el medio en que se distribuyen); la investigación de brotes de enfermedad producidos en animales o humanos y su posible transmisión entre especies; y la investigación en la búsqueda de nuevas vacunas, nuevos antibióticos y nuevas herramientas para reducir el uso y la dependencia de los antibióticos (Wielinga &

Schlundt, 2013; Riegelman & Kirkwood, 2018). Como tal, el paradigma de One Health aborda los impactos negativos de las resistencias antimicrobianas en el bienestar de los animales y los seres humanos y la salud del medio ambiente, junto con la necesidad de planes de investigación y prevención transdisciplinarios para minimizar esta amenaza compartida (Fisman & Laupland, 2010; Kahn 2016; Amuasi et al., 2020).

### 1.2.2 PATÓGENOS DE IMPORTANCIA PARA LA CONSERVACIÓN DE QUELONIOS SILVESTRES

Las enfermedades infecciosas emergentes son consideradas como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en muchas especies silvestres, incluyendo las tortugas; si bien es cierto que los patógenos no son usualmente incluidos entre las principales amenazas para la conservación de estas especies, debido en gran medida al gran desconocimiento que existe aún hoy en día acerca de estos agentes en muchas especies de reptiles (Daszak et al., 2000; Gibbons & Steffes, 2013). Estudios recientes señalan la importancia de expandir el conocimiento existente acerca de las enfermedades emergentes en tortugas terrestres y marinas para prevenir eventos de mortalidad en poblaciones ya de por sí muy comprometidas o cuyas poblaciones están sufriendo un rápido declive debido a otros impactos de origen antropogénico como el cambio climático o la degradación, contaminación y destrucción del hábitat (Dospoly et al., 2013; Kane et al., 2017; Kolesnik et al., 2017).

En las últimas décadas se han incrementado las investigaciones enfocadas en describir agentes víricos y bacterianos en los reptiles. El interés por describir estos patógenos específicos ha estado motivado tanto por su importancia en la terapéutica y conservación de estas especies, como por su aplicación para incrementar el conocimiento acerca de la sistemática y evolución de los microorganismos (Agius et al., 2019). Numerosas enfermedades infecciosas continúan siendo prevalentes en las especies de quelonios, tanto en libertad como en cautividad, incluyendo las enfermedades producidas por herpesvirus y *Mycoplasma* spp., mientras que otros patógenos son considerados

actualmente como emergentes en las tortugas (p. ej. adenovirus, ranavirus) (Gibbons & Steffes, 2013; Marschang, 2011). Es frecuente observar la coinfección entre dos o más de estos agentes patógenos, lo que puede aumentar significativamente la severidad y mortalidad en esos individuos, a la vez que dificulta su diagnóstico (Kolesnik et al., 2017; Sim et al., 2016). En los reptiles, numerosos factores pueden afectar al hecho de que un cierto microorganismo resulte o no patogénico, incluyendo el estado nutricional del hospedador, la temperatura (determinante en especies poiquilotermas), la presencia de coinfecciones con otros agentes patógenos y el estado inmunitario del hospedador, que a su vez puede verse afectado por numerosos factores (p. ej. estrés, cautividad, manipulación, hacinamiento) (Wellehan & Divers, 2019). A la hora de realizar la identificación y diagnóstico de estos agentes infecciosos es importante diferenciar entre la presencia o colonización del agente o microorganismo y la infección causada por el o los agentes infecciosos (Marschang, 2019). En muchos casos, los postulados de Koch no se cumplen en las enfermedades observadas en los reptiles, lo que obliga a establecer la conexión entre la presencia del agente infeccioso y los signos clínicos e histopatológicos observados (Marschang, 2011; Wellehan & Divers, 2019).

La micoplasmosis es una de las enfermedades infecciosas mejor caracterizadas en los quelonios y se ha asociado con declives poblacionales en algunas especies silvestres (Jacobson et al., 2014). Se trata de bacterias gramnegativas del filo Tenericutes que han perdido la pared celular y muchos de los mecanismos bioquímicos, lo que las convierte en microorganismos intracelulares obligados, altamente dependientes de las células del hospedador. El género *Mycoplasma* ha sido descrito en todos los vertebrados y la infección asintomática ocasionada por estas bacterias es mucho más frecuente que la enfermedad activa en la mayoría de las especies (Wellehan & Divers, 2019). *Mycoplasma agassizii* se encuentra descrita como el microorganismo causante de la enfermedad del tracto respiratorio superior (URTD) en ciertas especies de tortuga terrestre (*Gopherus agassizii* y *Gopherus polyphemus*) mientras que *Mycoplasma testudineum* ha sido aislada también en tortugas con URTD sin que se haya podido esclarecer si este agente puede ser también causante del síndrome respiratorio (Brown et al., 1994; 1999). Una nueva especie del género *Mycoplasma* fue descrita en tortugas terrestres de Estados Unidos, también asociada con URTD, pudiendo causar reacción serológica cruzada con *M. agassizii* y *M.*

*testidineum* en las pruebas diagnósticas (Palmer et al., 2016). Los signos clínicos comúnmente asociados con infecciones por micoplasmosis en quelonios incluyen letargia, edema palpebral, conjuntivitis y descarga oculonasal (Palmer et al., 2016). Las bacterias del filo Tenericutes requieren de medios especiales para su cultivo; la ausencia de pared celular hace que estas bacterias sean altamente susceptibles a la desecación y su crecimiento en cultivos celulares es lento, por lo que puede requerir varias semanas. El método estandarizado para su diagnóstico es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El tratamiento es sintomático, incluyendo el uso de antibióticos como las tetraciclinas o fluoroquinolonas. La eliminación completa de estas bacterias no siempre es posible, siendo frecuente la aparición de portadores asintomáticos incluso después de haber recibido tratamiento (Wellehan & Divers, 2019).

Las infecciones por herpesvirus (HV) se han documentado en numerosas especies de quelonios, siendo uno de los agentes víricos mejor estudiados en casi todas las familias, incluyendo a las tortugas terrestres (*Testudinidae*), tanto en sus poblaciones silvestres como en individuos mantenidos en cautividad (Kane et al., 2017; Origgi, 2012; Richard R Sim et al., 2015; Yonkers et al., 2015). Las infecciones por HV comúnmente observadas en las tortugas terrestres varían desde infecciones subclínicas hasta cuadros agudos y graves, pudiendo existir una latencia de larga duración. Los signos clínicos más frecuentes incluyen anorexia, letargia, rinitis, conjuntivitis, estomatitis, glositis, presencia de placas diftérico-necróticas en cavidad oral que pueden extenderse hasta la tráquea y el esófago y edema a nivel del cuello (Marschang, 2019). Generalmente, los animales que sobreviven a una infección aguda por HV pueden desarrollar desórdenes del sistema nervioso central tales como parálisis, incoordinación o tortícolis (Marschang, 2019). Hasta la fecha se han descrito cuatro herpesvirus asociados con infección en tortugas terrestres: *Testudinid* HV1-4 (TeHV1-4) (Marschang, 2011). TeHV1 ha sido detectado en tortugas terrestres de Rusia, Japón y Europa, asociado con estomatitis y procesos leves en los animales infectados, ocasionando una baja morbilidad y mortalidad (Une et al., 1999). TeHV2 fue descrito en Estados Unidos, en una tortuga de California (Johnson et al., 2005), mientras que TeHV3 se ha descrito con mayor frecuencia en tortugas de Europa, si bien ha sido aislado también en Estados Unidos y el norte de África. TeHV3 parece presentar un cuadro más grave en algunas especies, ocasionando una mayor morbilidad y mortalidad que los

otros herpesvirus descritos hasta ahora. Por último, TeHV4 fue aislado en una tortuga asintomática en un zoológico de Estados Unidos y posteriormente en Europa (Bicknese et al., 2010; Kolesnik et al., 2016; 2017). El método diagnóstico de preferencia es la PCR, mediante el uso de *primers* degenerados para una sección altamente conservada del gen de la polimerasa, siendo necesario confirmar los resultados mediante secuenciación (Van Devanter et al., 1996).

Las infecciones por Adenovirus (AdV) son consideradas enfermedades emergentes en las tortugas dada su relativamente reciente detección y aislamiento en estas especies. Estos virus han sido comúnmente aislados en otras especies de reptiles del orden Squamata (Saurios) en los que se encuentran mejor caracterizados (Marschang, 2011; 2019). La taxonomía de la familia *Adenoviridae* sugiere una estrecha coevolución entre estos virus y sus hospedadores, pudiendo observarse saltos entre especies hospedadoras, lo que suele conllevar un aumento de la patogenicidad (Benko et al., 2005). En algunas especies, como las tortugas de Célebes (Sulawesi) (*Indotestudo forstenii*), la enfermedad por adenovirus ha sido asociada con un cuadro sistémico muy grave y una alta mortalidad (Rivera et al., 2009). Los signos clínicos observados incluyen estomatitis, esofagitis, hepatitis necrótica y lipidosis hepática, necrosis mieloide de la médula espinal, enterocolitis necrotizante, neumonía y encefalitis (Gibbons & Steffes, 2013; Marschang, 2011). Este adenovirus hallado en las tortugas de Célebes ha sido propuesto como perteneciente a un nuevo género denominado *Siadenovirus*. Wilkinson (2004) describió un AdV en una tortuga leopardo (*Stigmochelys pardalis*) que presentaba una coinfección con HV y cuyos signos clínicos incluían biliverdinuria, pérdida de peso y episodios hemorrágicos. Posteriormente, Farkas & Gal (2009) describieron un AdV en una tortuga caja (*Terrapene ornata ornata*) mantenida en cautividad, donde se observó degeneración de las células hepáticas, vacuolización en el citoplasma y cuerpos de inclusión en los hepatocitos. Algunos virus similares han sido hallados en años recientes en tortugas de Estados Unidos y Europa, tanto en animales enfermos como asintomáticos, por lo que se ha propuesto clasificar a estos virus dentro de un nuevo género de la familia *Adenoviridae*, denominado *Testadenovirus* (Doszpoly et al., 2013).

La familia *Iridoviridae* se subdivide en cinco géneros, entre los que se encuentra el *Ranavirus* spp. Los virus de este género están considerados como importantes patógenos

que afectan a muchas especies poiquilothermas, siendo causantes de graves declives poblacionales a nivel mundial en numerosas especies de anfibios (Marschang, 2019). Los estudios realizados acerca de su filogenia y rutas de transmisión indican que los ranavirus pueden transmitirse entre anfibios, reptiles y peces, habiendo sido aislados de manera regular en numerosas especies de reptiles desde los años 90 (Marschang, 2011). El tráfico ilegal de reptiles y anfibios, así como otros factores de origen antropogénico como el cambio climático, están facilitando la traslocación de especies y sus patógenos y con ello la mayor ubicuidad y dispersión de ranavirus, contribuyendo a que sea considerada como una enfermedad emergente de elevada importancia para la conservación de anfibios, reptiles y peces. Al igual que sucede con otros agentes, su patogenicidad está relacionada con la especie hospedadora y su estado inmunitario, la cepa viral, la presencia de coinfecciones y diversos factores ambientales, entre los que destaca la temperatura (Allender, 2012; Duffus et al., 2015). En las tortugas, el género *Ranavirus* fue aislado por primera vez en la década de los 80 en Suiza (Heldstab & Bestetti, 1982), siendo posteriormente aislado en diversas especies acuáticas y terrestres, incluyendo tortugas caja (*Terrapene* spp.) y tortugas africanas (*Testudo* spp.) (Johnson et al., 2008; Allender et al., 2013; Sim et al., 2016). La mayoría de los brotes de ranavirus descritos en tortugas han ocurrido en tortugas caja de Norte América, habiendo relacionado estos eventos y su potencial susceptibilidad al hecho de que estas especies, a pesar de ser terrestres, están en contacto estrecho con lagunas temporales donde pueden verse expuestas a la infección por aguas contaminadas o por la presencia de anfibios infectados (Allender, 2012; Kimble, 2015; Duffus et al., 2015). El virus aislado con más frecuencia en las tortugas es el ranavirus tipo 3 (FV3-like) (Allender et al., 2011). Los signos clínicos asociados a la infección por ranavirus en las tortugas incluyen letargia, anorexia, secreción oculonasal, conjuntivitis, edema cervical subcutáneo, estomatitis ulcerativa, “enfermedad del cuello rojo” e incluso la muerte (Marschang, 2019). Aunque la ruta de transmisión descrita con mayor frecuencia ha sido la transmisión desde anfibios hacia reptiles, se ha demostrado que puede existir contagio entre tortugas (Marschang et al., 2008; 2011). El método de elección para el diagnóstico incluye PCR y PCR a tiempo real (rtPCR) en hisopados orales o cloacal, o en muestras de tejidos diana (hígado, riñón, bazo y sistema gastrointestinal) (Allender, 2013; Marschang, 2019).

### 1.2.3 RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS: LA PANDEMIA INVISIBLE

A nivel mundial, estamos experimentando un rápido aumento de las resistencias a los antimicrobianos (AMR) combinado con una drástica reducción en el descubrimiento y desarrollo de nuevas clases de antibióticos. Las infecciones causadas por bacterias resistentes son responsables de al menos 700.000 muertes humanas cada año que antes podrían haberse evitado y de la pérdida de millones de dólares. La estimación realizada para el 2050 sitúa a las resistencias como la primera causa de mortalidad en los seres humanos (O' Neil, 2014; World Bank, 2016; Patel et al., 2020).

Las resistencias antimicrobianas fueron detectadas poco después del descubrimiento de los primeros antibióticos, a principios del siglo XX. Alexander Fleming, poco después de ganar el Premio Nobel en 1945 por su descubrimiento de la penicilina vaticinó: *“The thoughtless person playing with penicillin treatment is morally responsible for the death of the man who succumbs to infection with the penicillin-resistant organism”* (la persona irreflexiva que juegue con la penicilina será moralmente responsable de la muerte del ser humano que sucumba a la infección por organismos resistentes a la penicilina) (Sillankorva et al., 2019). La resistencia a la penicilina empezaría a ser detectada (como su descubridor predijo) apenas una década después de haberse generalizado su uso, lo mismo que sucedería tan sólo unos años después con las resistencias a la estreptomicina, tetraciclina, vancomicina o fluoroquinolonas, entre otros (Errecalde, 2004; Levy & Marshall, 2004; Davies & Davies, 2010).

El desarrollo de la resistencia es un fenómeno que ocurre de manera natural en las comunidades microbianas a pequeña escala, debido a que la mayoría de los antibióticos derivan de precursores de origen natural extraídos de organismos fúngicos o bacterianos (Tan et al., 2018), encontrando bacterias resistentes en todos los continentes y ecosistemas, incluso en aquellos menos modificados por las actividades antropogénicas como son los casquetes polares, o en restos arqueológicos neolíticos (Aminov, 2010; Segawa et al., 2013; Van Goethem et al., 2018). Estos organismos productores de sustancias con acción antimicrobiana cuentan a su vez con genes que codifican resistencia para esas mismas sustancias que producen (genes de resistencia a los antimicrobianos o

ARGs), como pueden ser las  $\beta$ -lactamasas. La reconstrucción filogenética de los ARGs sugiere la presencia de genes que confieren resistencia a varias clases de antibióticos en la naturaleza mucho antes de la era de los antibióticos, estimando que las enzimas  $\beta$ -lactamasas, por ejemplo, pueden haber estado presentes en los plásmidos desde hace varios millones de años (Aminov, 2010). A pesar de que se pueden encontrar resistencias de origen natural en todos los nichos ecológicos, el uso de antibióticos en las diversas actividades humanas incrementa de manera significativa la abundancia y diversidad de las resistencias en el medio ambiente.

Los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a los antibióticos están ampliamente distribuidos en el reino microbiano y han sido bien descritos para una variedad de microorganismos comensales y patógenos (Davies & Davies, 2010; Wang et al., 2014; Pu et al., 2015). La mayoría puede diseminarse mediante uno o más mecanismos distintos de transferencia de genes, debido en gran medida a la acción de los elementos genéticos móviles (MGE), un término utilizado para referirse a los elementos que promueven la movilidad del ADN intracelular (por ejemplo, desde el cromosoma a un plásmido o entre plásmidos) e intercelular. Las secuencias de inserción (IS) y los transposones (Tn) son segmentos del ADN capaces de moverse ellos mismos al azar, hacia nuevas ubicaciones dentro de una sola célula. Otros elementos, como los integrones (In), usan la recombinación específica de una región para mover los genes de resistencia entre regiones definidas. Los mecanismos intercelulares de intercambio genético incluyen la conjugación/movilización (mediada fundamentalmente por plásmidos), la transducción (mediada por bacteriófagos) y la transformación (captación de ADN extracelular) (Partridge et al., 2018).

Los ARGs han existido en el medio ambiente debido a una variedad de presiones selectivas de origen natural, pero los seres humanos hemos aplicado una presión selectiva adicional a estos genes debido a las grandes cantidades de antibióticos que producimos, consumimos y aplicamos en los campos de la medicina (humana y animal), ganadería y agricultura. Las fuerzas físicas (agua, aire) y biológicas (animales y seres humanos) contribuyen a su vez a la diseminación generalizada de estos genes de resistencia en todos los hábitats y ecosistemas (Allen et al., 2010). Tomando en cuenta todos estos factores, los ARGs han sido catalogados hace casi dos décadas como contaminantes ambientales

de alta preocupación para la salud humana, animal y medioambiental (Pruden et al., 2006).

El uso de antibióticos conlleva la selección y diseminación de resistencias, tanto en medicina humana como en veterinaria, y la dispersión de éstas sucede de persona a persona, de animal a animal, entre personas y animales y entre éstos y el medio ambiente. Las AMR se encuentran presentes en los sistemas de producción animal y por tanto en los alimentos de origen animal, así como en el medio ambiente, especialmente en los suelos y en los sistemas acuáticos (Calero-Cáceres et al., 2014; Nesme & Simonet, 2015; Jones-Dias et al., 2016; Van et al., 2020). Los antibióticos se usan también en los sectores de la acuicultura y la horticultura, lo que implica que las resistencias a estas sustancias están presentes en casi todos los ecosistemas y productos alimenticios (Chee-Sanford et al., 2009; Collington et al., 2013; Jiang et al., 2013; Wang et al., 2016).

El mal uso y abuso de antimicrobianos en medicina humana y veterinaria ha desempeñado un papel fundamental en el crecimiento exponencial de las resistencias antimicrobianas a escala global. En la práctica veterinaria se puede destacar el uso de antibióticos como profilácticos, metafilácticos y promotores de crecimiento en colectividades, lo que ha contribuido de manera silenciosa, a que los antibióticos y consecuentemente las bacterias resistentes a éstos se hayan distribuido a lo largo y ancho del planeta (World Bank, 2016; Wadsworth & Berthe, 2019). Numerosos patógenos causantes de enfermedades epidémicas han evolucionado a lo largo del tiempo en formas multirresistentes, como consecuencia del extendido uso de los antibióticos. El término *superbacteria* se ha acuñado en los últimos años para describir a estos patógenos multirresistentes que han incrementado su morbilidad y mortalidad en un proceso evolutivo de sucesivas mutaciones que pueden transferirse de manera horizontal, confiriendo resistencia a múltiples antimicrobianos. Las opciones terapéuticas para tratar las infecciones provocadas por estas superbacterias se han reducido drásticamente, de la mano con un incremento en los costes de tratamiento intrahospitalario y los índices de mortalidad (Davies & Davies, 2010; Wadsworth & Berthe, 2019).

Considerando que la fauna silvestre generalmente no recibe antibióticos ni atención veterinaria de ningún tipo, se encuentra aceptado y reconocido que la prevalencia de resistencias en bacterias comensales de los animales silvestres está influenciada por el nivel de exposición que sufren a la contaminación de origen antropogénica. Numerosos estudios realizados recientemente en diferentes sistemas ecológicos demuestran que los organismos silvestres pueden actuar como centinelas de la carga de ARGs presentes en un ecosistema, por lo tanto, puede ser útil emplear a estas especies clave para identificar posibles fuentes de contaminación de resistencias antimicrobianas de origen antropogénico (Blanco-Peña et al., 2017; Cevidanes et al., 2020; Ramey & Ahlstrom, 2020; Sacristán et al., 2020; Ahlstrom et al., 2021; Ewbank et al., 2021). La prevalencia de AMR en la fauna silvestre depende de una variedad de factores, como son el uso del hábitat y las estrategias de alimentación de las diferentes especies. La búsqueda de alimento representa un mecanismo por el cual la vida silvestre puede estar expuesta de diferentes maneras a la contaminación de AMR de origen humano, pudiendo emplear estos factores ecológicos para identificar aquellas especies más idóneas para actuar como centinelas del resistoma (conjunto de ARGs de una comunidad microbiana) ambiental (Ramey & Ahlstrom, 2020). Se ha encontrado incluso una correlación positiva entre la presencia de microplásticos y AMR (Pham et al., 2021), lo que podría explicar una mayor prevalencia de resistencias en aquellas especies que habitan ecosistemas altamente contaminados por residuos de origen antropogénicos (Figura 11).



Figura 11. Tortuga de Santa Cruz (*C. porteri*) en una zona periurbana con una elevada contaminación por residuos antropogénicos, mayoritariamente plásticos (izquierda) y tortuga ingiriendo un plástico (derecha). Imágenes cedidas por Karina Ramón, GTMEP.

La preocupación mundial por los efectos negativos de las AMR ha crecido exponencialmente en las últimas décadas. En 2001, la OMS publicó la Estrategia Global para la Contención de las Resistencias Antimicrobianas donde se resalta la importancia de controlar y reducir el uso de antimicrobianos en salud humana y producción animal, fortaleciendo de manera simultánea los planes de vigilancia epidemiológica en materia de resistencias y detección de enfermedades y los planes de vacunación e investigación de nuevos recursos terapéuticos (WHO, 2001). A lo largo del siglo XXI, numerosos organismos nacionales e internacionales han dado la voz de alarma sobre la necesidad urgente de fortalecer la vigilancia antimicrobiana en todas las diferentes actividades relacionadas con la salud, incluyendo las prácticas veterinarias (ONU 2008; WHO, 2017; World Bank, 2016; Wadsworth & Berthe, 2019). A raíz de la firma de los tratados de libre comercio y después de la creación de la Agencia Europea del Medicamento, se creó en 1997 la Red de Autoridades de Medicamentos en Iberoamérica (EAMI), en un esfuerzo por integrar políticas y regulaciones que ayuden a reducir las AMR. La Red EAMI está formada por las Agencias o Direcciones de medicamentos vinculadas a Ministerios de Salud o instituciones de investigación en salud pública de veintidós países iberoamericanos, incluyendo Ecuador. Los países de la Unión Europea, a diferencia de lo que sucede en Estados Unidos y Latinoamérica, han establecido regulaciones muy estrictas para el uso de antimicrobianos para usos no terapéuticos. A finales del siglo XX, Suecia se convirtió en el primer país en prohibir el uso de antibióticos con fines no terapéuticos en la producción animal, seguido de Dinamarca a finales de los 90, debido a la presencia de estreptococos resistentes a la vancomicina. En 2006, la Unión Europea prohibió el uso de antibióticos en animales como promotores de crecimiento en todos sus estados miembros y se acordaron una serie de regulaciones, a ser aplicadas en 2022, para restringir el uso de antibióticos como profilácticos y metafilácticos, reforzar el control sobre usos no autorizados y prohibir la importación de productos de origen cárnico producidos con antibióticos (Kahn, 2016). En Estados Unidos (EE. UU.) las regulaciones han sido históricamente mucho más laxas. A pesar de los intentos de la agencia de Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) por prohibir el uso de algunas clases antibióticas como promotores de crecimiento, durante décadas las multinacionales farmacéuticas y agropecuarias consiguieron evitar la prohibición, limitándose tan solo a una serie de recomendaciones que podían ser adoptadas de manera voluntaria por la industria y los consumidores,

eligiendo poder consumir productos “ecológicos” y libres de medicamentos a un mayor coste. Este escenario, común a muchos otros países de Asia, Latinoamérica y África, en conjunto con un aumento en la demanda de productos de origen cárnico a nivel mundial (la FAO estima un incremento del 73 % en el consumo global de carne para el año 2050), ha conllevado la generación y dispersión de una gran cantidad de bacterias resistentes y de enfermedades nosocomiales de muy difícil tratamiento (FAO, 2011; Kahn, 2016).

En 2017, la OMS, en colaboración con la FAO y la OIE, presentaron un plan a escala global para combatir las resistencias, reduciendo el uso innecesario de antibióticos en animales y seres humanos. Este plan recomienda restringir el uso de antibióticos de importancia sanitaria como promotores de crecimiento, profilácticos y metafilácticos (EMA & EFSA, 2017). Su aplicación en Estados Unidos y muchos otros países es hasta ahora cuestionable; a pesar de la prohibición de la FDA de usar antibióticos como promotores de crecimiento, éstos sí pueden usarse con fines preventivos, lo que deja la puerta abierta para que los productores notifiquen el uso de determinados antibióticos de manera “preventiva” cuando en realidad están siendo empleados como promotores de crecimiento (Patel et al., 2020). También en 2017, la OMS publicó una lista elaborada por un panel de expertos internacionales, donde se recogen aquellos patógenos resistentes de mayor importancia sanitaria en los que se deben priorizar los esfuerzos de investigación y búsqueda de nuevos tratamientos (Tacconelli et al., 2017). Entre ellos destacan *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y enterobacterias resistentes a las carbapenemasas y a las cefalosporinas de tercera generación (EMA & EFSA, 2017). En 2019, en un esfuerzo coordinado entre diversas agencias gubernamentales (ONU, FAO, OMS, OIE) se publicó un documento que urge a tomar acciones inmediatas en la lucha contra las resistencias antimicrobianas, instando a los países a integrar políticas acordes al marco teórico de One Health, que permitan el cumplimiento de los objetivos del desarrollo (ODS) abordando, la lucha contra las resistencias a los antimicrobianos como un eje crucial (Figura 12) (Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance, 2019).



Figura 12. Recomendaciones para una respuesta integral a la crisis global de las resistencias antimicrobianas y su relación con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030. Adaptado del Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance (IACG) Report, 2019.

En la Unión Europea, se estableció en 2019 una cascada de prescripción de antibióticos en la práctica veterinaria, con el objetivo de preservar aquellos antibióticos de importancia crítica para su uso en enfermedades humanas. Este plan clasifica los antibióticos en cuatro categorías: A (antibióticos a evitar), B (a limitar), C (uso con precaución) y D (uso con prudencia), para hacer un uso prudente y responsable de estos (EMA, 2019).

Los programas nacionales e internacionales actuales generalmente están sesgados hacia la vigilancia bacteriana de AMR en humanos y animales domésticos, mientras que los programas enfocados en el medio ambiente han recibido una atención muy limitada (Dolejska & Literak, 2019). En 2019, Ecuador lanzó un plan nacional estratégico para reducir las resistencias antimicrobianas (Ministerio de Salud de Ecuador, 2019); sin embargo, la mayoría de los antimicrobianos para uso humano y animal todavía están disponibles en todo el país sin receta médica y no existe ninguna restricción ni regulación

acerca del uso de antibióticos en la práctica veterinaria. Esto es aún muy frecuente en numerosos países mal llamados “en vías de desarrollo”, donde los medicamentos pueden ser fácilmente adquiridos sin prescripción médica o veterinaria en establecimientos homologados (farmacias, clínicas veterinarias o agro-ferreterías), tiendas y mercados informales o incluso en el mercado negro, con el riesgo adicional de adquirir medicamentos que no tienen una calidad adecuada (Wadsworth & Berthe, 2019). El último informe publicado por la OIE en 2021 sobre el uso de antimicrobianos identifica a América como el continente en que más países (57 %) emplean antibióticos como promotores de crecimiento, indicando como principales motivos la ausencia de un marco legal regulador y la falta de financiamiento y herramientas para su implementación (Gochez et al., 2021).

### **1.3 ANTECEDENTES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

#### **1.3.1 PROGRAMA DE ECOLOGÍA DE MOVIMIENTO DE LAS TORTUGAS DE GALÁPAGOS**

En el año 2009, en un esfuerzo coordinado entre la Dirección del Parque Nacional Galápagos, la Fundación Charles Darwin y el Instituto Max Planck de Ornitología, el Dr. Stephen Blake, biólogo y ecólogo especializado en movimiento animal, realizó un estudio piloto en la isla de Santa Cruz, para determinar si las tortugas gigantes de esta isla eran especies migratorias, como así indicaban las observaciones empíricas y los datos preliminares publicados por numerosos científicos desde la época de Charles Darwin (Porter, 1815; Darwin, 1839; Rodhouse, 1975; Torres, 2002). Para ello, se colocaron ocho dispositivos de radio-telemetría, equipados con Sistemas de Posicionamiento Global

(GPS) en tortugas adultas de las dos especies de la Santa Cruz (Figura 13) (Blake et al., 2021).



Figura 13. Monitoreo de tortugas terrestres empleando una antena de radio- telemetría (Freddy Cabrera, izquierda) y primera tortuga marcada con un dispositivo GPS en 2009. Imágenes cedidas por Stephen Blake, GTMEP.

Los primeros resultados confirmaron la hipótesis que afirmaba que las tortugas gigantes de esa isla eran especies migratorias, mostrando un claro patrón de migración estacional en ambas especies (*C. porteri* y *C. donfaustoi*) (Blake et al., 2012b). Este hallazgo supuso un salto cualitativo en el conocimiento existente acerca de la ecología de las tortugas gigantes y planteó numerosos interrogantes que fueron siendo respondidos en años posteriores. Se estableció el Programa de Ecología de Movimiento de Tortugas de Galápagos (GTMEP) y se expandió el estudio a otras islas y localidades no pobladas, colocando dispositivos GPS en tortugas adultas del volcán Alcedo (Isabela) y de la isla Española. Numerosas publicaciones en los siguientes años revelaron la dieta de las tortugas terrestres en Santa Cruz y su preferencia por especies frutales introducidas en las partes altas de la isla (Blake et al., 2015), y su importancia como dispersoras de semillas y modificadoras del hábitat al ingerir una gran variedad de especies vegetales y contar con un tiempo de retención digestivo de hasta 28 días (Sadeghayobi et al., 2011; Blake et al., 2012a; Ellis-Soto et al., 2017). El uso de dispositivos de alta tecnología combinado con un proyecto de monitoreo a largo plazo ha permitido caracterizar en detalle los patrones de movimiento de las diferentes especies, determinando las diversas estrategias que han adoptado las tortugas en los distintos ecosistemas (Figura 14); mientras en Alcedo y Santa Cruz las tortugas han evolucionado hacia patrones de movimiento migratorios con carácter estacional, en la árida y plana isla de Española, donde los recursos alimenticios

se distribuyen de manera homogénea durante todo el año, las tortugas han adoptado estrategias sedentarias, observando en ocasiones individuos que realizan viajes exploratorios de tipo nómada, pero no observando en ningún caso patrones migratorios (Bastille-Rousseau et al., 2017).

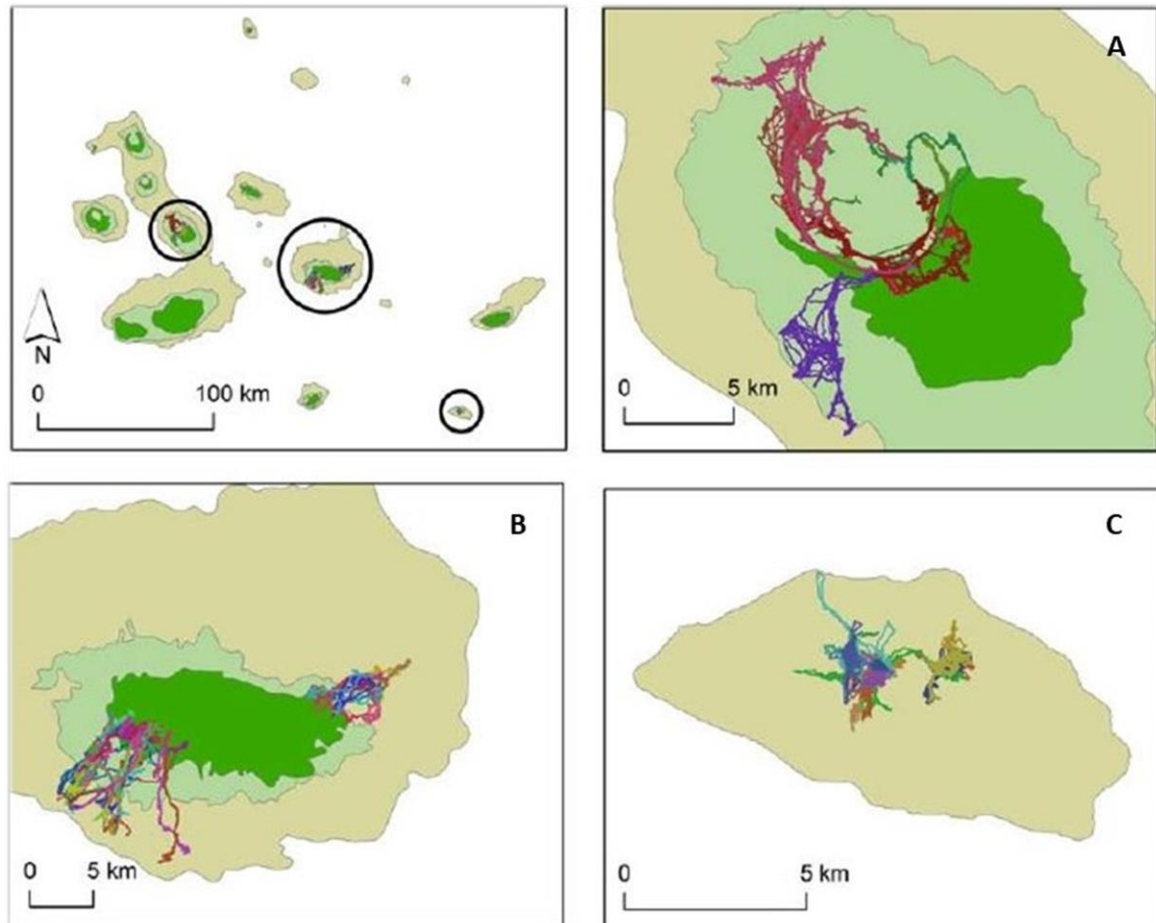


Figura 14. Patrones de movimiento de las tortugas gigantes de Galápagos en las diferentes islas. Cada color refleja el movimiento de un individuo diferente. En el volcán Alcedo (A) y en las dos especies de Santa Cruz (B) predomina la migración estacional, mientras que en Española (C) predomina el sedentarismo. Adaptado de Bastille-Rousseau et al. (2017).

Esta información permitió así mismo establecer algunos de los factores determinantes para la migración de las tortugas, como su tamaño corporal o su estado de salud (Yackulic et al., 2017). Se determinó que el sexo también condiciona los patrones de movimiento de estas especies; mientras que la migración de los machos está estrechamente ligada a la calidad del forraje (la cuál impulsa el movimiento a las tierras bajas y secas durante la época de lluvia debido a la disponibilidad de alimento altamente nutritivo), en las hembras la migración está motivada además por factores reproductivos,

al tener éstas que incorporar la anidación y la puesta de huevos dentro de sus patrones migratorios (Bastille-Rousseau et al., 2019). Desde 2013, el GTMEP estudia también los patrones de movimiento de las tortugas neonatas, lo que ha servido para determinar que las tortugas juveniles no realizan migraciones, sugiriendo que estas especies comienzan su comportamiento migratorio cuando alcanzan la madurez sexual (Blake et al., 2022, manuscrito en preparación).

En 2013, el Instituto de Medicina de la Conservación del Zoológico de Saint Louis se unió al GTMEP para contribuir, desde una perspectiva holística de *One Health*, a desarrollar estudios encaminados a comprender el estado de salud de las tortugas gigantes. Los primeros resultados pusieron de manifiesto que las tortugas migratorias presentaban un mejor estado de salud (evidenciado por una mejor condición corporal y valores más elevados de hematocrito y sólidos totales plasmáticos) que aquellas tortugas no migratorias (Blake et al., 2015). También se pudo establecer una correlación positiva entre la condición corporal de las hembras y la presencia de huevos y/o folículos (Deem et al., 2022a, manuscrito en preparación). En 2016, se publicó el primer estudio comparando diversos métodos de laboratorio empleados para la cuantificación de leucocitos en tortugas silvestres (Sheldon et al., 2016) (Figura 15).



Figura 15. Realización de ecografías en el campo (Dra. Sharon Deem, Freddy Cabrera y Freddy Villalba) (izquierda). Neonato marcado con dispositivo de radio seguimiento (derecha). La Reserva, Santa Cruz. Imágenes cedidas por Samuel Rowley, GTMEP.

En 2017 se realizó un estudio piloto para determinar el sexo de las tortugas neonatas empleando técnicas de laparoscopia. Se estudió la morfología gonadal de tortugas inmaduras (juveniles) de la especie *C. porteri*, realizando el procedimiento en el campo y bajo anestesia (Emmel et al., 2021) y se estableció una correlación entre la

temperatura de incubación y el sexo de los individuos para todas aquellas tortugas marcadas con dispositivos de radio-telemetría (Deem et al., 2022b, manuscrito en preparación). Los diversos resultados obtenidos por estos estudios corroboraron que continuaba existiendo un vacío de conocimiento referente al estado de salud de las tortugas terrestres de Galápagos: no existían valores de referencia de hematología y bioquímica para estas especies, no había estudios de línea base de los principales agentes infecciosos presentes en las tortugas gigantes, ni se estaba trabajando en identificar posibles impactos negativos asociados al incremento de las actividades humanas en el archipiélago.

### 1.3.2 ESTADO DEL ARTE: SALUD DE LAS TORTUGAS GIGANTES DE LAS GALÁPAGOS

Desde la creación de la Estación Científica Charles Darwin y los proyectos de cría en cautividad y reintroducción de tortugas gigantes en los años 60, se han realizado numerosos estudios para comprender la ecología de las tortugas terrestres, el impacto de las especies introducidas, la diversidad genética de sus poblaciones y en años más recientes, sus estrategias migratorias (Márquez et al., 2004; Blake et al., 2012b; Gibbs et al., 2014a; Poulakakis et al., 2015; Bastille-Rousseau et al., 2017). Sin embargo, pocos estudios se han realizado hasta la fecha para establecer una línea base sobre el estado de salud de estas especies (p. ej. agentes infecciosos y parasitarios, enfermedades no infecciosas) que ayude a comprender las potenciales amenazas que pueden estar enfrentando para su supervivencia y bienestar.

Lo únicos tres brotes de mortalidad descritos en tortugas silvestres de Galápagos tuvieron lugar hace más de veinte años y las causas no pudieron ser determinadas, aunque se sospechó de una infección de origen bacteriana en al menos uno de los brotes (Márquez, 2019). El primer evento de mortalidad registrado data de 1979, donde se hallaron cinco tortugas muertas en la isla Santa Cruz. En 1996, 21 tortugas silvestres en esa misma isla fueron encontradas muertas en la zona de El Chato. Apenas dos años después, tras el fuerte evento de El Niño en 1998, se registró la muerte de 22 tortugas de

Santa Cruz (Bensted-Smith et al., 1999) en la misma zona. Cruz Márquez, uno de los primeros científicos que trabajó como herpetólogo en la ECCD, relata en su libro que estos brotes de mortalidad tuvieron lugar únicamente en machos adultos de gran tamaño (en ningún caso se observaron juveniles o hembras afectadas) y las únicas bacterias que pudieron ser aisladas a partir de las muestras de tejidos colectados pertenecían a los géneros *Aeromonas* y *Pseudomonas* (Márquez, 2019). Dos de los individuos encontrados en Santa Cruz en 1999 (de la especie actualmente descrita como *C. porteri*) fueron necropsiados y se determinó que la causa de la muerte era una gastroenteritis septicémica, si bien no existen registros de estudios anatomopatológicos. En ambos animales, se encontró también una elevada parasitación por nematodos, que fueron identificados como una nueva especie del género *Atractis* (*Atractis marquezii*) sin que se pudiera llegar a establecer la causalidad entre la presencia de estos parásitos y la muerte de los animales (Burse & Flanagan, 2002). Márquez (2019) relata la excesiva parasitación por nematodos de los animales encontrados en 1999, así como la presencia de abundante secreción oculonasal, estomatitis, diarrea y abundantes petequias a nivel de la mucosa cloacal.

En el Informe Galápagos (1999), Bensted-Smith et al. enuncian que a raíz del brote de mortalidad acaecido en 1996 se puso en evidencia la necesidad de recabar información acerca del estado de salud de las tortugas terrestres, motivo por el cual la ECCD comenzó con un proyecto de evaluación del estado de salud de las tortugas. En el año 2000 se publica la primera y única tesis relativa al estado de salud de las tortugas gigantes (Landázuri, 2000) donde se describe el evento de mortalidad sucedido en 1999 y se realiza el primer estudio hematológico en las tortugas de Galápagos. Este estudio comparó los resultados de hematocrito y sólidos totales obtenidos en tortugas sanas de tres subespecies (entonces consideradas subespecies pertenecientes al género *Geochelone elephantopus*) y los resultados de las tortugas enfermas halladas en Santa Cruz en 1999, concluyendo que se observaba leucocitosis en los individuos enfermos y que existían ligeras diferencias en los valores hemáticos en función de la edad, el sexo y la subespecie analizada. Este trabajo constituye el primer esfuerzo por crear una línea base sobre valores hematológicos en tortugas terrestres. Lewbart et al. (2018) describió por primera vez valores de referencia de hematología y bioquímica sanguínea en un pequeño grupo

de tortugas terrestres mantenidas en cautividad en la isla San Cristóbal (*C. chathamensis*). Sin embargo, estos resultados son contrarios a los obtenidos por Sheldon et al. (2016) donde se describe que las tortugas gigantes de Galápagos tienen una mayor proporción de linfocitos que de heterófilos en sangre (Lewbart et al., 2018). Hasta la fecha, ningún estudio ha profundizado en la descripción de valores de hematología y bioquímica de las tortugas gigantes de Galápagos siguiendo estándares internacionales para el cálculo de dichos intervalos (Flatland et al., 2013).

El conocimiento relativo a la presencia de agentes infecciosos en las tortugas gigantes de Galápagos es muy limitado. Flanagan (2021) expone que esto puede deberse al reducido número de individuos de estas especies mantenidos en cautividad en diferentes colecciones e instituciones zoológicas del mundo y el relativamente elevado coste y tecnificación de las herramientas de diagnóstico molecular. Sutton et al. (2013) describieron la presencia de un nuevo hongo (*Aphanoascella galapagosensis*) en una lesión necrótica superficial observada en el caparazón de una tortuga gigante mantenida en cautividad en un zoológico de Texas (EE. UU.). Este hallazgo es similar al observado en numerosas tortugas silvestres de Galápagos que habitan en ecosistemas húmedos (Santa Cruz o volcán Alcedo, por ejemplo), en las cuáles se observan lesiones superficiales de coloración blanquecina que cubren en ocasiones áreas muy extensas del caparazón (A. Nieto, comunicación personal). Se desconoce si este patógeno puede tener una relevancia clínica para estas especies, pero las observaciones realizadas hasta la fecha no parecen apoyar esta teoría (Figura 16).



Figura 16. Lesiones de coloración blanquecina en el caparazón de una tortuga adulta (izquierda) y una juvenil (derecha) de Santa Cruz (*C. porteri*). Lesión compatible con el hongo *Aphanoascella galapagosensis*. Imagen de archivo personal (izquierda) y cedida por Jorge Carrión, GTMEP (derecha).

Existen algunas descripciones de parásitos externos e internos en las tortugas de Galápagos. Se conoce la presencia de *Argas (Migroargas) transversus*, *Amblyoma usingeri*, *Amblyoma macfarlandi* y *Amblyoma pilosum* (Hoogstraal et al., 1973; Keirans et al., 1973; Márquez, 1983). Estos ectoparásitos no han sido asociados con signos clínicos compatibles con enfermedad en los animales parasitados, pero no se descarta que puedan actuar como vectores de hemoparásitos (Flanagan, 2021) que han sido observados en frotis sanguíneos de diferentes especies de tortugas (J. Palmer, comunicación personal) y que de acuerdo con Márquez (2019) podría tratarse de *Haemogregarinas* spp. Algunas especies de coccidios han sido identificadas en las tortugas gigantes de Galápagos: en 1996, durante un estudio exploratorio en diferentes especies de reptiles de Galápagos, se describió la presencia de una nueva especie del género *Eimeria* (*E. geocheilona*) en una tortuga mantenida en el centro de crianza de Santa Cruz (Couch et al., 1996); *Eimeria iversoni* fue descrita en una tortuga mantenida en cautividad en el zoológico de Dallas (McAllister et al., 2014) y más recientemente se identificó la parasitación por *Eimeria* spp. como la causa principal de mortalidad en al menos uno de los individuos juveniles del Centro de Crianza Fausto Llerena (Santa Cruz) (Sevillano, 2017). En el 2019 se publicó la primera caracterización molecular del género *Eimeria* en muestras de heces de tortugas aparentemente sanas del mismo centro de crianza, encontrando una prevalencia de ooquistes en heces de un 19 % (Sevillano et al., 2019). En los dos últimos años han ocurrido algunos eventos de mortalidad aislados en tortugas neonatas y juveniles mantenidas en cautividad en este mismo centro, estableciendo la parasitación por protozoos como la causa más probable de mortalidad de estos animales (A. Loyola, comunicación personal).

La coccidiosis intestinal, asociada con cuadros clínicos severos y mortalidad en numerosas especies de tortugas, ha sido también descrita en tortugas de Galápagos mantenidas en cautividad (Gibbons & Steffes, 2013). Se ha descrito la presencia de nematodos (Bursey & Flanagan, 2002; Flanagan, 2021), tanto en sus fases adultas como la presencia de huevos compatibles con acáridos, oxiúridos, tricúridos y estrongílicos en las heces de las tortugas de Galápagos. En un estudio realizado por Fournié et al. (2015) se describe una diferente composición de las comunidades de nematodos en diferentes especies de tortugas gigantes silvestres, existiendo una mayor diversidad parasitaria en

las tortugas silvestres muestreadas, en contraposición a aquellas provenientes de los centros de cría en cautividad, proponiendo la coevolución entre parásitos y hospedadores, y reflexionando sobre el impacto en la reducción de la diversidad microbiana en aquellos animales mantenidos en cautividad.

Se han observado también algunas patologías en individuos silvestres para las que todavía no existe un diagnóstico certero (A. Nieto, observación personal). Es el caso de las tumoraciones fibromatosas observadas en individuos adultos (fundamentalmente machos grandes) en los que se pueden apreciar masas de tamaño muy variable en la región cráneo-ventral de las extremidades posteriores, a la altura de la sutura con los escudos del plastrón (Figura 17).



Figura 17. Tumoración de gran tamaño en extremidad posterior derecha de un macho adulto de Santa Cruz (*C. porteri*) encontrado en 2017. Vista caudal (arriba), vista ventral donde se observa la masa creciendo por encima del plastrón (abajo izquierda) y vista ventrocaudal, posterior a la escisión parcial realizada por Ainoa Nieto y Andrea Loyola (abajo derecha). Imágenes de archivo personal.

Estas tumoraciones pueden alcanzar un gran tamaño y se han descrito como masas densas de tejido fibroso poco vascularizado, que se ulceran con facilidad debido a su localización en la zona ventral (Flanagan, 2021). En algunos casos se ha procedido a la escisión parcial o total de estas masas, sin embargo, se ha vuelto a observar crecimiento posterior a la cirugía (A. Nieto, observación personal) (Figura 17).

La inflamación edematosa de la base del cuello ha sido descrita en tortugas juveniles criadas en cautividad fuera de las Galápagos (Flanagan, 2021). Esta inflamación, en ocasiones mal diagnosticada como bocio, aparece en la base del cuello, pudiendo extenderse a las extremidades y llegando en algunos casos a ocasionar la muerte. Este suceso se ha relacionado con hipertrofia del timo (Fleming et al., 2004) y cardiomiopatía fibrosa. Contrariamente a lo que menciona Flanagan (2021), se han observado algunos episodios compatibles con este desorden en tortugas silvestres de la especie *C. porteri* durante los últimos años. Una hembra fue mantenida en cautividad por el servicio veterinario de la DPNG durante algunos meses en 2017, durante los cuales el individuo presentó episodios de inflamación con hipoproteïnemia y anemia, seguidos de curación espontánea. El animal fue puesto en libertad y se lo ha vuelto a observar alimentándose con normalidad en el campo y presentando dicha inflamación (Figura 18). Un estudio preliminar presentado por Zap et al. (2019) en el III Simposio de Ciencias y Conservación de Galápagos estableció los valores de referencia de hormonas tiroideas en tortugas gigantes, no encontrando diferencias entre animales sanos y enfermos, mientras que las biopsias realizadas del tejido inflamado del cuello revelaron células del timo y tejido graso, lo que a priori descarta una patología tiroidea (A. Zap, comunicación personal).



Figura 18. Hembra adulta de tortuga terrestre de Santa Cruz (*C. porteri*) con inflamación edematosa en la región ventrocaudal del cuello de etiología desconocida. Imágenes de archivo personal.

En los últimos años se ha observado un incremento en los atropellos producidos por vehículos, que en los casos más graves llegan a ocasionar la muerte o cuadros con múltiples fracturas de caparazón con exposición de pulmón y otros órganos (A. Nieto, observación personal). Otra causa frecuente de trauma en las tortugas terrestres es la ocasionada por la mordedura de perros asilvestrados, observando lesiones con arrancamiento de los bordes apicales del caparazón, que en ocasiones pueden ser bastante graves y extensas, involucrando toda la circunferencia del caparazón. La mayoría de estas tortugas cicatrizan por segunda intención, pero puede evidenciarse de manera notable aquellos individuos que han sufrido estas lesiones en su caparazón (A. Nieto, observación personal) (Figura 19).



*Figura 19. Trauma producido por perros en una hembra subadulta de Santa Cruz (*C. porteri*) con lesiones en los escudos marginales de las regiones craneolateral y caudal del caparazón (arriba). Abajo dos atropellos por vehículos en Santa Cruz. Fractura de escudos marginales craneales con hemorragia severa (izquierda) y politraumatismo en un individuo adulto ocasionando la muerte del animal (derecha). Imágenes de archivo personal e imagen cedida por Andrea Loyola, DPNG (abajo derecha).*

Las resistencias a los antimicrobianos no han sido muy estudiadas en las Islas Galápagos y los pocos estudios publicados se han basado en pruebas de susceptibilidad empleando cultivos microbianos, lo que puede haber limitado la detección de AMR debido a las dificultades asociadas al cultivo de numerosas bacterias. Thaller et al. (2010) realizó un estudio sobre la presencia de bacterias resistentes en las iguanas terrestres de la isla Santa Fé (*Chonolopus pallidus*), una pequeña isla ubicada al sureste de Santa Cruz, donde no existe población humana pero sí frecuentes visitas de excursiones turísticas y pescadores. Los resultados indicaron que tan solo el 2,1 % (2/96) de los individuos muestreados presentaron colonias de bacterias resistentes a tetraciclinas y aminoglusósidos (*Escherichia coli*), concluyendo la ausencia casi total de resistencias en el microbioma de esta especie, atribuyendo el hallazgo de estas resistencias a un posible origen humano, al haber colectado las muestras positivas cerca de una zona visitada regularmente por pescadores locales. Otro estudio realizado en 2012 incluyó el muestreo de diferentes especies de reptiles, incluyendo iguanas terrestres y marinas de diferentes localidades del archipiélago, y tortugas terrestres mantenidas en semicautividad en la isla San Cristóbal (Wheeler et al., 2012). Este estudio detectó la presencia de resistencias en algunos individuos muestreados en zonas turísticas o cercanos a playas públicas, mientras que no detectaron la presencia de resistencias en aquellos individuos muestreados en playas y localidades más remotas, donde existe una menor interacción humana. Las conclusiones de este estudio señalan de nuevo a las actividades humanas como una posible fuente de contaminación con bacterias resistentes para la fauna silvestre del archipiélago. Otro estudio realizado en diferentes playas de la isla San Cristóbal determinó la contaminación por enterobacterias en las zonas aledañas a los núcleos poblados, donde existen vertidos de aguas residuales, encontrando una mayor presencia de bacterias resistentes en estas localidades. Este estudio identificó una prevalencia de hasta un 100 % de bacterias *E. coli* resistentes a antimicrobianos en algunas de las zonas de estudio (Overbey et al., 2015). Más recientemente, un estudio realizado en animales de producción ha demostrado la presencia de *Salmonella infantis* multirresistente en pollos *broiler* criados en intensivo en la isla Santa Cruz. Este estudio describe la presencia de resistencias a las cefalosporinas de tercera generación mediadas por el gen *bla*<sub>CTX-M-65</sub>, descrito ya en numerosos países de América Latina, Estados Unidos y Europa y de elevada importancia para la salud pública (Burnett et al., 2021).

# **JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 2.1 JUSTIFICACIÓN

En agosto de 2015 y diciembre de 2016, se realizaron en Santa Cruz dos talleres complementarios con expertos nacionales e internacionales para desarrollar el Plan de Acción para las Contribuciones de la Salud de la Fauna Silvestre a la Conservación en las Galápagos. Como resultado de este esfuerzo participativo entre las instituciones gubernamentales y las científicas y expertas en salud animal, se elaboró una hoja de ruta en la que se evidenciaron los vacíos de información y las prioridades de investigación y manejo para avanzar en el estudio de la salud de la fauna silvestre de Galápagos y su conservación (Calle, 2015; Calle et al., 2017). El grupo de expertos y expertas que participó en el panel de reptiles endémicos de Galápagos identificó los problemas más urgentes a abordar y las acciones prioritarias a ser tomadas a corto y medio plazo, que se resumen a continuación:

- Obtener datos de línea base de las diferentes especies de reptiles para llenar los vacíos de información existentes: establecer valores de referencia de hematología y bioquímica de las diferentes especies, caracterizar los agentes infecciosos y parasitarios, estudiar el microbioma y evaluar la presencia de contaminantes y sustancias tóxicas (agroquímicos, plásticos, etc.).
- Minimizar los traumas ocasionados por vehículos (incluyendo impactos marinos y terrestres): establecer las áreas a priorizar, hacer cumplir las regulaciones de

velocidad y limitar el tráfico marino y terrestre en las zonas donde se genere un mayor impacto.

- Reducir la ingesta de contaminantes (marinos y terrestres) y el impacto con las artes de pesca (tortugas marinas): realizar estudios para determinar el grado de impacto en las diferentes especies de reptiles para crear nuevas regulaciones y/o hacer cumplir las regulaciones existentes.

A nivel general, se establecieron una serie de prioridades de investigación y manejo para todas las especies nativas y endémicas del archipiélago que incluían: recabar información científica sobre el estado de salud de las diferentes especies, realizar análisis de riesgo de agentes infecciosos, crear un sistema integrado de vigilancia epidemiológica, estrechar colaboraciones con el Ministerio de Salud Pública para abordar problemas vinculados a la salud humana, contar con un grupo asesor científico y con un sistema integrado de manejo de la información, minimizar el impacto de las especies introducidas e invasoras sobre la salud de las especies y ecosistemas de Galápagos y contar con un laboratorio tecnificado y personal cualificado para el procesamiento de muestras en el archipiélago.

Tras participar en el taller del 2016 y considerando la información y experiencia recabada por el GTMEP a lo largo de casi una década, en enero de 2017 se comenzó a diseñar un proyecto de investigación para dar respuesta a algunos de estos vacíos de información relativos a la salud de las tortugas terrestres de Galápagos. A la hora de diseñar este proyecto se tomó en cuenta también el gran número de tortugas que la Dirección del Parque Nacional Galápagos (DPNG) moviliza cada año desde los centros de cría en cautividad hacia otras islas y localidades, dentro de los programas de recuperación ecológica de los ecosistemas, sin realizar análisis de riesgo ni evaluaciones sanitarias de los individuos repatriados. Las nuevas metodologías de investigación y muestras a coleccionar fueron incluidas en el permiso de investigación anual del GTMEP que otorga cada mes de abril la DPNG y se formalizó con la contraparte ambiental la incorporación de los nuevos componentes de investigación.

## 2.2 FORMULACIÓN DE PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS

De acuerdo con esta justificación, se enuncian dos preguntas de investigación:

1. ¿Cuál es la línea base de parámetros fisiológicos, agentes infecciosos y genes de resistencia a antimicrobianos (ARGs) en las poblaciones de tortugas gigantes de Galápagos?

2. ¿De qué manera influyen las actividades humanas en la presencia y prevalencia de agentes infecciosos y ARGs en las tortugas gigantes de Galápagos?

La **hipótesis** que se plantea es que la presencia y prevalencia de agentes infecciosos y ARGs se va a ver alterada por el grado de antropización de los diferentes ecosistemas que habitan las tortugas terrestres. La predicción es que las tortugas que habitan en islas más alteradas por las actividades antropogénicas presentarán una mayor prevalencia de agentes infecciosos y ARGs que aquellas que habitan en islas no habitadas por seres humanos. Considerando el comportamiento migratorio de las tortugas en la isla Santa Cruz, se espera no encontrar diferencias significativas en la prevalencia de agentes infecciosos y ARGs entre las diferentes áreas de estudio de esta misma isla, pero sí en comparación con otras islas no habitadas.

## 2.3 OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El objetivo general de esta investigación es contribuir en la creación de una línea base sobre el estado de salud de las poblaciones silvestres de tortugas gigantes de las Islas Galápagos, determinando el potencial impacto que las actividades antropogénicas pueden tener sobre la salud de estas especies. Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Describir los intervalos de referencia de los parámetros hematológicos y bioquímicos en las tortugas gigantes de las Galápagos.
2. Determinar la presencia y prevalencia de herpesvirus, adenovirus, ranavirus y *Mycoplasma* spp. en tortugas silvestres sometidas a un diferente grado de impacto antropogénico.
3. Determinar la presencia y prevalencia de genes de resistencia a antimicrobianos (ARGs) en tortugas silvestres sometidas a un diferente grado de impacto antropogénico.

Con el fin de lograr dichos objetivos, se han desarrollado cuatro estudios experimentales:

1. Estudio para el cálculo de los intervalos de referencia de hematología y bioquímica sanguínea en la especie *Chelonoidis porteri*.
2. Estudio comparativo de presencia y prevalencia de los agentes infecciosos seleccionados en cinco especies de tortuga terrestre de Galápagos (*C. porteri*, *C. donfaustoi*, *C. vandenburghi*, *C. becki* y *C. hoodensis*).
3. Estudio piloto para detectar la presencia de ARGs en la especie *C. porteri*.
4. Estudio comparativo sobre la presencia de ARGs en dos especies (*C. porteri* y *C. vandenburghi*) que habitan ecosistemas sometidos a diferentes grados de humanización.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.1 ADQUISICIÓN DE PERMISOS

Esta investigación ha sido realizada dentro del Programa de Ecología de Movimiento de Tortugas de Galápagos (GTMEP), de acuerdo a los permisos de investigación anuales otorgados por la Dirección del Parque Nacional Galápagos (PC-36-17, PC-35-18, PC-16-19, PC-28-20 y PC-17-21). La toma de muestras y manipulación de los animales de estudio se encuentra amparada por el Comité Ético de Bienestar Animal de GREFA (Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat) con número de registro 17/001. El transporte de muestras a España y Estados Unidos se realizó siguiendo las directrices nacionales e internacionales, con los respectivos permisos de autorización de las entidades locales (DPNG y ABG), nacionales (Ministerio de Medio Ambiente y Contrato Marco de Acceso al Recurso Genético) e internacionales (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, CITES). Las muestras para los estudios de resistencias y enfermedades fueron transportadas a España con los permisos de exportación 153-2019-EXP-CM-FAU-DNB/MA, 192-2019-EXP-CMFAU-DNB/MA y 031-2020-EXP-CM-FAU-DNB/MA mientras que los frotis de sangre para la determinación de los parámetros hematológicos se movilizaron a Estados Unidos con los permisos CITES 18EC000001/PG, 19EC000001/PG, 18US62698C/9 y 19US62698C/9.

### 3.2 ZONAS DE ESTUDIO

El presente estudio ha tenido lugar en el archipiélago de las Islas Galápagos, Ecuador, único lugar de distribución de las tortugas gigantes de Galápagos (*Chelonoidis* spp.), incluidas en el Apéndice I del CITES. El estudio se focalizó principalmente en dos localidades del archipiélago: el oeste de la isla Santa Cruz (zona antrópica) y el volcán Alcedo en la isla Isabela (zona no antrópica). Sin embargo, durante la implementación del trabajo de campo fue posible tener acceso a muestras de tortugas gigantes silvestres de cinco especies, en tres islas del archipiélago (Santa Cruz, Isabela y Española). En el capítulo II de esta tesis se incluyeron también muestras de tortugas gigantes mantenidas en cautividad en el Centro de Crianza Fausto Llerena (Santa Cruz). Este incremento en el número de muestras y especies ha ocasionado que los diferentes estudios realizados hayan sido llevados a cabo en un número diferente de animales y localidades (Figura 20). Las zonas geográficas de las Islas Galápagos en las que se ha realizado este estudio son las siguientes:

- Santa Cruz: isla ubicada en el centro del archipiélago (S00.66551°, W090.357241°). Las dos especies de tortuga terrestre que la habitan han sido objeto de este estudio; *Chelonoidis porteri* es la especie predominante, distribuyéndose en el centro y suroeste de la isla, mientras que la especie *Chelonoidis donfaustoi* se distribuye en el sureste de la isla, y cuenta con una población mucho más reducida. Sus poblaciones están bien diferenciadas y no existe un solapamiento geográfico entre ellas. Santa Cruz es con diferencia la isla más poblada de las cinco islas habitadas y en la que se observa una mayor modificación antrópica de sus ecosistemas.

- Isabela: es la isla más grande y se encuentra ubicada al este del archipiélago (S00.975418°, W91.007818°). Esta investigación se ha llevado a cabo con dos de las cinco especies de la isla: *Chelonoidis vandenburghi* ubicada en el volcán Alcedo (S00.4409454°, W091.1068907°) y *Chelonoidis becki* que habita el volcán Wolf, en el extremo norte de la isla (S00.016080°, W091.350429°). Los volcanes antes mencionados no han contado nunca con asentamientos humanos, si bien es cierto que entre los años 2004-2007 se llevó a cabo la erradicación masiva de cabras asilvestradas (consideradas invasoras) por parte

del Proyecto Isabela (Lavoie, et al., 2007a) en el que participaron cientos de guardaparques y cazadores, y durante el cual se establecieron campamentos a lo largo de toda la isla Isabela. Desde que se completó la erradicación en el 2007, ambos volcanes son considerados como áreas intangibles no accesibles al turismo, donde solo están autorizadas las expediciones de carácter científico, que suceden con poca frecuencia e incluyen la visita de unos pocos investigadores y guardaparques cada año.

- Española: es una pequeña isla árida y llana, ubicada al sureste del archipiélago (S01.373559°, W089.673705°) y no habitada por seres humanos. Española alberga a la especie de tortuga *Chelonoidis hoodensis*, una de las especies que ha sido objeto de un intenso programa de cría en cautividad y reintroducción desde los años 70.



Figura 20. Tortugas terrestres del este (arriba izquierda) y oeste (arriba derecha) de Santa Cruz, volcán Alcedo en la isla Isabela (abajo izquierda) e isla Española (abajo derecha). Se puede apreciar la diferente morfología del caparazón de la tortuga de Española (forma "silla de montar"). Imagen de archivo personal y cedidas por Jorge Carrión, GTMEP (arriba derecha) y Juan Manuel García, FCD (abajo).

### 3.3 DISEÑO DEL MUESTREO

#### 3.3.1 TAMAÑO MUESTRAL POR ESPECIE

Al no contar con estudios previos relativos a la presencia y/o prevalencia de patógenos o resistencias antimicrobianas en las tortugas de Galápagos, en 2017 se realizó un estudio piloto en la isla de Santa Cruz, que permitió probar y ajustar las técnicas de muestreo, evaluar las técnicas diagnósticas propuestas, realizar un mejor diseño del tamaño muestral y someter propuestas de financiación basadas en los resultados preliminares obtenidos.

El estudio piloto consistió en el muestreo de un total de 30 tortugas de la especie *C. porteri* en la isla Santa Cruz. Empleando los resultados obtenidos a partir de este estudio piloto y considerando la factibilidad del muestreo en función de las especies, las condiciones del terreno y la localización, se diseñó el protocolo final para la toma de muestras. Se revisó la literatura referente al cálculo del tamaño muestral, contemplando en ese momento una población de entre 6.000 y 10.000 tortugas de la especie *C. porteri* y un estimado de 6.500 individuos en *C. vandenburghi* en Alcedo (según los datos de IUCN del 2017), con un 95 % de confianza y esperando una prevalencia mínima del 5 % de la población para la presencia de virus y bacterias potencialmente patógenas ( $z = 1,96$ ;  $p = 0.05$ ). Los resultados estimados a través de los cálculos estadísticos sugerían muestrear 200 individuos de cada especie, lo cual, teniendo en cuenta el grado de protección de estas especies, la dificultad de manipulación y la población real accesible debido a su distribución y las características del terreno, resultaba un reto inalcanzable en la práctica. Considerando todos estos factores, no se pudo realizar un muestreo equivalente en todas las diferentes especies y poblaciones de estudio, sino que se centralizaron los esfuerzos de muestreo en la más accesible, *C. porteri*, mientras que para las demás especies se realizó un muestreo oportunista, considerando las circunstancias particulares de cada una y su localidad. Entre abril del 2018 y enero del 2019 se muestrearon los individuos de la isla Santa Cruz, cubriendo en la medida de lo posible toda su área de distribución (en

función de la accesibilidad por vía terrestre, el permiso de los propietarios de las fincas y la abundancia estacional de tortugas), e incluyendo muestras de localidades que presentaban un diferente grado de modificación antropogénica (Figura 21).

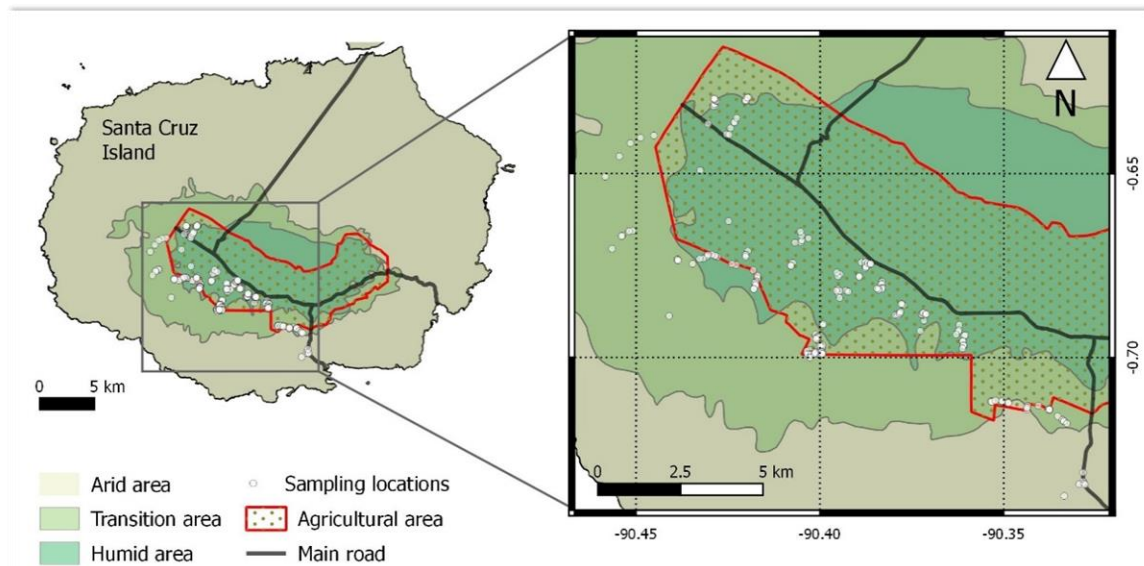


Figura 21. Representación de las localidades de muestreo de la especie *C. porteri* en la isla Santa Cruz. Cada círculo blanco corresponde con un individuo muestreado. Se puede apreciar en el mapa que las tortugas fueron muestreadas dentro y fuera de la zona agropecuaria, delimitada en rojo. Mapa cedido por Carolina Carrión, FCD.

La población del volcán Alcedo en Isabela fue muestreada en julio del 2018 durante una semana de trabajo, en las inmediaciones del cráter y la cumbre del volcán. Para esta fase de campo fue necesario contar con una lancha para el transporte marítimo hasta la isla de Isabela, seguido de una caminata de 17 km hasta la cumbre del volcán, la contratación de dos porteadores para el transporte de los materiales y la comida, y la instalación de un laboratorio de campo en la cumbre del volcán. Este laboratorio incluyó un generador portátil para proveer de energía eléctrica, una centrífuga de tubos Vacutainer 5ml y un congelador portátil para la preservación de las muestras hasta el retorno a la ECCD.

De manera adicional, y como se mencionó anteriormente, tuvimos la posibilidad de acceder al muestreo de otras especies de tortugas terrestres, gracias a la colaboración con la DPNG y *Galapagos Conservancy*. El muestreo de estas especies se realizó de manera oportunista, muestreando en cada caso el mayor número de animales posibles en función de las características del viaje y los medios disponibles.

A continuación, se detallan el número y especies incluídas en cada uno de los componentes de investigación o capítulos de la presente tesis doctoral (Tabla 1).

Tabla 1. Tipo de estudio, especies, número de individuos y localidades de muestreo.

<b>Estudio</b>	<b>Especies</b>	<b>Número individuos</b>	<b>Localidades</b>
<b>Hematología y bioquímica sanguínea</b>	<i>C. porteri</i>	208	Santa Cruz
<b>Agentes infecciosos</b>	<i>C. porteri</i> , <i>C. donfaustoi</i> , <i>C. becki</i> , <i>C. vandenburghi</i> , <i>C. hoodensis</i>	454*	Santa Cruz, Isabela (Wolf y Alcedo), Española
<b>AMR (piloto)</b>	<i>C. porteri</i>	30	Santa Cruz
<b>AMR (comparación entre especies)</b>	<i>C. porteri</i> y <i>C. vandenburghi</i>	270	Santa Cruz e Isabela (Alcedo)

\*Incluye 21 individuos mantenidos en cautividad en el Centro de Crianza Fausto Llerena.

### 3.3.2 CATEGORIZACIÓN DE LAS ZONAS DE MUESTREO

En el estudio piloto se establecieron tres zonas de muestreo de acuerdo con el uso del suelo que determina la zonificación del Plan de Manejo del Parque Nacional Galápagos (DPNG, 2014). La primera zona se encontraba dentro del área agrícola y ganadera (fincas privadas en Occidente y Salasaca), la segunda zona en el área urbana y periurbana (Camiseta y Parque Artesanal) y la tercera zona dentro del área protegida (Cazuela y Las Peñas) (Figura 22).

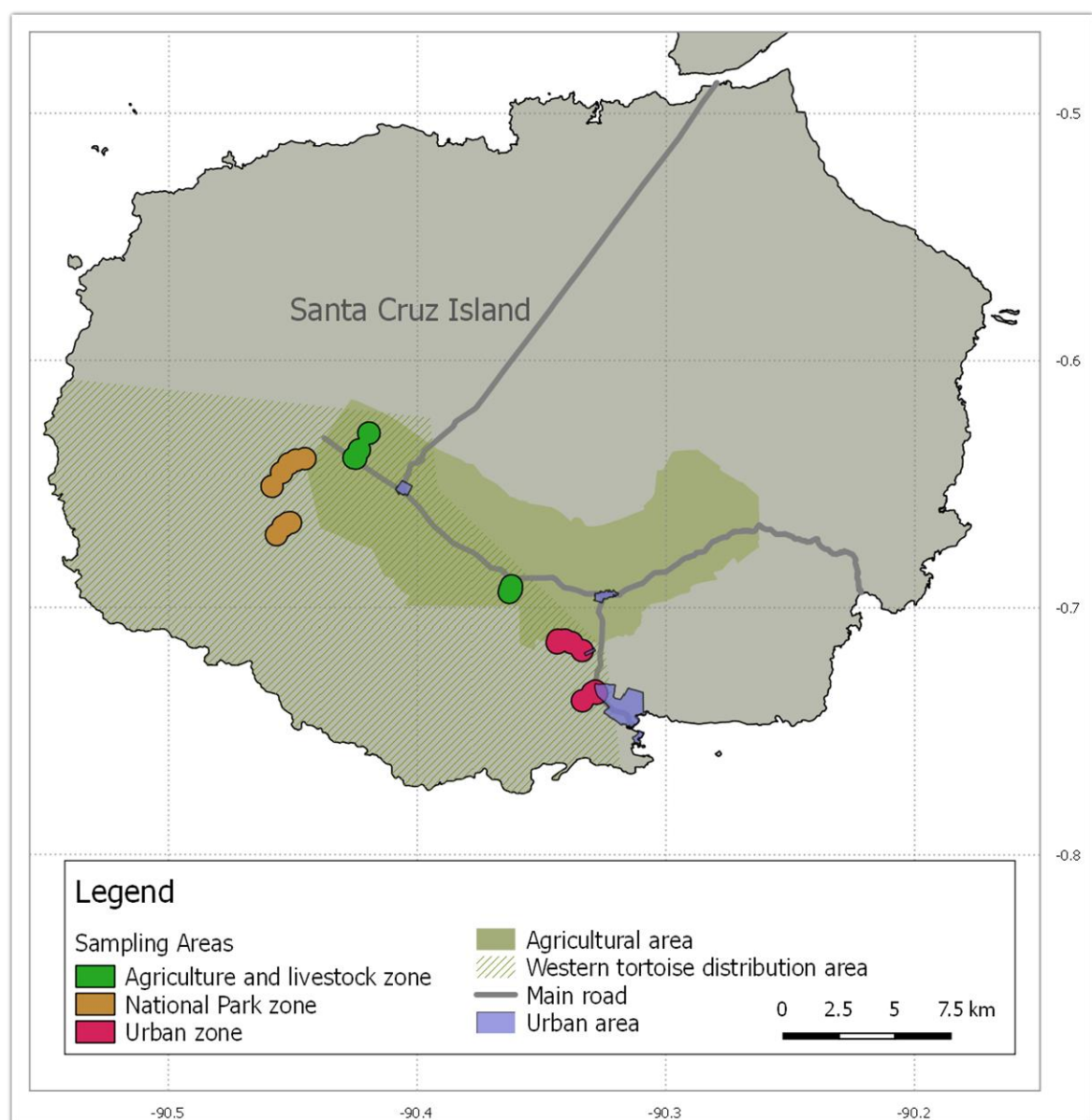


Figura 22. Zonas de muestreo del estudio piloto realizado en la isla Santa Cruz, categorizadas por uso de suelo: zona agropecuaria (verde), zona protegida (naranja) y zona urbana y periurbana (rosa). Mapa cedido por Carolina Carrión, FCD.

Para abordar el estudio final de resistencias se determinaron dos niveles diferentes de categorización en función del uso del suelo y del grado de modificación antropogénica presente en el área de muestreo:

- *Categorización I*: Para evaluar la influencia de las actividades humanas en la isla de Santa Cruz, las zonas de muestreo se agruparon en cuatro categorías: agroganadera, urbana, turística y protegida, incluyendo una nueva zona con respecto al estudio piloto realizado anteriormente.

La zona agroganadera es predominantemente utilizada para la producción de ganado vacuno en sistemas extensivos, con pequeños establos ubicados aledaños a las zonas de forrajeo y permeables al paso de tortugas terrestres. Las zonas de pastoreo están dominadas por pastos introducidos para la alimentación del ganado, combinados con cultivos de cítricos y zonas de sombra en las que se emplean también especies forestales introducidas, como la cedrela (*Cedrela odorata*).

Las zonas periurbanas y urbanas se encuentran aledañas a la ciudad de Puerto Ayora, donde se concentra la mayor parte de la población humana en la isla, y donde las tortugas se distribuyen en la periferia noroeste, entrando en contacto con ecosistemas altamente modificados por la presencia humana, donde se observan numerosos impactos y amenazas para su salud (contacto con animales domésticos y seres humanos, contaminación por plásticos y residuos químicos, contaminación acústica, colisiones con vehículos, depredación por perros, entre otros).

Las zonas turísticas son fincas privadas que se encuentran dentro de la zona de influencia humana de la isla pero que están enfocadas en el turismo sostenible para avistamiento de tortugas en su estado natural. Estas fincas tienen un vallado permeable a las tortugas, de manera que los animales transitan libremente entre las áreas protegidas y las fincas. Las fincas turísticas no realizan actividades agroganaderas y cuentan con pozas de agua y barro naturales o artificiales y grandes áreas de pastos donde las tortugas suelen concentrarse durante la época seca del año.

Las zonas protegidas dentro del Parque Nacional son áreas extensas de la isla donde no se permiten actividades humanas de ningún tipo, a excepción de actividades de investigación y actividades cinegéticas orientadas al control de especies introducidas e invasoras (p. ej. cerdos, burros y cabras ferales). Estas zonas protegidas no están cercadas, solamente señalizadas y comienzan inmediatamente después de las zonas urbanas, agroganaderas y turísticas.

- *Categorización II*: Para realizar el estudio comparativo entre una isla no habitada por seres humanos (volcán Alcedo) frente a una isla con población permanente con diferentes grados de antropización (Santa Cruz) se estableció un gradiente de impacto antropogénico de la siguiente manera: volcán Alcedo (*sin impacto*), zonas protegidas de Santa Cruz (*impacto menor*), zonas turísticas de Santa Cruz (*impacto moderado*) y zonas urbanas y agroganaderas de Santa Cruz (*impacto elevado*).

### 3.4 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Todas las tortugas silvestres fueron muestreadas directamente en el campo, en cada una de las zonas de muestreo establecidas. Para facilitar la manipulación de los individuos y con el objetivo de poder contar con el peso exacto (para determinar su condición corporal), se seleccionaron visualmente aquellos animales que pesaban menos de 250 kg, lo que supuso un cierto sesgo hacia hembras, dado que los machos adultos pueden llegar a alcanzar los 300 kg. Los pocos individuos mantenidos en cautividad e incluidos en el segundo capítulo fueron muestreados dentro de las instalaciones del Centro de Crianza Fausto Llerena, siguiendo la misma metodología que se refiere a continuación.

En primer lugar, se llevó a cabo un examen clínico visual de cada individuo y se registró la presencia de cualquier lesión o anomalía. A continuación, se tomaron fotografías seriadas de cada individuo desde todos los ángulos (cenital, frontal, lateral derecho, posterior, lateral izquierdo y plastrón) y se registraron las medidas

morfométricas (longitud y ancho curvo del caparazón y del plastrón, y longitud de la cola) con una cinta flexible de 150 cm. Las categorías de edad se establecieron, por primera vez, tomando en cuenta el largo curvo del caparazón (CCL), considerando subadultas a aquellas hembras cuyo CCL < 75 cm y a los machos con CCL < 80 cm. Los animales se colocaron en decúbito dorsal para facilitar la manipulación y la toma de muestras. De cada individuo se tomó una muestra de sangre de la vena braquial (hasta 5 ml empleando una jeringa de 6 ml previamente heparinizada y una aguja 20 G- 1,5 pulgadas), hisopados orales, oculares y cloacales, raspados del caparazón, ectoparásitos (en caso de estar presentes) y una muestra de heces directamente de la cloaca. Por último, se registró el peso del animal mediante una balanza colgante, con una precisión de  $\pm 0,5$  kg. Todos los animales fueron identificados de manera individual empleando un microchip subcutáneo (DATAMARS®) ubicado en la región cráneo-ventral femoral de la extremidad posterior izquierda.

Inmediatamente después de coleccionar las muestras de sangre en el campo, éstas fueron empleadas para la realización de dos frotis sanguíneos in situ, con el objetivo de no alterar los recuentos celulares posteriores (Sheldon et al., 2016). Por último, se transfirieron 2 ml de sangre a un tubo heparinizado y la sangre restante fue almacenada en un criotubo de 2 ml para posteriores análisis. Una vez en el laboratorio de la ECCD, las muestras (a excepción de la sangre heparinizada) fueron almacenadas en congelación (-20 °C) hasta su posterior análisis. La determinación del hematocrito y los sólidos totales se llevaron a cabo en las 8 horas posteriores a la toma de las muestras. Las muestras de sangre heparinizada fueron centrifugadas inmediatamente después de realizar el hematocrito (10 min, 1.500 g) y el plasma resultante fue almacenado en congelación hasta su análisis (-20 °C) en la ECCD, realizado durante las dos semanas posteriores a la toma de muestra.

Para analizar la posible presencia de agentes infecciosos (ranavirus, herpesvirus, adenovirus y *Mycoplasma* spp.) tomamos muestras de hisopados orales, conjuntivales y cloacales de todos los individuos. Por cada animal se recolectaron un total de dos hisopados de cada región, que fueron depositados en criotubos y mantenidos en congelación (-20 °C) hasta su análisis en el laboratorio de la ECCD.

Para llevar a cabo la detección de genes de resistencia a antimicrobianos empleamos muestras de heces recolectadas directamente de la cloaca de las tortugas, evitando la contaminación de estas con el suelo u otras superficies. Se recolectaron aproximadamente 25 g de heces de cada individuo y se colocaron en tubos Falcon, almacenados en congelación (-20 °C) en la ECCD y transportados posteriormente al laboratorio del INIA-CISA en Madrid, lugar en que se realizaron los análisis (Figura 23).



Figura 23. Toma muestras de las tortugas silvestres. Pesaje (arriba derecha), toma de muestra de sangre (centro izquierda), hisopado ocular (centro derecha), colocación de microchip (abajo izquierda) y recolección de muestra fecal (abajo derecha). Imágenes cedidas por Joshua Vela y Juan Manuel García, FCD.

### 3.5 DETERMINACIÓN DE LOS INTERVALOS DE REFERENCIA DE HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEAS

El hematocrito (PCV) y la determinación de los sólidos totales (TS) se realizaron basándonos en las técnicas previamente descritas por Sheldon et al. (2016). El hematocrito fue calculado tras la centrifugación en microcapilares (5 min, 1.500 g) y los sólidos totales se calcularon de manera manual empleando un refractómetro clínico (J-351, Jorgensen Laboratories). Los recuentos celulares fueron realizados a partir de los frotis sanguíneos hechos en el campo y teñidos posteriormente en el laboratorio de la ECCD empleando la tinción modificada de Wright Giemsa (Jorvet™ Diff Quick Stain Kit) (Figura 24). Los recuentos celulares fueron llevados a cabo por una sola persona, para evitar en lo posible el sesgo asociado a la subjetividad del recuento manual (J. Palmer, técnica de laboratorio del ICM). La determinación de los leucocitos totales (WBC) se realizó a partir del recuento de 10 campos monocelulares empleando el objetivo de 40x y de acuerdo con la siguiente fórmula:  $WBC (x10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}) = (\text{Promedio 10 campos a 40x}) \times 1.6$  (Sheldon et al., 2016). La determinación del recuento diferencial (WBC Diff %) de la serie blanca fue realizada contando un total de 100 leucocitos en el mismo frotis sanguíneo, empleando el objetivo de 100x. Se calcularon los valores estimados de heterófilos, eosinófilos, linfocitos, basófilos y monocitos, así como la proporción de heterófilos/linfocitos (H:L). Se empleó la siguiente fórmula para calcular los valores absolutos (ABS) de cada tipo celular:  $ABS \text{ WBC Diff } (x10^9 \text{ cells}/L) = [ABS \text{ WBC } (x10^9 \text{ cells}/L)] \times [WBC \text{ Diff } (\%)] \times 0.01$ ; a partir del número total de leucocitos (ABS WBC) y el porcentaje obtenido en el recuento manual para cada tipo celular. Por último, se observó la morfología celular en los frotis sanguíneos con el fin de evidenciar posibles parásitos hemáticos, artefactos, toxicidad celular o cualquier otro hallazgo relevante.

Para la bioquímica sanguínea se usaron rotores VetScan® (Avian/Reptilian Profile) que incluyen la determinación de los siguientes parámetros: albúmina (Alb), ácidos biliares (BA), aspartato aminotransferasa (AST), calcio (Ca), creatina quinasa (CK), glucosa

(GLU), potasio (K), sodio (Na), fósforo (P), globulinas (Glob), proteínas totales (TP) y ácido úrico (UA).



Figura 24. Procesamiento de las muestras de sangre en el campo. Elaboración de frotis sanguíneos inmediatamente después de la toma de muestra en el volcán Alcedo (arriba) y realización de hematocrito y sólidos totales en campo (abajo; izquierda isla Española y derecha volcán Alcedo). Imágenes cedidas por Jorge Carrión y Francisco Laso (GTMEP), y Juan Manuel García y Joshua Vela (FCD).

Para el cálculo de los intervalos de referencia (IR) seguimos las recomendaciones de la Federación Internacional de Bioquímica Clínica y el Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos (Flatland et al., 2013). De acuerdo con estas normas, se requiere de un mínimo de 120 muestras de individuos clínicamente sanos de una población para realizar el cálculo de los intervalos de referencia, para lo cual se recomienda el uso de métodos no paramétricos, que no requieren asumir una distribución particular de los datos. Para el cálculo de valores de referencia en grupos de individuos  $n < 120$  se recomienda el empleo de métodos estadísticos robustos o en su defecto de métodos no paramétricos si la distribución no se ajusta a una gaussiana. De acuerdo con esto, se emplearon métodos no paramétricos para el cálculo de los IR en aquellas variables con  $n > 120$ , mientras que para aquellas variables con  $n < 120$  empleamos métodos robustos no transformados si la distribución era gaussiana, y métodos no paramétricos o métodos

robustos transformados mediante el método de Box-Cox para las variables con distribuciones no gaussianas. Se empleó la herramienta Reference Value Advisor (RefVal) v.2.1 que permite el cálculo de los estadísticos descriptivos (media, mediana, desviación estándar, mínimo y máximo) y se calcularon los IR con un 95 % de confianza, con sus intervalos de confianza (IC 90 %) para cada variable. Para los individuos subadultos (n = 46) de esta misma especie se realizó el cálculo de los valores de referencia, empleando el método más apropiado de acuerdo al número de muestras disponibles para cada variable (Flatland et al., 2013). Para realizar comparaciones entre los diferentes grupos de edad, sexo, época de muestreo, localización y grado de hemólisis empleamos la prueba de ANOVA (análisis de la varianza) o la prueba de Mann-Whitney, en función de la distribución de los datos de cada variable (gaussiana o no gaussiana, respectivamente). Empleamos para ello los programas estadísticos R, Versión 4.0.2 (R Core Team, 2021) e IBM® SPSS *Statistics for Windows*, Versión 25.0.

### **3.6 DETERMINACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE AGENTES INFECCIOSOS**

Los análisis moleculares fueron realizados en la ECCD, donde se instaló en febrero del 2018 un laboratorio portátil de diagnóstico molecular que incluía un termociclador (Bio-Rad MJ Mini), *thermoblocks* (*Thermo Scientific Drybath Stdrd 2blck*) y una cubeta para gel de electroforesis (*Thermo Scientific EC300XL*) con transiluminador (*Invitrogen Safe Imager 2.0*) para la realización de PCR de herpesvirus, adenovirus y micoplasmosis. Aquellos análisis que requerían adicionalmente de rtPCR (p. ej. ranavirus y adenovirus), así como la secuenciación de las muestras positivas se llevaron a cabo en el INIA-CISA en Madrid.

La extracción del ADN se realizó directamente, a partir de los hisopados recogidos en el campo y empleando el kit de extracción de *Qiagen DNeasy Blood & Tissue*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección de adenovirus empleamos en primer lugar una PCR anidada descrita por Wellehan et al. (2004) que utiliza primers universales para detectar una región conservada de 330 pb del gen de la polimerasa. Todas las

muestras extraídas de los hisopados cloacales fueron analizadas con este protocolo y los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1,5 % durante 80 minutos. Se obtuvo un gran número de muestras positivas; sin embargo, la secuenciación de los productos de PCR demostró que muchas de ellas no eran legibles o constituían falsos positivos. En base a estos resultados, se diseñaron nuevos primers degenerados específicos de las secuencias halladas (verdaderos positivos) y se desarrolló un nuevo protocolo de rtPCR basado en *SYBR® Green* (ADV\_Chelonoidis-F: CTTCCAGGRCCTCCWCT; ADV\_Chelonoidis-R: CGTCGACGGAGGTGATGA) que amplifica un fragmento de 207 pb del gen de la polimerasa. Se empleó una reacción de 20 µl que contenía 4 µl de muestra (ADN extraído de hisopados cloacales), 0.8 µl del primer F (20 µM), 0.4 µl del primer R (20 µM) y 10 µl de *Kappa Master Mix* (Sigma Aldrich, España). La amplificación se realizó empleando una temperatura inicial de desnaturalización de 95 °C durante 3 min, seguido de 40 ciclos de amplificación a 95 °C 15 s y 60 °C 30 s.

Para la detección de herpesvirus se empleó un protocolo de PCR convencional con primers degenerados que amplifica una región conservada de 250 pb del gen de la polimerasa (VanDevanter et al., 1996). La detección de *Mycoplasma* spp. se realizó a su vez adaptando un protocolo de rtPCR a un termociclador para PCR convencional, que amplifica una región conservada entre los genes 16S y 23S (Rebelo et al., 2011). Las muestras de ADN extraídas de los hisopados orales y conjuntivales fueron analizadas con ambos protocolos y los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 1,5 %.

Por último, para realizar la detección de ranavirus se empleó un protocolo de rtPCR diseñado en el INIA-CISA por el Dr. Fernando Esperón, utilizando el colorante *SYBR® Green*. Este protocolo amplifica una región de 250 pb del gen que codifica las proteínas de la cápsula de los ranavirus y emplea los siguientes primers: ranaV-F 5'-TTACATCCTCAACGCCTGGT-3'; ranaV-R 5'-GAGATCGCTGGTGTTCCTA-3'. La amplificación se realizó a 95 °C durante 3 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C 15 s y 65 °C 30 s.

Se empleó secuenciación Sanger para todos aquellos productos de PCR susceptibles de ser positivos. Las muestras fueron consideradas como verdaderos positivos siempre y cuando se obtuviera una secuencia clara, y se realizaron las búsquedas en BLAST para todas las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas. Las secuencias de adenovirus se alinearon con otras 18 secuencias de adenovirus obtenidas a través del

*GenBank* mientras que las secuencias de herpesvirus se alinearon con 23 secuencias de herpesvirus. Posteriormente se calcularon las distancias filogenéticas ( $p$ ) para las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas alineadas. Los árboles filogenéticos de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se realizaron empleando el método de máxima verosimilitud, con una frecuencia de arranque de 1000 réplicas empleando *Mega7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 7.0 for bigger datasets* (Kumar et al., 2016). Se empleó la prueba de Chi cuadrado para explorar diferencias en la prevalencia de agentes infecciosos entre las diferentes especies de tortuga ( $p < 0.05$ ). Solo en el caso de la isla Santa Cruz, donde las muestras fueron recolectadas durante las dos estaciones del año, se realizó un estudio exploratorio empleando la prueba de Chi cuadrado para determinar la influencia de la estacionalidad en la prevalencia de agentes infecciosos.

### **3.7 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS**

La extracción de ADN se realizó directamente a partir de las muestras fecales, usando una técnica de filtración por presión (*QuickGene DNA Tissue Kit S, Fujifilm, Japan*) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción de las muestras fue validada mediante la amplificación del gen ARNr 16S en diluciones en base 10, empleando rtPCR (Jiang et al., 2013) y considerando como válidas aquellas muestras que presentaran un ciclo umbral (ct) inferior a 25 (Esperón et al., 2018). Una vez validadas, las muestras fueron analizadas para un panel de 21 genes antimicrobianos (ARGs) que codifican resistencia para ocho clases diferentes de antimicrobianos: tetraciclinas (*tetA*, *tetB*, *tetY*, *tetK*, *tetM*, *tetQ*, *tetS* y *tetW*), sulfonamidas (*sulI* y *sulII*), aminoglucósidos (*str* y *aadA*), fenicoles (*catI* y *catII*), macrólidos (*ermB* y *ermF*), quinolonas (*qnrS* y *qnrB*),  $\beta$ -lactámicos (*blaTEM* y *mecA*) y polimixinas (*mcr-1*). Empleamos primers ya descritos con anterioridad, a excepción del gen *mcr-1*, para el que se diseñó un set de primers en el laboratorio del INIA-CISA (*mcr-1F*: 5'-TGATACGACCATGCTCCAAA-3'; *mcr-1R*: 5'-GCCACCACAGGCAGTAAAT-3') (Tabla 2).

Tabla 2. Genes de resistencia a antimicrobianos incluidos en el estudio, clasificados de acuerdo con las familias antimicrobianas a que pertenecen, su mecanismo de acción y la referencia bibliográfica correspondiente.

Resistencia a	Gen	Referencia bibliográfica
Aminoglucósidos	<i>aadA</i>	Devarajan et al., 2016
	<i>str</i>	Wang et al. 2014
β-lactámicos	<i>blaTEM</i>	Devarajan et al., 2016
	<i>mecA</i>	Francois et al., 2003
Macrólidos	<i>ermB</i>	Chen et al., 2007
	<i>ermF</i>	Chen et al., 2007
Fenicoles	<i>catI</i>	Jiang et al., 2013
	<i>catII</i>	Jiang et al., 2013
Polimixinas	<i>mcr-1</i>	Nieto-Claudín et al., 2019
Quinolonas	<i>qnrB</i>	Cummings et al., 2011
	<i>qnrS</i>	Marti & Balcazar, 2013
Sulfonamidas	<i>sulI</i>	Jiang et al., 2013
	<i>sulII</i>	Jiang et al., 2013
Tetraciclinas	<i>tetA</i>	Jiang et al., 2013
	<i>tetB</i>	Jiang et al., 2013
	<i>tetK</i>	Jiang et al., 2013
	<i>tetM</i>	Jiang et al., 2013
	<i>tetQ</i>	Jiang et al., 2013
	<i>tetS</i>	Jiang et al., 2013
	<i>tetW</i>	Jiang et al., 2013
	<i>tetY</i>	Jiang et al., 2013

Para cuantificar la carga porcentual de bacterias de cada muestra que presentan genes resistentes se empleó la siguiente fórmula desarrollada en el laboratorio del INIA-CISA:  $\% \text{ ARG} = 10[2+0.33(\text{ct}16\text{SrRNA}-\text{ctARG})]$ , donde 16SrRNA hace referencia a la determinación del gen 16S bacteriano, ARG a cada gen y 0,33 es la pendiente media de los genes analizados. Los resultados se expresan en forma logarítmica, en un rango de -8 (muestra negativa) hasta + 2 (límite máximo de detección, con un 100 % de las bacterias

de la muestra portando el gen de resistencia). Para la detección de cada uno de estos 21 genes se empleó el siguiente protocolo de rtPCR: [6 min 95 °C, 40× (95 °C 10 s, 60 °C 30 s)], realizando el alineamiento y la extensión en un mismo paso, a una temperatura constante de 60 °C. Las muestras fueron consideradas *microbiomas multirresistentes* si presentaban ARGs que codificaban resistencia para un mínimo de tres clases antimicrobianas diferentes, de acuerdo a la descripción realizada por Blanco-Peña et al., (2017).

Se realizó la estadística descriptiva de los resultados cuantitativos obtenidos para cada uno de los ARGs (máximo, mínimo, media, mediana). En el estudio piloto se realizó además un mapa de calor mediante agrupamiento jerárquico. Para abordar el análisis estadístico del estudio comparativo de resistencias entre Alcedo y Santa Cruz, se analizó la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se estudiaron las diferencias entre los grupos de estudio mediante la prueba de Mann-Whitney, comparando entre las dos especies (volcán Alcedo y Santa Cruz), entre los grupos de sexo, edad (adultos y subadultos) y época de muestreo (seca y húmeda). Se empleó la prueba de Kruskal Wallis con un análisis post hoc de Bonferroni para evaluar diferencias entre las cuatro zonas de estudio de la isla Santa Cruz, todas sometidas a algún tipo de impacto o modificación de origen antropogénico (Categorización I). La hipótesis nula se rechazó para un valor de  $p < 0,05$ .

Para explorar el papel que las actividades humanas juegan en la dispersión de ARGs se aplicó un modelo de regresión logística, evaluando la presencia de microbiomas multirresistentes y de resistencias para las ocho diferentes clases antimicrobianas, usando al volcán Alcedo como población de referencia (Categorización II). Para aquellas variables de recuento se empleó una regresión de Poisson (número de ARGs y número de clases antimicrobianas por muestra). Se estimó el Odds Ratio y sus IC 95 %. El análisis estadístico se realizó empleando el programa IBM® SPSS *Statistics for Windows*, Versión 25.0. Por último, se realizó un estudio espacial que establece patrones de distribución de los datos obtenidos, aplicando herramientas de asignación de clústeres, mediante el análisis de puntos calientes basado en la metodología de Getis-Ord *Gi Statistic* (Getis & Ord, 1992) y empleando el programa ArcGIS [Software GIS], Versión 10.6.1 (Redlands, CA: Environmental Systems Research Institute, Inc., 2010). Este modelo nos permite

identificar aquellos individuos que presentan significativamente más ARGs de lo esperado en una distribución aleatoria, considerando la distancia y el valor relativo con respecto a la media esperada. Un *punto caliente* está por tanto formado por aquellos individuos que presenten niveles relativamente elevados de ARGs y que se encuentren a su vez rodeados por otros individuos que también presenten niveles elevados de ARGs. El modelo identifica donde se pueden producir los agrupamientos espaciales significativos mediante el cálculo probabilístico, estableciendo una gradación a partir de la puntuaciones  $z$  (DE) y los valores de  $p$ , asumiendo una distribución normal de los datos (Zhang, 2008). Un valor alto de  $z$  ( $\geq 1,65$ ) representa un punto caliente por el agrupamiento de valores significativamente altos ( $p \leq 0,1$ ); mientras que un valor de  $z$  bajo ( $< -1,65$ ) representa un *punto frío* donde se agrupan valores significativamente bajos. Un valor de  $z$  próximo a cero indica que no existe agrupación espacial.



## **RESULTADOS**



# **CAPÍTULO I**

*Hematología y bioquímica*



## Título

*Haematology and plasma biochemistry reference intervals for the critically endangered western Santa Cruz Galapagos tortoise (Chelonoidis porteri).*

## Resumen

Establecer los intervalos de referencia (IR) de los parámetros hemáticos y bioquímicos es una herramienta esencial para monitorear la salud de las poblaciones de animales silvestres, tanto en libertad como en cautividad. Las tortugas gigantes de las Galápagos son uno de los animales más emblemáticos, con nueve de sus doce especies consideradas en peligro de extinción debido a diversas actividades antropogénicas. Como parte del monitoreo a largo plazo de la salud de las tortugas se muestrearon un total de 210 individuos silvestres de la isla Santa Cruz (*Chelonoidis porteri*), obteniendo sangre de la vena braquial para estudiar los siguientes parámetros hemáticos: hematocrito (PCV), sólidos totales (TS), evaluación morfológica de las células sanguíneas, recuento total (WBC) y diferencial de leucocitos, así como un panel bioquímico de cada uno de los individuos (albúmina, ácidos biliares, aspartato aminotransferasa, calcio, creatina quinasa, glucosa, potasio, sodio, fósforo, globulinas, proteínas totales y ácido úrico). Se estimaron los IR 95 % (IC 90 %) empleando la herramienta *Reference Value Advisor* y se siguieron las directrices internacionales de la Federación Internacional de Bioquímica Clínica y el Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos. Las tortugas fueron categorizadas según su edad en adultas (n = 164) y subadultas (n = 46) y se estimaron los valores de IR y IC para uno de los parámetros analizados. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en función del sexo, donde las hembras adultas mostraron un hematocrito más bajo y valores más elevados de calcio y potasio que los

machos. Comparando entre los grupos de edad, se observó que las tortugas adultas presentan valores más elevados de PCV, TS y albúmina, y valores más bajos para WBC, aspartato aminotransferasa y creatina quinasa. Además, las tortugas presentaron mayor número de linfocitos durante la época seca, pero mayor número de basófilos, eosinófilos, fósforo, potasio y TS durante la temporada húmeda. Los leucocitos predominantes encontrados en las tortugas gigantes de Galápagos fueron los linfocitos y la proporción heterófilos/linfocitos no presentó diferencias entre los distintos grupos de edad y sexo. Bajo nuestro conocimiento, éste es el primer estudio que presenta valores de referencia de hematología y bioquímica sanguínea en tortugas gigantes silvestres de Galápagos. Este trabajo provee una herramienta diagnóstica de gran interés e importancia clínica para los programas de cría en cautividad de tortugas de las Galápagos, así como para instituciones zoológicas y centros de recuperación que alberguen tortugas de Galápagos y proyectos de investigación y manejo de tortugas gigantes silvestres. El objetivo final es contribuir a llenar el vacío de información relativo a la línea base sobre el estado de salud de las tortugas gigantes, para asesorar en las decisiones de manejo que a nivel local contribuyen a la conservación de estas especies en el archipiélago.

### **Referencia**

Nieto-Claudín, A., Palmer, J.L., Esperón, F. & Deem, S.L. (2021). Haematology and plasma biochemistry reference intervals for the critically endangered western Santa Cruz Galapagos tortoise (*Chelonoidis porteri*). *Conservation Physiology*, 9(1), coab019; <https://doi:10.1093/conphys/coab019>.

### **Factor de Impacto y Posición de la Revista**

IF 3,079. Q2 Biodiversity Conservation, Q2 Ecology (JCR, 2020).

### **Proceedings**

Nieto-Claudín, A., Deem, S.L., Guezou, A., Cabrera, F. & Blake, S. (2022, February 7-9). *Conservación de tortugas gigantes desde una perspectiva de One Health* [Conference presentation]. II Simposio Internacional Galápagos-Israel. Sostenibilidad en las Islas Galápagos: Siglo XXI y más allá. Fundación Charles Darwin, Santa Cruz, Ecuador.

# Haematology and plasma biochemistry reference intervals for the critically endangered western Santa Cruz Galapagos tortoise (*Chelonoidis porteri*)

Ainoa Nieto-Claudín<sup>1,2,3,\*</sup>, Jamie L. Palmer<sup>2</sup>, Fernando Esperón<sup>3,4</sup> and Sharon L. Deem<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Charles Darwin Foundation, Charles Darwin Ave., Santa Cruz, 200350, Galapagos Islands, Ecuador

<sup>2</sup> Saint Louis Zoo Institute for Conservation Medicine, One Government Drive, Saint Louis, MO 63110, USA

<sup>3</sup> Complutense University of Madrid, Veterinary Faculty, Puerta de Hierro Ave, Madrid, 28040, Spain

<sup>4</sup> INIA-CISA, Algete-El Casar Road, Valdeolmos, 28130, Spain

\* **Corresponding author:** Charles Darwin Foundation, Charles Darwin Ave., Santa Cruz, 200350, Galapagos Islands, Ecuador. Tel: +593 983342944. Email: [ainoa.nieto@fcdarwin.org.ec](mailto:ainoa.nieto@fcdarwin.org.ec)

Reference intervals (RIs) are an increasingly valuable tool for monitoring captive and free-living wildlife populations. Galapagos tortoises are one of the most emblematic species on Earth with 9 of the 12 extant species considered endangered due to human activities. As part of a long-term health assessment within the Galapagos Tortoise Movement Ecology Programme, we sampled a total of 210 free-living Santa Cruz Galapagos tortoises (*Chelonoidis porteri*). We collected blood from the brachial vein and performed packed cell volume (PCV), total solids (TS), morphological evaluation, white blood cell (WBC) count estimates and differentials and a VetScan biochemistry panel for each individual. We calculated 95% RIs and 90% confidence intervals (CIs) using the Reference Value Advisor tool and following international standard guidelines. Tortoises were categorized by estimated age and sex, with RI and CI reported here for 164 adult tortoises and 46 sub-adult tortoises. We found significant differences between sexes, with adult females presenting a lower PCV and higher values for both calcium and potassium. Among age groups, adult tortoises presented higher PCV, TS and albumin and lower WBC counts, aspartate aminotransferase and creatine kinase than sub-adult tortoises. We also found that tortoises presented higher numbers of lymphocytes during the dry season, but higher basophils, eosinophils, phosphorus, potassium and TS during the humid season. The heterophil:lymphocyte ratio did not differ between groups. To the authors' knowledge, this is the first report of formal plasma biochemistry and haematology RI for free-living Galapagos tortoises. With the present study we provide an important diagnostic tool for captive-breeding programs in the Galapagos and zoological institutions globally that care for giant tortoises. The ultimate goal of this study is to contribute to the understanding of giant tortoise baseline health parameters and to inform local management decisions that help to conserve these emblematic species.

**Key words:** Baseline, giant tortoises, health, reference values, wildlife surveillance

**Editor:** Steven Cooke

Received 9 November 2020; Revised 8 February 2021; Editorial Decision 24 March 2021; Accepted 29 March 2021

**Cite as:** Nieto-Claudín A, Palmer JL, Esperón F, Deem SL (2021) Haematology and plasma biochemistry reference intervals for the critically endangered western Santa Cruz Galapagos tortoise (*Chelonoidis porteri*). *Conserv Physiol* 9(1): coab019; doi:10.1093/conphys/coab019.

## Introduction

Reference values are typically reported as reference intervals (RIs) comprising 95% of a healthy reference population (Dybæk and Solberg, 1987). Since their introduction for human medicine in 1969, population-based RIs have become one of the most common tools used in clinical decision-making processes for both human and veterinary medicine (Friedrichs et al., 2012; Siest et al., 2013).

Guidelines specifically addressing veterinary species have numerous benefits to the veterinary medical community. In response to this need, the American Society of Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) formed a subcommittee to generate guidelines for de novo determination of RI in veterinary species (available on [www.asvcp.org](http://www.asvcp.org)). The ultimate goal was to develop balanced and practical recommendations that are statistically and clinically valid (Friedrichs et al., 2012).

*In situ* health evaluations of wildlife species, including reptiles, have been shown to be a valuable tool for monitoring free-living populations and reintroduction programs (Deem et al., 2001, 2011; Lecq et al., 2014). Health evaluations often include physical examination data along with complete blood cell counts, morphological evaluation and biochemical analysis, which provide important information about the health of individuals, as well as the population being studied (Deem et al., 2009; Atkins et al., 2010; Boers et al., 2020). Due to the logistical difficulties of describing RIs for all wildlife species, using RIs from a taxonomically related species may be helpful in some situations; however, conclusions should be drawn with extreme caution due to wide variation among species (Heatley and Russell, 2019).

The Galapagos Islands retain most of their original biodiversity, with a total of 58 reptile species described within the archipelago (Arteaga et al., 2019). The most iconic and emblematic species are the giant Galapagos tortoises (*Chelonoidis* spp.). Over the past few decades, the taxonomy of Galapagos tortoises has undergone a number of major shifts and revisions; however, it is currently accepted by the international union for conservation of nature (IUCN) that 14 different species once inhabited the archipelago (2 extinct, 6 critically endangered, 3 endangered and 3 vulnerable) (IUCN, 2020). The western Santa Cruz tortoise (*Chelonoidis porteri*) is native to Santa Cruz Island, the most human-populated island of the Galapagos archipelago. Whereas the estimated population for this species is considered as 3400 individuals by the IUCN (Cayot et al., 2017), no census has been conducted in the past decade. Based on our current studies, we estimate a population that exceeds 6000 individuals (Blake et al., unpublished data).

Much research has been conducted to assess the ecology, biology and genetics of giant tortoises, whereas very little is known about the health status of these species. Current threats include habitat loss and fragmentation, illegal trade, introduced and invasive species, global warming, egg loss

due to introduced predators, disease, trauma and possibly antimicrobial resistance (Blake et al., 2012; Ellis-Soto et al., 2017; Bastille-Rousseau et al., 2019; Nieto-Claudin et al., 2019). Several studies have been published to describe RI for chelonian species globally; however, there was only one study on giant tortoises describing haematology and blood biochemistry parameters for 32 giant tortoises (*Chelonoidis chathamensis*) at a captive-breeding facility on San Cristóbal Island (Lewbart et al., 2018), and no morphological evaluation of blood cells was documented. RIs of animals under human care are increasingly available and of great value (Species360, 2021). However, RIs calculated for free-living populations are based on animals in a more natural state with diet and other environmental factors often different from what may be provided to collection animals.

For this study, we calculated biochemical and haematology RI and described cell morphology along with morphometric measurements, body weight and body condition index from 164 free-living adults and 46 sub-adults of the Western Santa Cruz tortoise (*C. porteri*). To the authors' knowledge, this is the first publication of formal RI of plasma biochemistry and haematology for any free-living Galapagos tortoises. The present study contributes to the understanding of giant tortoise baseline health parameters, as well as provides an important diagnostic resource for veterinarians and researchers at zoological and private collections to captive-breeding programs and local wildlife rescue networks.

## Materials and methods

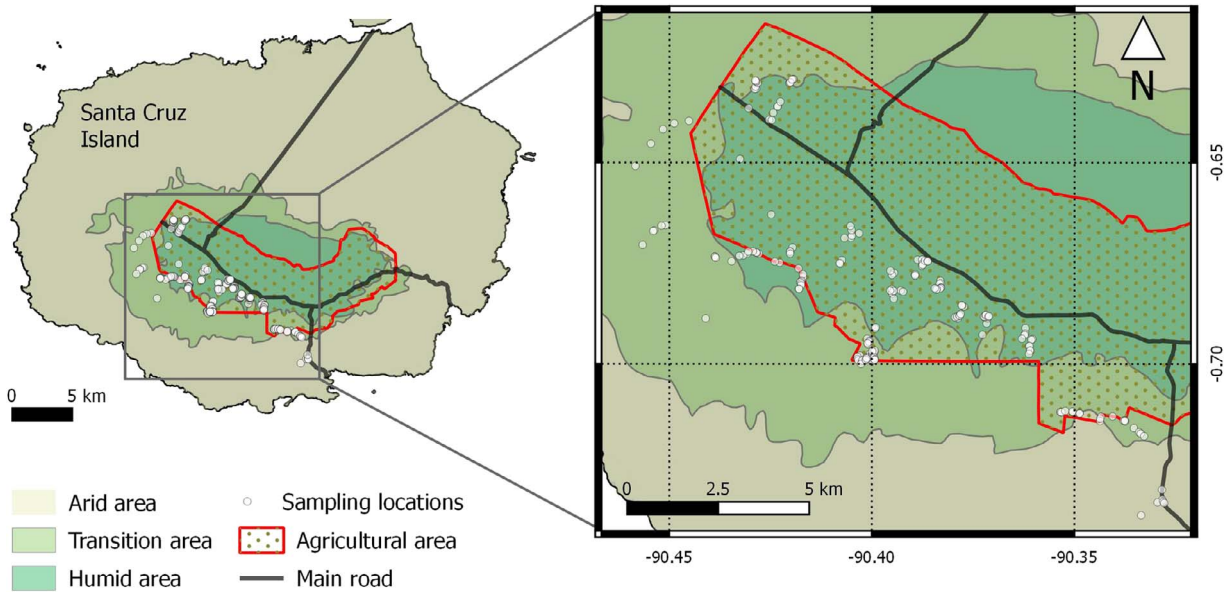
### Study site

The study site, Santa Cruz Island, is an extinct volcano that rises to a maximum elevation of 860 m in the Galapagos Archipelago. Santa Cruz is the most human-populated island of the archipelago, although almost 90% of its territory is considered national park. Tortoises were randomly sampled from different locations along their seasonal migration routes including humid and transitional habitats throughout the national park (protected areas), touristic reserves, rural (agricultural, livestock) and urban (within Puerto Ayora town limits) zones (Fig. 1). We classified those sampling areas along a gradient of anthropogenic impacts (park, tourism, urban and farming), with 'park' the most protected area and 'farming' and 'urban' the most impacted by human activities.

### Sampling design and collection

We collected tortoise biological samples as part of a long-term health assessment within the Galapagos Tortoise Movement Ecology Programme. From 2017 to 2020, we sampled 210 free-ranging western Santa Cruz tortoises for several health research purposes.

To facilitate animal handling, we randomly selected individuals weighing less than 200 kg. We recorded physical



**Figure 1:** Sampling locations of 210 free-living Galapagos tortoise (*C. porteri*) on Santa Cruz Island, Galapagos.

condition and morphometric measurements using a flexible 150-cm measuring tape. Measurements included curved carapace length (CCL), curved carapace width, curved plastron length, curved plastron width and tail length (TL). In addition, we used a hanging scale to weigh each tortoise with a precision of  $\pm 0.5$  kg. We performed a physical examination and determined the sex in mature animals by tail length and plastron concavity. We classified immature animals (sub-adults) based on CCL. Despite the number of scientific publications on Galapagos tortoises, none have established a size-based age categorization for these species. For this reason, we determined age categories based on our 11 years of fieldwork experience with giant tortoises as follows: a CCL of  $<75$  cm for immature females and  $<80$  cm for immature males. We calculated the body condition index (BCI) as follows:  $BCI = m/L^{2.89}$  where  $m$  is mass (kg) of the tortoise and  $L$  is CCL (cm) (Blake *et al.*, 2015).

We collected up to 5 mL of blood from the brachial vein of each tortoise with a 6-mL heparinized syringe and a 20-G 1.5-inch needle, and we made two blood films immediately at the field site for complete and differential blood cell counts (Sheldon *et al.*, 2016). We fixed blood films for 2 min by using high-quality methanol (Fixative 1, Jorvet™ Diff Quick Stain Kit, Jorgensen Laboratories, USA), air dried, labelled with tortoise ID and stored in a slide box. Up to 3 mL of blood was immediately transferred to a lithium heparin tube to avoid clotting and the remaining blood was placed in a sterile cryovial. We kept heparinized blood at 4°C until analysis within the same day. We also collected a number of other biomaterials (e.g. faeces, oral, cloacal and ocular swabs, carapace scrapes, blood on Whatman® FTA card) as part of an on-going health assessment of Galapagos tortoises across

islands and species. We identified tortoises by microchips previously placed by Galapagos National Park Service rangers. If no microchip was detected, we placed a new subcutaneous microchip (DATAMARS®) in the caudo-ventral area of the left hind leg.

### Haematology and plasma biochemistry

We performed packed cell volume (PCV) and total solids (TS) from heparinized blood samples within 8 hr of sample collection. PCV was determined using high-speed centrifugation of blood-filled microhematocrit tubes and manual TS via plasma analysis with a clinical refractometer (J-351, Jorgensen Laboratories, USA). We immediately separated plasma by high-speed centrifugation (1500 g, 10 min) and kept frozen at  $-20$  C until biochemistry was performed within 2 weeks of collection.

We stained all blood films with a modified Wright Giemsa stain (Jorvet™ Diff Quick Stain Kit, Jorgensen Laboratories, USA) following manufacturer's instructions. While mammalian haematology can be performed using automated cell counters, reptilian haematologic analyses require manual methods that are technically challenging and more imprecise (Stacy *et al.*, 2011). Each method has a different set of benefits and limitations; however, estimates from blood films method is inexpensive and allows for the observation of leukocyte abnormalities such as toxic heterophils or intra-cellular inclusions (Heatley and Russel, 2019; Winter *et al.*, 2019). To reduce inter-analyses variability and inaccuracy, a well-trained technician (J.P.) performed all leukocyte quantification methods, leukocyte differentials and morphological evaluations. We determined

the estimated total white blood cell (WBC) counts on the highest quality field blood film from each tortoise. WBC counts were read at 40× magnification on 10 different fields of the monolayer and averaged using the following equation:  $\text{WBC} (\times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}) = (\text{AVG } 10 \text{ field on } 40\times) \times 1.6$  (Sheldon *et al.*, 2016). We performed WBC differential counts by examining 100 WBCs on the same blood film at 100× magnification. We calculated estimated values (%) for heterophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils. We determined heterophil:lymphocyte ratio (H:L) from the differential. Absolute values (ABS) for each white cell morphotype were calculated as follows:  $\text{ABS WBC Diff} (\times 10^9 \text{ cells/L}) = [\text{ABS WBC} (\times 10^9 \text{ cells/L})] \times [\text{WBS Diff} (\%)] \times 0.01$ . Blood cell morphology evaluation is an essential part of the WBC assessment and can be used to identify evidence of cell toxicity and pathogen presence (mainly parasites) (Stacy *et al.*, 2011). Modified Wright-Giemsa stain, though useful and easy to use in the field, can lead to damage of cells and under-staining of some cell characteristics (Campbell, 2006). Diff Quick was still our staining method of choice due to its ease of use in remote field areas.

We performed biochemistry (Avian/Reptilian VetScan® Profile) on frozen-thawed plasma. The biochemical panel included albumin (Alb), bile acids (BA), aspartate aminotransferase (AST), calcium (Ca), creatine kinase (CK), glucose (GLU), potassium (K), sodium (Na), phosphorus (P), globulin (Glob), total protein (TP) and uric acid (UA).

We collected all samples under the Galapagos National Park annual research permits PC-36-17, PC-35-18, PC-16-19 and PC-28-20 and the International Animal Care and Use Committee from the Group of Rehabilitation of Endemic Wildlife Species (GREFA-Spain) with registration number 17/001. All samples were processed and analysed at the Charles Darwin Research Station. We performed WBC counts at the Saint Louis Zoo Institute for Conservation Medicine. CITES permits 18EC000001/PG and 19EC000001/PG and importation CITES permits 18US62698C/9 and 19US62698C/9 were used for the transportation of samples out of Ecuador.

## Statistical analyses

We used Reference Value Advisor (RefVal) v.2.1 to perform descriptive statistics (mean, median, SD, min and max) and computed 95% RI and 90% confidence intervals (CIs) for each variable. We followed ASVCP recommendations, which are based on guidelines by the International Federation for Clinical Chemistry and the Clinical and Laboratory Standards Institute (Flatland *et al.*, 2013). According to the ASVCP, non-parametric methods are recommended for RI calculations when  $\geq 120$  reference samples are available and do not require assumption of a particular distribution of the data. Therefore, we used non-parametric methods to report RI and CI of adult tortoise variables when there are  $\geq 120$  reference samples. Although robust methods are preferred when there are  $< 120$  reference values, nonparametric methods can be used when

the distribution of reference data is not Gaussian (Flatland *et al.*, 2013). For variables with sample sizes  $< 120$ , we provide RI and CI using untransformed robust methods for Gaussian distributed data and non-parametric or Box–Cox-transformed robust methods for non-Gaussian distributed data.

We assessed symmetry and distribution of data using the Anderson–Darling test, whereby  $P \geq 0.05$  was considered to be indicative of normality and symmetry, and by visual evaluation of data histograms fitted with a Gaussian distribution curve. We evaluated the distribution of each physical measurement, haematologic and plasma biochemistry variable separately for the entire sample population, age group and sex. We identified outlier values by RefVal using Dixon and Tukey's range tests. We closely analysed every suspected outlier and manually removed only those in which we could attribute the cause due to poor sample quality or analytic error. The ASVCP guidelines recommend partitioning the sample population into subgroups for RI and CI only if there are  $\geq 40$  or if there are clear clinical reasons. We report RI and CI separately for our total sample population of adults and sub-adult tortoises.

According to whether distribution was normal (N) or non-normal (NN), respectively, we used ANOVA (one-way analyses of variance) or Mann–Whitney *U* Test (Wilcoxon Rank Sum Test) to test for differences in all plasma biochemistry and haematology parameters between age and sex classes, sampling season and location. Additionally, we took the same approach, using ANOVA or Mann–Whitney *U* to test for differences in plasma biochemistry and haematology parameters between grades of hemolysis (considering Grade 1 as Hemo  $\leq 1$  and Grade 2 as Hemo  $> 1$  based on VetScan reports). We performed the analyses in R 4.0.2 and IBM® SPSS Statistics 25.

## Results

Based on our morphological classification, we sampled 46 (30.5%) sub-adults and 164 (78%) adult tortoises [111 (67.7%) females and 53 (32.3%) males]. All individuals were determined to be in good health based on physical evaluations and BCI score, considering a BCI of  $> 0.1$  as acceptable (Blake *et al.*, 2015) and having an average BCI of 0.14 for adults and sub-adults. There was a significant difference in body mass and length between sexes with males having an average CCL of  $109.5 \pm 17.9$  cm and weight of  $102.1 \pm 33.8$  kg, whereas females had an average CCL of  $91.2 \pm 9.2$  and weighed  $69.5 \pm 21.8$  kg ( $P < 0.001$ ). Tortoise tail length also varied by sex with males having an average TL of  $9.2 \pm 3.5$  cm and females an average TL of  $4.9 \pm 1.1$  cm ( $P < 0.001$ ). Sub-adult individuals were significantly smaller than adults with an average CCL of  $67.8 \pm 6.5$  cm, TL of  $4.1 \pm 0.8$  cm and weighed  $29.7 \pm 7.2$  kg ( $P < 0.001$ ).

We performed manual PCV and TS for all 210 blood samples, although only 159 (75.7%) individuals were examined

**Table 1:** Nonparametric RIs and CIs of haematology parameters for western Santa Cruz adult tortoises (*C. porteri*)

Analyte	SI units	N	Mean	Median	±SD	Min	Max	LRI	URI	90% LCI	90% UCI	Distrib.
PCV	%	156	21.1	22.0	3.0	14	28	14	26.1	14.0–16.0	26.0–28.0	NN
WBC	$\times 10^9/L$	127	19.4	17.1	9.2	5.6	42.2	6.6	40.3	5.6–7.0	37.6–42.2	NN
Heterophils	%	127	11.5	9.0	7.1	1	39	2.2	29.8	1.0–3.0	23.0–39.0	NN
ABS het	$\times 10^9/L$	127	2.0	1.7	1.3	0.2	6.1	0.3	5.3	0.2–0.5	4.6–6.1	NN
Lymphocytes	%	127	79.3	82.0	10.5	47	96	55.0	94.8	47.0–58.0	93.0–96.0	NN
ABS lymph	$\times 10^9/L$	127	15.8	13.8	8.6	3	38	4.5	36.3	3.0–5.1	32.3–38.0	NN
Monocytes	%	127	1.6	1.0	1.5	0	6	0.0	5.0	0.0–0.0	5.0–6.0	NN
ABS mono	$\times 10^9/L$	127	0.3	0.2	0.3	0	1.6	0.0	1.2	0.0–0.0	0.9–1.6	NN
Eosinophils	%	127	3.3	2.0	4.3	0	20	0.0	17.0	0.0–0.0	12.0–20.0	NN
ABS eos	$\times 10^9/L$	127	0.5	0.3	0.6	0	2.8	0.0	2.2	0.0–0.0	1.7–2.8	NN
Basophils	%	127	4.3	4.0	2.7	0	11	0.0	10.0	0.0–0.0	9.0–11.0	NN
ABS baso	$\times 10^9/L$	127	0.7	0.6	0.5	0	2.8	0.0	2.1	0.0–0.0	1.7–2.8	NN
H:L ratio		127	0.2	0.1	0.1	0.01	0.67	0.0	0.5	0.0–0.0	0.4–0.7	NN

for WBC estimate and differentials due to difficult field and weather conditions that caused blood smears to have poor cell quality.

In [Table 1](#), we report nonparametric RI and CI of haematology variables in adult tortoises. In [Table 2](#), we report RI and CI for sub-adult tortoises and the method used for calculations.

We found significant statistical differences among male and female adult tortoises for PCV ( $P < 0.001$ ) with males presenting higher haematocrit than females (mean PCV: 20.7% for females and 22% for males). Likewise, we found significant statistical differences among age groups for manual PCV ( $P < 0.001$ ) and TS ( $P < 0.001$ ), with adults having higher values for both parameters. We also found differences among adults and sub-adult tortoises for WBC estimates ( $P = 0.002$ ), with adults having lower WBC when compared to sub-adults, and for lymphocytes ( $P = 0.026$ ) and basophils ( $P = 0.021$ ), with adults having slightly fewer lymphocytes and more basophils than sub-adults. The H:L was lower in subadult tortoises (0–0.3) when compared to adults (0–0.5) but this difference was not significant. H:L did not differ between the sexes.

There were significant differences for some haematological parameters based on sampling season. Tortoises of all ages presented a higher number of lymphocytes during the dry season ( $P = 0.009$ ) and a higher number of basophils during the humid season ( $P = 0.002$ ). Adult tortoises also showed a slightly higher number of eosinophils during the humid season ( $P = 0.017$ ). The main morphological characteristics of the blood cells are provided in [Fig. 2](#). Drying artefacts were present in approximately half of the blood slides, which we attributed to poor field conditions, including rain and

humidity, which can both affect cell quality and lead to slide artefacts. Mature erythrocytes were oval with dense chromatin in the nucleus and basophilic inclusions in some cases ([Fig. 2d](#)). Vacuoles in the cytoplasm of the erythrocytes were observed, although infrequently. Immature red blood cells (RBCs) were also infrequently observed, smaller and rounder, with a basophilic cytoplasm, less dense chromatin in the nucleus and some mitotic figures ([Fig. 2e](#)). Lymphocytes were the most predominant leukocyte ( $79.3 \pm 10.5$ ). The nucleus was dark with dense, clumped chromatin and cytoplasm ranged from light to dark blue in colour. In most cases, the lymphocytes were easy to distinguish from thrombocytes as thrombocyte cytoplasm was clear to light blue and the nucleus was typically elongated, and chromatin looked smooth ([Fig. 2a](#)). Lymphocyte-like cells where the cytoplasm could not be differentiated from thrombocytes were not included in the total WBC counts or differentials. Heterophils were the second most predominant leukocyte ( $11.5 \pm 7.1$ ). The nucleus was round or lobed, eccentric, with a slightly clear cytoplasm and rod shaped, pink and glass-like refractive granules ([Fig. 2c and d](#)). In some tortoises, the granules were fused and therefore difficult to observe. In all tortoises, most heterophils had light grey, circular intracytoplasmic inclusions. This characteristic helped with differentiation between heterophils and eosinophils. Nuclei in eosinophils were typically round, eccentric and dark with grey to clear cytoplasm. Granules were round, less densely packed and stained darker than heterophil granules, ranging from dark pink to purple grey ([Fig. 2b](#)). Monocytes were identified by their cytoplasm to nucleus ratios, larger, often kidney-shaped nucleus and presence of cytoplasmic vacuoles. Azurophils were counted as monocytes for the differential as is recommended for all reptiles except snake species ([Stacy et al., 2011](#)). Azurophils were morphologically difficult

**Table 2:** RIs and CIs of haematology parameters for western Santa Cruz sub-adult tortoises (*C. porteri*) and the method used for calculations

Analyte	SI units	N	Mean	Median	±SD	Min	Max	LRI	URI	90% LCI	90% UCI	Distrib.
PCV	%	46	18.6	19.0	4.0	10	26	10.0	26	10.0–12.4	24.1–26.0	N
WBC <sup>a</sup>	×10 <sup>9</sup> /L	32	25.7	26.9	10.6	4.2	45.6	4.6	49.1	1.0–9.6	43.6–54.0	N
Heterophils <sup>a</sup>	%	30	9.2	9.0	5.0	1	19	0.6	21.4	0.0–2.4	18.2–24.5	N
ABS het <sup>a</sup>	×10 <sup>9</sup> /L	30	2.3	2.3	1.3	0.2	5.1	0.0	5.2	0.0–0.2	4.4–5.9	N
Lymphocytes <sup>b</sup>	%	30	84.5	85.0	6.7	68	96	68.7	96.7	63.0–73.7	94.0–99.4	N
ABS lymph <sup>b</sup>	×10 <sup>9</sup> /L	30	22.5	24.9	9.2	6.0	40.1	5.4	43.5	2.3–9.2	37.6–49.8	N
Monocytes <sup>c</sup>	%	30	1.3	1.0	1.0	0	3	0.0	3.4	0.0–0.0	2.9–3.8	NN
ABS mono <sup>d</sup>	×10 <sup>9</sup> /L	30	0.3	0.3	0.3	0	1.2	0.0	1.0	0.0–0.0	0.8–1.2	NN
Eosinophils <sup>c</sup>	%	30	1.8	1.0	2.3	0	9	0.0	6.6	0.0–0.0	4.6–8.4	NN
ABS eos <sup>c</sup>	×10 <sup>9</sup> /L	30	0.4	0.2	0.6	0	2.0	0.0	1.6	0.0–0.0	1.0–2.0	NN
Basophils <sup>c</sup>	%	30	3.2	3.0	2.1	0	9	0.0	7.5	0.0–0.0	6.1–8.8	NN
ABS baso <sup>d</sup>	×10 <sup>9</sup> /L	30	0.8	0.6	0.7	0	3.4	0.0	2.2	0.0–0.0	1.5–2.8	NN
H:L ratio <sup>a</sup>		30	0.1	0.1	0.1	0.01	0.26	0.0	0.3	0.0–0.0	0.2–0.3	N

The sample size was too small ( $n < 40$ ) to calculate a nonparametric RI for some parameters. Alternative statistical methods were used after checking the symmetry of the distribution.

<sup>a</sup>Robust method with a Box-Cox transformation.

<sup>b</sup>Standard method with a Box-Cox transformation.

<sup>c</sup>Untransformed standard method.

<sup>d</sup>Untransformed robust method.

to distinguish from monocytes (Fig. 2d). Basophils were small, with densely packed dark purple granules throughout the cytoplasm often covering the nucleus. The nuclei were dark purple and difficult to distinguish from the granules in the cytoplasm. Some basophils showed a degranulated image (Fig. 2b, c and f). No structures compatible with hemoparasites were observed.

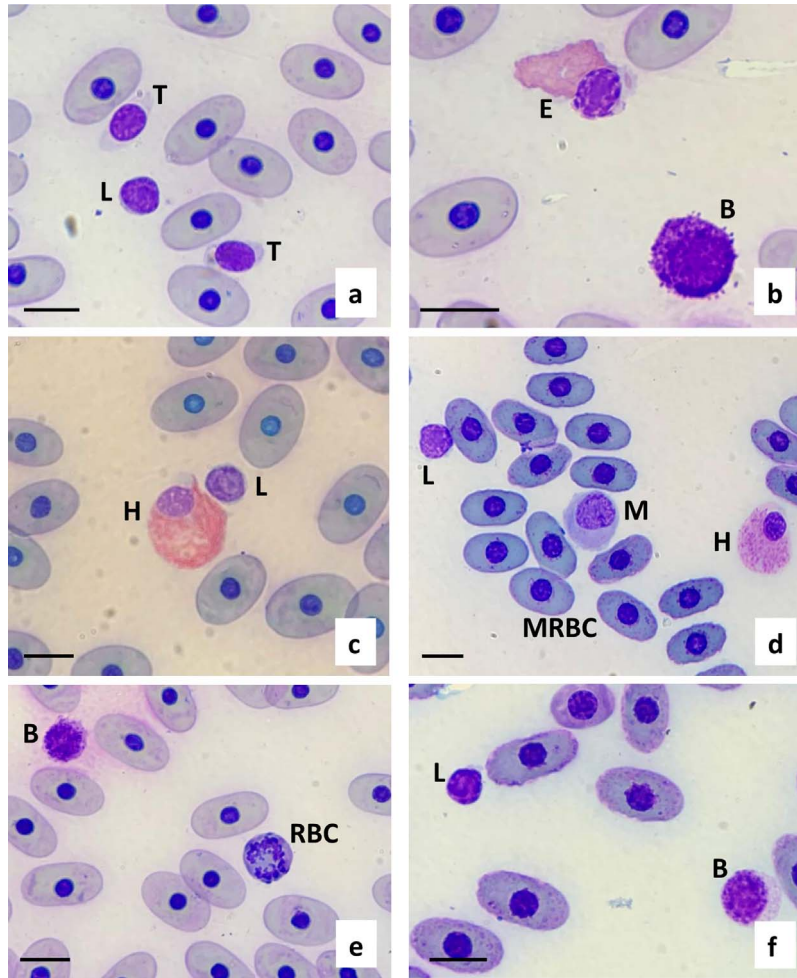
We ran a total of 210 Vetscan avian/reptilian panels, with 3 (1.4%) panels cancelled due to internal quality issues detected by the Vetscan VS2 analyser. The system also reported 52 (24.8%) instances in which one or more analyte was outside of the linear range of the analyser, but the remaining analytes were correctly analysed and reported. Typically, this finding was noted in the Alb, Glob and/or CK analytes. For Ca and K, several samples were reported beyond the detection range of the analyser. A total of 12 samples reported Ca > 16 mg/dl, whereas 7 samples reported Ca > 20 mg/dl. All 19 samples corresponded to adult females and only 3 showed hemolysis of >1. A total of 54 samples reported K > 8.5 mmol/L (41 adults and 13 subadults) with 64.8% (35/54) of these results corresponding to hemolytic samples (hemolysis > 1). For these two instances (Ca and K) and in order to calculate the RI, we were very conservative and gave the closest numeric value (16.1 mg/dl for Ca > 16, 20.1 mg/dl for Ca > 20 and 8.6 mmol/L for K > 8.5). Bile acids were not calculated by the VetScan analyser and were reported as <35 µmol/L in all 210 samples so we were not able to calculate RI for this analyte.

We found statistically significant differences between grades of hemolysis for several plasma chemistry variables. However, RI calculations using all samples vs. only hemolysis grade 1 samples computed the same intervals for all analytes except K. For this reason, we report RI and CI using the total number of samples for all analytes but K. For K we report RI and CI only for samples with hemolysis of ≤1. In Tables 3 and 4, we report nonparametric RI and CI of plasma biochemistry variables in adult and sub-adult tortoises, respectively.

We found significant statistical differences among male and female adult tortoises for Ca ( $P = 0.009$ ) and P ( $P < 0.001$ ) with females presenting higher values for both parameters (mean: females, Ca = 12.9 and  $P = 4.2$  mg/dl; males, Ca = 11 and  $P = 3.9$  mg/dl). We found differences among age groups, with adults showing higher TP ( $P < 0.001$ ) and Alb ( $P < 0.001$ ), and lower AST ( $P = 0.004$ ) and CK ( $P = 0.012$ ) than sub-adults. However, some of these differences might be due to the sample size variability (only 46 sub-adults when comparing to 164 adults).

We found significant differences for some biochemistry parameters based on sampling season. Tortoises of all ages presented higher values for P ( $P = 0.003$ ), K ( $P = 0.035$ ) and TS ( $P = 0.026$ ) during the humid season.

Tortoises sampled within the national park area showed a higher AST during the humid season, when compared to the dry season (mean: 66.6 and 48.3 U/L, respectively)



**Figure 2:** Modified Wright-Giemsa stained peripheral blood from a Galapagos tortoise (*C. porteri*) showing L, lymphocyte; T, thrombocyte; H, heterophil; B, basophil; M, monocyte (most likely azurophil); E, eosinophil; MRBC, mature red blood cell with basophilic inclusions in the cytoplasm; RBC, immature mitotic red blood cell (size bar, 10  $\mu$ m).

( $P=0.019$ ). We explored differences among sampling areas and found that tortoises sampled within the national park showed higher values of AST than those sampled within farming areas during the same humid season ( $P=0.003$ ). By contrast, tortoises within the farming areas presented a higher Alb during the humid season when compared to the dry season ( $P<0.001$ ) with an average of 1.9 g/dL during the humid season and 1.5 g/dL during the dry season.

## Discussion

Despite the ecological and economic importance of giant tortoises for the Galapagos archipelago, very little is known about their health status. With this study we contribute to the understanding of giant tortoise baseline health parameters with formal RIs for the critically endangered western Santa Cruz giant tortoise (*C. porteri*).

Lewbart *et al.* (2018) reported biochemistry and haematology parameters of 32 San Cristóbal Galapagos tortoises (*C. chathamensis*), housed at a captive-breeding facility and using an iSTAT portable clinical analyser. When compared to their results, we obtained higher values for both adult and sub-adult tortoises for mean K, Glu and TS (K, 7.6 vs. 4.4 mmol/L; Glu, 70.9 vs. 45.5 mg/dL; and TS, 6.5 vs. 5.2 mg/dL, respectively, in adult tortoises). Despite the fact that their study used a different analyser and tortoise species and a much smaller sample size, results from it fit within the RI that we have calculated for Santa Cruz tortoise species.

Estimations of PCV and TS were reported by several authors in different species of giant tortoises (Knafo *et al.*, 2011; Rivera *et al.*, 2011; Blake *et al.*, 2015; Lewbart *et al.*, 2018), but sample sizes were smaller than 40 individuals in all of these studies. PCV (%) values were very similar between previous studies and the present study, whereas TS (mg/dL)

**Table 3:** Nonparametric RIs and CIs of plasma biochemistry parameters for western Santa Cruz adult tortoises (*C. porteri*)

Analyte	SI units	N	Mean	Median	±SD	Min	Max	LRI	URI	90% LCI	90% UCI	Distrib.
TS	mg/dL	161	6.5	6.2	1.2	4	11	4.6	9.8	4.0–4.8	8.6–11.0	NN
AST	U/L	153	46.9	44.0	15.2	22	112	24.9	84.2	22.0–27.0	78.0–112.0	NN
CK	U/L	143	2024.8	1558	1432.1	99	6124	260.0	5296.0	99.0–409.0	4953.0–6124.0	NN
UA	mg/dL	159	1.8	1.8	0.6	0.5	3.4	0.8	3.2	0.5–0.9	2.9–3.4	N
GLU	mg/dL	157	70.9	68.0	23.7	15	132	26.7	123.2	15.0–35.0	117.0–132.0	N
CA	mg/dL	145	12.0	11.4	2.6	6.8	20.1	7.8	20.1	6.8–9.0	16.1–20.1	NN
FOS	mg/dL	155	4.1	4.1	0.6	2.7	5.8	3.2	5.4	2.7–3.3	5.2–5.8	NN
TP	g/dL	160	5.9	5.8	0.9	3	8.4	3.7	7.7	3.0–4.5	7.4–8.4	N
ALB	g/dL	147	1.6	1.6	0.4	1	2.6	1.1	2.5	1.0–1.1	2.3–2.6	NN
GLOB	g/dL	145	4.3	4.2	0.8	2.4	6.8	2.9	5.9	2.4–3.1	5.5–6.8	N
NA	mmol/L	151	126.6	126.0	5.2	114	144	116.8	138.2	114.0–119.0	135.0–144.0	NN
K	mmol/L	159	7.6	7.7	1	3.3	8.6	5.3	8.6	3.3–5.9	8.6–8.6	NN
K <sup>a</sup>	mmol/L	81	7.4	7.5	1.1	3.3	8.6	4.1	8.6	3.3–5.4	8.6–8.6	NN

<sup>a</sup>Potassium RI calculated only for samples with hemolysis ≤1.

**Table 4:** Nonparametric RIs and CIs of plasma biochemistry parameters for western Santa Cruz sub-adult tortoises (*C. porteri*)

Analyte	SI units	N	Mean	Median	±SD	Min	Max	LRI	URI	90% LCI	90% UCI	Distrib.
TS	mg/dL	46	5.4	5.5	1	3.4	7.2	3.4	7.2	3.4–4.2	7.0–7.2	N
AST	U/L	44	54.6	51	16.8	31	96	31.0	95.5	31.0–32.4	82.0–96.0	N
CK	U/L	41	2534.8	2286	1321.4	556	5227	56.1	5225.0	556.0–899.2	4632.0–5227.0	N
UA	mg/dL	46	1.9	1.8	0.7	0.7	4.2	0.7	4.0	0.7–0.8	2.7–4.2	N
GLU	mg/dL	45	76.2	79.0	26.3	32	131	32.5	130.9	32.0–36.9	121.0–131.0	N
CA	mg/dL	45	11.6	11.6	1.3	6.8	14	7.2	13.9	6.8–10.0	13.4–14.0	N
FOS	mg/dL	46	4.1	4.1	0.6	2.8	5.4	2.8	5.4	2.8–3.5	4.8–5.4	N
TP	g/dL	46	5.1	5.1	0.9	2.5	7.1	2.7	7.0	2.5–3.8	6.1–7.1	N
ALB <sup>a</sup>	g/dL	26	1.3	1.3	0.3	0.7	2	0.7	1.9	0.6–0.9	1.7–2.1	N
GLOB <sup>b</sup>	g/dL	23	4.1	4.0	0.8	2.8	6	2.6	5.9	2.3–3.0	5.4–6.5	N
NA	mmol/L	45	127.4	128.0	5.0	117	138	117.5	137.9	117.0–120.3	136.4–138.0	N
K	mmol/L	46	7.8	7.9	0.9	4	8.9	4.4	8.8	4.0–6.7	8.6–8.9	NN

The sample size was too small ( $n < 40$ ) to calculate a nonparametric RI for some parameters. Alternative statistical methods were used after checking the symmetry of the distribution.

<sup>a</sup>Standard method with a Box-Cox transformation.

<sup>b</sup>Robust method with a Box-Cox transformation.

differed in some of the reports with lower values in [Rivera et al. \(2011\)](#) and [Lewbart et al. \(2018\)](#). However, all results fit within the RI that we have calculated for both parameters.

WBC estimates and differentials were reported by [Sheldon et al. \(2016\)](#) in a study to compare leucocyte quantification methods. Results from their study, using the same methodology, concluded lower values for WBC estimates, absolute

heterophils and lymphocytes, but report similar values for absolute monocytes and basophils and slightly higher results for absolute eosinophils. However, all [Sheldon et al. \(2016\)](#) results fit within the RI that we report here for all parameters. By contrast, [Lewbart et al. \(2018\)](#) reported WBC estimates and differentials percentages for a different species of giant tortoise (*C. chathamensis*) maintained at a captive breeding center. They used a different methodology, performing WBC

counts at 10× instead of 40× magnification and multiplied by 2000 so we did not compare this with our results. Interestingly, they reported a very high percentage of heterophils (46%) and monocytes (17%), whereas we found giant tortoises to be lymphocyte dominant (79.3%) with a low percentage of monocytes (1.6%), as in agreement with Sheldon *et al.* (2016). The H:L also supports that haematology of giant tortoises is lymphocyte predominant (H:L ≤ 0.5). Differences found among studies are most likely due to species-specific reasons and/or captive vs. free-living variations.

To the author's knowledge, this is the first complete description of erythrocyte and leukocyte morphology for free-living giant Galapagos tortoises. Inclusions, vacuoles and immature figures can be observed in reptilian RBC due to a variety of processes including sample collection method, field conditions, stress, poor slide preparation or staining and/or disease (Heatley and Russel, 2019; Rodríguez *et al.*, 2018). Mitotic figures in circulating reptile RBC have been described as normal findings (Sykes and Klaphake, 2008), whereas erythrocytes in chelonians may contain basophilic cytoplasmic inclusions, thought to be degenerating organelles or haemoglobin precipitates, with no pathologic significance (Stacy *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2016). Cytoplasmic vacuoles, mitotic and immature figures were infrequently observed in the current study, and the authors associate these findings with the poor quality of the slides and the abundance of artefacts due to the high humidity and rain during field slide preparation. Heterophil inclusions have been observed in sick captive giant tortoises with no difference upon recovery (personal communication from Dr Nicole Stacy, University of Florida). Based on our experience evaluating giant tortoise slides from tortoises deemed healthy by physical examination, and from a number of *Chelonoidis* spp. and considering that light inclusions were found in most heterophils, we conclude no pathologic significance of heterophil inclusions in the hemogram.

Variability in haematology and plasma biochemistry values is known to exist both within and between reptilian species. This variation has been attributed to environmental conditions such as climate, season and toxins, as well as nutrition, age, sex, population dynamics, method of collection, sample handling and biochemical assay method (Deem *et al.*, 2009; Scope *et al.*, 2013; Boers *et al.*, 2020). This is also true for our findings on lymphocytes, eosinophils, basophils, P, K and TS, in which we report different values according to the season; as well as differences found in Alb and AST among sampling areas. Seasonal changes in plasma enzymes, electrolytes, metabolites and proteins have been described for a wide variety of reptile species (Heatley and Russel, 2019), whereas sampling location might also be correlated with different migratory patterns and different foraging strategies as demonstrated to influence tortoise fitness (Blake *et al.*, 2015). Seasonal plasma increases of total calcium and phosphorous in free-living and captive females during vitellogenesis occurs in all major reptile taxa (Deem *et al.*, 2009; Scope *et al.*, 2013, Heatley and Russel, 2019), which explains the higher results

obtained in adult females. Adult reptiles tend to have greater concentrations of albumin and therefore total protein than sub-adults and juveniles (Heatley and Russel, 2019), which also supports our results of higher TP, Alb and TS in adult giant tortoises. Additionally, it is important to highlight that Galapagos tortoises do not go through hibernation as many other turtle species, and therefore we can find actively reproductive individuals year-around in Santa Cruz, with a peak mating season between November and March (humid season) and the peak nesting season between July and September. Clinical interpretation of enzyme activity remains minimally studied in reptiles. CK and AST are commonly evaluated in reptile biochemistry profiles. Increased AST may be derived in large quantities from muscle, liver, or other tissues (Heatley and Russel, 2019) or may be attributed to muscle and/or liver injury; although they may also be associated with a high level of exercise and musculoskeletal wear, as may occur in migratory tortoises.

The precision of the point-of-care Vetscan VS2 analyser has been described as accurate for some turtle species and parameters (Atkins *et al.*, 2010). Based on our findings, some analytes in giant tortoises should be evaluated and/or confirmed with additional testing methods (BA, Ca, K, CK, Alb, Glob), as was also described in sea turtles and other reptile species (Gibbons *et al.*, 2019). The VetScan system reported instances mainly for Alb and Glob and parameters were also affected by the quality of the sample, so we recommend additional methods when testing captive or sick individuals for these parameters. The Avian/Reptilian VetScan profile cannot be used to calculate BA in giant tortoises as the values appear to be below the lower detection limit of the analyser. Moreover, the upper detection limits of the Avian/Reptilian profile for Ca and K are below the normal values found within healthy giant tortoises, mainly reproductive females. Lastly, using the VetScan analyser, there was a poor level of precision for CK. Laboratory-based technology, when available, may be better to evaluate biochemical parameters in these species due to these limitations.

In conclusion, this study contributes to the baseline database of health parameters for Galapagos tortoises. These data may be helpful for the Galapagos National Park Service personnel in efforts to preserve these species, free-living in the National Park and at captive-breeding centers, as well as for monitoring the health and welfare of giant tortoises within private and zoological institutions around the world. Future research should focus on establishing RIs for all Galapagos tortoise species to facilitate comparisons and a deeper understanding of tortoise eco-physiology and pathology.

## Funding

This work was supported by the Saint Louis Zoo's Field Research for Conservation (FRC) program (FRC#2018.03), Saint Louis Zoo WildCare Institute Center for Chelonian

Conservation, Charles Darwin Foundation, Houston Zoo, Galapagos Conservation Trust, Ecoventura, Linda Esler and Miss Karen Lo.

## Conflict of Interest Statement

Ainoa Nieto Claudín, Jamie Palmer, Fernando Esperón, and Sharon L. Deem declare there is no conflict of interest.

We followed all institutional and national guidelines for the care and use of animals. We collected samples under the Galapagos National Park annual research permits PC-36-17, PC-35-18, PC-16-19 and PC-28-20 and the International Animal Care and Use Committee from GREFA, Spain, with registration number 17/001. All samples were processed and analyzed at the Charles Darwin Research Station. We performed WBC at the Saint Louis Zoo Institute for Conservation Medicine. We transported samples under exportation CITES permits 18EC000001/PG and 19EC000001/PG and importation CITES permits 18US62698C/9 and 19US62698C/9.

## Acknowledgments

A special recognition for their contribution goes to the Galapagos National Park Directorate, Stephen Blake, Nicole Stacy, Freddy Cabrera, José Haro, Casilda Rodríguez, Anne Guezou, Karina Ramón, Laura Kleinschmidt, Surya Castillo, Irene Peña, Kathleen Apakupakul, Maris Brenn-White, Kathy Ziegler, Santiago Cano, Adrián Navas, Jane Merkel and Carolina Carrión. This publication is contribution number 2386 of the Charles Darwin Foundation for the Galapagos Islands.

## References

- Arteaga A, Bustamante L, Vieira J, Tapia W, Guayasamin JM (2019) *Reptiles of the Galápagos: Life on the Enchanted Islands*. Tropical Herping, Quito, 208 pp.
- ASVCP Quality Assurance and Laboratory Standards Committee (QALS) Guidelines for the Determination of Reference Intervals in Veterinary Species. [https://cdn.ymaws.com/www.asvcp.org/resource/resmgr/QALS/Other\\_Publications/RI\\_Guidelines\\_For\\_ASVCP\\_webs.pdf](https://cdn.ymaws.com/www.asvcp.org/resource/resmgr/QALS/Other_Publications/RI_Guidelines_For_ASVCP_webs.pdf). (Accessed 8 October 2020).
- Atkins A, Jacobson E, Hernandez J, Bolten AB, Lu X (2010) Use of a portable point-of-care (Vetscan Vs2) biochemical analyzer for measuring plasma biochemical levels in free-living Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*). *J Zoo Wildl Med* 41: 585–593.
- Bastille-Rousseau G, Yackulic CB, Gibbs JP, Frair JL, Cabrera F, Blake S (2019) Migration triggers in a large herbivore: Galápagos giant tortoises navigating resource gradients on volcanoes. *Ecology* 100: 1–11.
- Blake S, Guézou A, Deem SL, Yackulic CB, Cabrera F (2015) The dominance of introduced plant species in the diets of migratory Galapagos tortoises increases with elevation on a human-occupied Island. *Biotropica* 47: 246–258.
- Blake S, Wikelski M, Cabrera F, Guezou A, Silva M, Sadeghbaybi E, Yackulic CB, Jaramillo P (2012) Seed dispersal by Galapagos tortoises. *J Biogeogr* 39: 1961–1972.
- Boers KL, Allender MC, Novak LJ, Palmer J, Adamovicz L, Deem SL (2020) Assessment of hematologic and corticosterone response in free-living eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*) at capture and after handling. *Zoo Biol* 39: 13–22.
- Campbell TW (2006) Clinical pathology of reptiles. In DR Mader, ed, *Reptile Medicine and Surgery*, Ed2nd. Elsevier, St. Louis (MO), pp. 453–470
- Cayot LJ, Gibbs JP, Tapia W, Caccone A (2017) *Chelonoidis porteri*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T9026A82777132. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T9026A82777132.en> (Accessed 28 September 2020).
- Deem SL, Karesh WB, Weisman W (2001) Putting theory into practice: wildlife health in conservation. *Conserv Biol* 15: 1224–1233.
- Deem SL, Norton TM, Mitchell M, Segars A, Rick Alleman A, Cray C, Poppenga RH, Dodd M, Karesh WB (2009) Comparison of blood values in foraging, nesting, and stranded loggerhead turtles (*Caretta caretta*) along the coast of Georgia, USA. *J Wildl Dis* 45: 41–56.
- Deem SL, Parker PG, Cruz MB, Merkel J, Hoeck PEA (2011) Comparison of blood values and health status of Floreana mockingbirds (*Mimus trifasciatus*) on the islands of Champion and Gardner-by-Floreana. *Bull Wildl Dis Assoc* 47: 94–106.
- Dybkaer R, Solberg HE (1987) Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 6. Presentation of observed values related to reference values. *Clin Chim Acta* 170: S33–S41.
- Ellis-Soto D, Blake S, Soultan A, Guézou A, Cabrera F, Lötters S (2017) Plant species dispersed by Galapagos tortoises surf the wave of habitat suitability under anthropogenic climate change. *PLoS One* 12: 1–16.
- Flatland B, Freeman KP, Vap LM, Harr KE (2013) ASVCP guidelines: quality assurance for point-of-care testing in veterinary medicine. *Vet Clin Pathol* 42: 405–423.
- Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, Szladovits B, Walton RM, Barnhart KF, Blanco-Chavez J (2012) ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet Clin Pathol* 41: 441–453.
- Gibbons P, Whitaker B, Carpenter J, McDermott C, Klaphake E, Sladky K (2019) Hematology and biochemistry tables. In S Divers, S Stahl, eds, *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery*, Ed3rd. Elsevier, St. Louis (MO), pp. 333–350.e2.
- Heatley JJ, Russell KE (2019) Hematology and clinical chemistry. In SJ Divers, SJ Stahl, eds, *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery*, Ed3rd. Elsevier, St. Louis (MO), pp. 301–318.e3.

- Hernández JD, Orós J, Ariles M, Castro P, Blanco A (2016) Ultrastructural characteristics of blood cells in the yellow-bellied slider turtle (*Trachemys scripta scripta*). *Vet Clin Pathol* 45: 106–109.
- IUCN (2020) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-3. <https://www.iucnredlist.org> (Accessed 14 October 2020).
- Knafo SE, Divers SJ, Rivera S, Cayot LJ, Tapia-Aguilera W, Flanagan J (2011) Sterilisation of hybrid Galapagos tortoises (*Geochelone nigra*) for island restoration. Part 1: endoscopic oophorectomy of females under ketamine-medetomidine anaesthesia. *Vet Rec* 168: 47. doi:10.1136/vr.c6520
- Lecq S, Ballouard JM, Caron S, Livoreil B, Seynaeve V, Matthieu LA, Bonnet X (2014) Body condition and habitat use by Hermann's tortoises in burnt and intact habitats. *Conserv Physiol* 2: 1–10.
- Lewbart GA, Savo A, Ortega C, Loyola A, Roberts S, Schaaf G, Steinberg D, Osegueda SB, Levy MG (2018) Biochemistry and hematology parameters of the San Cristóbal Galápagos tortoise (*Chelonoidis chathamensis*). *Conserv Physiol* 6: 1–8.
- Nieto-Claudin A, Esperón F, Blake S, Deem SL (2019) Antimicrobial resistance genes present in the faecal microbiota of free-living Galapagos tortoises (*Chelonoidis porteri*). *Zoonoses Public Health* 66: 900–908.
- Rivera S, Divers SJ, Knafo SE, Martinez P, Cayot LJ, Tapia-Aguilera W (2011) Sterilisation of hybrid Galapagos tortoises (*Geochelone nigra*) for island restoration. Part 2: phallectomy of males under intrathecal anaesthesia with lidocaine. *Vet Rec* 168: 47.
- Rodríguez CE, Henao-Duque AM, Steinberg J, Woodburn DB (2018) Clinical pathology. Chelonia. In KA Terio, D McAloose, J St. Leger, eds. *Pathology of Wildlife and Zoo Animals*. Elsevier, CA, United States, pp. 829–832.
- Scope A, Schwendenwein I, Schauburger G (2013) Characterization and quantification of the influence of season and gender on plasma chemistries of Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*, Gmelin 1789). *Res Vet Sci* 95: 59–68.
- Sheldon JD, Stacy NI, Blake S, Cabrera F, Deem SL (2016) Comparison of total leukocyte quantification methods in free-living Galapagos tortoises (*Chelonoidis* spp.). *J Zoo Wildl Med* 47: 196–205.
- Siest G, Henny J, Gräsbeck R, Wilding P, Petitclerc C, Queraltó JM, Hyltoft Petersen P (2013) The theory of reference values: an unfinished symphony. *Clin Chem Lab Med* 51: 47–64.
- Solberg H (1986) Approved recommendation on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 25: 337–342.
- Species360 Zoological Information Management System (ZIMS) (2021) <https://www.zims.Species360.org>.
- Stacy NI, Alleman AR, Saylor KA (2011) Diagnostic hematology of reptiles. *Clin Lab Med* 31: 87–108.
- Sykes JM, Klaphake E (2008) Reptile hematology. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 11: 481–500.
- Winter JM, Stacy NI, Adamovicz LA, Allender MC (2019) Investigating the analytical variability and agreement of manual leukocyte quantification methods in eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). *Front Vet Sci* 6: 1–9.
- Zhang F, Gu H, Li P (2011) A review of chelonian hematology. *Asian Herpetol Res* 2: 12–20.



# **CAPÍTULO II**

*Agentes infecciosos*



### **Título**

*Health assessments uncover novel viral sequences in five species of Galapagos tortoises.*

### **Resumen**

Las enfermedades infecciosas son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en numerosas especies silvestres, incluyendo a las tortugas, siendo las actividades humanas uno de los factores que más contribuye a la dispersión de enfermedades. Las tortugas gigantes de Galápagos continúan amenazadas debido al impacto directo o indirecto de acciones antropogénicas en el archipiélago (p. ej. fragmentación del hábitat, especies invasoras, tráfico ilegal), sin embargo se desconoce hasta la fecha qué agentes infecciosos están presentes en estas especies. Con el objetivo de identificar microorganismos potencialmente patógenos en las tortugas gigantes, se muestrearon un total de 454 individuos procedentes de las islas de Santa Cruz, Isabela y Española. Empleamos técnicas moleculares (PCR y rtPCR) para detectar la presencia de adenovirus, herpesvirus, *Mycoplasma* spp. y ranavirus. Un total de 31 individuos resultaron positivos para adenovirus y 12 para herpesvirus; sin embargo, no se detectó la presencia de ranavirus o *Mycoplasma* spp. en las muestras analizadas. Identificamos dos secuencias nucleotídicas diferentes de adenovirus (AdVntST-1 y AdVntST-2) que traducen en dos secuencias aminoacídicas (AdVaaST-1 y AdVaaST-2), formando entre ambas un clado común. Estas secuencias presentaron bajas

identidades (por debajo del 80 %) con las secuencias descritas en el *Genbank*, por lo que tentativamente se clasificaron como dos nuevos adenovirus, denominados: *Chelonoidis adenovirus 1* (CheAdV1) y *Chelonoidis adenovirus 2* (CheAdV2). Se identificaron adicionalmente cuatro secuencias nucleotídicas de herpesvirus (HVntST-1, HVntST-2, HVntST-3 y HVntST-4). Las tres primeras secuencias traducen la misma secuencia aminoacídica (HVaaST-1) mientras que la cuarta secuencia traduce a una nueva secuencia aminoacídica (HVaaST-2), con un porcentaje de similitud del 64,2 % con respecto al HVaaST-1. Estas secuencias presentaron bajas identidades (por debajo del 85 %) entre ellas y con las secuencias descritas en el *Genbank*, por lo que tentativamente se clasificaron como dos nuevos herpesvirus, denominados: *Chelonoidis herpesvirus 1* (CheHV1) y *Chelonoidis herpesvirus 2* (CheHV2), clasificando al CheHV1 en el mismo clado que el *Terrapene herpesvirus 2*, mientras que el CheHV2 se clasifica dentro de una nueva rama, no emparentada con otros herpesvirus previamente descritos. De acuerdo con su localización, se detectó la presencia de adenovirus en las tortugas del oeste y el este de Santa Cruz, y en el volcán Alcedo; mientras que herpesvirus fue detectado en tortugas del oeste de Santa Cruz y en los volcanes Alcedo y Wolf en la isla Isabela. La prevalencia encontrada en ambos patógenos difiere de una especie a otra, con una mayor prevalencia de adenovirus en la especie *C. porteri* (11 %) y *C. vandenburghi* (9 %) y una mayor prevalencia de herpesvirus en *C. becki* (3,6 %) y *C. porteri* (2,9 %). No se obtuvo ninguna muestra positiva en la isla de la Española. El aislamiento de estos agentes infecciosos en tortugas en cautividad que presentaban signos clínicos compatibles indica que estos virus podrían ocasionar enfermedad en determinadas circunstancias (p. ej. inmunosupresión, estrés), por lo que se recomienda continuar generando información referente a la prevalencia, morbilidad y potencial mortalidad asociada a estos microorganismos. Esta información contribuye a crear la primera línea base de agentes infecciosos en tortugas terrestres de Galápagos. La diferente prevalencia encontrada entre especies sugiere que se debe considerar esta información a la hora de llevar a cabo acciones de manejo que impliquen la movilización de tortugas terrestres entre las diferentes islas y localidades del archipiélago.

## Referencia

Nieto-Claudín, A., Esperon, F., Apakupakul, K., Peña, I., Deem, S.L. (2021). Health assessments uncover novel viral sequences in five species of Galapagos tortoises. *Transboundary and Emerging Diseases*.

## Factor de Impacto y Posición de la Revista

IF 5,005. Q1 *Veterinary Science*, Q1 *Infectious Diseases* (JCR, 2020).

## Proceedings

Nieto-Claudín, A. (2022, March 15). Las Islas Galápagos: un planeta en miniatura. *NaturalMente*, 33, 27-32. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Centro Superior de Investigaciones Científicas.

Nieto-Claudín, A., Esperón, F. & Deem, S.L. (2021, November 24-26). *Las tortugas de Galápagos como centinelas de la salud de los ecosistemas* [Conference presentation]. XXVI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinaria, PANVET, México. Virtual.

Nieto-Claudín, A., Esperón, F., Apakupakul, K. & Deem, S.L. (2021, August 31-September 2). *Novel viruses discovered in Galapagos tortoises* [Poster presentation]. International Annual Wildlife Disease Association Congress (WDA-EWDA), Cuenca, España. Virtual.

Nieto-Claudín, A., Deem, S.L. & Esperón, F. (2020, November 16-20). *Evaluación sanitaria de las tortugas de Galápagos desde una perspectiva de One Health* [Conference presentation]. I Ciclo de *Webinars* Sección Latinoamericana Wildlife Disease Association (WDA-LA): Biodiversidad, Salud y Enfermedades de Fauna Silvestre en Latinoamérica. Virtual.



## ORIGINAL ARTICLE

# Health assessments uncover novel viral sequences in five species of Galapagos tortoises

Ainoa Nieto-Claudin<sup>1,2,3</sup>  | Fernando Esperón<sup>2,4,5</sup> | Kathleen Apakupakul<sup>3</sup> | Irene Peña<sup>1</sup> | Sharon L. Deem<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Charles Darwin Research Station, Charles Darwin Foundation, Santa Cruz, Galapagos, Ecuador

<sup>2</sup> Veterinary Faculty, Complutense University of Madrid, Puerta de Hierro Av, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Saint Louis Zoo Institute for Conservation Medicine, One Government Drive, Saint Louis, Missouri

<sup>4</sup> INIA, CISA, Algete-El Casar Road, Valdeolmos, Spain

<sup>5</sup> Veterinary Department, School of Biomedical and Health Sciences, Universidad Europea de Madrid, Madrid, Spain

## Correspondence

Ainoa Nieto Claudin, Charles Darwin Foundation, Charles Darwin Av., Santa Cruz 200350, Galapagos Islands, Ecuador.  
Email: [ainoa.nieto@fcdarwin.org.ec](mailto:ainoa.nieto@fcdarwin.org.ec)

## Funding information

Saint Louis Zoo Institute for Conservation Medicine; Saint Louis WildCare Institute Center for Chelonian Conservation; American Association of Zoo Veterinarians Wildlife Animal Health Fund; Grant/Award Number: WAHF #37; Houston Zoo; Galapagos Conservation Trust; Charles Darwin Foundation; Ecoventura; Miss Linda Esler

## Abstract

Emerging infectious diseases (EIDs) have been reported as causes of morbidity and mortality in free-living animal populations, including turtles and tortoises, and they have even resulted in species extinctions, with human activities contributing to the spread of many of these diseases. In the Galapagos, giant tortoises are endangered due to habitat change, invasive species, and other human impacts; however, the impact of EIDs on Galapagos tortoise conservation remains understudied. To fill this gap, we conducted health assessments of five tortoise species from the islands of Santa Cruz, Isabela and Española. We performed health evaluations of 454 animals and PCR testing for pathogens known to be relevant in other tortoise species. We identified two novel sequences of adenoviruses and four of herpesviruses. Based on alignments of the DNA polymerase gene and maximum likelihood phylogenetic analyses, we found both novel adenoviruses to be most closely related to red footed tortoise adenovirus 2, by nucleotide sequence and red footed tortoise adenovirus 1, based on amino acid sequence. Three of the herpesvirus sequences translated into the same deduced amino acid sequence; therefore, they may be considered the same viral species, closely related to terrapene herpesvirus 2. The fourth herpesvirus sequence was highly divergent from any sequence previously detected and is related to an eagle owl herpesvirus based on nucleotide sequence and to loggerhead oro-cutaneous herpesvirus based on amino acids. These novel viruses may be pathogenic for giant tortoises under specific conditions (e.g., stress). Continued screening is crucial to determine if these viruses play a role in tortoise fitness, morbidity and survival. This information allows us to provide recommendations to the Galapagos National Park Directorate and other institutions to improve the management of these unique species both in Galapagos and globally, and for tortoise reintroduction plans throughout the archipelago.

## KEYWORDS

adenovirus, *Chelonoidis* spp, conservation medicine, herpesvirus, wildlife surveillance

## 1 | INTRODUCTION

Turtles and tortoises compose a taxonomic group that includes more than 300 species that live on land, in freshwater systems, and in oceans; however, this large group of vertebrates is among the most threatened according to the IUCN Red List criteria (Rhodin et al., 2018; Stanford et al., 2020). The combined effects of habitat loss and degradation, consumption and use of the animals and their eggs, invasive species and climate change are bringing many of the world's tortoises and turtles to the brink of extinction, and Galapagos tortoises are no exception. Two Galapagos tortoise species became extinct in the last two centuries due to human predation, and all of the twelve extant species are considered threatened with extinction (IUCN, 2020). New challenges for Galapagos tortoise conservation include the dispersion of antimicrobial resistance genes into the environment driven by human activities (Nieto-Claudin et al., 2021a) and the impacts of plastics and pesticides, which are largely under-recognised based on our initial studies. Emerging infectious diseases (EIDs) also have been reported as causes of morbidity and mortality of free-living animal populations including tortoises; however, disease and pathogens are not usually listed as potential or current threats to reptile populations, as they remain poorly understood (Daszak et al., 2000; Gibbons & Steffes, 2013). Recent studies highlight the importance of expanding EID studies in turtles and tortoises to prevent mortality events of already compromised and declining populations of high conservation concern (Doszpoly et al., 2013; Kane et al., 2017; Kolesnik et al., 2017). In the Galapagos Archipelago, giant tortoises play key roles for maintaining healthy ecosystems (e.g., seed dispersal, habitat modifications) while also significantly contributing to the local economy based on eco-tourism activities, as these giants are considered one of the main attractions for visitors and researchers (Benitez-Capistros et al., 2019; Blake et al., 2012). Since the late 1970s, the reintroduction of Galapagos tortoises in captive-breeding and restoration programs have resulted in hundreds of tortoises moved across the archipelago (Gibbs et al., 2014), with the potential to disseminate and/or introduce pathogens to naïve populations, as has occurred in other animal species and countries with rabies and bovine brucellosis (Fèvre et al., 2006; Massei et al., 2010). Despite their importance, infectious agents that might be present in free-living giant tortoises and their potential impacts on tortoise and reptile conservation remain understudied.

Research on reptile virology and microbiology has undergone rapid expansion over the past few decades. Interest in reptile-specific pathogens has focused on both their importance to reptile medicine and conservation, as well as on increasing knowledge of microbe systematics and evolution (Agius et al., 2019). Several infectious diseases continue to be prevalent in captive and free-living chelonians, including the well-documented mycoplasmosis and herpesvirus-related diseases, whereas other pathogens are currently emerging in tortoises (i.e., adenovirus, ranavirus) (Gibbons & Steffes, 2013; Marschang, 2011). Concurrent infections with these pathogens have been described and may lead to more severe systemic disease and mortality in turtles experiencing these co-infections (Kolesnik et al., 2017; Sim et al., 2016).

Herpesvirus (HV) infections have been reported in many different species of tortoises (Testudinidae), including captive and free-living populations (Kane et al., 2017; Origi, 2012; Sim et al., 2015; Yonkers et al., 2015). Clinical signs commonly associated with HV infections range from subclinical to severe, including rhinitis, conjunctivitis, stomatitis and glossitis, which frequently develop into a diphtheroid-necrotising process with diphtheroid membranes covering parts of the oral cavity and extending down into the trachea and oesophagus (Marschang, 2019). Oedema of the neck is a common sign. Affected animals are generally anorexic and lethargic. Animals that survive acute HV infection may develop central nervous system disorders including paralysis or incoordination (Marschang, 2019). Adenoviruses have only relatively recently been detected in several species of chelonians, showing a high mortality rate in some species such as Sulawesi tortoises (Rivera et al., 2009). Pathological findings in infected tortoises may include stomatitis, esophagitis, hepatic necrosis and lipodosis, myeloid necrosis in bone marrow, necrotising enterocolitis, pneumonia and encephalitis (Gibbons & Steffes, 2013; Marschang, 2011). Tortoise mycoplasmosis is one of the most extensively characterised infectious diseases of chelonians and has been associated with population declines in free-living tortoises (Jacobson et al., 2014). Clinical signs include lethargy, palpebral oedema, conjunctivitis and nasal and ocular discharges, causing significant upper respiratory tract disease in turtle and tortoises (Palmer et al., 2016). Ranaviruses have been increasingly shown to be important pathogens of ectothermic animals (Chinchar, 2002), regularly isolated from reptiles since the late 1990s, mostly in chelonian species. Ranavirus is associated with lethargy, anorexia, nasal and ocular discharge, conjunctivitis, severe subcutaneous cervical oedema, ulcerative stomatitis, 'red-neck disease' and death. Analysis suggests that reptilian ranavirus is originally transmitted from amphibians to reptiles; however, it has been demonstrated that it can also be transmitted between tortoise species (Marschang, 2011; Marschang et al., 2008).

For the current study, we designed a broad health assessment of giant tortoises across islands and species to test for four pathogens of conservation concern in tortoises; that is, herpesvirus, adenovirus, ranavirus and mycoplasmosis. Our goal was to describe the presence and prevalence of these potential pathogens within giant tortoise populations, their potential pathogenicity and if their presence might compromise tortoise conservation and well-being. This research advances knowledge of infectious agents in free-living Galapagos tortoises across species and islands.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Study sites

We conducted the study on three islands of the Galapagos Archipelago, covering five different species of giant tortoises. Santa Cruz, located in the centre of the archipelago and inhabited by humans (S00.66551, W090.357241), contains two species of critically endangered giant tortoises, with the most predominant (*Chelonoidis porteri*) inhabiting

the central and southwestern area, and the other (*Chelonoidis donfaustoi*) restricted to the northeastern area of the island. The estimated population for *C. porteri* based on IUCN data from 2010 is 3400 individuals (Cayot et al., 2017), but no census has been conducted in the last decade. Through our work, we estimate a population that currently exceeds 6000 individuals (Blake, Cabrera, Nieto-Claudin, Deem unpublished data). The population of *C. donfaustoi* is estimated to be 550 individuals based on the latest census in 2018 (Tapia, 2018) and is believed to be one of the smallest population sizes for any Galapagos tortoise species.

Española Island is located in the south-east of the archipelago (S01.371006, W089.670863). This arid and small island is not inhabited by humans and contains one species of giant tortoise (*Chelonoidis hoodensis*) considered critically endangered by the IUCN (Cayot et al., 2017). After five decades of an intense captive-breeding program to restore its population, *C. hoodensis* is considered stable, and the last reproductive individuals maintained in captivity were released into the wild in June 2020 (Tapia, 2021a).

Isabela Island is the largest island, located on the eastern side of the archipelago.

Because of the isolating environment of each of its five volcanoes, a unique species of giant tortoise has evolved on each volcano. *Chelonoidis vandenburghi* is restricted to Alcedo Volcano and its slopes (S00.4409454°, W091.1068907°), and *Chelonoidis becki* is restricted to Wolf Volcano (S00.016080, W091.350429). A recent census conducted in Alcedo estimates its population to be 12,000–15,000 individuals (Tapia, 2021b), whereas the population of giant tortoises from Wolf is around 10,000–12,000 (Arteaga & Guayasamin, 2020). Alcedo and Wolf volcanoes have never been inhabited by humans, although an extensive goat eradication program to control for invasive species was carried out between 2004 and 2007 as part of the International Project Isabela (Lavoie et al., 2007). Since then, human activity on Alcedo and Wolf volcanoes has been restricted to scientific activities, with few scientists and rangers occasionally visiting every year.

## 2.2 | Sampling design and sample collection

Most samples were collected as part of a long-term health assessment within the Galapagos Tortoise Movement Ecology Programme (GTMEP) (Blake, Yackulic et al., 2015). From 2017–2020, we collected samples from 208 free-living western Santa Cruz tortoises, 55 from eastern Santa Cruz, 70 from Alcedo Volcano, and 45 from Española Island. In collaboration with Galapagos Conservancy and the Galapagos National Park Directorate, we also collected samples from 55 free-living Wolf tortoises. A total of five hybrids from *C. becki* and 16 tortoises from Española Island (*C. hoodensis*) maintained in captivity at the Fausto Llerena Breeding Center (Santa Cruz Island) were sampled and included in the present work. Samples collected from western Santa Cruz and Alcedo Volcano were also used in a broader study to assess antimicrobial resistance and reference intervals. For these two species, sample size was calculated based on the literature ( $Z = 1.96$ ;  $p = .05$ ) (Lwanga & Lemeshow, 1991). We also considered the feasibility of col-

lecting the desired number of samples from a remote and isolated volcano such as Alcedo. Because of the logistical challenges of collection, for these tortoise species, sampling was opportunistic and took place in a single trip of 3–7 days, so all the samples were collected over a very short period of time and during the same season.

For each individual, we recorded morphometrics, weight and determined the sex in mature animals based on tail length and plastron concavity, as well as a body condition index (BCI) as previously described in Nieto-Claudin et al. (2021b) and Blake, Guézou et al. (2015). We identified tortoises by microchips previously placed by Galapagos National Park Service rangers. If no microchip was detected, we placed a new subcutaneous microchip (DATAMARS®) in the caudo-ventral area of the left hind leg. We collected conjunctival, oral and cloacal swabs using a sterile cotton swab (Puritan Sterile Products Company LLC, Maine, USA) and placed each in 2 ml sterile cryovials with no media. We kept all samples frozen at  $-30^{\circ}\text{C}$  for up to 3 months until analyses.

We collected samples under the Galapagos National Park annual research permits PC-36-17, PC-35-18, PC-16-19, PC-28-20 and the International Animal Care and Use Committee from GREFA (Spain) with registration number 17/001. Samples from Fausto Llerena Breeding Centre were collected under the supervision of the Galapagos National Park Directorate. We transported frozen samples under exportation permits 153-2019-EXP-CM-FAU-DNB/MA, 192-2019-EXP-CM-FAU-DNB/MA and 031-2020-EXP-CM-FAU-DNB/MA.

## 2.3 | DNA extraction and molecular analysis

We added 100  $\mu\text{l}$  of sterile PBS to each swab and allowed them to thaw for an hour at room temperature before carrying out the DNA extraction. We performed total DNA extraction directly from swab samples following the manufacturer's instructions (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Valencia, CA, USA). All DNA extraction occurred at the Charles Darwin Research Station (CDRS) in Galapagos, Ecuador.

For initial adenovirus screening, we used a nested PCR method with consensus primers targeting a 330 bp region of the DNA-dependent DNA polymerase gene of adenoviruses (Wellehan et al., 2004). We tested all extracted DNA from cloacal swabs at the CDRS. PCR products were resolved in 1.5% agarose gels. We used Sanger sequencing for all putative positive results using both primers. We then designed new degenerate primers (ADV\_Chelonoidis-F: CTCCAGGR-CCTCCWCT; ADV\_Chelonoidis-R: CGTCGACGGAGGTGATGA) from compatible bands obtained from the conventional PCR for use in a real-time PCR (qPCR) assay to test all samples. We used qPCR based on SYBR® Green dye, which amplifies a 209 bp fragment of the polymerase gene. A 20  $\mu\text{l}$  reaction mixture consisted of 4  $\mu\text{l}$  extracted DNA, 0.8  $\mu\text{l}$  forward primer (20  $\mu\text{M}$ ), 0.4  $\mu\text{l}$  reverse primer (20  $\mu\text{M}$ ) and 10  $\mu\text{l}$  Kappa Master Mix (Sigma Aldrich, Spain). Reactions were amplified in a thermal cycler with an initial denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 3 min, followed by 40 cycles of amplification at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s and  $60^{\circ}\text{C}$  for 30 s.

To test for herpesviruses in conjunctival and oral swabs from 454 tortoises, we used a consensus PCR assay utilising degenerate primers targeting a 250 bp region of the polymerase gene (VanDevanter et al.,

1996). To test for mycoplasma in conjunctival and oral swab samples of *C. porteri* and *C. vanderburghi* tortoises ( $n = 278$ ), we adapted a qPCR protocol for use in a conventional PCR. This protocol targets the intergenic region between the 16S and 23S genes (Rebello et al., 2011). Any PCR products were resolved in 1.5% agarose gels.

After screening oral swabs from a randomly selected group ( $n = 90$ ) of *C. porteri* to test for Frog Virus 3 (FV3)-like ranaviruses, we used custom-made primers that amplify a 250 bp region of the major capsid protein gene (ranaV-F 5'-TTACATCCTCAACGCCTGGT-3'; ranaV-R 5'-GAGATCGCTGGTGTGCCTA-3') in a SYBR Green-based qPCR assay. These primers were designed by Primer3 and were tested in silico by the alignment with all FV3 and FV3-like ranavirus sequences available on Genbank. Cycling conditions were 95°C for 3 s, 40 cycles at 95°C for 15 s and 65°C for 30 s, followed by melt curve analysis. In order to validate the test, a control of FV3 ranavirus was amplified and sequenced. We tested mycoplasma for all western Santa Cruz and Alcedo Volcano tortoises as part of the broader health study conducted for these species. We selected a smaller number of samples to be tested for ranavirus due to the inability to conduct qPCR in Galapagos and limited funds available; however, no mortality or morbidity events have been reported in Galapagos frogs or reptiles that might be compatible with ranavirus. For the remaining species that had been opportunistically sampled we prioritised testing for adenovirus and herpesvirus as they had been previously detected in *C. porteri* and *C. vanderburghi*. In western Santa Cruz, where tortoises were sampled during humid and dry seasons, we used a Pearson's chi-square test to assess the influence of season in viral prevalence, as described by Kane et al. (2017).

## 2.4 | Sequencing and phylogenetic analyses

We subjected all PCR positive samples to Sanger sequencing. We considered a sample truly positive if a clear sequence was obtained. Nucleotide and deduced amino acid sequences were subjected to BLAST searches. Adenovirus sequences were aligned with 18 other adenovirus sequences found in GenBank. Herpesvirus sequences were aligned with 23 other herpesvirus sequences. Because there were gaps that made translation into amino acids problematic, we aligned the deduced amino acid sequences and subjected them to a protein BLAST search. In both groups, we calculated p-distances for nucleotide and deduced amino acid sequences. We inferred phylogenetic trees from nucleotide and deduced amino acid alignments using a maximum likelihood algorithm with a bootstrap frequency of 1000 replications (Mega 7.0). To assess for differences of pathogen prevalence between tortoise species, we used a Pearson's chi-square test ( $p < .05$ ) and observed the adjusted standardised residuals.

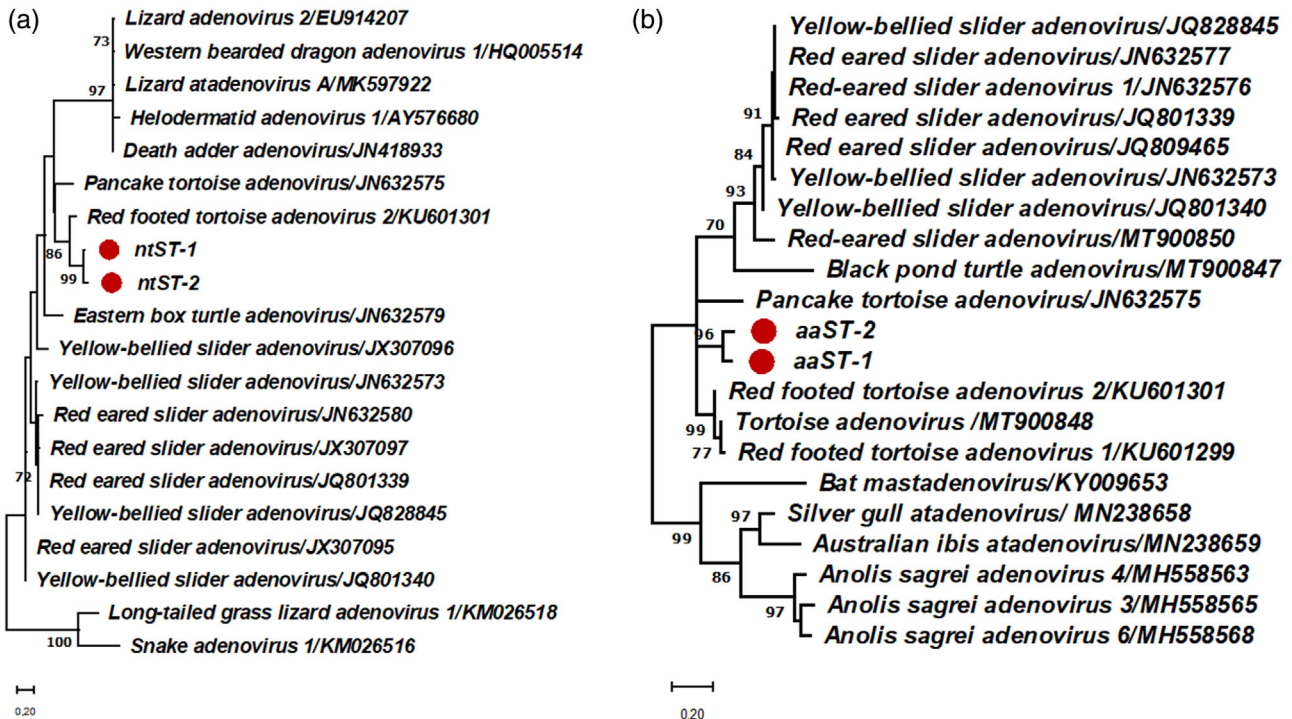
## 3 | RESULTS

We obtained a total of 31 clean sequences 209 bp in length from adenovirus qPCR. Out of all sequences, we obtained two consistently different nucleotide sequence types (AdVntST-1 and AdVntST-2). These

sequence data have been submitted to the EMBL databases under accession numbers OU508386 and OU508387, respectively. The two nucleotide sequences translated into two amino acid sequences (AdVaaST-1 and AdVaaST-2). The identities between AdVntST-1 and AdVntST-2 and between AdVaaST-1 and AdVaaST-2 were 95.6% and 91.2%, respectively. Based on alignments of the DNA polymerase gene and through maximum likelihood phylogenetic analyses, we found both novel adenoviruses to be most similar to red footed tortoise adenovirus 2 by nucleotide sequence (identities of 79.5% and 77.0%, respectively), and red footed tortoise adenovirus 1 based on amino acid sequence (79.4%). AdVaaST-1 and AdVaaST-2 form a clade with a bootstrap value of 0.96 (Figure 1), lending support to the placement of these viruses as novel species; therefore, we hereafter refer to them as *Chelonoidis adenovirus 1* (CheAdV1) and *Chelonoidis adenovirus 2* (CheAdV2). Clustered by tortoise species, 23 out of 208 tortoises (11.1%; 95% CI 6.8–15.3) tested positive for adenovirus in western Santa Cruz (*C. porteri*), 1 of 55 tortoises (1.8%; 95% CI 0.0–5.35) in eastern Santa Cruz (*C. donfaustoi*) and 7 of 78 (9%; 95% CI 2.63–15.32) in Alcedo (*C. vanderburghi*). No tortoises tested positive from Wolf Volcano, Española Island and the captive breeding facilities. In Table 1, we report the nucleotide and amino acid sequences obtained for the different tortoise species. Statistical differences were observed in adenovirus prevalence (chi-squared,  $p < .05$ ), with *C. porteri* presenting a higher prevalence (11.1%) than expected (7%) and no detection in *C. becki* (0%). *C. donfaustoi* also presented a low prevalence (1.8%), but statistics were not significant. In Santa Cruz, all tortoises that were positive for adenovirus presented CheAdV1 except for one individual. The one tortoise from western Santa Cruz that presented the CheAdV2 sequence was an adult female tortoise tagged in 2019 as part of the long-term movement ecology research conducted by the GTMEP. In contrast, 6 out of 7 adenovirus-positive tortoises from Alcedo Volcano presented CheAdV2, and only one individual tested positive for CheAdV1. One of the tortoises that had tested positive for CheAdV2 was an adult female that had been monitored with a GPS tag since 2010.

A total of twelve animals in this study tested positive for herpesviruses based on conventional PCR. Only one of the positives was from a conjunctival swab, while the other eleven positive results were from oral swabs. We obtained four 180 bp nucleotide sequences of herpesviruses (HVntST-1, HVntST-2, HVntST-3 and HVntST-4). These sequence data have been submitted to the EMBL databases under accession numbers OU508388, OU508389, OU508390 and OU508391, respectively). These four nucleotide sequences translated into two different amino acid sequences (HVaaST-1 and HVaaST-2). Sequence similarity between the three first ntSTs ranged from 96.9% to 99.4%, whereas the similarity between these three and HVntST-4 was lower with a range of 62.5–63.7%. HVntST-1 to HVntST-3 all translated the same deduced amino acid sequence (HVaaST-1); therefore, they could be considered the same viral species. HVaaST-1 was 64.2% similar to the deduced amino acid sequence from nucleotide sequence HVntST-4 (HVaaST-2). The highest score by BLAST of HVntST-1-2-3 was with Emydid herpesvirus 1 and Terrapene herpesvirus 2, with 69.2–71.1% and 68.6–69.8% similarity, respectively. The highest score





**FIGURE 1** Maximum likelihood phylogenetic trees with 1000 bootstrap replications of nucleotide (a) and deduced amino acid (b) of 20 and 21 adenoviral DNA-dependent DNA polymerase gene sequences, respectively. The names correspond to Genbank name plus the GenBank accession number. The numbers near the branches represent the bootstrap frequency. All values under 70 have been omitted. Red dots denote the novel sequences described for Galapagos giant tortoises in the present study (EMBL accession numbers OU508386 and OU508387, respectively).

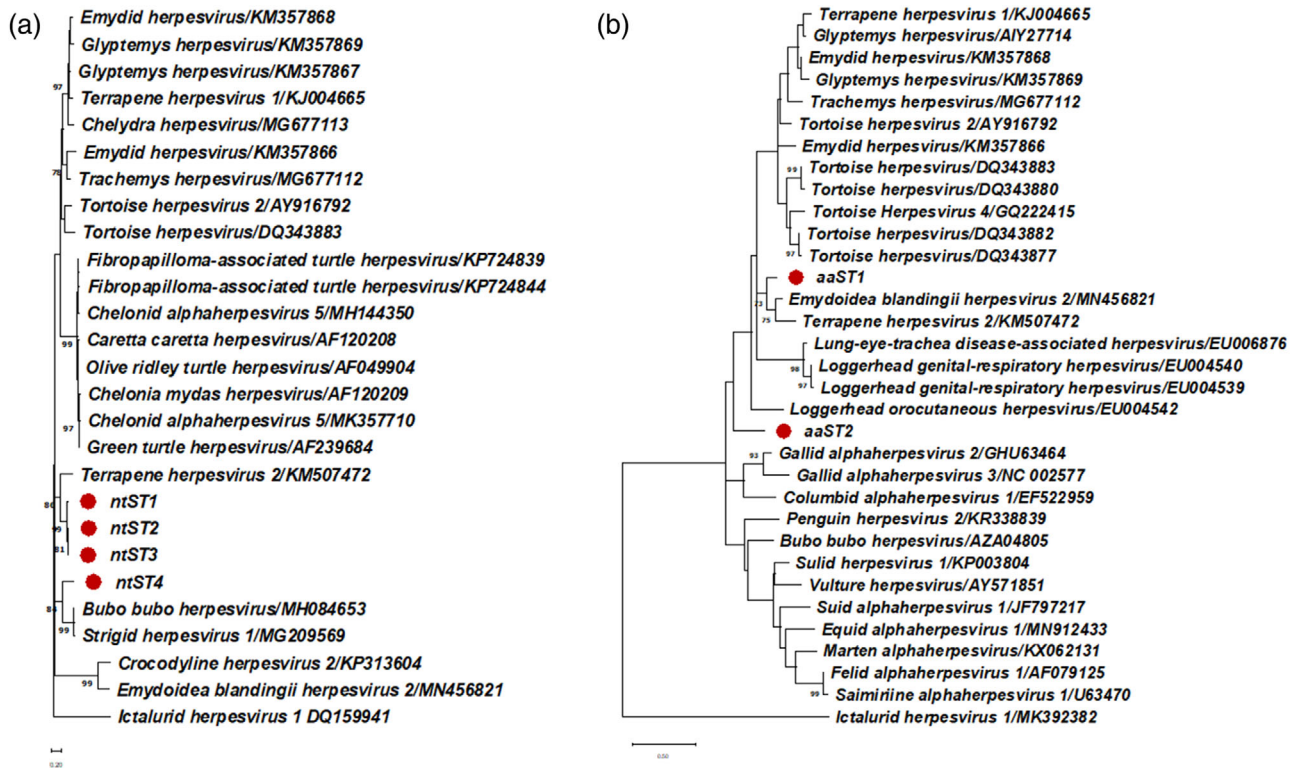
obtained by BLAST of HVaaST-1 was with the *Emydoidea blandingii* herpesvirus 2 (81.1%). However, HVntST-4 was highly divergent from any sequence previously detected, with a *Bubo bubo* herpesvirus as the most similar sequence based on nucleotide sequence (66.9%), while HVaaST-2 had an identity of 66% with Loggerhead (*Caretta caretta*) orcutaneous herpesvirus. HVntST-1 to HVntST-3 formed a clade that fell as a sister group to *Terrapene herpesvirus 2*, with a bootstrap value of 0.86 (Figure 2a). HVntST-4 and the corresponding translated HVaaST-2 did not group with the other three novel sequences nor with other herpesviruses detected in tortoises (Figure 2). The genetic distance seen between these and other characterised herpesviruses is consistent with placement of these viruses as novel species, and therefore we refer to them as *Chelonoidis herpesvirus 1* (CheHV1) and *Chelonoidis herpesvirus 2* (CheHV2). CheHV1 was detected in Santa Cruz and Isabela (Alcedo and Wolf Volcanoes) Islands, as well as in captive tortoises maintained at the Don Fausto Llerena Breeding Center in Santa Cruz. By contrast, CheHV2 was only found in a free-living adult male tortoise from Wolf Volcano. Clustered by tortoise species, 6 out of 208 tortoises (2.88%; 95% CI 0.61–5.16) were positive in western Santa Cruz (*C. porteri*), 1 of 78 (1.3%; 95% CI 0.0–3.78) in Alcedo (*C. vanderburghi*) and 2 of 55 (3.6%; 95% CI 0.0–8.58) in Wolf (*C. becki*) (Table 1). Interestingly, we had no herpesvirus positive tortoises from the eastern Santa Cruz ( $n = 55$ ) or Española Island ( $n = 45$ ) populations. No significant differences were observed in HV prevalence between free-living animals of the five tortoise species. In Figure 3, we represent the prevalences

of free-living individuals for CheAdV1 and CheAdV2, and CheHV1 and CheHV2 clustered by species.

Of the tortoises maintained in captivity at the GNP breeding centre, three out of five sharing the same enclosure tested positive for HV (*C. becki* hybrids) (60%; 95% CI 17.1–100.0), including one adult female tortoise that presented with mucoid/diphtheric stomatitis, rhinitis, glossitis, conjunctivitis, blepharedema, mucopurulent nasal discharge, severe lethargy, cloacal ulcers, incoordination and torticollis on 29 August 2018. This animal was treated by the GNP veterinary service for up to 3 weeks (ceftazidime 20 mg/kg every 72 h, meloxicam 0.2 mg/kg, vitamin B and Fe) until it recovered. However, after 2 years, some physical damage still persists, including severe torticollis. Whether these symptoms were associated with the presence of CheHV1 remains unknown. No captive tortoises from Española Island tested positive for herpesvirus.

All free-living animals included in the current study were in apparently good condition based on physical exam performed during the sample collection (BCI based on weight and morphometrics and no visual signs of disease, discharge, lethargy or emaciation). No animals were recaptured or monitored over time other than those tagged with GPS devices. We did not have any individual that presented coinfection of both herpesvirus and adenovirus. All tortoises tested were negative for FV3 ranavirus ( $n = 90$ ) and mycoplasma ( $n = 278$ ) based on qPCR.

In western Santa Cruz, where tortoises were sampled during dry and humid seasons, more individuals tested positive for HV and AV during



**FIGURE 2** Maximum likelihood phylogenetic trees with 1000 bootstrap replications of nucleotide (a) and deduced amino acid (b) of 27 and 33 herpesviral DNA-dependent DNA polymerase gene sequences, respectively. The names correspond to Genbank name plus the GenBank accession number. The numbers near the branches represent the bootstrap frequency. All values under 70 have been omitted. Red dots denote the sequences described for Galapagos giant tortoises in the present study (EMBL accession numbers OU508388, OU508389, OU508390 and OU508391, respectively). Ictalurid herpesvirus 1 is included as an outgroup.

the humid season; however, statistics were not significant (AV  $p = .25$  and HV  $p = .09$ ).

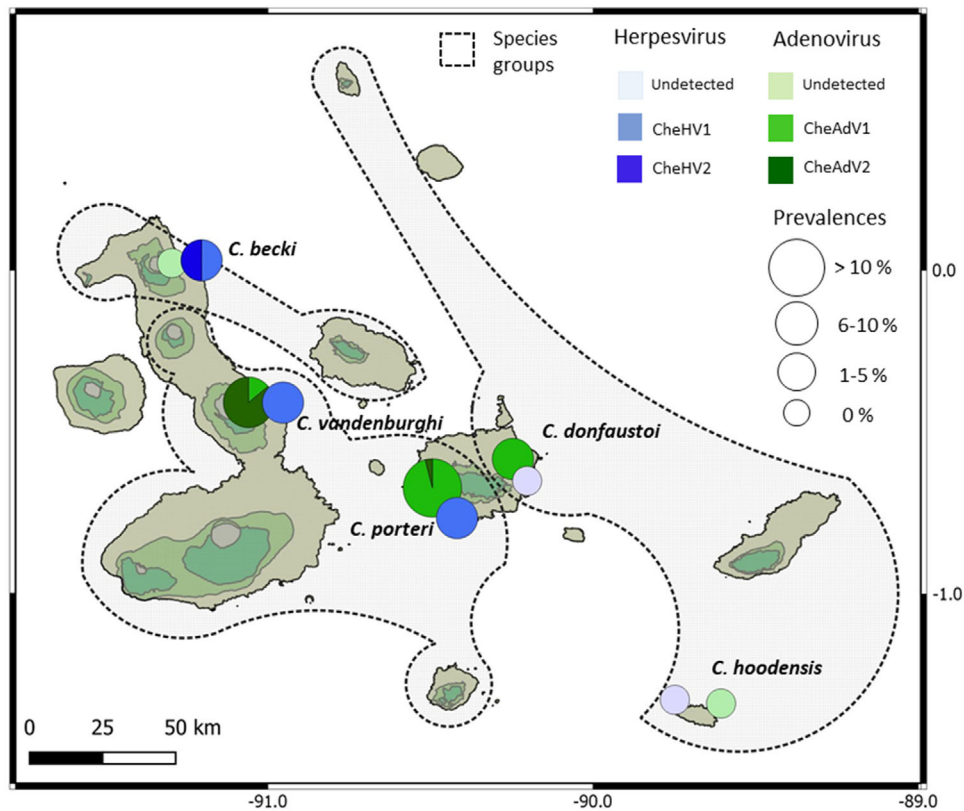
## 4 | DISCUSSION

In the course of health assessments and exams on several species of giant tortoises in the Galapagos Islands, we discovered two novel viral sequences of herpesviruses and two of adenoviruses, which we describe here. Interestingly, we found a range of prevalences among species and locations, with western Santa Cruz (*C. porteri*) and Alcedo tortoises (*C. vandenburghi*) being the only two species in which herpesvirus and adenovirus were both documented within the same population. The prevalence of adenovirus was higher in *C. porteri* (11.1%), the population of tortoises most exposed to anthropogenic activities as indicated by the presence of antimicrobial resistance genes and other human impacts (Nieto-Claudin et al., 2021). Thirty-nine per cent of the samples that had tested positive for CheAdV in *C. porteri* were found in tortoises sampled within cattle farms, and another 39% of positive individuals were sampled within touristic farms or private properties in the highlands of Santa Cruz, used for ecotourism. Only 22% of the tortoises that had tested positive in Santa Cruz were sampled in protected areas of the National Park. By contrast, in the eastern Santa Cruz tortoise species, a species restricted to a small area of Santa Cruz and with much

less interaction with human activities, only one individual of 55 tested was positive for CheAdV1 (1.8%) in an agricultural area, and no herpesvirus was detected. Considering that tortoises were translocated by the Galapagos National Park Services between the East and West tortoise populations of Santa Cruz in recent years, and prior to the designation of *C. donfaustoi* as a separate species in 2015, we cannot refute the possibility that adenovirus infection of eastern Santa Cruz tortoises may have been anthropogenically introduced in association with previous management practices.

In Alcedo Volcano, there was a relatively high prevalence of adenovirus (9%) and a low prevalence of herpesvirus (1.3%). We found both viruses within *C. porteri* and *C. vandenburghi* populations, which may be due to how closely related these species are to one another. Western Santa Cruz tortoises (*C. porteri*) are more related to Alcedo tortoise species (*C. vandenburghi*) than to the eastern Santa Cruz species (*C. donfaustoi*), which is more closely related to San Cristóbal tortoises (*C. chathamensis*) (Poulakakis et al., 2020). Interestingly, the isolation between the western Santa Cruz and the Alcedo species may have resulted in the coevolution of tortoises and their viruses, as the most frequent sequence found in *C. porteri* was CheAdV1 (only 1 out of 23 individuals tested positive for CheAdV2), whereas in *C. vandenburghi* 6 out of 7 positive tortoises carried CheAdV2.

While we did not detect adenovirus in Wolf Volcano species, we did detect two different species of herpesvirus in this population, with



**FIGURE 3** Graphical representation of CheAdV1 and CheAdV2 and CheHV1 and CheHV2 for Galapagos giant tortoises clustered by species and according to the three main phylogenetic species groups described by Poulakakis et al. (2020)

CheHV2 detected in one adult male. This information could be of high conservation concern since Wolf tortoises coexist with the unique and endemic pink land-iguana (*Conolophus marthae*), as well as with yellow iguanas (*Conolophus subcristatus*). Based on phylogenetics, the species most related to Wolf Volcano tortoises is *C. darwini* from Santiago Island. Studying the presence and prevalence of herpesvirus in Santiago could therefore provide more information about the potential evolution of these viruses within Galapagos tortoise species. Moreover, hybrids of the extinct Floreana and Pinta tortoises have been found in Wolf, suggesting that this population was historically highly influenced by human interventions, with pirates, whalers and researchers moving tortoises between islands during the 19th and 20th centuries (Garrick et al., 2012; Tapia, 2020). These movements also may have influenced the presence of certain pathogens such as herpesviruses.

Viruses that have evolved with their host generally do not pose a high risk of infection or morbidity unless the virus jumps host species or mutates into a virulent form (Mandl et al., 2015). However, cataloging existing viruses is important, since a virus that might be endemic in one species could be virulent in another (Rosenberg, 2015). Even well-adapted pathogens may result in a slight cost in terms of immunity, which might be exacerbated if external or additional factors coexist (e.g. stress, malnutrition, aging, comorbidity). Captive-breeding programs and wildlife translocation, while successful to prevent extinctions under some circumstances, may also facilitate the spread of microorganisms and disease if animals are translocated without com-

prehensive risk analyses and proper veterinary advice (Deem, 2012; Hunter et al., 2019; Kock et al., 2010; Sainsbury & Vaughan-Higgins, 2012). In this sense, the tortoise restoration initiatives carried out across the archipelago could pose the risk of pathogen translocation if no diagnostics are performed. In Galapagos, where several species of endemic and unique reptiles coexist, describing existing viruses of all reptile species will provide a valuable tool for management decisions involving translocation of individuals and species.

In 2019, one juvenile tortoise maintained in captivity by the Galapagos National Park Service of Santa Cruz presented respiratory signs (blepharitis, conjunctivitis, ocular and nasal discharge) and tested positive for CheAdV2. It is possible that these clinical signs are associated with adenovirus and/or other tortoise pathogens. Considering that this individual was maintained in a high-density enclosure with another 25 tortoises from different species, all of them in poor health conditions, and most of them also PCR positive to CheAV, we cannot rule out that adenovirus may have played a role in the observed signs. Additionally, the evidence of a captive tortoise positive for CheHV1 with severe symptoms suggests that herpesvirus also could be pathogenic under specific conditions, such as with immunosuppression due to stress, captivity or transportation. The determination of these clinical signs being due to CheAV or CheHV1 infection in tortoises warrant further investigation. Regardless, these findings support the importance of a systematic wildlife health surveillance within the archipelago for both captive and free-living animals, to identify current and potential new

threats that may compromise wildlife health and well-being and support the rapid detection of novel pathogens that may be introduced to the archipelago.

Based on our results, we obtained more positive herpesvirus diagnoses from oral swabs than from ocular swabs in Galapagos tortoises; therefore, we suggest standardising the methodology to conduct long term tortoise surveillance of herpesvirus and adenovirus based on oral and cloacal swabs, respectively, and for using either PCR or qPCR protocols. We suggest the use of both adenovirus consensus primers and the specific primers described within this work when working with Galapagos tortoise samples, as specific primers may produce cleaner sequences and less false positive results than consensus primers.

Tortoises from western Santa Cruz and Alcedo Volcano included in the current study were also included in a research project testing faecal samples for antimicrobial-resistant genes (ARGs). Five tortoises that had tested positive for CheAdV1 (21.7%) and one that tested positive for CheHV1 (16.7%) in Santa Cruz corresponded to the same location where a hotspot of antimicrobial resistance was also described (Nieto-Claudin et al., 2021). This particular location is a cattle farm in the highlands of Santa Cruz. The average number of ARGs on the microbiome of the six individuals that tested positive within this farm was 7.3, higher than the prevalence observed for this population of giant tortoises (4 genes per sample based on Nieto-Claudin et al., 2021;  $p = .001$ , CI = 95%). This suggests a potential correlation between the presence of viruses and the prevalence of ARGs observed in western Santa Cruz. Exposure to antibiotics could disrupt the normal commensal flora of wildlife, and the presence of bacteria carrying anthropogenically associated ARGs may indicate the possibility of zoonotic disease transmission between humans and wildlife (Vittecoq et al., 2016). Some authors have also suggested that microbial dysbiosis can result in enhanced virulence of colonising pathogens (Thomason et al., 2017) with critical implications for the health of wildlife, domestic animals and humans. While it cannot be assumed that CheAV and/or CheHV are pathogenic for giant tortoises without further studies, the potential association of ARGs and tortoise virus presence, while not an outcome from the present work, deserves further investigation. It is possible that anthropogenic-induced changes in microbiota resulting in the presence of resistant bacteria can effect changes in the performance of the host immune system and possibly lead to more viral shedding.

Based on the different strains and prevalences of herpesvirus and adenovirus observed among tortoise species, we suggest expanding tortoise health monitoring into Pinzón, Santiago, San Cristóbal and other locations within Isabela Island, as well as including other reptile species in close contact with free-living tortoises (e.g., land iguanas) to better understand the presence and prevalence of these viruses across the archipelago. Given the evolutionary relationship between species, CheHV1 and CheHV2 could be found in tortoise species closely related to Wolf Volcano such as Santiago tortoises, whereas CheAdV1 and CheAdV2 could be found in species closely related to Alcedo and western Santa Cruz, such as *C. vicina* and *C. microphyes* (Isabela Island). Continued screening is crucial to determine if these viruses play a role in tortoise fitness, morbidity and survival. This information will allow us to provide proper recommendations to the Galapagos National Park

Directorate and other institutions to improve the management and reintroduction plans for these unique species, which would include strategies to prohibit the movement of potential pathogens across islands and populations not previously exposed to these viruses.

#### CONFLICT OF INTEREST

Ainoa Nieto Claudin, Fernando Esperón, Kathleen Apakupakul, Irene Peña and Sharon L. Deem declare there is no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Galapagos National Park Directorate, Saint Louis Zoo Institute for Conservation Medicine, Saint Louis Wild-Care Institute Center for Chelonian Conservation, the AAZV Wild Animal Health Fund (WAHF #37), Houston Zoo, Galapagos Conservation Trust, Charles Darwin Foundation, Ecoventura, Galapagos Conservancy and Linda Esler. A special recognition for their contributions goes to Stephen Blake, Freddy Cabrera, José Haro, Anne Guezou, Andrea Loyola, Washington Tapia, Carolina Carrión, Karina Ramón, Laura Kleinschmidt, Surya Castillo, Jamie Palmer, Cristina Chasipanta, Elena Neves, Irene Sacristán, Encarnación Madueño, Santiago Cano and Olga Calatayud. This publication is contribution number 2425 of the Charles Darwin Foundation for the Galapagos Islands.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.

#### ETHICS STATEMENT

The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to and the appropriate ethical review committee approval has been received. We followed the guidelines of the Galapagos National Park Directorate and the International Animal Care and Use Committee from GREFA (Spain) with registration number 17/001.

#### ORCID

Ainoa Nieto-Claudin  <https://orcid.org/0000-0001-5856-3779>

#### REFERENCES

- Arteaga, A., & Guayasamin, J. M. (2020). *Chelonoidis becki*. In A. Arteaga, L. Bustamante, J. Vieira, & J. M. Guayasamin (Eds.), *Reptiles of Ecuador: Life in the middle of the world*. Available from: Quito: Universidad Tecnológica Indoamericana. [www.tropicalherping.com](http://www.tropicalherping.com)
- Agius, J. E., Phalen, D. N., Rose, K., & Eden, J. S. (2019). New insights into Sauropsid Papillomaviridae evolution and epizootiology: Discovery of two novel papillomaviruses in native and invasive Island geckos. *Virus Evolution*, 5, 1–12.
- Benitez-Capistros, F., Couenberg, P., Nieto, A., Cabrera, F., & Blake, S. (2019). Identifying shared strategies and solutions to the human-giant tortoise interactions in Santa Cruz, Galapagos: A nominal group technique application. *Sustain*, 11, 1–25.
- Blake, S., Wikelski, M., Cabrera, F., Guezou, A., Silva, M., Sadeghoyabi, E., Yackulic, C. B., & Jaramillo, P. (2012). Seed dispersal by Galápagos tortoises. *Journal of Biogeography*, 39, 1961–1972.
- Blake, S., Yackulic, C. B., Wikelski, M., Gibbs, J. P., Deem, S., & Villamar, F. (2015). La migración de las tortugas gigantes de Galápagos requiere de

- esfuerzos de conservación a escala de paisaje. In *En: Informe Galápagos 2013-2014. DPNG, CGREG, FCD y GC. Puerto Ayora, Galápagos, Ecuador.* (pp. 144–150).
- Blake, S., Guézou, A., Deem, S. L., Yackulic, C. B., & Cabrera, F. (2015). The Dominance of Introduced Plant Species in the Diets of Migratory Galapagos Tortoises Increases with Elevation on a Human-Occupied Island. *Biotropica*, 47(2), 246–258. <https://doi.org/10.1111/btp.12195>
- Cayot, L. J., Gibbs, J. P., Tapia, W., & Caccone, A. (2017a). *Chelonoidis porteri*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: E.T9026A82777132. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T9026A82777132.en> Downloaded on 21 June 2021.
- Cayot, L. J., Gibbs, J. P., Tapia, W., & Caccone, A. (2017b). *Chelonoidis hoodensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: E.T9024A82777079. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T9024A82777079.en> Downloaded on 24 March 2021.
- Chinchar, V. G. (2002). Ranaviruses (family Iridoviridae): Emerging cold-blooded killers Brief Review. *Archives of Virology*, 147, 447–470.
- Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife—Threats to biodiversity and human health. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 287, 443–450.
- Deem, S. L. (2012). Fowler's zoo and wild animal medicine: Current therapy 7. In R. E. Miller & M. E. Fowler (Eds.), *Disease risk analysis in wildlife health studies*. Saunders Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-1986-4.00001-9>
- Doszpaly, A., Wellehan, J. F. X., Childress, A. L., Tarján, Z. L., & Kovács, E. R. (2013). Partial characterization of a new adenovirus lineage discovered in testudinoid turtles. *Infection, Genetics and Evolution*, 17, 106–112.
- Fèvre, E. M., Bronsvoort, B., Hamilton, K. A., & Cleaveland, S. (2006). Animal movements and the spread of infectious diseases. *Trends in Microbiology*, 14, 125–131.
- Garrick, R. C., Benavides, E., Russello, M. A., Gibbs, J. P., Poulakakis, N., Dion, K. B., Hyseni, C., Kajdacsi, B., Márquez, L., Bahan, S., Ciofi, C., Tapia, W., & Caccone, A. (2012). Genetic rediscovery of an “extinct” Galápagos giant tortoise species. *Current Biology*, 22, R10–R11.
- Gibbons, P. M., & Steffes, Z. J. (2013). Emerging infectious diseases of chelonians. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 16, 303–317.
- Gibbs, J. P., Hunter, E. A., Shoemaker, K. T., Tapia, W. H., & Cayot, L. J. (2014). Demographic Outcomes and Ecosystem Implications of Giant Tortoise Reintroduction to Española Island, Galapagos. *Plos One*, 9, E110742.
- Hunter, E. A., Gibbs, J. P., Cayot, L. J., Tapia, W., Quinzin, M. C., Miller, J. M., Caccone, A., & Shoemaker, K. T. (2019). Seeking compromise across competing goals in conservation translocations: The case of the ‘extinct’ Floreana Island Galapagos giant tortoise. *Journal of Applied Ecology*, 57, 136–148.
- IUCN (2020). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020–3. <https://www.iucnredlist.org> (Accessed 14 June 2021).
- Jacobson, E. R., Brown, M. B., Wendland, L. D., Brown, D. R., Klein, P. A., Christopher, M. M., & Berry, K. H. (2014). Mycoplasmosis and upper respiratory tract disease of tortoises: A review and update. *Veterinary Journal*, 201, 257–264.
- Kane, L. P., Allender, M. C., Archer, G., Dzhaman, E., Pauley, J., Moore, R., Ruiz, M. O., Smith, R. L., Byrd, J., & Phillips, C. A. (2017). Prevalence of *Terrapene herpesvirus 1* in free-ranging eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*) in Tennessee and Illinois. *Journal of Wildlife Diseases*, 53, 1–11.
- Kock, R. A., Woodford, M. H., & Rossiter, P. B. (2010). Disease risks associated with the translocation of wildlife. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 29, 329–350.
- Kolesnik, E., Obiegala, A., & Marschang, R. E. (2017). Detection of *Mycoplasma* spp., herpesviruses, topiviruses, and ferlaviruses in samples from chelonians in Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29, 820–832.
- Lavoie, C., Cruz, F., Carrion, G. V., Campbell, K., Donlan, C. J., Harcourt, S., & Moya, M. (2007). *The thematic atlas of project Isabela: An illustrative document describing, step-by-step, the biggest successful goat eradication project on the Galapagos Islands, 1998–2006*. Puerto Ayora, Galapagos: Charles Darwin Foundation.
- Lwanga, S. K., & Lemeshow, S. (1991). Sample size determination in health studies: A practical manual. World Health Organization.
- Mandl, J. N., Ahmed, R., Barreiro, L. B., Daszak, P., Epstein, J. H., Virgin, H. W., & Feinberg, M. B. (2015). Reservoir host immune responses to emerging zoonotic viruses. *Cell*, 160, 20–35.
- Marschang, R. E. (2011). Viruses infecting reptiles. *Viruses*, 3, 2087–2126.
- Marschang, R. E. (2019). Virology. In S. J. S., Stephen & J., Divers (Eds.), *Mader's reptile and amphibian medicine and surgery* (3rd edn., pp. 247–269). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48253-0.00030-1>
- Marschang, R. E., Bergmann, S. M., & Miller, D. L. (2008). Ranavirus infection in amphibians. *EAZVW Transmissible Disease Fact Sheet Sheet 1–3*.
- Massei, G., Qu, R. J., Gurney, J., & Cowan, D. P. (2010). Can translocations be used to mitigate human-wildlife conflicts? *Wildlife Research*, 37, 428–439.
- Nieto-Claudin, A., Deem, S. L., Rodriguez, C., Cano, S., Moity, N., Cabrera, F., & Esperón, F. (2021a). Antimicrobial resistance in Galapagos tortoises as an indicator of the growing human footprint. *Environmental Pollution*, 284, 117453. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117453>.
- Nieto-Claudin, A., Palmer, J. L., Esperón, F., & Deem, S. L. (2021b). Haematology and plasma biochemistry reference intervals for the critically endangered western Santa Cruz Galapagos tortoise (*Chelonoidis porteri*). *Conserv Physiol*, 9(1): coab019; <https://doi.org/10.1093/conphys/coab019>.
- Origg, F. C. (2012). Testudinid herpesviruses: A review. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 22, 42–54.
- Palmer, J. L., Blake, S., Wellehan, J. F. X., Childress, A. L., & Deem, S. L. (2016). Clinical *Mycoplasma* sp. infections in free-living three-toed box turtles (*Terrapene carolina triunguis*) in Missouri, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 52, 378–382.
- Poulakakis, N., Miller, J. M., Jensen, E. L., Beheregaray, L. B., Russello, M. A., Glaberman, S., Boore, J., & Caccone, A. (2020). Colonization history of Galapagos giant tortoises: Insights from mitogenomes support the progression rule. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 58, 1262–1275.
- Rebelo, A. R., Parker, L., & Cai, H. Y. (2011). Use of high-resolution melting curve analysis to identify *Mycoplasma* species commonly isolated from ruminant, avian, and canine samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23, 932–936.
- Rhodin, A. G. J., Stanford, C. B., Van, D. P. P., Eisemberg, C., Luiselli, L., Mittemeier, R. A., Hudson, R., Horne, B. D., Goode, E. V., Kuchling, G., Walde, A., Baard, E. H. W., Berry, K. H., Bertolero, A., Blanck, T. E. G., Bour, R., Buhlmann, K. A., Cayot, L. J., ... Vogt, R. C. (2018). Global conservation status of turtles and tortoises (order testudines). *Chelonian Conservation and Biology*, 17, 135.
- Rivera, S., Wellehan, J. F. X., McManamon, R., Innis, C. J., Garner, M. M., Raphael, B. L., Gregory, C. R., Latimer, K. S., Rodriguez, C. E., Diaz-Figueroa, O., Marlari, A. B., Nyaoke, A., Gates, A. E., Gilbert, K., Childress, A. L., Risatti, G. R., & Frasca, S. Jr. (2009). Systemic adenovirus infection in Sulawesi tortoises (*Indotestudo forsteni*) caused by a novel siadenovirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21, 415–426.
- Rosenberg, R. (2015). Detecting the emergence of novel, zoonotic viruses pathogenic to humans. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72, 1115–1125.
- Sainsbury, A. W., & Vaughan-Higgins, R. J. (2012). Analyzing disease risks associated with translocations. *Conservation Biology*, 26, 442–452.
- Sim, R. R., Allender, M. C., Crawford, L. K., Wack, A. N., Murphy, K. J., Mankowski, J. L., & Bronson, E. (2016). Ranavirus epizootic in captive Eastern Box Turtles (*Terrapene carolina carolina*) with concurrent herpesvirus and mycoplasma infection: Management and monitoring. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 47, 256–270.
- Sim, R. R., Norton, T. M., Bronson, E., Allender, M. C., Stedman, N., Childress, A. L., & Wellehan, J. F. X. (2015). Identification of a novel herpesvirus

- in captive Eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). *Veterinary Microbiology*, 175, 218–223.
- Stanford, C. B., Iverson, J. B., Rhodin, A. G. J., Van, D. P. P., Mittermeier, R. A., Kuchling, G., Berry, K. H., Bertolero, A., Bjorndal, K. A., Blanck, T. E. G., Buhlmann, K. A., Burke, R. L., Congdon, J. D., Diagne, T., Edwards, T., Eisemberg, C. C., Ennen, J. R., Forero-Medina, G., Frankel, M., ...Walde, A. D. (2020). *Review turtles and tortoises are in trouble*. *Current Biology*, 30, R721–R735.
- Tapia, W. (2018). Results from the first-ever census of the Eastern Santa Cruz Tortoise. Giant Tortoise Restoration Initiative. Available from: <https://www.galapagos.org>
- Tapia, W. (2020). Breaking: Expedition to wolf locates tortoise with pinta genes. Giant Tortoise Restoration Initiative. Available from: <https://www.galapagos.org>
- Tapia, W. (2021a). Española tortoises return home following closure of successful breeding program. Giant Tortoise Restoration Initiative. Available from: <https://www.galapagos.org>
- Tapia, W. (2021b). Breaking: Giant tortoise population on alcedo deemed healthiest in galapagos. Giant Tortoise Restoration Initiative. Available from: <https://www.galapagos.org>
- Thomason, C. A., Mullen, N., Belden, L. K., May, M., & Hawley, D. M. (2017). Resident microbiome disruption with antibiotics enhances virulence of a colonizing pathogen. *Scientific Reports*, 7, 1–8.
- VanDevanter, D. R., Warrenner, P., Bennett, L., Schultz, E. R., Coulter, S., Garber, R. L., & Rose, T. M. (1996). Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 1666–1671.
- Vittecoq, M., Godreuil, S., Prugnolle, F., Durand, P., Brazier, L., Renaud, N., Arnal, A., Aberkane, S., Jean-Pierre, H., Gauthier-Clerc, M., Thomas, F., & Renaud, F. (2016). Antimicrobial resistance in wildlife. *Journal of Applied Ecology*, 53, 519–529.
- Wellehan, J. F. X., Johnson, A. J., Harrach, B., Benkő, M., Pessier, A. P., Johnson, C. M., Garner, M. M., Childress, A., & Jacobson, E. R. (2004). Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the adenoviruses. *Journal of Virology*, 78, 13366–13369.
- Yonkers, S. B., Schneider, R., Reavill, D. R., Archer, L. L., Childress, A. L., & Wellehan, J. F. X. (2015). Coinfection with a novel fibropapilloma-associated herpesvirus and a novel *Spirorchis* sp. in an eastern box turtle (*Terrapene carolina*) in Florida. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27, 408–413.

**How to cite this article:** Nieto-Claudin, A., Esperón, F., Apakupakul, K., Peña, I., & Deem, S. L. (2021). Health assessments uncover novel viral sequences in five species of Galapagos tortoises. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1–11. <https://doi.org/10.1111/tbed.14391>



## **CAPÍTULO III**

### ***Resistencias antimicrobianas***



Este capítulo incluye tanto el trabajo exploratorio llevado a cabo en 2017 para determinar la presencia y prevalencia de resistencias a antimicrobianos en las tortugas terrestres de Santa Cruz, como el estudio comparativo a gran escala realizado con posterioridad para caracterizar las resistencias antimicrobianas de las tortugas gigantes de Santa Cruz (*C. porteri*) y Alcedo (*C. vandenburghi*) y establecer comparaciones en función del grado de impacto de las actividades antropogénicas en los diferentes ecosistemas y áreas de estudio.



## Título

*Antimicrobial resistance genes present in the faecal microbiota of free-living Galapagos tortoises (Chelonoidis porteri)*

## Resumen

Las resistencias a los antimicrobianos, codificadas en su gran mayoría por genes (ARGs) mediados por plásmidos constituyen una creciente amenaza a nivel mundial. La fauna silvestre juega un papel fundamental como centinelas y potenciales vectores de ARGs. Por primera vez en las Islas Galápagos, se ha realizado la detección y cuantificación de ARGs en tortugas silvestres de la especie *Chelonoidis porteri*. Se llevó a cabo un análisis inicial para detección y cuantificación de ARGs mediante PCR cuantitativa a tiempo real, a partir de muestras fecales de 30 tortugas muestreadas a lo largo de su área natural de distribución en la isla de Santa Cruz. Las muestras fueron analizadas para un panel de 21 genes diferentes que codifican resistencia para un total de ocho clases de antimicrobianos (tetraciclinas, aminoglucósidos,  $\beta$ -lactámicos, fenicoles, polimixinas, quinolonas, macrólidos y sulfonamidas). Todas las muestras analizadas mostraron resultados positivos para uno o varios ARGs. Trece de los 21 genes se encontraron presentes en al menos una muestra, y diez de las muestras (35,7 %) presentaron un patrón de multirresistencia. En el presente estudio encontramos un 100 % de los microbiomas de tortuga positivos a ARGs, lo que sugiere una distribución a gran escala de resistencias a antimicrobianos en el ambiente de las Islas

Galápagos. En base a estos resultados se recomiendan estudios complementarios para un mejor entendimiento de los patrones de resistencia presentes en las diferentes especies y poblaciones de tortugas gigantes de las Galápagos, así como las implicaciones que estas resistencias puedan tener para la salud humana y animal.

### **Referencia**

Nieto-Claudín, A., Esperón, F., Blake, S. & Deem, S.L. (2019). Antimicrobial resistance genes present in the faecal microbiota of free-living Galapagos tortoises (*Chelonoidis porteri*). *Zoonoses and Public Health*, 66(8), 900-908. <https://doi.org/10.1111/zph.12639>

### **Factor de Impacto y Posición de la Revista**

IF 2,271. Q1 *Veterinary Sciences*, Q3 *Infectious Diseases* (JCR, 2019)

### **Proceedings**

Nieto-Claudín, A., Deem, S.L., Cabrera, F., Guezou, A., Haro, J. & Blake, S. (2019, July 2-3). *10 años de Investigación y Conservación en Tortugas Terrestres* [Conference presentation]. Simposio 60 años: Conservación y Ciencia en Galápagos. Dirección del Parque Nacional Galápagos. Puerto Ayora, Galápagos, Ecuador.


Nieto-Claudín, A., Esperón, F. & Deem, S.L. (2018, August 5-10). *First detection of antimicrobial resistance genes by qPCR in free-living Galapagos giant tortoises* [Poster presentation]. 67<sup>th</sup> Annual International Conference Wildlife Disease Association (WDA), St. Augustine, Florida, USA.

Nieto-Claudín, A., Esperón, F. & Deem, S.L. (2018, July 2-3). *La salud de las tortugas gigantes de Galápagos y sus implicaciones para la conservación* [Conference presentation]. Simposio: Ciencias de la Sostenibilidad para Galápagos. Dirección del Parque Nacional Galápagos. Puerto Ayora, Galápagos, Ecuador.

Nieto-Claudín, A. (2018). Assessing the health of Galapagos giant tortoises. *VII Newsletter WDA Latin American Section*, 1(1), 1-3.

## ORIGINAL ARTICLE

# Antimicrobial resistance genes present in the faecal microbiota of free-living Galapagos tortoises (*Chelonoidis porteri*)

Ainoa Nieto-Claudin<sup>1,2,3</sup>  | Fernando Esperón<sup>1,4</sup> | Stephen Blake<sup>2,5,6</sup> | Sharon L. Deem<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Charles Darwin Research Station, Charles Darwin Foundation, Santa Cruz, Ecuador

<sup>3</sup>Saint Louis Zoo Institute for Conservation Medicine, St. Louis, MO, USA

<sup>4</sup>INIA-CISA, Valdeolmos, Spain

<sup>5</sup>Max Planck Institute for Animal Behavior, Radolfzell, Germany

<sup>6</sup>University of Saint Louis, St. Louis, MO, USA

## Correspondence

Ainoa Nieto-Claudin, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain.  
Email: ainoa.nieto@fcdarwin.org.ec

## Funding information

Scott Neotropical Fund from Cleveland Metroparks Zoo; Saint Louis Zoo Institute for Conservation Medicine; Galapagos Conservation Trust; Charles Darwin Foundation; IWC Schaffhausen; Houston Zoo; Miss Karen Lo

## Abstract

Antimicrobial resistance (AMR), encoded by plasmid-mediated AMR genes (ARGs), is an increasing global public health threat. Wildlife play a fundamental role as sentinels, reservoirs and potential vectors of ARGs. For the first time in Galapagos, we have identified and quantified the presence of ARGs in free-living giant tortoises (*Chelonoidis porteri*). We performed ARG analyses by quantitative PCR of faeces collected from the cloaca of 30 tortoises widely distributed across Santa Cruz Island. Validated samples ( $n = 28$ ) were analysed by a panel of up to 21 different ARGs and all 28 tortoise samples were positive to one or more genes encoding resistance. Thirteen of 21 tested ARGs were present in at least one sample, and 10 tortoises (35.7%) had a multi-resistant pattern. We recommend additional research so we may more fully understand resistance patterns across taxa and geographical locations throughout the Galapagos archipelago, and the implications of ARGs for the health of wildlife, domestic animals, and humans. In this study, we found 100% of sampled giant tortoises had ARGs present in their faeces, suggesting a large-scale distribution of these genes within the archipelago.

## KEYWORDS

antibiotic resistance, Galapagos Islands, giant tortoises, multi-resistant patterns, wildlife surveillance

## 1 | INTRODUCTION

Antimicrobial resistance (AMR) presents an increasing global public health threat that involves all major microbial pathogens and antimicrobial drugs (Greger, 2007; Levy & Marshall, 2004; Marinho, Santos, Gonçalves, Poeta, & Igrejas, 2016). The main cause of AMR is the misuse of antibiotics in veterinary and human medicine since antibiotics are not only prescribed for treatment, but are also administered as disease prevention measures and growth promotion (Guerra, Fischer, & Helmuth, 2014). In developing countries, antimicrobial drugs are readily available in community pharmacies and improper use also contributes to the emergence of AMR (Sakeena, Bennett, & McLachlan, 2018).

Free-living wildlife play a fundamental role as sentinels, reservoirs and potential vectors of AMR (Blanco-Peña et al., 2017; Jobbins & Alexander, 2015; Pruden, Pei, Storteboom, & Carlson, 2006). AMR has entered wildlife populations around the world and has in some places been shown to be more frequent among wildlife than in human or livestock populations in the same regions (Vittecoq et al., 2016). Since AMR is greater when antibiotic exposure increases (e.g., due to anthropogenic use) (van de Sande-Bruinsma et al., 2008), the diversity and abundance of AMR in wild animals may be used as an indicator of human activities (e.g., over-use in livestock), at the interface between wildlife, domestic animals and humans.

Most studies on AMR surveillance in wildlife are performed by culture-dependent methods, using a limited number of bacterial

strains presented in the microbiota (e.g., *Escherichia coli*) as indicators of AMR. However, since most bacteria are not cultivable (Eckburg et al., 2010), and the most relevant resistance determinants (i.e., AMR genes [ARGs]) are codified into mobile genetic elements, mainly plasmids which are not captured in culture methods, the detection of AMR using culture-dependent methods might not be representative of the whole ARG microbiota. Consequently, recent studies emphasize the advantage of characterizing the environmental spread of AMR by using non-culture-dependent methods directly from the microbiome (Esperón, Sacristán, Carballo, & Torre, 2018; Jiang et al., 2013; Wang et al., 2014).

As the human footprint expands into the last wilderness areas on earth (Di Marco, Venter, Possingham, & Watson, 2018), the potential for AMR impact on previously isolated wildlife populations is increasing with consequences largely unknown. The endemic biotas of oceanic islands are highly vulnerable to human impacts. On the Galapagos Islands, human colonization occurred relatively recently and the archipelago retains most of its original endemic biodiversity (Causton et al., 2013). Nevertheless, anthropogenic environmental degradation has progressed rapidly due to recent land transformations through agriculture, urbanization, tourism, and the impacts of novel invasive species (Toral-Granda et al., 2017).

Antimicrobial resistance has been identified as a potential threat to the unique fauna of the Galapagos; however, previous studies have been performed only by culture methods, and samples were collected far from human-inhabited areas, showing inconclusive results (Thaller et al., 2010; Wheeler, Hong, Bedon, & Mackie, 2012). Farm activities in the Galapagos often cause ecological and sanitary impacts on natural ecosystems and may introduce unknown quantities of antibiotics under poorly controlled conditions.

Critically endangered Galapagos tortoises (*Chelonoidis* spp.) are emblematic animals with the very name "Galapagos" stemming from the Spanish word for tortoise. Threatened by centuries of over-harvesting, they remain endangered due to habitat and climate change, invasive species and other human impacts (Deem, Cruz, Higashiguchi, & Parker, 2012; Deem, Cruz, et al., 2008; Gibbs, Snell, & Causton, 1999; Watson et al., 2010). Characterized as generalist herbivores, Galapagos tortoises undertake migrations driven by spatiotemporal variability in vegetation productivity (Blake, Guézou, Deem, Yackulic, & Cabrera, 2015; Yackulic, Blake, & Bastille-Rousseau, 2017). These giants move long distances, from protected national park areas to human-modified landscapes, including tourist farms and areas managed for livestock on human-inhabited islands such as Santa Cruz (Blake et al., 2015, 2012). Despite the identification of human-animal cohabitation as one of the most critical factors for the conservation of wildlife species (Daszak, Cunningham, & Hyatt, 2001; Deem, Parker, & Miller, 2008), few studies have been performed to assess how this cohabitation may affect tortoise health and the spread of AMR in the archipelago.

Here, we respond to this deficit by identifying, quantifying and reporting, for the first time in Galapagos, on the presence of ARGs in the symbiotic gut bacteria among free-living giant tortoises (*Chelonoidis porteri*) on Santa Cruz Island.

### Impacts

- Antimicrobial resistance has become one of the main public health threats worldwide.
- We found antibiotic resistance genes in 100% of free-living giant tortoises sampled.
- Direct detection of antimicrobial resistance genes offers a more sensitive technique for environmental studies when compared to microbiological culture.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Study site

We conducted the study on Santa Cruz, a 986 km<sup>2</sup> island that rises to a maximum elevation of 860 m. The Galapagos National Park covers almost 90% of Santa Cruz with native vegetation dominate at low and middle elevations, but introduced plant species are throughout the central highlands due to farming and tourism on privately owned land (114 km<sup>2</sup>). Santa Cruz is the most populated island in the archipelago with an estimated 15,700 inhabitants (National Institute of Statistics and Census, 2015). Most people are concentrated in a small town (Puerto Ayora) on the southern coast of the island, with smaller rural settlements along roads throughout the south-central region of the island.

### 2.2 | Sampling design and sample collection

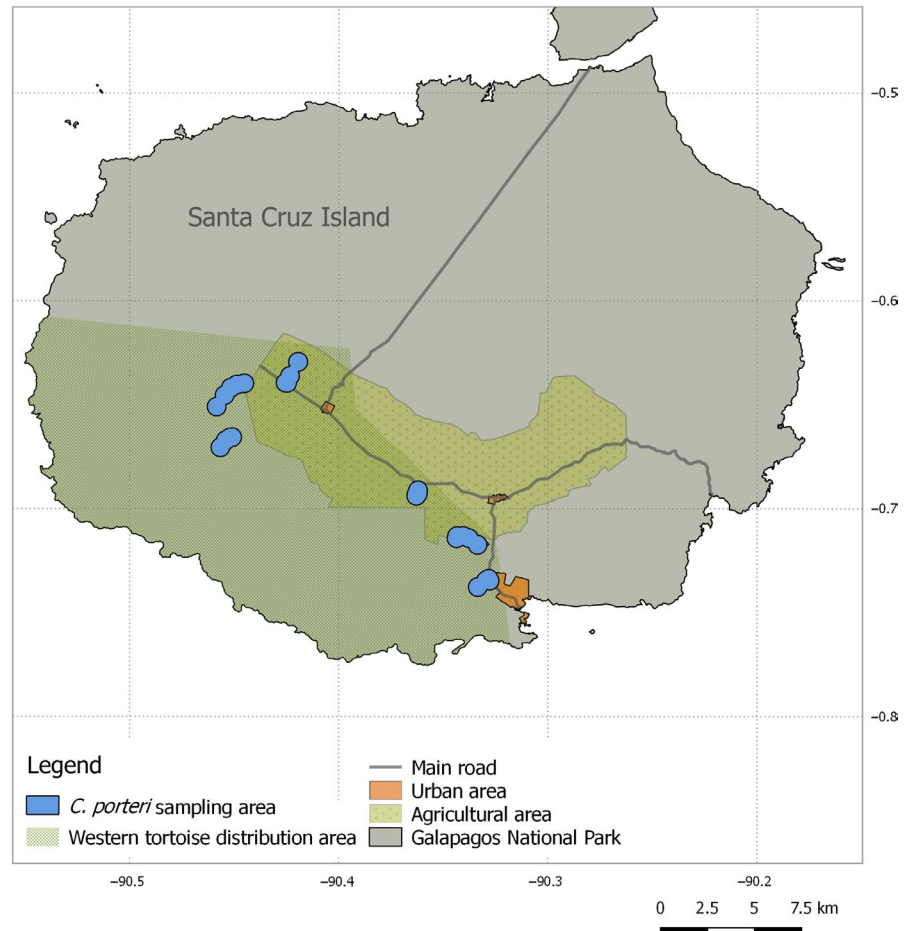
In October 2017, we collected samples from 30 free-roaming tortoises from different locations along their seasonal migration routes (Bastille-Rousseau et al., 2016), including humid and transitional habitats throughout the National Park (protected areas), rural (agricultural, livestock), and urban zones (within Puerto Ayora town limits; Figure 1).

To facilitate animal handling, we selected individuals weighing <200 kg. We collected faeces from the cloaca and placed approximately 25 g per tortoise in a 15-ml sterile Falcon tubes for the ARG studies. We kept all samples frozen at -20°C until analyses. We identified tortoises by microchips previously placed by Galapagos National Park Service rangers. Tortoises that had not been previously pit tagged were given a subcutaneous microchip (DATAMARS<sup>®</sup>) placed in the caudoventral area of the right hind leg. We also collected a number of other biomaterials (e.g., blood, swabs, carapace scrapes) and recorded morphometric measurements as part of an ongoing health assessment of the Galapagos tortoises across the islands. We collected samples under the Galapagos National Park research permit PC-36-17 and the International Animal Care and Use Committee from GREFA, Spain, with registration number 17/001.

### 2.3 | Molecular analysis of ARGs

We performed the analysis of ARGs by quantitative PCR (qPCR) directly from faecal samples. Following faecal thaws, we carried out

**FIGURE 1** Galapagos tortoise (*Chelonoidis porteri*) sampling areas for study of ARGs in relation to areas of human influence on Santa Cruz Island (agricultural and urban areas). Notice almost 90% of the island is protected (Galapagos National Park)



DNA extraction by a pressure filtration technique (QuickGene DNA tissue kit S, Fujifilm®) under the manufacturer's instructions. We validated DNA extraction through the detection of the 16S rRNA gene by qPCR based on SYBR Green® (Jiang et al., 2013). Once validated, we analysed samples by a panel of up to 21 different ARGs. We chose representative ARGs of the main antimicrobial classes used in veterinary and human medicine (i.e., tetracyclines, sulphonamides, phenicols, macrolides, aminoglycosides, beta-lactams, quinolones and polymyxins), with many of them of clinical relevance (Table 1). In the case of *mcr-1* gene, we designed a set of primers (see Table 1), based on the sequences available in the GenBank. This qPCR was validated with an *E. coli* isolate previously tested as positive to *mcr-1*, kindly provided by VISAVET Research Group (Faculty of Veterinary Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Spain). We then tested field samples of different origins (faeces from different species, soil and manure) with this qPCR and sequenced any positive amplifications in order to evaluate whether unspecific amplification was observed. We performed sensitivity of the test with 10-fold dilutions of a cloned PCR product for a positive detection up to 8.4 copies per reaction. For all genes, we added PCR-positive controls and both DNA extraction and PCR-negative controls. We quantified the 21 genes for each sample by the cycle threshold (ct) for the 16S rRNA gene. We developed a custom-made formula as follows:  $\log_{10}$  (percentage of an

ARG) =  $2+0.33*(ct_{16SrRNA} - ct_{ARG})$ , where ct is the cycle threshold (16S rRNA is for the bacterial determination and ARG is for each gene), and the value 0.33 is the mean slope for all the genes tested. We expressed results in the  $\log_{10}$  of the hypothetical percentage of bacteria that each gene presents, for the percentage load of ARG. Our custom-made formula also allows the results to be expressed by percentage, and it is highly correlated with those previously published by Xie et al. (2016) ( $R^2 = .997$ ; data not shown).

## 2.4 | Statistical analyses

We obtained qualitative results for both single ARGs and antimicrobial classes, and considered the microbiome potentially resistant to an antimicrobial class if the sample was positive for at least one gene within a class. We calculated the percentage of “multi-resistant microbiomes,” as previously described by Blanco-Peña et al. (2017). We applied the term “multi-resistant microbiome” when a faecal sample was positive to at least three genes encoding resistance to different classes of antimicrobials. We also obtained quantitative results for each ARG within each sample. For statistical analysis, we defined a negative sample as any value  $\leq -8$  since we calculated the sensitivity of the technique using a baseline threshold of  $-7$  (i.e., 0.0000001% of bacteria with one ARG). We performed descriptive statistics (minimum, maximum, and average) for each gene within the total

Resistance to	Gene	Mechanism	Reference
Aminoglycosides	<i>aadA</i>	Deactivation	Devarajan et al. (2016)
	<i>Str</i>	Deactivation	Wang et al. (2014)
β-lactams	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	Deactivation	Devarajan et al. (2016)
	<i>mecA</i>	Ribosomal protection	Francois et al. (2003)
Macrolides	<i>erm(B)</i>	Ribosomal protection	Chen, Yu, Michel, Wittum, and Morrison (2007)
	<i>erm(F)</i>	Ribosomal protection	Chen et al. (2007)
Phenicols	<i>catI</i>	Deactivation	Jiang et al. (2013)
	<i>catII</i>	Deactivation	Jiang et al. (2013)
Polymyxins	<i>mcr-1</i>	Deactivation	Current study <sup>a</sup>
Quinolones	<i>qnrB</i>	Ribosomal protection	Cummings et al. (2011)
	<i>qnrS</i>	Ribosomal protection	Marti & Balcazar (2013)
Sulphonamides	<i>sull</i>	Ribosomal protection	Jiang et al. (2013)
	<i>sullI</i>	Ribosomal protection	Jiang et al. (2013)
Tetracyclines	<i>tet(A)</i>	Efflux pump	Jiang et al. (2013)
	<i>tet(B)</i>	Efflux pump	Jiang et al. (2013)
	<i>tet(K)</i>	Efflux pump	Jiang et al. (2013)
	<i>tet(M)</i>	Ribosomal protection	Jiang et al. (2013)
	<i>tet(Q)</i>	Ribosomal protection	Jiang et al. (2013)
	<i>tet(S)</i>	Ribosomal protection	Jiang et al. (2013)
	<i>tet(W)</i>	Ribosomal protection	Jiang et al. (2013)
	<i>tet(Y)</i>	Efflux pump	Jiang et al. (2013)

<sup>a</sup>Primers for *mcr-1* are as follows: *mcr-1F*: 5'-TGATACGACCATGCTCCAAA-3'; *mcr-1R*: 5'-GCCACCACAGGCAGTAAAT-3'.

samples. Additionally, we represent ARG quantification results by hierarchical clustering using a heat map.

### 3 | RESULTS

Thirteen of the 21 ARGs (61.9%) for which we tested were present in at least one sample. Genes *tet(Q)* and *tet(W)* were the most common (100% and 96.4%, respectively), followed by *aadA* (39.3%), *bla<sub>TEM</sub>* (32.1%), *qnrB* (28.6%), *erm(F)* (17.8%), *str* (14.3%), *tet(B)* (10.7%), *sullI* (7.1%) and 3.6% for genes *tet(A)*, *tet(M)*, *mecA* and *qnrS*. Genes *tet(Y)*, *tet(K)*, *tet(S)*, *sull*, *catI*, *catII*, *erm(B)*, and *mcr-1* were not detected. The average number of ARGs per sample was 3.6 (mode of three, with a minimum of two and a maximum of six genes).

In the 28 samples that passed validation and clustered by antimicrobial classes, 100% were positive to one or more genes encoding resistance for tetracycline, 42.9% for aminoglycosides, 32.1% for beta-lactams, 28.6% for quinolones, 17.9% for macrolides, and 7.1% for sulphonamides. None of the tortoise faecal samples contained ARGs encoding phenicol or polymyxin resistance (Figure 2). The

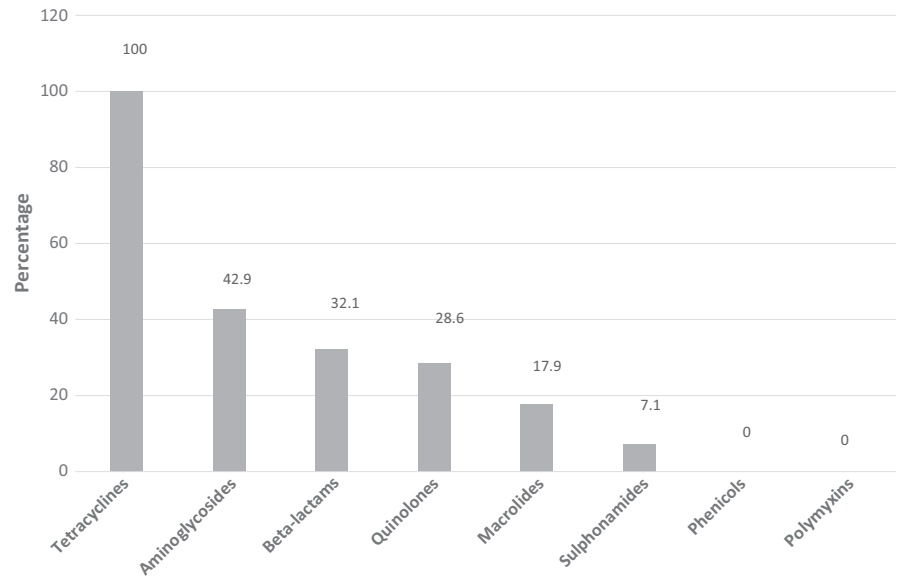
**TABLE 1** Antimicrobial resistance genes selected for the Santa Cruz tortoise (*Chelonoidis porteri*) study clustered by antimicrobial classes, their mechanism of analysis and references

average number of antimicrobial classes that were presented in each sample was 2.3, and 80% of the samples presented ARGs for two or more antimicrobial classes.

Additionally, 10 of 28 tortoises (35.7%) had microbiomes with a multi-resistant pattern (Table 2). We detected several patterns of multi-resistance. The most frequent patterns included the combination of tetracyclines with aminoglycosides and tetracyclines with beta-lactams. The combination of beta-lactams, tetracyclines, and aminoglycosides was associated with 5 of 10 microbiomes (50.0%), whereas sulphonamides were only present in 2 of 10 multi-resistant patterns (20.0%). Macrolides and quinolones were associated with 4 of 10 multi-resistant patterns (40.0%) but never presented in the same pattern together. One of the 10 patterns (10.0%) contained ARGs from five different antimicrobial classes (i.e., tetracyclines, sulphonamides, aminoglycosides, quinolones, and beta-lactams).

Results of ARG quantification were represented with a heat map (Figure 3), showing values below the 1% of bacteria harbouring each gene ( $\log_{10}$  values ranging -7 to -0.5). The highest level was a sample with 0.29% of bacteria harbouring the *tet(Q)* gene, with the other 27 samples with ARG quantification below 0.01% (Table 3).

**FIGURE 2** Percentage of tested samples for Santa Cruz tortoise (*Chelonoidis porteri*) study that presented antimicrobial resistance genes categorized by antimicrobial classes



**TABLE 2** Patterns of multi-resistant genes for the Santa Cruz tortoise (*Chelonoidis porteri*) study

Id number	Pattern <sup>a</sup>	n genes	Genes detected
689173	tet-amin-blac-quin-sul	6	<i>tet(Q)</i> , <i>tet(W)</i> , <i>sullI</i> , <i>str</i> , <i>qnrB</i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i>
702961	tet-amin-blac-quin	5	<i>tet(Q)</i> , <i>tet(W)</i> , <i>aadA</i> , <i>qnrB</i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i>
697079	tet-amin-blac-quin	5	<i>tet(Q)</i> , <i>tet(W)</i> , <i>aadA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i>
694751	tet-amin-blac	4	<i>tet(Q)</i> , <i>tet(W)</i> , <i>aadA</i> , <i>mecA</i>
681540	tet-amin-blac	4	<i>tet(Q)</i> , <i>tet(W)</i> , <i>aadA</i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i>
674304	tet-blac-quin	4	<i>tet(Q)</i> , <i>tet(W)</i> , <i>qnrB</i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i>
685390	tet-amin-macr	6	<i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tet(Q)</i> , <i>tet(W)</i> , <i>aadA</i> , <i>erm(F)</i>
683519	tet-amin-macr	5	<i>tet(Q)</i> , <i>tet(W)</i> , <i>str</i> , <i>aadA</i> , <i>erm(F)</i>
628743	tet-blac-macr	4	<i>tet(Q)</i> , <i>tet(W)</i> , <i>erm(F)</i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i>
690633	tet-macr-sul	5	<i>tet(B)</i> , <i>tet(Q)</i> , <i>tet(W)</i> , <i>sullI</i> , <i>erm(F)</i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i>

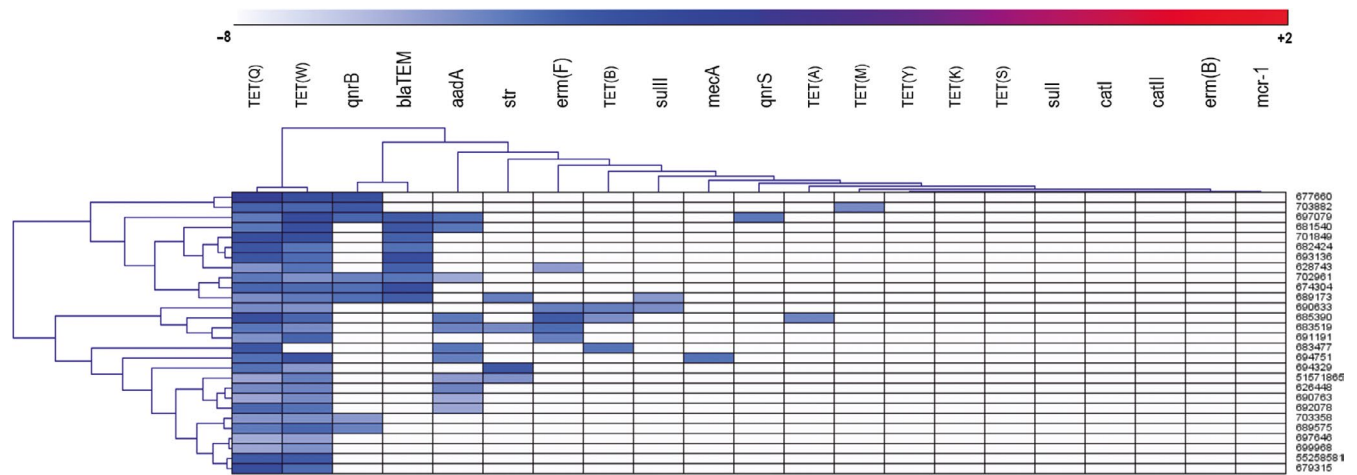
<sup>a</sup>tet: tetracycline; amin: aminoglycoside, blac: beta-lactam; quin: quinolone; sul: sulphonamide; macr: macrolide.

## 4 | DISCUSSION

All 28 Galapagos tortoise faecal samples we tested were positive to one or more genes encoding antibiotic resistance. This prevalence is high in comparison with previous results from Galapagos, although previous studies used culture methodologies and only included animals living away from high human-impacted areas (Thaller et al., 2010; Wheeler et al., 2012). Results by culture methods reported the presence of AMR “virtually absent” from land iguanas, with ARGs only detected in two of 96 samples (Thaller et al., 2010). In addition, Wheeler et al. (2012) reported the presence of resistant bacteria in

reptiles from tourism sites on Plaza Sur and San Cristobal Islands, but only genes *tet(A)* and *tet(B)* were described from *E. coli* cultures, with an estimated prevalence of 30% (18 of 59 tested samples). Our results are higher than these two previous studies, which may be a function of our focus on a species that travels between high and low human-impacted areas, and/or the utilization of a more sensitive molecular diagnostic.

In the present study, the average number of ARGs detected per sample was 3.6. This value is higher when compared to the 2.2 average value in the only other known study of ARGs in wildlife in which qPCR was used on pigeon faecal samples (Blanco-Peña et al., 2017). This



**FIGURE 3** Hierarchical clustering of samples and genes from Santa Cruz tortoise (*Chelonoidis porteri*) study, with a heat map. White cells correspond with negative results, whereas blue to red gradient represents values from 0.0000001% to 100% of bacteria with ARG. The 21 genes that were tested are located in the headline, and microchip identification numbers of study individuals are located along the right-hand side

Antimicrobial families	Genes	Quantification (Log <sub>10</sub> ) Average (min/max)	% Positive re- sults (n = 28)
Tetracyclines	<i>tet(A)</i>	-7.9 (-8.0/-4.5)	3.6
	<i>tet(B)</i>	-7.6 (-8.0/-3.9)	10.7
	<i>tet(Y)</i>	-8.0 (-8.0/-8.0)	0
	<i>tet(K)</i>	-8.0 (-8.0/-8.0)	0
	<i>tet(M)</i>	-7.9 (-8.0/-4.7)	3.6
	<i>tet(Q)</i>	-3.9 (-5.8/-0.5)	100
	<i>tet(W)</i>	-4.0 (-8.0/-2.1)	96.4
Sulphonamides	<i>sull</i>	-8.0 (-8.0/-8.0)	0
	<i>sullI</i>	-7.8 (-8.0/-4.8)	7.1
Aminoglycosides	<i>str</i>	-7.5 (-8.0/-3.0)	14.3
	<i>aadA</i>	-6.7 (-8.0/-3.8)	39.3
Phenicol	<i>catI</i>	-8.0 (-8.0/-8.0)	0
	<i>catII</i>	-8.0 (-8.0/-8.0)	0
Macrolides	<i>erm(B)</i>	-8.0 (-8.0/-8.0)	0
	<i>erm(F)</i>	-7.3 (-8.0/-3.1)	17.8
Quinolones	<i>qnr(B)</i>	-6.8 (-8.0/-2.5)	28.6
	<i>qnr(S)</i>	-7.3 (-8.0/-3.1)	3.6
Beta-lactams	<i>blaTEM</i>	-6.8 (-8.0/-2.2)	32.1
	<i>mecA</i>	-7.9 (-8.0/-3.9)	3.6
Polymyxins	<i>mrc-1</i>	-8.0 (-8.0/-8.0)	0

**TABLE 3** Quantification (log<sub>10</sub> percentage of bacteria with each gene)—mean (minimum/maximum)—and percentage of positive samples for each ARG for Santa Cruz tortoise (*Chelonoidis porteri*) study, clustered by antimicrobial classes

result suggests how farm areas may show higher contamination of AMR than urban areas (where pigeons were sampled), indicating how important it is to develop antibiotic good practices within the farming industry.

Genes *qnrB*, *qnrS* and *bla<sub>TEM</sub>*, all associated with farming activities (Dohmen et al., 2017; Esperón et al., 2018; Jones-Dias, Manageiro, & Caniça, 2016) and widely distributed in South America and Ecuador (Armas-Freire et al., 2015; Salles, Zurita,

Mejía, Villegas; Latin America Working Group on Bacterial Resistance, 2013), were found in faeces of eight, one and nine tortoises, respectively. This finding is noteworthy since quinolones and beta-lactams are broad-spectrum antibiotics commonly used to treat human infections, and the appearance of resistances may compromise the treatment of bacterial infectious diseases in both humans and animals.

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is widely distributed throughout the world, including mainland Ecuador (Planet et al., 2015). Originally, healthcare-associated MRSA infections have emerged in the community and also from livestock in recent years (Stefani et al., 2012), becoming epidemic and causing severe disease and often fatal outcomes in humans (DeLeo & Chambers, 2009). MRSA is listed as “High Priority” by the World Health Organization in their global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics (Tacconelli & Magrini, 2017). This is the first report of the *mecA* gene in Galapagos; importantly, this discovery was in the faeces of a giant tortoise that freely moves across the most human-populated island.

Regarding multi-resistant microbiomes, and in contrast with Blanco-Peña et al. (2017), sulphonamides were not the most predominant genes associated with multi-resistant patterns, being found in only two samples. The combination of beta-lactams, tetracyclines, aminoglycosides and/or quinolones was associated with 6 of 10 microbiomes (60%). The low prevalence of *sul* genes found in this study agrees with previous results based on culture methods in Galapagos, in which only one out of 23 isolates showed resistance to trimethoprim-sulphamethoxazole (Wheeler et al., 2012).

Unlike iguanas and many other wildlife species in the Galapagos, giant tortoises commonly overlap with farmlands, increasing the risk of ingestion and dissemination of AMR throughout the environment. Due to their long migrations, tortoises are potential vectors for the spread of ARGs throughout the biotic community, and may act as key indicators of environmental health. Tracking the health status of tortoises may allow for a better understanding of threats that not only affect the conservation of these tortoises, but also the health of the entire ecosystem. Lastly, we recommend the proper use of antibiotics in veterinary and human medical practices in the Galapagos. If implemented, this would greatly minimize exposure to ARGs for humans, domestic animals, and wildlife. Antibiotic best practices and local outreach and advice must be a priority to minimize the presence and impacts of antibiotic resistance in the iconic wildlife species and unique ecosystems of the archipelago.

To the authors' knowledge, this is the first time that qPCR has been used for the detection and quantification of ARGs in wildlife species in the Galapagos. These data contribute to the conservation of one of the most iconic animals of the islands and in turn may help direct management decisions for the well-being of Galapagos' human and non-human inhabitants alike.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This project was funded by the Saint Louis Zoo Institute for Conservation Medicine, the Scott Neotropical Fund from Cleveland Metroparks Zoo, IWC Schaffhausen, Houston Zoo, Galapagos Conservation Trust, and Miss Karen Lo. A special recognition for their contribution goes to Freddy Cabrera, José Haro, Anne Guezou, Karina Ramón, Laura Kleinschmidt, Jamie Palmer, Kathleen Apakupakul, Elena Neves, Irene Peña, and Carolina Carrión. This

publication is contribution number 2278 of the Charles Darwin Foundation for the Galapagos Islands.

## CONFLICT OF INTEREST

Ainoa Nieto Claudin, Fernando Esperon, Stephen Blake and Sharon L. Deem declare there is no conflict of interest.

We followed all institutional and national guidelines for the care and use of animals. Samples were collected under the Galapagos National Park research permit PC-36-17 and the International Animal Care and Use Committee from GREFA, Spain, with registration number 17/001. Samples were transported following all national and international guidelines, under the Galapagos National Park authorization permit 102-2017 and the Galapagos Biosecurity Agency authorization permit 235-ABG-2017.

## ORCID

Ainoa Nieto-Claudin  <https://orcid.org/0000-0001-5856-3779>

## REFERENCES

- Armas-Freire, P. I., Trueba, G., Proaño-Bolaños, C., Levy, K., Zhang, L., Marrs, C. F., & Eisenberg, J. N. S. (2015). Unexpected distribution of the fluoroquinolone-resistance gene *qnrB* in *Escherichia coli* isolates from different human and poultry origins in Ecuador. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 18(2), 85–90. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.237>
- Bastille-Rousseau, G., Potts, J. R., Yackulic, C. B., Frair, J. L., Ellington, E. H., & Blake, S. (2016). Flexible characterization of animal movement pattern using net squared displacement and a latent state model. *Movement Ecology*, 4(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s40462-016-0080-y>
- Blake, S., Guézou, A., Deem, S. L., Yackulic, C. B., & Cabrera, F. (2015). The dominance of introduced plant species in the diets of migratory Galapagos tortoises increases with elevation on a human-occupied island. *Biotropica*, 47(2), 246–258. <https://doi.org/10.1111/btp.12195>
- Blake, S., Wikelski, M., Cabrera, F., Guezou, A., Silva, M., Sadeghayobi, E., & Jaramillo, P. (2012). Seed dispersal by Galapagos tortoises. *Journal of Biogeography*, 39(11), 1961–1972. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02672.x>
- Blanco-Peña, K., Esperón, F., Torres-Mejía, A. M., de la Torre, A., de la Cruz, E., & Jiménez-Soto, M. (2017). Antimicrobial resistance genes in pigeons from public parks in Costa Rica. *Zoonoses and Public Health*, 64(7), e23–e30. <https://doi.org/10.1111/zph.12340>
- Causton, C. E., Hoddle, C. D., Hoddle, M. S., Lincango, M. P., Poulosom, T. G. A., Van Driesche, R. G., & Cruz, S. (2013). Improving health of native Galápagos plants by introducing a specialized predator of the invasive cottony cushion scale. In R. G. Van Driesche & R. C. Reardon (Eds.), *Biological control in natural areas* (pp. 16–22). Morgantown, WV: The Forest Health Technology Enterprise Team (FHTET).
- Chen, J., Yu, Z., Michel, F. C. Jr, Wittum, T., & Morrison, M. (2007). Development and application of real-time PCR assays for quantification of erm genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. *Appl Environ Microbiol.*, 73(14), 4407–16.

- Cummings, D. E., Archer, K. F., Arriola, D. J., Baker, P. A., Faucett, K. G., Laroya, J. B., ... & Zuill, D. E. (2011). Broad dissemination of plasmid-mediated quinolone resistance genes in sediments of two urban coastal wetlands. *Environ Sci Technol*, 45(2), 447–54.
- Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2001). Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica*, 78(2), 103–116. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(00\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(00)00179-0)
- Deem, S. L., Cruz, M. B., Higashiguchi, J. M., & Parker, P. G. (2012). Diseases of poultry and endemic birds in Galapagos: Implications for the reintroduction of native species. *Animal Conservation*, 15(1), 73–82. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2011.00489.x>
- Deem, S. L., Cruz, M., Jimenez-Uzategui, G., Fessl, B., Miller, E. R., & Parker, P. G. (2008). *Pathogens and parasites: An increasing threat to the conservation of Galapagos avifauna*. Galapagos Report (pp. 125–130).
- Deem, S. L., Parker, P. G., & Miller, R. E. (2008). Building bridges: Connecting the health and conservation professions. *Biotropica*, 40(6), 662–665. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2008.00436.x>
- DeLeo, F. R., & Chambers, H. F. (2009). Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(9), 2464–2474. <https://doi.org/10.1172/JCI38226>
- Devarajan, N., Laffite, A., Mulaji, C. K., Otamonga, J.-P., Mpiana, P. T., Mubedi, J. I., ... Poté, J. (2016). Occurrence of antibiotic resistance genes and bacterial markers in a tropical river receiving hospital and urban wastewaters. *PLoS ONE*, 11(2), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149211>
- Di Marco, M., Venter, O., Possingham, H. P., & Watson, J. E. M. (2018). Changes in human footprint drive changes in species extinction risk. *Nature Communications*, 9(1), 4621.
- Dohmen, W., Dorado-García, A., Bonten, M. J. M., Wagenaar, J. A., Mevius, D., & Heederik, D. J. J. (2017). Risk factors for ESBL-producing *Escherichia coli* on pig farms: A longitudinal study in the context of reduced use of antimicrobials. *PLoS ONE*, 12(3), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174094>
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., & Realman, D. A. (2010). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(6), 895–901. <https://doi.org/10.1016/j.jajo.2009.07.014>. Aqueous
- Esperón, F., Sacristán, C., Carballo, M., & de la Torre, A. (2018). Antimicrobial resistance genes in animal manure, manure-amended and nonanthropogenically impacted soils in Spain. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 9(9), 469–480. <https://doi.org/10.4236/abb.2018.99032>
- Francois, P., Pittet, D., Bento, M., Peppey, B., Vaudaux, P., Lew, D., & Schrenzel, J. (2003). Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from sterile or nonsterile clinical samples by a new molecular assay. *J Clin Microbiol*, 41(1), 254–60.
- Gibbs, J. P., Snell, H. L., & Causton, C. E. (1999). Effective monitoring for adaptive wildlife management: Lessons from the Galapagos Islands, 63. *The Journal of Wildlife Management*, 63(4), 1055–https://doi.org/10.2307/3802825
- Greger, M. (2007). The human/animal interface: Emergence and resurgence of zoonotic infectious diseases. *Critical Reviews in Microbiology*, 33(4), 243–299. <https://doi.org/10.1080/10408410701647594>
- Guerra, B., Fischer, J., & Helmuth, R. (2014). An emerging public health problem: Acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Veterinary Microbiology*, 171(3–4), 290–297. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2014.02.001>
- Jiang, L., Hu, X., Xu, T., Zhang, H., Sheng, D., & Yin, D. (2013). Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China. *Science of The Total Environment*, 458, 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.038>
- Jobbins, S. E., & Alexander, K. A. (2015). From whence they came: Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in African wildlife. *Journal of Wildlife Diseases*, 51(4), 811–820. <https://doi.org/10.7589/2014-11-257>
- Jones-Dias, D., Manageiro, V., & Caniça, M. (2016). Influence of agricultural practice on mobile bla genes: IncI1-bearing CTX-M, SHV, CMY and TEM in *Escherichia coli* from intensive farming soils. *Environmental Microbiology*, 18(1), 260–272. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13021>
- Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10(S12), S122–S129. <https://doi.org/10.1038/nm1145>
- Marinho, C. M., Santos, T., Gonçalves, A., Poeta, P., & Igrejas, G. (2016). A decade-long commitment to antimicrobial resistance surveillance in Portugal. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1650. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01650>
- Marti, E., & Balcázar, L. (2013). Real-Time PCR Assays for Quantification of qnr genes in environmental water samples and chicken feces. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), 1743–1745. <https://doi.org/10.1128/AEM.03409-12>
- National Institute of Statistics and Census, Ecuador. (2015). Censo de Población y Vivienda de Galápagos. <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/institucional/home/>
- Planet, P. J., Diaz, L., Kolokotronis, S.-O., Narechania, A., Reyes, J., Xing, G., & Arias, C. A. (2015). Parallel epidemics of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 infection in North and South America. *Journal of Infectious Diseases*, 212(12), 1874–1882. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv320>
- Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H., & Carlson, K. H. (2006). Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in northern Colorado. *Environmental Science and Technology*, 40(23), 7445–7450.
- Sakeena, M. H. F., Bennett, A. A., & McLachlan, A. J. (2018). Non-prescription sales of antimicrobial agents at community pharmacies in developing countries: A systematic review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, <https://doi.org/10.1016/j.ijant.2018.09.022>
- Salles, M. J. C., Zurita, J., Mejía, C., Villegas, M. V.; Latin America Working Group on Bacterial Resistance (2013). Resistant gram-negative infections in the outpatient setting in Latin America. *Epidemiology and Infection*, 141(12), 2459–2472. <https://doi.org/10.1017/S095026881300191X>
- Stefani, S., Chung, D. R., Lindsay, J. A., Friedrich, A. W., Kearns, A. M., Westh, H., & MacKenzie, F. M. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(4), 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.ijant.2011.09.030>
- Tacconelli, E., & Magrini, N. (2017). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. Retrieved from <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
- Thaller, M. C., Migliore, L., Marquez, C., Tapia, W., Cedeño, V., Rossolini, G. M., & Gentile, G. (2010). Tracking acquired antibiotic resistance in commensal bacteria of Galápagos Land Iguanas: No Man, no resistance. *PLoS ONE*, 5(2), e8989. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008989>
- Toral-Granda, M. V., Causton, C. E., Jäger, H., Trueman, M., Izurieta, J. C., Araujo, E., ... Garnett, S. T. (2017). Alien species pathways to the Galapagos Islands. *Ecuador. Plos One*, 12(9), e0184379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184379>
- van de Sande-Bruinsma, N., Grundmann, H., Verloo, D., Tiemersma, E., Momen, J., Goossens, H., & Ferech, M. (2008). Antimicrobial drug use and resistance. *Europe*, 14(11), <https://doi.org/10.3201/eid1411.070467>
- Vittecoq, M., Godreuil, S., Prugnotte, F., Durand, P., Brazier, L., Renaud, N., ... Renaud, F. (2016). Antimicrobial resistance in

- wildlife. *Journal of Applied Ecology*, 53(2), 519–529. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12596>
- Wang, F.-H., Qiao, M., Su, J.-Q., Chen, Z., Zhou, X., & Zhu, Y.-G. (2014). High throughput profiling of antibiotic resistance genes in urban park soils with reclaimed water irrigation. *Environmental Science and Technology*, 48(16), 9079–9085. <https://doi.org/10.1021/es502615e>
- Watson, J., Trueman, M., Tufet, M., Henderson, S., Atkinson, R., Gibbs, J. P., & Vargas, H. (2010). Mapping terrestrial anthropogenic degradation on the inhabited islands of the Galapagos Archipelago. *Oryx*, 44(1), 79. <https://doi.org/10.1017/S0030605309990226>
- Wheeler, E., Hong, P.-Y., Bedon, L. C., & Mackie, R. I. (2012). Carriage of antibiotic-resistant enteric bacteria varies among sites in Galapagos reptiles. *Journal of Wildlife Diseases*, 48(1), 56–67. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.1.56>
- Xie, W.-Y., Yang, X.-P., Li, Q., Wu, L.-H., Shen, Q.-R., & Zhao, F.-J. (2016). Changes in antibiotic concentrations and antibiotic resistome during commercial composting of animal manures. *Environmental Pollution*, 219, 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.044>
- Yackulic, C. B., Blake, S., & Bastille-Rousseau, G. (2017). Benefits of the destinations, not costs of the journeys, shape partial migration patterns. *Journal of Animal Ecology*, 86(4), 972–982. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12679>

**How to cite this article:** Nieto-Claudin A, Esperón F, Blake S, Deem SL. Antimicrobial resistance genes present in the faecal microbiota of free-living galapagos tortoises (*Chelonoidis porteri*). *Zoonoses Public Health*. 2019;00:1–9. <https://doi.org/10.1111/zph.12639>



**Título**

*Antimicrobial resistance in Galapagos tortoises as an indicator of the growing human footprint*

**Resumen**

La resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en una de las principales amenazas para la salud pública en todo el mundo, siendo las actividades antropogénicas uno de los principales factores que impulsan la propagación de las resistencias. Comprender y combatir la propagación de bacterias resistentes es una de las principales prioridades de las instituciones sanitarias a nivel mundial, y se incluye como uno de los principales objetivos de la iniciativa *One Health*. Las tortugas gigantes (*Chelonoidis* spp.) son una de las especies más emblemáticas de la Tierra, ampliamente distribuidas en el archipiélago de las Galápagos y, por lo tanto, candidatas idóneas para probar la hipótesis de que las especies silvestres de Galápagos portan genes resistentes a los antimicrobianos (ARGs) asociados con las actividades humanas. Para este proyecto se recolectaron muestras de un total de 200 tortugas silvestres en el oeste de la isla Santa Cruz (*C. porteri*), la isla con una mayor población humana del archipiélago, y 70 tortugas del volcán Alcedo (*C. vandenburghi*) en la isla Isabela, un espacio natural con mínima presencia humana. Las muestras fecales se analizaron mediante PCR a tiempo real para un panel de 21 genes que confieren resistencia a ocho clases

de antimicrobianos (tetraciclinas, aminoglucósidos,  $\beta$ -lactámicos, fenicoles, polimixinas, quinolonas, macrólidos y sulfonamidas). Se encontraron ARGs tanto en las tortugas gigantes de Santa Cruz como en el volcán Alcedo, sin embargo, los resultados tanto cualitativos como cuantitativos mostraron cargas más altas de genes resistentes en las tortugas que habitan los ambientes antropizados de Santa Cruz. Además, las tortugas de Santa Cruz que fueron muestreadas en zonas más antropizadas (fincas ganaderas y áreas urbanas) presentaron un mayor número de ARGs y microbiomas multirresistentes que aquellas muestreadas en áreas menos antropizadas dentro de la misma isla. Nuestros hallazgos sugieren que las actividades humanas en las Galápagos tienen un impacto negativo en la salud del ecosistema a través de la dispersión de ARGs. Esta investigación pone de manifiesto una nueva amenaza para la salud y conservación de la vida silvestre única de Galápagos, sus ecosistemas y los humanos que habitan este Patrimonio Natural de la Humanidad. Nuestra recomendación para los responsables políticos locales es controlar y reducir el uso de antibióticos tanto en la salud humana como animal y establecer medidas para realizar una correcta gestión y disposición final de los desechos farmacológicos.

### **Referencia**

Nieto-Claudín, A., Deem, S.L., Rodríguez, C., Cano, S., Moity, N., Cabrera, F. & Esperón, F. (2021). Antimicrobial resistance in Galapagos tortoises as an indicator of the growing human footprint. *Environmental Pollution* 284, 117453. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117453>

### **Factor de Impacto y Posición de la Revista**

IF 8,071. Q1 Environmental Sciences (JCR, 2020)

### **Proceedings**

Nieto-Claudín, A. (2021, August 18). Las bacterias resistentes a los antibióticos también se encuentran en las tortugas gigantes de Galápagos. *The Conversation*. <https://theconversation.com/las-bacterias-resistentes-a-los-antibioticos-tambien-se-encuentran-en-las-tortugas-gigantes-de-galapagos-165896>

Nieto-Claudín, A. & Deem, S.L. (2021). One Health: One Solution for Galapagos conservation. *IX Newsletter WDA Latin American Section Special Edition*, 29-31.

Nieto-Claudín, A., Deem, S.L., Guezou, A., Cabrera, F. & Blake, S. (2020, November 5). *Biología de las tortugas de Galápagos, estado de conservación y principales amenazas* [Conference presentation]. Ciclo de Conferencias Webi-Tortugas: Acción para su Conservación. Zoológico de Quito y Vivarium de Quito, Ecuador. Virtual.

Nieto-Claudín, A., Esperón, F. & Deem, S.L. (2020, October 30- November 3). *Antimicrobial resistance genes in giant tortoises as an indicator of One Health impacts in the Galapagos Islands* [Conference presentation]. Fellowship grant. Virtual Edition 6<sup>th</sup> World One Health Congress, Edimburgo, Escocia.

Nieto-Claudín, A., Esperón, F., Palmer, J., Apakupakul, K. & Deem, S.L. (2019, November 20-22). *Salud de las tortugas gigantes desde una perspectiva de One Health* [Conference presentation]. I Congreso: La Herpetología en América. Universidad de Las Américas, Quito, Ecuador.





## Antimicrobial resistance in Galapagos tortoises as an indicator of the growing human footprint<sup>☆</sup>

Ainoa Nieto-Claudin<sup>a,b,c,\*</sup>, Sharon L. Deem<sup>a,c</sup>, Casilda Rodríguez<sup>b</sup>, Santiago Cano<sup>b</sup>,  
Nicolas Moity<sup>a</sup>, Freddy Cabrera<sup>a</sup>, Fernando Esperón<sup>b,d</sup>

<sup>a</sup> Charles Darwin Research Station, Charles Darwin Foundation, Santa Cruz, Galapagos, Ecuador

<sup>b</sup> Complutense University of Madrid, Veterinary Faculty, Puerta de Hierro Av, Madrid, 28040. Spain

<sup>c</sup> Saint Louis Zoo Institute for Conservation Medicine, One Government Drive, Saint Louis, MO, 63110. USA

<sup>d</sup> INIA-CISA. Algete-El Casar Road, Valdeolmos, 28130. Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Wildlife surveillance  
One health  
Antibiotic resistance  
ARG  
*Chelonoidis* spp

### ABSTRACT

Antimicrobial resistance has become one of the main public health threats worldwide with anthropogenic activities driving the spread of resistance. Understanding and combatting the spread of resistant bacteria is a top priority for global health institutions, and it is included as one of the main goals of the One Health initiative. Giant tortoises (*Chelonoidis* spp.), some of the most iconic species on Earth, are widely distributed across the Galapagos archipelago and are thus perfect candidates to test the hypothesis that wildlife species in the Galapagos carry antimicrobial resistant genes (ARGs) associated with human activities. We sampled a total of 200 free-living Galapagos tortoises from western Santa Cruz Island (*C. porteri*), the most human-populated island of the archipelago, and 70 tortoises (*C. vandenburghi*) from the isolated Alcedo Volcano on Isabela Island, a natural area with minimal human presence. Fecal samples were analyzed by quantitative PCR for a panel of 21 ARGs conferring resistance for eight antimicrobial classes. We found ARGs in both Santa Cruz and Alcedo Volcano giant tortoises; however, both qualitative and quantitative results showed higher loads of ARGs in tortoises inhabiting the human modified environments of Santa Cruz. Moreover, Santa Cruz tortoises sampled in higher human-modified landscapes (i.e., farmlands and urban areas) presented a higher number of ARGs, antimicrobial classes, and multi-resistant microbiomes than those from less anthropized areas within the same island. Our findings suggest that human activities in Galapagos have a negative impact on ecosystem health through ARG dispersal. This research highlights a new threat for the health and conservation of the unique wildlife of the Galapagos, their ecosystems, and the humans inhabiting this World Heritage Site. Our recommendation to local policy makers is to control and reduce the use of antibiotics in both human and animal health, thus helping enforce antimicrobial regulations.

### 1. Introduction

Globally, we are experiencing a rapid escalation of antimicrobial resistance (AMR) combined with the equally rapid decline in discovery and development of new antibiotic classes (Bartlett et al., 2013). Infections caused by resistant bacteria are responsible for thousands of once preventable human deaths and the loss of millions of USD every year (O'Neil, 2014; WHO, 2020). The Pan American Health Organization (PAHO) has drawn the attention of the urgent need of strengthening

antimicrobial surveillance in all different activities including veterinary practices (Acar and Moulin, 2013). A main challenge in veterinary medicine is the use of antimicrobials as growth promoters, prophylactics, and metaphylactics (Murphy et al., 2017). One Health has been internationally recognized as a collaborative effort of multiple disciplines to attain optimal health for people, animals, and the environment (Deem and Brenn-White, 2020). As such, the One Health paradigm addresses the negative impacts of AMR on the well-being of animals, humans, and the health of environments, together with the

<sup>☆</sup> This paper has been recommended for acceptance by Da Chen.

\* Corresponding author. Charles Darwin Research Station, Charles Darwin Foundation, Santa Cruz, Galapagos, Ecuador.

E-mail addresses: [ainoa.nieto@fcdarwin.org.ec](mailto:ainoa.nieto@fcdarwin.org.ec) (A. Nieto-Claudin), [deem@stlzoo.org](mailto:deem@stlzoo.org) (S.L. Deem), [rodfermc@vet.ucm.es](mailto:rodfermc@vet.ucm.es) (C. Rodríguez), [scano@ucm.es](mailto:scano@ucm.es) (S. Cano), [nicolas.moity@fcdarwin.org.ec](mailto:nicolas.moity@fcdarwin.org.ec) (N. Moity), [fredy.cabrera@fcdarwin.org.ec](mailto:fredy.cabrera@fcdarwin.org.ec) (F. Cabrera), [esperon@inia.es](mailto:esperon@inia.es) (F. Esperón).

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117453>

Received 25 February 2021; Received in revised form 20 May 2021; Accepted 21 May 2021

Available online 22 May 2021

0269-7491/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

need for transdisciplinary research and prevention plans to minimize this shared threat (Fisman and Laupland, 2010; Kahn, 2016; Amuasi et al., 2020).

Despite recent efforts to lessen this health threat, AMR is widely distributed across the world with resistant bacteria found in all continents and environments, both with and without evidence of significant human impacts (Segawa et al., 2013; Van Goethem et al., 2018). The development of resistance is an event that naturally occurs in microbial communities on a small scale (Tan et al., 2018); however, it is well-known that human activities play a key role in the dissemination of AMR throughout the environment (Carballo et al., 2016; Esperón et al., 2020). For instance, between 75 and 90% of the antibiotics administered to livestock may be released into the environment through animal waste and widely dispersed through the use of slurry (Chee-Sanford et al., 2009; Wright, 2010). Antimicrobial resistance may be encoded by plasmid-mediated antimicrobial resistance genes (ARGs) that can be further disseminated among bacteria through horizontal gene transfer mechanisms via mobile genetic elements such as transposons, plasmids, and integrons (Wang et al., 2014). Therefore, ARGs are considered environmental pollutants of high concern for human, animal, and environmental health (Pruden et al., 2006).

As free-living wildlife generally do not receive antibiotics or veterinary care, the prevalence of AMR harbored by wildlife is generally accepted as influenced by the relative level of exposure to anthropogenic contamination (Ramey and Ahlstrom, 2020; Ahlstrom et al., 2021). As such, several studies confirm that wildlife may be good sentinels of the burden of resistance within the local environment and may therefore be useful for identifying potential point sources of anthropogenic AMR contamination (Blanco-Peña et al., 2017; Cevitanes et al., 2020; Sacristán et al., 2020; Ewbank et al., 2021).

Strict regulations and governmental operation plans have been delivered in several countries to reduce and control the dispersion of AMR (WHO, 2017). In Latin America, the Heads of Medicine Agencies (EAMI) have joined the battle against AMR in an effort to integrate policies and regulations that help to reduce it. Unfortunately, current national and international programs are generally biased toward human and domestic animal AMR bacterial surveillance, and the environment has only received limited attention (Dolejska and Literak, 2019). In 2019, Ecuador launched a strategic national plan to reduce AMR (Ecuadorian Ministry of Health, 2019); however, most antimicrobials for both human and animal use are still accessible throughout the country without a medical prescription.

The Galapagos Archipelago is located in the eastern tropical Pacific Ocean, almost 1000 km away from the coast of mainland Ecuador. Galapagos is a UNESCO World Heritage Site and is still considered one of the most well conserved and managed archipelagos on Earth; however, oceanic islands are highly sensitive to human impacts (Fordham and Brook, 2010; Veron et al., 2019). In recent years, anthropogenic environmental degradation has progressed rapidly in Galapagos due to land transformations through agriculture, urbanization, tourism, and the impacts of novel invasive species (Watson et al., 2009; Toral-Granda et al., 2017). The biggest terrestrial vertebrate inhabiting Galapagos are species of giant tortoises (*Chelonoidis* spp.), widely distributed across the archipelago in both natural and human-modified landscapes. From the 14 species of Galapagos tortoises that have ever been described, two are currently extinct and nine are considered endangered or critically endangered by the IUCN, 2020. Main threats to Galapagos tortoises include habitat loss and fragmentation, illegal trade, introduced and invasive species, global warming, egg loss to introduced predators, disease, and trauma (Blake et al., 2012; Ellis-Soto et al., 2017; Bastille-Rousseau et al., 2019; Frazier, 2021).

Preliminary results from our research group show that tortoises from the human-inhabited Santa Cruz Island carry ARGs (Nieto-Claudin et al., 2019) with 100% of the 28 samples positive to at least one gene conferring resistance. Based on these findings, we designed a broader study to better understand how ARGs are distributed across the

archipelago and whether human activities such as farming and sewage may play a role on ARG abundance and distribution within inhabited islands. We hypothesized that tortoises inhabiting human-modified landscapes (Santa Cruz) would have a higher frequency and load of resistance gene-carrying bacteria than tortoises from non-inhabited areas (Alcedo Volcano, Isabela). Considering the fact that Santa Cruz tortoise species are migratory and move long distances every year from protected national park areas into urban and farming properties (Blake et al., 2013), our second hypothesis was that tortoises sampled across an anthropic gradient within the human-populated Santa Cruz Island would not present differences in frequency and ARG load since their movements suggest use of the landscape within these different categories of human land-use.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study site

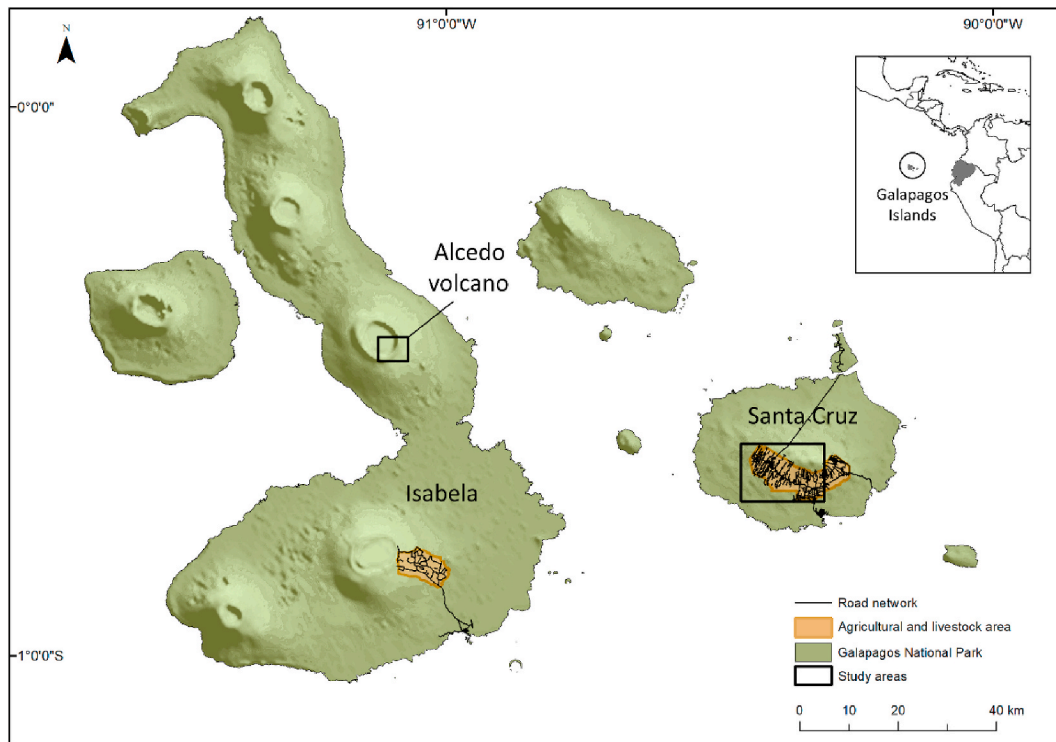
We conducted the study on two islands of the Galapagos Archipelago (Fig. 1). Santa Cruz, located in the center of the archipelago and inhabited by humans, and the non-inhabited Alcedo Volcano, located in northern Isabela Island. Santa Cruz is the most populated island of Galapagos, with an estimated 15,700 inhabitants (National Institute of Statistics, 2015). In addition, the population of Santa Cruz has dramatically increased in the last few years because of tourism, with a record of 276,000 visitors arriving to Galapagos in 2018, and the majority of these visiting Santa Cruz, the most tourist trafficked island of the archipelago (Observatorio de Turismo de Galápagos, 2018). Isabela, by contrast, has a small population of less than 2500 inhabitants (National Institute of Statistics, 2015) with human settlements restricted to the southern part of the island (S00.975418°, W91.007818°).

Santa Cruz contains only two species of critically endangered giant tortoises, with the most predominant (*Chelonoidis porteri*) inhabiting the central and south-western area and the other (*Chelonoidis donfaustoi*) restricted to the north-eastern side of the island. For the current study we focus on *C. porteri* as the most representative and more widely distributed species of Santa Cruz. The estimated population for this species is 3400 individuals based on IUCN data from 2010 (Cayot et al., 2017), but no census has been conducted in the last decade. Through our work, we estimate a population that exceeds 6000 individuals (Blake, Cabrera, Nieto-Claudin, Deem unpublished data).

Alcedo Volcano is located in the middle of Isabela Island, south of the Equator (S00.4409454°, W091.1068907°) and is one of five volcanoes on Isabela inhabited by giant tortoises. As a result of isolation and evolution, each volcano has a unique species of giant tortoise, with *Chelonoidis vandenburghi* endemic to Alcedo and its slopes. The IUCN estimated population for this species is 6320 tortoises and its conservation status is vulnerable (Cayot et al., 2018). Alcedo Volcano has never been inhabited by humans; however, between 2004 and 2006 extensive goat eradication was carried out by dozens of hunters and rangers as part of the International Project Isabela (Lavoie et al., 2007). Since then, Alcedo Volcano has been restricted to scientific activities, with very few scientists visiting the caldera annually.

### 2.2. Sampling design and sample collection

We collected tortoise biological samples as part of a long-term health assessment within the Galapagos Tortoise Movement Ecology Programme (GTMEP). From 2017 to 2020, we collected samples from 200 free-living western Santa Cruz tortoises (including 28 samples from a pilot study, Nieto-Claudin et al., 2019) and 70 Alcedo Volcano tortoises, for several health research purposes. Samples in Santa Cruz were collected over multiple years and seasons across a gradient of human to non-human modified landscapes (i.e., farms, urban areas, and the national park). “Farm” and “urban” areas were considered the most human-modified, “touristic reserves” (private properties, with very few



**Fig. 1.** Location of the Galapagos islands within the American continent (insert). Giant tortoise sampling areas to study ARGs within the Galapagos archipelago in relation to areas of human influence (agricultural and urban areas) on Santa Cruz and Isabela islands. Almost 97% of the archipelago is protected (Galapagos National Park).

human infrastructures, that focus on sustainable tourism where tortoises freely roam every year) were considered intermediate human impact, and “national park” was deemed the least human-impacted area since no people are allowed to conduct any activity other than research and targeted hunting of invasive species. Samples in Alcedo were collected during an 8-day field trip in July 2018 along the rim of the crater and the slopes of the volcano.

Due to handling challenges, we selected individuals weighing less than 200 kg. We recorded morphometric measurements and weighed each tortoise with a precision of  $\pm 0.5$  kg. We performed a physical examination and determined the sex in mature animals by tail length and plastron concavity. We classified immature animals (sub-adults) based on curve carapace length (Nieto-Claudin et al., 2021). We collected feces from the cloaca and placed approximately 25 g per tortoise in a 15 ml sterile conical tube for ARG determination. We kept all samples frozen at  $-80$  °C until analysis and for a maximum of 6 months. We identified tortoises by microchips previously placed by Galapagos National Park Service rangers. If no microchip was detected, we placed a new subcutaneous microchip (DATAMARS®) in the caudo-ventral area of the left hind leg to avoid sampling duplication.

We collected samples under the Galapagos National Park annual research permits PC-36-17, PC-35-18, PC-16-19, PC-28-20, and the International Animal Care and Use Committee from GREFA (Spain) with registration number 17/001. We stored all samples at the Charles Darwin Research Station (CDRS) and conducted the analyses at the INIA-CISA in Madrid, Spain. We transported frozen samples under exportation permits 153-2019-EXP-CM-FAU-DNB/MA, 192-2019-EXP-CM-FAU-DNB/MA, and 031-2020-EXP-CM-FAU-DNB/MA.

### 2.3. Molecular analysis of ARGs

We performed total DNA extraction directly from fecal samples by using a pressure filtration technique (QuickGene DNA Tissue Kit S, Fujifilm, Japan) following the manufacturer’s instructions. The 16S

rRNA gene was amplified in each DNA sample by quantitative PCR (qPCR) in 10-fold dilutions of extracted samples according to Jiang et al. (2013). A sample was considered as validated when a ten-fold dilution showed a cycle threshold (Ct) less than 25 (Esperón et al., 2018). Once validated, we analyzed samples by a panel of up to 21 different ARGs encoding resistance to eight different antimicrobial classes as representatives of the main antimicrobials generally used in veterinary and human medicine: tetracyclines (*tet(A)*, *tet(B)*, *tet(Y)*, *tet(K)*, *tet(M)*, *tet(Q)*, *tet(S)*, and *tet(W)*), sulfonamides (*sulI* and *sulII*), aminoglycosides (*str* and *aadA*), phenicols (*catI* and *catII*), macrolides (*ermB* and *ermF*), quinolones (*qnrS* and *qnrB*), betalactams (*blaTEM* and *mecA*), and polymyxins (*mcr-1*). We used the primers previously described in Nieto-Claudin et al. (2019). We quantified the 21 genes for each sample by the cycle threshold (Ct) for the 16S rRNA gene. We applied the following formula to estimate the percentage of bacteria harboring ARGs (load percentage of each ARG):

$$\% \text{ ARG} = 10^{[2+0.33(\text{ct}_{16S} - \text{ct}_{\text{ARG}})]}$$

, with results expressed in logarithm 10, ranging from  $-8$  (given to a sample considered negative) to  $+2$  (when 100% of the bacteria in the sample presented the ARG). The cycling parameters were the same for all qPCR reactions [ $6' 95$  °C,  $40 \times (10'' 95$  °C,  $30'' 60$  °C)], with annealing and extension in the same step, at constant temperature of  $60$  °C. A melting curve step was performed at the end of the qPCR reaction (Nieto-Claudin et al., 2019). We classified a microbiome as multi-resistant when the fecal sample was positive to at least three genes encoding resistance to different classes of antimicrobials (Blanco-Peña et al., 2017).

### 2.4. Statistical analyses

We provided descriptive statistics for each gene within the total samples. We analyzed the normality of the data by Kolmogorov-Smirnov test ( $p < 0.05$ ). We performed a non-parametric Mann-Whitney *U* test to assess differences between the two species (Alcedo Volcano and Santa Cruz), sex, age (adults and subadults), and sampling season (dry and

humid) due to violation of ANOVA model assumptions. We used Kruskal Wallis (K–W) with Bonferroni post-hoc adjustment to test for differences in the classes and numbers of ARGs between the four sampling areas of Santa Cruz.

To further explore the hypothesis that more human-modified areas would lead to higher loads of ARGs in giant tortoises, we ranked the sample areas on an anthropogenic gradient from least to most human impacts: Alcedo Volcano as the most preserved biotope, the national park area of Santa Cruz, touristic reserves of Santa Cruz, and urban and agricultural areas within Santa Cruz as the most human-modified biotopes. We used a logistic regression model to study the effect of anthropization on the presence of multi-resistant microbiomes and the presence of different antimicrobial classes, using Alcedo Volcano as the reference. We used a Poisson regression to model count data (total number of ARGs and antimicrobial classes per sample). We estimated Odds Ratio (OR) and 95% confident intervals (CI) for each variable. All analyses were performed on IBM® SPSS® Statistics 25.

To further explore spatial differences regarding ARGs within the Santa Cruz sampling areas, and to identify spatial clusters within those areas, we performed a hot spot analysis based on the Getis-Ord  $G_i^*$  statistic (Getis and Ord, 1992) using ArcGIS 10.6.1 (ESRI, Redlands, CA). This statistic allows us to identify areas with individuals carrying significantly more ARGs in their microbiome than expected in a random distribution, given their distance and their value relative to the mean. Therefore, an individual with high ARGs should be surrounded by other individuals with high ARGs to constitute a significant hotspot. This statistic identifies spatial clustering by means of z-scores and assumes normality of data (Zhang, 2008). A high z-score value ( $\geq 1.65$ ) represents statistically significant clustering of high values (hotspot) at the  $p$ -value  $\leq 0.1$ , a low negative value ( $< -1.65$ ) represents spatial clustering of low values (cold spot), while a value close to zero indicates no spatial clustering.

### 3. Results

In Santa Cruz, 19 of the 21 ARGs were present in at least one sample. The most predominant genes were *tet(W)* and *tet(Q)* with 93% and 71% respectively, followed by *tet(M)* (35.5%), *tet(S)* (33.5%), *blaTEM* (33%), *qnrS* (26%), and *aadA* (25%). Genes *sull* and *mcr-1* were not detected, and the median genes per sample was 4 (min 0, max 10). By contrast, we

found 18 of the 21 ARGs present in Alcedo Volcano. The most predominant genes were also *tet(W)* and *tet(Q)* with 51.4% and 50% respectively, followed by *blaTEM* (37.1%), *qnrS* (30%), and *tet(B)* (24.3%). Genes *tet(Y)*, *tet(M)*, and *erm(B)* were not detected, and the median genes per sample (2) was significantly lower than in Santa Cruz ( $p < 0.001$ ). We found statistically significant differences among species with a higher number of tortoises carrying genes *tet(M)* ( $p < 0.001$ ), *tet(Q)* ( $p = 0.001$ ), *tet(S)* ( $p < 0.001$ ), *tet(W)* ( $p < 0.001$ ), *tet(Y)* ( $p = 0.002$ ), *str* ( $p = 0.026$ ), and *aadA* ( $p < 0.001$ ) in Santa Cruz. The presence of *sull* gene ( $p = 0.017$ ) in Alcedo Volcano was also statistically significant. We did not find significant differences for any of the other genes. There were no differences based on sex or age.

Clustered by antimicrobial classes, the tortoise microbiome in both islands were observed to be characterized by the presence of tetracycline, beta-lactams, and quinolone resistant genes, in descending order of occurrence. However, in Santa Cruz the microbiome was also characterized by aminoglycoside resistance, having a statistically significant higher percentage of tetracyclines ( $p < 0.001$ ) and aminoglycosides ( $p < 0.001$ ) than in Alcedo Volcano (Fig. 2). The number of antimicrobial classes for which resistance genes were detected was also significantly different between the two tortoise species ( $p = 0.003$ ).

Additionally, 68 of 200 Santa Cruz tortoises (34%) had a multi-resistant microbiome, whereas only 12 out of 70 Alcedo tortoises (17.1%) did. This difference was statistically significant ( $p = 0.008$ ).

The quantification of genes showed significant differences for genes *tet(M)* ( $p < 0.001$ ), *tet(S)* ( $p < 0.001$ ), *tet(W)* ( $p < 0.001$ ), *tet(Y)* ( $p = 0.002$ ), *str* ( $p = 0.027$ ), and *aadA* ( $p < 0.001$ ), with a higher load of bacteria carrying these ARGs in Santa Cruz. Only the *sull* gene showed a higher quantification in Alcedo ( $p = 0.017$ ) (Table 1). The *mcr-1* gene was only found in one individual from *C. vandenburghi* which was not statistically significant.

In Santa Cruz, and contrary to our second hypothesis, tortoises sampled within more anthropized areas (urban and farming locations) presented a significantly higher number of ARGs than those from less human-modified areas (touristic reserves and national park) ( $p < 0.001$ ) (Fig. 3). Clustered by antimicrobial classes, farming areas showed a higher number of tortoises carrying tetracycline resistance than those from the national park ( $p = 0.019$ ), and tortoises in urban areas had higher aminoglycosides than both the national park ( $p = 0.009$ ) and touristic reserves ( $p = 0.013$ ). Urban areas also presented a higher

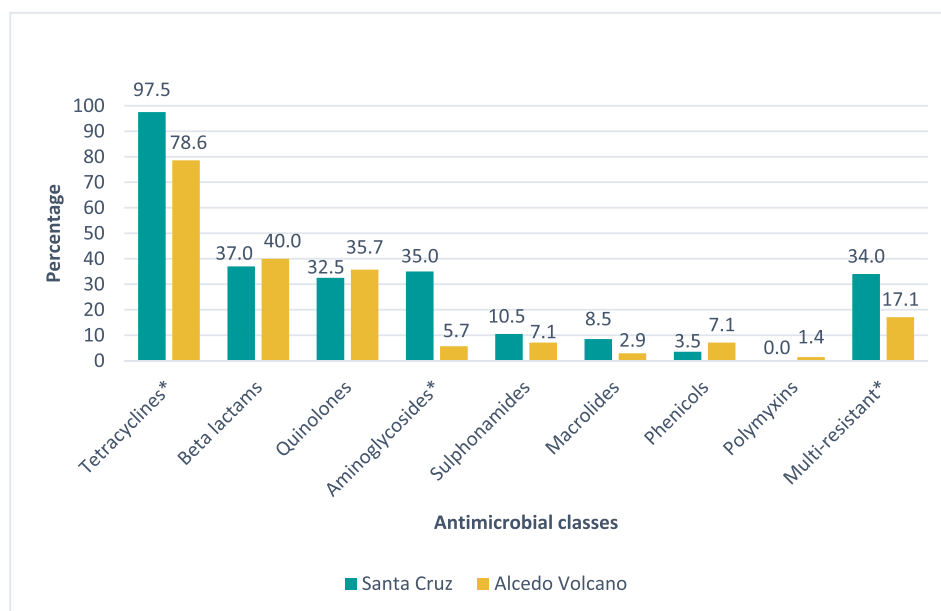


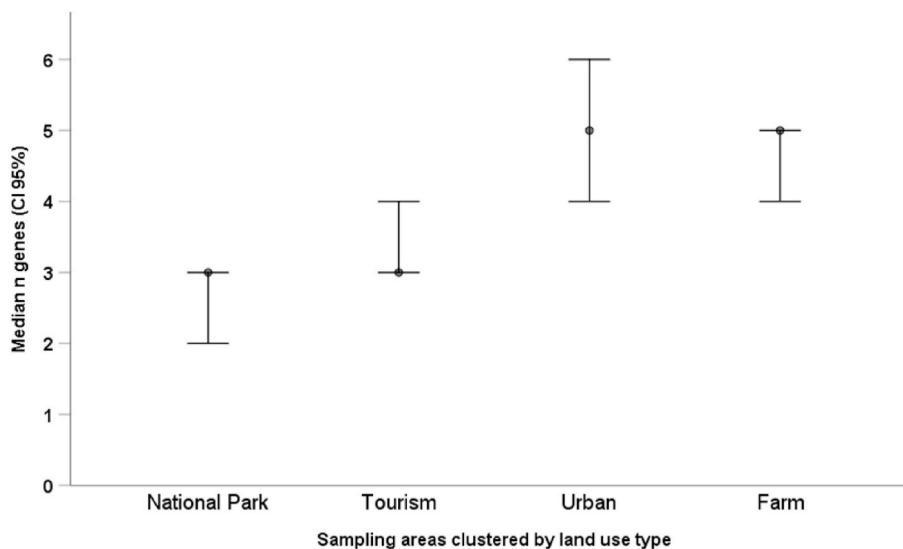
Fig. 2. Percentage of tested samples for Santa Cruz and Alcedo Volcano tortoise study areas that presented antimicrobial resistant genes categorized by antimicrobial classes. Multi-resistance is considered when more than two classes are present. (\*) Statistically significant results.

**Table 1**

Quantification (log10 percentage of bacteria with each gene) of positive samples for each ARG (clustered by antimicrobial classes) for Santa Cruz and Alcedo Volcano tortoise study areas. Percentage (prevalence) - median (Quartile 1, Quartile 3) - and range (minimum, maximum).

Antimicrobial classes and genes	Santa Cruz tortoises (n = 200)			Alcedo Volcano tortoises (n = 70)		
	Prevalence %	Median (Q1, Q3)	Min- Max	Prevalence %	Median (Q1, Q3)	Min- Max
Tetracyclines	97.5			78.6		
<i>tet(A)</i>	14.5	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -2.8	7.1	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -2.4
<i>tet(B)</i>	17.5	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -2.1	24.3	-8.0 (-8.0, -7.3)	-8 to -0.5
<i>tet (K)</i>	6.5	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -3.1	2.8	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -2.7
<i>tet (M)*</i>	35.5	-8.0 (-8.0, -5.7)	-8 to -2.0	0		
<i>tet (Q)</i>	71	-4.6 (-8.0, -3.6)	-8 to -0.5	50	-6.6 (-8.0, -3.7)	-8 to -0.3
<i>tet (S)*</i>	33.5	-8.0 (-8.0, -5.5)	-8 to -0.7	7.1	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -2.1
<i>tet (W)*</i>	93	-3.9 (-4.7, -3.1)	-8 to -2.0	51.4	-5.5 (-8.0, -4.0)	-8 to -0.3
<i>tet(Y)*</i>	12	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -2.6	0		
Sulphonamides	10.5			7.1		
<i>sulf*</i>	0			2.9	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -4.3
<i>sulfII</i>	10.5	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -3.6	4.3	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to 0.7
Aminoglycosides	35			5.7		
<i>str*</i>	12	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -3.0	2.9	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -4.4
<i>aadA*</i>	25	-8.0 (-8.0, -6.8)	-8 to -1.3	2.9	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -3.5
Phenicol	3.5			7.1		
<i>catI</i>	0.5	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -6.4	1.4	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -3.0
<i>catII</i>	3	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -2.7	7.1	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -2.0
Macrolides	8.5			2.9		
<i>erm(B)</i>	1.5	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -2.8	0		
<i>erm(F)</i>	7	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -1.5	2.3	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -4.5
Quinolones	32.5			35.7		
<i>qnrB</i>	9.5	-8.0 (-8.0, -6.0)	-8 to -2.8	11.4	-8.0 (-8.0, -4.2)	-8 to -1.1
<i>qnrS</i>	26	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -1.5	30	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -3.1
Beta-lactams	37			40		
<i>blaTEM</i>	33	-8.0 (-8.0, -5.0)	-8 to -0.6	37.1	-8.0 (-8.0, -4.1)	-8 to -0.7
<i>mecA</i>	5	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -3.3	4.3	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -3.4
Polymyxins	0			1.4		
<i>mcr-1</i>	0			1.4	-8.0 (-8.0, -8.0)	-8 to -3.9

\*Statistically significant.



**Fig. 3.** Graphic representation of median and 95% CI for the number of ARGs presented in giant tortoises (*C. porteri*) from different sampling areas of Santa Cruz Island, clustered by land use type.

number of tortoises carrying macrolide resistance than touristic reserves, but Bonferroni post-hoc adjustment was approaching significance ( $p = 0.07$ ).

We found a positive correlation between human activities (i.e., farming, agriculture, deforestation, sewage, infrastructure, domestic animals) and the presence of AMR. Logistic regression predicted a higher risk of finding multi-resistant microbiomes for touristic areas and urban and agricultural areas when compared to Alcedo Volcano, with an increment of 2.5- and 3-fold respectively. Regarding antimicrobial classes, the probability of finding resistant microbiomes to

aminoglycosides was also strongly associated with anthropization, having a probability 5.8-, 6.5-, and 12.2-fold increase for park, touristic, and urban and agricultural zones, respectively (Table 2).

In Santa Cruz, Poisson regression predicted a risk of having more ARGs per sample of 2.3-fold in the national park area and 2.4-fold in touristic reserves. Interestingly, the risk of having higher ARGs increased 11.2-times in urban and agricultural areas of Santa Cruz when compared to the isolated Alcedo Volcano. The risk of having multi-drug resistance increased by 1.8-fold in urban and agricultural zones when compared to the Volcano (Table 3).

**Table 2**

Logistic regression model of multi-resistant microbiomes and aminoglycoside resistant genes on a gradient of human-modified sampling areas, in relation to Alcedo Volcano. Different areas correspond to Santa Cruz national park areas, Santa Cruz touristic reserves, and Santa Cruz urban and farming areas.

Variables	Sampling areas	p value	OR Exp (β)	95% C.I.for OR [Exp(β)]	
				Lower	Upper
Multi-resistance	Constant	<0.001	0.207	0.111	0.385
	National Park	0.373	1.519	0.606	3.810
	Touristic Reserves*	0.034	2.486	1.071	5.771
	Urban and Agriculture*	0.003	3.040	1.451	6.369
Aminoglycosides	Constant	<0.001	0.061	0.022	0.166
	National Park*	0.004	5.824	1.746	19.429
	Touristic Reserves*	0.002	6.513	2.016	21.047
	Urban and Agriculture*	<0.001	12.233	4.139	36.151

\*Statistically significant.

**Table 3**

Poisson regression model of antimicrobial classes and ARGs on a gradient of human-modified sampling areas, in relation to Alcedo Volcano. Different areas correspond to Santa Cruz national park areas, Santa Cruz touristic reserves, and Santa Cruz urban and farming areas.

Variables	Sampling areas	p value	OR Exp (β)	95% C.I.for OR [Exp(β)]	
				Lower	Upper
Number of ARGs	Constant	<0.001	12.358	8.524	17.917
	National Park*	0.01	2.352	1.231	4.495
	Touristic Reserves*	0.005	2.416	1.300	4.489
	Urban and Agriculture*	<0.001	11.206	6.334	19.825
Number of classes	Constant	<0.001	5.964	4.361	8.156
	National Park	0.37	1.266	0.755	2.122
	Touristic Reserves	0.09	1.554	0.934	2.586
	Urban and Agriculture*	0.01	1.77	1.147	2.729

\*Statistically significant.

Results from the hot spot analysis identified two main areas in Santa Cruz where sampled tortoises with higher numbers of ARGs clustered spatially with a 90–99% confidence ( $p < 0.1$  and  $p < 0.01$ ). These areas correspond to a) a peripheral urban zone that has recently been converted into an industrial area; and b) cattle farms near Occidente and El Carmen districts in the highlands of Santa Cruz (Fig. 4a and b respectively). Cold spots from this analysis (i.e., areas with tortoise clusters that have significantly lower ARGs) all correspond to touristic and national park areas where anthropogenic activities are absent or very reduced (Fig. 4c).

#### 4. Discussion

We found ARGs to be present in both Santa Cruz (*C. porteri*) and Alcedo Volcano giant tortoises; however, a significantly higher prevalence of tetracyclines, aminoglycosides, number of ARGs, number of antimicrobial classes, and prevalence of multi-drug resistance was found in tortoises on the human-inhabited island of Santa Cruz when compared to the Volcano. Moreover, statistical analyses comparing Santa Cruz sampling areas support a positive correlation between human activities and the level of ARGs in free-living giant tortoises. Both farming and urban areas showed a higher prevalence of AMR when compared to the less human-modified areas of touristic reserves and

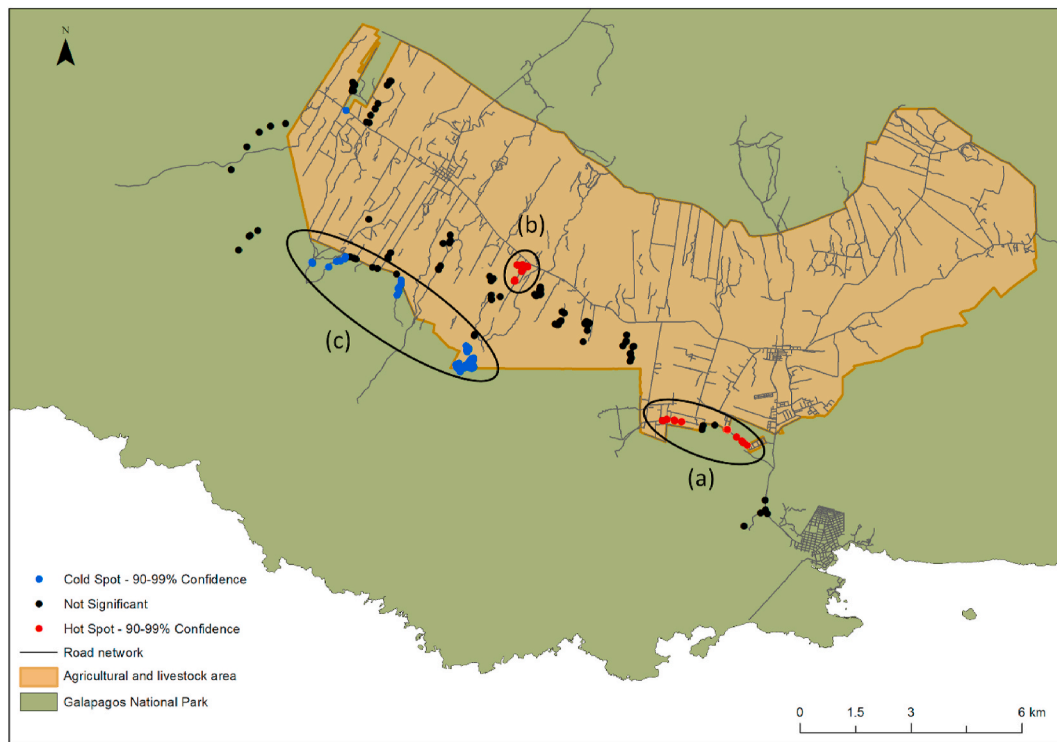
national park. The hot spot analysis performed for Santa Cruz Island showed a positive correlation between the higher number of ARG and the presence of human activities (e.g., sewage, cattle industry, human settlements), where all hot spots were found either within farming properties or within highly impacted human areas and former landfills. These hot spot areas all correspond with tortoises sampled near main roads, feeding on plastic and human waste contaminated landscapes, and freely roaming and feeding at cowsheds. By contrast, cold spots from the same analyses were found only within touristic reserves and national park areas where no pollution is found, and no farming activities can be performed.

Despite the fact that Santa Cruz tortoises are partially migrants and move long distances from dry protected areas into humid anthropized areas every year (Blake et al., 2013), a recent study shows how the use of agricultural land is segregated by body size, sex, and philopatry, with tortoises using an average of four farms a year and presenting a strong philopatry for the same areas every season (Pike et al., 2021). According to Pike et al. (2021), some individuals tend to remain in private land for up to six months a year, which means that they may be exposed to, and feed on, resistant-contaminated grass and water sources for a long period of time every year, supporting our findings in relation to higher number of ARGs and multi-resistance in more human-modified areas.

The prevalence of multi-resistance microbiomes in Santa Cruz free-living tortoises (34%) is noteworthy when compared to other studies based on the same methodology in wildlife species from remote archipelagos. In Ewbank et al. (2021), an AMR study on seabirds comparing biotopes showed a prevalence of 11.1% multi-drug resistance in the human-inhabited Fernando de Noronha Archipelago (Brazil). By contrast, Sacristán et al. (2020) found a 43% multi-resistance prevalence in wild felids ( $n = 51$ ) from mainland Chile, with a positive association of anthropization landscapes and multi-resistance microbiomes. Considering these results, multi-resistance prevalence for Santa Cruz giant tortoises appears to be intermediary as compared to foxes inhabiting highly modified environments in Chile and seabirds inhabiting a remote but developed Brazilian archipelago. Differences among the published studies could be attributable to different factors: the consumption of antimicrobials for human, veterinary and agricultural use, or the microbial communities of the different host species as well as geographical, environmental, and climatic factors, which could favor the persistence of antimicrobial compounds and resistant bacteria. In the case of pristine or less-anthropized areas, differences among studies could also be due to the composition and diversity of plant and fungal communities, as well as soil bacteria. It is known that soil bacteria are one of the most natural sources for ARGs development, which is highly influenced by the type of soil (Álvarez-Martínez et al., 2020; Wang et al., 2020). We cannot reject that other species such as migratory birds may play a role in the dissemination of ARGs in the Galapagos Islands as it has been suggested in other environments, including genes of public health interest such as *mcr-1* and  $\beta$ -lactamase genes (Hernández and González-Acuña, 2016; Cao et al., 2020). Therefore, to investigate the contribution of human activities on the presence of ARGs in the environment, it is necessary to carry out studies comparing more anthropized scenarios with less anthropized ones, using model species.

Based on our results, the microbiome of tortoises inhabiting the human-populated island of Santa Cruz is characterized by tetracycline and aminoglycoside resistant genes. The predominance of genes codifying for tetracycline resistance is in agreement with all other studies conducted in wildlife species with the same methodology (Cevadanes et al., 2020; Sacristán et al., 2020; Ewbank et al., 2021).

In Santa Cruz, some of the selected antibiotics used in veterinary medicine (mainly for free-ranging cattle farming, swine, and small animals) include penicillin, oxytetracycline, gentamicin, erythromycin, and streptomycin based on local interviews conducted from our research team. This information is in agreement with some of our findings on genes *tet(M)*, *tet(S)*, *tet(W)*, *tet(Y)*, *str*, *aadA*, and *erm(F)* found to be higher in human-modified landscapes (Santa Cruz) than in the isolated



**Fig. 4.** ARGs cluster analysis within the Santa Cruz study area. Dots represent: hot spots in red (i.e., cluster areas with significantly more tortoises with a high number of ARGs), cold spots in blue (i.e., cluster areas with significantly more tortoises with a low number of ARGs), and non-significant clusters in black. (a) Hot spot cluster in a peripheral urban zone converted into an industrial area; (b) hot spot in cattle farms; (c) cold spots in touristic and national park areas. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Alcedo Volcano. Moreover, the risk of finding resistant bacteria to aminoglycosides increased meaningfully with human activities such as urbanization and farming. Aminoglycosides are broad-spectrum antibiotics ranked by WHO (WHO, 2019) as critically important antimicrobials for human medicine and often is used to treat nosocomial and zoonotic infections (e.g., plague, tularemia, leishmania) as well as used as active components of topical medication (Krause et al., 2016; Van Duijkeren et al., 2019). In veterinary practice, aminoglycosides are broadly used to treat a wide range of pathologies including gastrointestinal, respiratory, and genitourinary infections, sepsis, and in-feed prophylaxis and metaphylaxis for chickens and swine. A recent survey of antimicrobial use in animals, published in 2016 by the World Organization for Animal Health (OIE, 2016), found that antimicrobial growth promoters were authorized for use in 80% of American countries that participated in the survey (in contrast with 40% in Asia, 18% in Africa, and 3% in Europe). In the Americas, the main food-producing animal species reported were cattle, poultry, and pigs. There are no official reports of the use of human or animal antibiotics in Ecuador, but most antimicrobial drugs can be acquired with no prescription.

The prevalence of antibiotic-resistant bacteria among wildlife occurs to be dependent on a variety of factors, such as habitat use and foraging strategy of the species sampled, particularly as they relate to anthropogenic inputs into the environment. Foraging represents a mechanism by which wildlife may be exposed to anthropogenic AMR contamination in the environment and could therefore be useful to identify those more exposed species that could be used as sentinels of the environmental resistome (Ramey and Ahlstrom, 2020). Furthermore, a positive correlation between the presence of microplastics and AMR have been found (Pham et al., 2021) and can therefore explain the higher prevalence of ARGs found in tortoises feeding on high polluted environments, and frequently observed eating plastics and garbage (Nieto-Claudin, pers. obs.). As such, we propose that giant tortoises may serve as good sentinels of Galapagos ecosystem health since they are widespread,

inhabiting both human and non-human populated islands, and are long-lived species that commonly feed within cattle and farming areas and near human settlements of Santa Cruz. As we demonstrate in this study, levels of ARGs and multi-resistance in tortoises are directly correlated to level of anthropic impacts on landscapes.

Several efforts have been conducted recently in Galapagos to enhance the importance of integrating scientific outputs into local and regional policies and management decisions. A research agenda was created in 2017 as a result of a multi-institutional and multi-sectorial exercise (Izurietta et al., 2018), and three main issues for Galapagos sustainability were identified: human-population growth, climate change, and invasive species. Moreover, new approaches have been proposed to address potential conservation conflicts between local farmers and tortoises (Benitez-Capistros et al., 2019) and to redesign the livestock production systems in the archipelago, with the aim to achieve socio-ecological sustainability (Puente-Rodríguez et al., 2019). Unfortunately, to date human and animal health have not been given the attention and importance they require to ensure a sustainable and equitable development of the archipelago.

In conclusion, our results support the hypothesis that human activities in Galapagos are driving the dispersion of antibiotic resistant bacteria into the environment with potential consequences for human and animal health. This study advances the detection and evaluation of ARGs in Galapagos endemic species and adds to the growing body of knowledge on human-related impacts on the biodiversity and ecosystems of the Galapagos Islands. We recommend our results to be used for informing local policies that reinforce the proper use, control, and outreach on antibiotics for both human and veterinary medicine, together with a redesign of waste management practices leading to more sustainable and responsible stewardship. Moreover, this research highlights a new threat for wildlife, human, and ecosystem health that may threaten the conservation of the Galapagos archipelago and the well-being of human inhabitants. These potential threats from the spread of

AMR include water and land pollution, the transmission of resistant bacteria to other wildlife species, domestic animals, and human beings, compromising medical treatment success in both human and animal diseases, and negative impacts on normal microbiome and by extension to the normal immune system function of animals and humans. Further studies should focus on identifying the specific sources and pathways that lead ARGs to pollute the environment and for proposing alternative and creative solutions to limit and control antibiotic use within this World Heritage Site. We recommend implementing long-term monitoring of giant tortoise health and AMR prevalence across the Galapagos Islands to better understand the One Health implications of AMR and how wildlife might act as reservoirs and spreaders of ARGs that may threaten animal and human health and wellbeing.

### Credit author statement

Ainoa Nieto Claudin: Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft, Project administration, Funding acquisition. Sharon L. Deem: Conceptualization, Resources, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition. Casilda Rodríguez: Formal analysis, Writing – review & editing, Supervision. Santiago Cano: Formal analysis, Writing – review & editing. Nicolas Moity: Formal analysis, Writing – review & editing. Freddy Cabrera: Methodology, Investigation. Fernando Esperón: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing – review & editing, Supervision.

### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Acknowledgments

This work was supported by the Galapagos National Park Directorate, Saint Louis Zoo Institute for Conservation Medicine, Saint Louis WildCare Institute Center for Chelonian Conservation, the AAZV Wild Animal Health Fund (WAHF #37), IWC Schaffhausen, Houston Zoo, Galapagos Conservation Trust, Charles Darwin Foundation, Ecoventura, and Linda Esler. A special recognition for their contributions goes to Stephen Blake, José Haro, Anne Guezou, Karina Ramón, Laura Kleinschmidt, Surya Castillo, Joshua Vela, Manuel Haro, Unler Greffa, Jamie Palmer, Kathleen Apakupakul, Elena Neves, Irene Peña, Irene Sacristán, and Olga Calatayud. This publication is contribution number 2401 of the Charles Darwin Foundation for the Galapagos Islands.

### References

- Acar, J.F., Moulin, G., 2013. Integrating animal health surveillance and food safety: the issue of antimicrobial resistance. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 32, 383–392.
- Ahlstrom, C.A., van Toor, M.L., Woksepp, H., Chandler, J.C., Reed, J.A., Reeves, A.B., Waldenström, J., Franklin, A.B., Douglas, D.C., Bonnedahl, J., Ramey, A.M., 2021. Evidence for continental-scale dispersal of antimicrobial resistant bacteria by landfill-foraging gulls. *Sci. Total Environ.* 764, 144551. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144551>.
- Álvarez-Martínez, F.J., Barrajo-Catalán, E., Micol, V., 2020. Tackling antibiotic resistance with compounds of natural origin: a comprehensive review. *Biomedicines* 8 (10), 405. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8100405>. PMID: 33050619; PMCID: PMC7601869.
- Amuasi, J.H., Lucas, T., Horton, R., Winkler, A.S., 2020. Reconnecting for our future: the lancet one health commission. *Lancet* 395, 1469–1471.
- Bartlett, J.G., Gilbert, D.N., Spellberg, B., 2013. Seven ways to preserve the Miracle of antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* 56, 1445–1450.
- Bastille-Rousseau, G., Yackulic, C.B., Gibbs, J.P., Frair, J.L., Cabrera, F., Blake, S., 2019. Migration triggers in a large herbivore: galapagos giant tortoises navigating resource gradients on volcanoes. *Ecology* 100, 1–11.
- Benitez-Capistrós, F., Couenberg, P., Nieto, A., Cabrera, F., Blake, S., 2019. Identifying shared strategies and solutions to the human-giant tortoise interactions in Santa Cruz, Galapagos: a nominal group technique application. *Sustain.* 11, 1–25.

- Blake, S., Wikelski, M., Cabrera, F., Guezou, A., Silva, M., Sadeghbayi, E., Yackulic, C.B., Jaramillo, P., 2012. Seed dispersal by Galapagos tortoises. *J. Biogeogr.* 39, 1961–1972.
- Blake, S., Yackulic, C.B., Cabrera, F., Tapia, W., Gibbs, J.P., Kümmeth, F., Wikelski, M., 2013. Vegetation dynamics drive segregation by body size in Galapagos tortoises migrating across altitudinal gradients. *J. Anim. Ecol.* 82, 310–321.
- Blanco-Peña, K., Esperón, F., Torres-Mejía, A.M., de la Torre, A., de la Cruz, E., Jiménez-Soto, M., 2017. Antimicrobial resistance genes in pigeons from public parks in Costa Rica. *Zoonoses Public Health* 64, e23–e30.
- Cao, J., Hu, Y., Liu, F., et al., 2020. Metagenomic analysis reveals the microbiome and resistome in migratory birds. *Microbiome* 8, 26. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0781-8>.
- Carballo, M., Aguayo, S., González, M., Esperon, F., De La Torre, A., 2016. Environmental assessment of tetracycline's residues detected in pig slurry and poultry manure. *J. Environ. Protect.* 7, 82–92.
- Cayot, L.J., Gibbs, J.P., Tapia, W., Caccone, A., 2017. *Chelonoidis porteri*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T9026A82777132. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T9026A82777132.en>. Downloaded on. (Accessed 28 October 2020).
- Cayot, L.J., Gibbs, J.P., Tapia, W., Caccone, A., 2018. *Chelonoidis vandenburghi* (errata version published in 2019). The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T9027A144766471. IUCN. Downloaded on.
- Cevidanes, A., Esperón, F., Di Cataldo, S., Neves, E., Sallaberry-Pincheira, N., Millán, J., 2020. Antimicrobial resistance genes in Andean foxes inhabiting anthropized landscapes in central Chile. *Sci. Total Environ.* 724, 138247.
- Chee-Sanford, J.C., Mackie, R.I., Koike, S., Krapac, I.G., Lin, Y.-F., Yannarell, A.C., Maxwell, S., Aminov, R.I., 2009. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *J. Environ. Qual.* 38, 1086–1108.
- de Turismo de Galápagos, Observatorio, 2018. Estadísticas del turismo en Galápagos en 2018, Ministerio de Turismo del Ecuador, Galápagos Ecuador. [https://www.observatorioturismogalapagos.gob.ec/wp-content/uploads/2019/05/Estad%C3%ADsticas\\_turismo\\_Gal%C3%A1pagos\\_2018\\_V1.pdf](https://www.observatorioturismogalapagos.gob.ec/wp-content/uploads/2019/05/Estad%C3%ADsticas_turismo_Gal%C3%A1pagos_2018_V1.pdf).
- Deem, S.L., Brenn-White, M., 2020. One health—the key to preventing COVID-19 from becoming the new normal. *Mol Front J* 4, 1–6.
- Dolejska, M., Literak, I., 2019. Wildlife is overlooked in the epidemiology of medically important antibiotic-resistant bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, 1–5.
- Ecuadorian Ministry of Health, 2019. Ministerio de Salud Pública del Ecuador, Plan Nacional para la prevención y control de la resistencia antimicrobiana; Quito, Viceministerio de Gobernanza y Vigilancia de la Salud, 2019. Available on: <http://salud.gob.ec/>.
- Ellis-Soto, D., Blake, S., Sultana, A., Guézou, A., Cabrera, F., Lötters, S., 2017. Plant species dispersed by Galapagos tortoises surf the wave of habitat suitability under anthropogenic climate change. *PLoS One* 12, 1–16.
- Esperón, F., Sacristán, C., Carballo, M., De La Torre, A., 2018. Antimicrobial resistance genes in animal manure, manure-amended and non-anthropogenically impacted soils in Spain. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 9, 469–480.
- Esperón, F., Alberro, B., Ugarte-Ruiz, M., Domínguez, L., Carballo, M., Tadeo, J.L., del Mar Delgado, M., Moreno, M.A., de la Torre, A., 2020. Assessing the benefits of composting poultry manure in reducing antimicrobial residues, pathogenic bacteria, and antimicrobial resistance genes: a field-scale study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 27738–27749.
- Ewbank, A.C., Esperón, F., Sacristán, C., Sacristán, I., Krul, R., Macedo Cavalcanti, E., Calatayud, O., Bueno, I., de Francisco Strefezzi, R., Catão-Dias, J.L., 2021. Seabirds as anthropization indicators in two different tropical biotopes: a One Health approach to the issue of antimicrobial resistance genes pollution in oceanic islands. *Sci. Total Environ.* 754, 142141.
- Fisman, D.N., Laupland, K.B., 2010. The “One Health” paradigm: time for infectious diseases clinicians to take note? *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 21, 111–114.
- Fordham, D.A., Brook, B.W., 2010. Why tropical island endemics are acutely susceptible to global change. *Why Trop Isl Endem are acutely susceptible to Glob Chang Biodiversi* 329–342.
- Frazier, J., 2021. The Galapagos: island home of giant tortoises. In: Gibbs, J.P., Cayot, L.J., Tapia, W.A. (Eds.), *Biodiversity of the World: Conservation from Genes to Landscape Series, Galapagos Giant Tortoises*. Elsevier, USA, pp. 3–13.
- Getis, A., Ord, J.K., 1992. The analysis of spatial association by use of distance statistics. *Geogr. Anal.* 24, 189–206.
- Hernández, J., González-Acuña, D., 2016. Anthropogenic antibiotic resistance genes mobilization to the polar regions. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 6, 32112. <https://doi.org/10.3402/iee.v6.32112>.
- IUCN, 2020. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-3. <https://www.iucnredlist.org>. (Accessed 14 January 2021). Downloaded on.
- Izurieta, A., Delgado, B., Moity, N., Calvopina, M., Banda-cruz, G., Cruz, E., Aguas, M., Astudillo, E., F Db, Soria, B., et al., 2018. A Collaboratively Derived Environmental Research Agenda for Galapagos.
- Kahn, L., 2016. *One Health and the Politics of Antimicrobial Resistance*. John Hopkins University Press, Baltimore, MD, USA, p. 200.
- Krause, K.M., Serio, A.W., Kane, T.R., Connolly, L.E., 2016. Aminoglycosides : an Overview 1–18.
- Lavoie, C., Cruz, F., Carrion, G.V., Campbell, K., Donlan, C.J., Harcourt, S., Moya, M., 2007. The Thematic Atlas of Project Isabela: an Illustrative Document Describing, Step-by-step, the Biggest Successful Goat Eradication Project on the Galapagos Islands, 1998–2006. Charles Darwin Foundation, Puerto Ayora, Galapagos.
- Murphy, D., Ricci, A., Auce, Z., et al., EMA Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) and EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2017 Jan 24. EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use

- antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA). *EFSA J* 15 (1), e04666. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4666>. PMID: 32625259; PMCID: PMC7010070.
- Nieto-Claudin, A., Esperón, F., Blake, S., Deem, S.L., 2019. Antimicrobial resistance genes present in the faecal microbiota of free-living Galapagos tortoises (*Chelonoidis porteri*). *Zoonoses Public Health* 66, 900–908.
- Nieto-Claudin, A., Palmer, J.L., Esperón, F., Deem, S.L., 2021. Haematology and plasma biochemistry reference intervals for the critically endangered western Santa Cruz Galapagos tortoise (*Chelonoidis porteri*). *Conserv Physiol* coab019. <https://doi.org/10.1093/conphys/coab019>, 00(00).
- OIE, 2016. Annual Report on the Use of Antimicrobial Agents in Animals: Better Understanding of the Global Situation. World Organization for Animal Health. [https://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/AMR/Suvey\\_on\\_monitoring\\_antimicrobial\\_agents\\_Dec2016.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/Suvey_on_monitoring_antimicrobial_agents_Dec2016.pdf).
- O'Neil, J., 2014. Review on antibiotic resistance. Antimicrobial resistance : tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Heal Wealth Nations* 1–16.
- Pham, D.N., Clark, L., Li, M., 2021. Microplastics as hubs enriching antibiotic-resistant bacteria and pathogens in municipal activated sludge. *J Hazard Mater Lett* 2, 100014.
- Pike, K., Blake, S., Cabrera, F., Gordon, I., Schwarzkopf, L., 2021. High Philopathy, Sex and Body Size Influence the Use of Agricultural Land by Galapagos Giant Tortoises (in press)(Oryx).
- Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H., Carlson, K.H., 2006. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7445–7450.
- Puente-Rodríguez, D., Bos, A.P., Bram, Groot Koerkamp, P.W.G., 2019. Rethinking livestock production systems on the Galápagos Islands: organizing knowledge-practice interfaces through reflexive interactive design. *Environ. Sci. Pol.* 101, 166–174.
- Ramey, A.M., Ahlstrom, C.A., 2020. Antibiotic resistant bacteria in wildlife: perspectives on trends, acquisition and dissemination, data gaps, and future directions. *J. Wildl. Dis.* 56, 1–15.
- Sacristán, I., Esperón, F., Acuña, F., Aguilar, E., García, S., López, M.J., Cevidanes, A., Neves, E., Cabello, J., Hidalgo-Hermoso, E., et al., 2020. Antibiotic resistance genes as landscape anthropization indicators: using a wild felid as sentinel in Chile. *Sci. Total Environ.* 703 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134900>.
- Segawa, T., Takeuchi, N., Rivera, A., Yamada, A., Yoshimura, Y., Barcaza, G., Shinbori, K., Motoyama, H., Kohshima, S., Ushida, K., 2013. Distribution of antibiotic resistance genes in glacier environments. *Environ Microbiol Rep* 5, 127–134.
- Tan, L., Li, L., Ashbolt, N., Wang, X., Cui, Y., Zhu, X., Xu, Y., Yang, Y., Mao, D., Luo, Y., 2018 Apr 15. Arctic antibiotic resistance gene contamination, a result of anthropogenic activities and natural origin. *Sci. Total Environ.* 621, 1176–1184. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.110>. Epub 2017 Oct 22. PMID: 29070451.
- Toral-Granda, M.V., Causton, C.E., Jäger, H., Trueman, M., Izurieta, J.C., Araujo, E., Cruz, M., Zander, K.K., Izurieta, A., Garnett, S.T., 2017. Alien species pathways to the Galapagos islands, Ecuador. *PLoS One* 12, e0184379.
- Van Duijkeren, E., Schwarz, C., Bouchard, D., Catry, B., Pomba, C., Baptiste, K.E., Moreno, M.A., Rantala, M., Ružauskas, M., Sanders, P., et al., 2019. The use of aminoglycosides in animals within the EU: development of resistance in animals and possible impact on human and animal health: a review. *J. Antimicrob. Chemother.* 74, 2480–2496.
- Van Goethem, M.W., Pierneef, R., Bezuidt, O.K.I., Van De Peer, Y., Cowan, D.A., Makhalanyane, T.P., 2018. A reservoir of “historical” antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils. *Microbiome* 6, 1–12.
- Veron, S., Mouchet, M., Govaerts, R., Haevermans, T., Pellens, R., 2019. Vulnerability to climate change of islands worldwide and its impact on the tree of life. *Sci. Rep.* 9, 1–14.
- Wang, F.H., Qiao, M., Su, J.Q., Chen, Z., Zhou, X., Zhu, Y.G., 2014. High throughput profiling of antibiotic resistance genes in urban park soils with reclaimed water irrigation. *Environ. Sci. Technol.* 48, 9079–9085.
- Wang, L., Wang, J., Wang, J., Zhu, L., Conkle, J.L., Yang, R., 2020. Soil types influence the characteristic of antibiotic resistance genes in greenhouse soil with long-term manure application. *J. Hazard Mater.* 392, 122334. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122334>. Epub 2020 Feb 17. PMID: 32092657.
- Watson, J., Trueman, M., Tufet, M., Henderson, S., Atkinson, R., 2009. Mapping terrestrial anthropogenic degradation on the inhabited islands of the Galapagos Archipelago. *Fauna Flora Int* 44, 79–82.
- WHO, 2019. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. World Health Organization, Geneva, 6th revision. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf?ua=1>. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available on:
- World Health Organization, 2017. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report: Early Implementation 2016-2017. World Health Organization, Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- World Health Organization, 2020. Antibiotic Resistance Fact Sheet. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.
- Wright, G.D., 2010. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 589–594.
- Zhang, T., 2008. Limiting distribution of the G statistics. *Stat. Probab. Lett.* 78, 1656–1661.



## **DISCUSIÓN**



El presente trabajo contribuye a llenar los vacíos de información existentes sobre el estado de salud de la especie más icónica de las Islas Galápagos: la tortuga gigante. Éste es el primer esfuerzo a gran escala para monitorear el estado de salud de las tortugas gigantes de las Galápagos, incluyendo más de cuatrocientos individuos muestreados de cinco especies diferentes, en tres islas del archipiélago, sometidos a un distinto grado de impacto antropogénico. Los cuatro artículos científicos que han sido publicados como resultado de esta tesis doctoral constituyen nuevos descubrimientos para la comunidad científica, como es la descripción de cuatro nuevos virus en las tortugas de Galápagos (dos adenovirus y dos herpesvirus) y la prevalencia de resistencias a antimicrobianos en las tortugas gigantes, e incorpora nuevas herramientas para la terapéutica clínica y el manejo y conservación de estas especies, como la primera descripción de intervalos de referencia de hematología y bioquímica sanguíneas en la especie *Chelonoidis porteri* y el diseño de un protocolo de diagnóstico para *Chelonoidis adenovirus I y II*. Este estudio señala a su vez potenciales nuevas amenazas para la salud y conservación de las tortugas de Galápagos y sus ecosistemas, que hasta ahora no se habían descrito y que deben ser incorporadas a los planes de manejo y las prioridades de investigación y conservación de las autoridades ambientales locales. La presencia de signos clínicos compatibles con enfermedad causada por adenovirus y/o herpesvirus, detectados en algunas tortugas mantenidas en cautividad, sugiere que en determinadas circunstancias (p. ej. estrés, inmunosupresión) estos agentes infecciosos podrían llegar a ser causantes de morbilidad y potencial mortalidad en las tortugas gigantes de Galápagos. Por otro lado, los resultados obtenidos relativos a una mayor prevalencia y

diversidad de genes resistentes y adenovirus en tortugas gigantes que habitan en ecosistemas antropizados respaldan nuestra hipótesis, que enuncia que el estado de salud de las tortugas terrestres y de los ecosistemas que habitan está viéndose afectado por la estrecha convivencia con animales domésticos y seres humanos.

Este estudio cuenta con ciertas limitaciones, como son el diferente tamaño muestral obtenido en las distintas especies de estudio. Las condiciones del terreno en Galápagos y la difícil accesibilidad a los lugares en que habitan ciertas poblaciones de tortugas dificultan la realización de los muestreos y la correcta preservación de las muestras, lo que conllevó un esfuerzo de muestreo muy elevado. Las características del archipiélago pueden dificultar la replicabilidad de los estudios científicos, sobre todo si no se cuenta con el apoyo de métodos de transporte tales como embarcaciones o helicóptero, para el acceso a aquellas zonas más remotas. Las condiciones de campo imposibilitaron tener un mayor número de muestras del volcán Alcedo y de la isla Española, por ejemplo, o cubrir un área más extensa de muestreo en el este de Santa Cruz (*C. donfaustoi*). También en la isla Santa Cruz hubo que coordinar con los propietarios de las fincas el acceso a sus terrenos y propiedades, lo que en algunos casos dificultó el acceso a ciertas zonas planificadas para el estudio. Otros obstáculos a los que se ha debido hacer frente durante el desarrollo de esta investigación están relacionados con el aislamiento y la falta de conectividad que existe entre las islas y el Ecuador continental, lo que dificultó la correcta adquisición de los materiales para realizar la toma de muestras y los análisis. El laboratorio portátil, los insumos de laboratorio, el generador y el congelador portátil y la mayor parte de los reactivos fueron adquiridos en el extranjero y transportados personalmente al archipiélago. Por otro lado, los permisos necesarios para el transporte de muestras fuera del país requirieron de meses de gestiones y demoras, lo que conllevó finalmente numerosos retrasos en la recogida de las muestras biológicas, e incluso imposibilitó en algunos casos la realización de protocolos de diagnóstico más tecnificados, como la imposibilidad de realizar rtPCR o secuenciación en el archipiélago. Estos aspectos respaldan la idoneidad de contar con un laboratorio tecnificado y personal cualificado en el archipiélago que permita realizar análisis moleculares y secuenciación genética, lo que contribuiría de manera importante a garantizar el diagnóstico temprano de posibles agentes infecciosos introducidos que puedan afectar la salud humana y animal. Simplificar los procesos administrativos para la movilización de las muestras y el acceso al recurso genético

facilitarían el desarrollo de los proyectos científicos, pudiendo dar respuestas más rápidas a las cuestiones sanitarias que puedan plantearse tanto en la fauna silvestre como en los animales domésticos, y que puedan tener un impacto directo sobre la población humana.

### *Línea base de hematología y bioquímica*

Realizar evaluaciones in situ de las especies silvestres es una herramienta de gran importancia a la hora de establecer el estado de salud de las poblaciones de animales salvajes o en los programas de reintroducción y cría en cautividad (Deem et al., 2001, 2011). Estas evaluaciones sanitarias deben incluir un examen físico, hematología sanguínea (incluyendo recuentos celulares y evaluación de la morfología celular), perfil bioquímico y pruebas complementarias adicionales en función de la especie y los recursos disponibles (Deem et al., 2009; Atkins et al., 2010). Contar con intervalos de referencia para las especies silvestres es siempre uno de los retos de la medicina veterinaria de fauna silvestre, requiriendo muchas veces del uso de valores de referencias de especies similares, a falta de información detallada y sistematizada sobre las especies de estudio. Conocemos, sin embargo, que existen numerosas variaciones interespecíficas en los perfiles hemáticos y bioquímicos, lo cual dificulta sobremanera la interpretación de los hallazgos clínicos y limita el uso de los valores de referencia obtenidos en otras especies (Heatley & Russell, 2019).

Establecer los intervalos de referencia en especies animales no convencionales (animales exóticos y silvestres) es por tanto de gran importancia a la hora de desarrollar programas de reintroducción y cría en cautividad de especies amenazadas, manejo de colecciones zoológicas o tratamiento de animales silvestres en centros de rescate y recuperación de fauna. Si bien es cierto que existen directrices internacionales que han sido desarrolladas específicamente para el establecimiento de intervalos de referencia en la práctica veterinaria (Friedrichs et al., 2012), realizar la estimación de estos valores de referencia a partir de animales silvestres conlleva importantes retos adicionales. Por un lado, los animales muestreados, aunque aparentemente sanos, pueden estar sufriendo alguna enfermedad o condición que pueda afectar sus valores basales; por otro lado, no se conoce con exactitud la edad de los individuos y éstos no son evaluados a lo largo del tiempo, lo que

imposibilita tener información adicional acerca de su comportamiento, nutrición, variables ambientales, condiciones preexistentes, exposición a toxinas, estado reproductivo, entre otros; información que podría ser relevante a la hora de establecer los valores de referencia (Scope et al., 2013; Heatley & Russell, 2019; Boers et al., 2020). En el caso particular de las tortugas terrestres de Galápagos, se trata de animales muy longevos con un dimorfismo sexual que suele ser evidente una vez alcanzada la madurez sexual (estimada entre los 20 y 30 años de edad), pero no es posible establecer de manera visual la edad aproximada de un individuo adulto, que puede oscilar entre 50-150 años. Por este motivo, a la hora de establecer los valores de referencia, se categorizaron los animales como adultos o subadultos, sin una categorización numérica para la variable edad. Además, se debe tener en cuenta que estos reptiles son animales poiquiloterms, por lo que sus parámetros fisiológicos son muy susceptibles a los cambios ambientales (Heatley & Russell, 2019).

Con anterioridad a este trabajo existía tan solo el estudio publicado por Landázuri (2000) donde se establecen valores de hematocrito y sólidos totales para tres especies de tortugas terrestres y el recuento diferencial de leucocitos, describiendo la predominancia de heterófilos frente a linfocitos en estas especies, lo que contradice los resultados de Sheldon et al. (2016) y los obtenidos en la presente tesis doctoral, donde existe un claro predominio de los linfocitos frente a los heterófilos. Los métodos diagnósticos han evolucionado significativamente en las últimas dos décadas y se han tecnificado y homologado, de manera que puedan emplearse unidades internacionales y metodologías estandarizadas que permitan la comparación entre diferentes estudios y especies. Estas pueden ser algunas de las causas que expliquen esta diferencia observada entre los estudios previos de hace más de dos décadas y los estudios recientes. El único trabajo contemporáneo que describe valores de referencia en tortugas de Galápagos, es el realizado por Lewbart et al. (2018), empleando para ello un total de 32 individuos de la especie *C. chathamensis* mantenidos en semicautividad en la isla de San Cristóbal, y pertenecientes a diferentes grupos de sexo y edad. Si bien la publicación de estos valores es de utilidad como referencia diagnóstica a la hora de trabajar con especies mantenidas en cautividad, la variabilidad interespecífica, así como las diferentes condiciones de mantenimiento de los animales (sobre todo en lo referente a la dieta y el gasto energético) hacen muy difícil poder establecer comparaciones con individuos silvestres. Por este motivo, y por tratarse de especies diferentes, no se

realizaron comparaciones ni se extrajeron conclusiones comparando los resultados obtenidos por Lewbart et al., y los obtenidos en el presente trabajo de investigación. Por otro lado, existen numerosas técnicas empleadas para la determinación de los parámetros hemáticos en reptiles, ya que las características celulares obligan en muchos casos a realizar técnicas de recuento manuales que pueden resultar más imprecisas y que dependen en gran medida de la experiencia y entrenamiento de los profesionales que realizan el diagnóstico (Stacy et al., 2011; Winter et al., 2019). En el presente trabajo, los recuentos celulares fueron llevados a cabo por una persona con experiencia en hematología de reptiles (J. Palmer), bajo el asesoramiento directo de la Dra. Stacy.

Realizar la bioquímica sanguínea de los reptiles en laboratorios de referencia conlleva unos costos muy elevados, además de requerir de numerosos permisos para la movilización de las muestras y la imposibilidad de realizar diagnósticos rápidos en campo. Esto ha favorecido la aparición de diversos equipos comerciales portátiles que permiten la determinación de la bioquímica sanguínea en los reptiles de manera rápida y en lugares de difícil acceso. Por otro lado, estos equipos pueden mostrar resultados a veces dispares o incluir diferentes parámetros en sus kits y rotores comerciales, que dificultan o imposibilitan realizar todos los análisis deseados. Es el caso del analizador portátil iSTAT (Abbot Point of Care Inc., Princeton, NJ, USA) empleado por Lewbart et al., (2018) o de los rotores VetScan (Avian/Reptilian VetScan®Profile) empleados en el presente trabajo. Desafortunadamente, los parámetros bioquímicos que permite medir cada equipo son diferentes, lo que dificulta realizar comparaciones entre estudios donde se emplean metodologías diferentes. Por este motivo, sería recomendable establecer colaboraciones interinstitucionales que permitan estandarizar la metodología a emplear en una misma especie, de forma que los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación puedan ser comparados. A pesar de que algunos estudios aconsejan el uso de los rotores para ciertas especies de tortugas (Atkins et al., 2010), éstos han sido descritos también por la literatura como poco precisos para medir ciertos parámetros (Gibbons et al., 2019) lo que concuerda con algunos de los resultados obtenidos por nuestro estudio. En tortugas gigantes de las Galápagos, la determinación de los ácidos biliares (BA) no puede realizarse empleando el rotor *Avian/Reptilian*, ya que los límites de detección del equipo están por encima de los valores presentados en esta especie. Observamos también que ciertos parámetros (calcio, potasio, creatina quinasa, albúmina y

globulinas) presentan inconsistencias al ser evaluados con este kit comercial. Es el caso del calcio o del potasio, cuyo rango superior de detección parece ser inferior a los valores basales presentes en las tortugas gigantes de Galápagos (sobre todo en tortugas hembras en época reproductiva con valores de calcio por encima de 16 mg/dl), mientras que en el caso de la albúmina, la creatina quinasa o las globulinas el equipo aparentemente muestra numerosos errores, potencialmente relacionados con la calidad de las muestras y el grado de hemólisis/lipemia. Este suele ser otro factor determinante en los reptiles a la hora de establecer los perfiles hemáticos y bioquímicos. La dificultad asociada a la manipulación de los animales, la extracción de las muestras de sangre (que en la mayoría de los casos se realiza a ciegas, con la ayuda tan solo de referencias anatómicas), el estrés de captura de los animales, entre otros muchos factores, origina muestras que pueden ser de una pobre calidad (elevada hemólisis y/o lipemia), afectando a los resultados obtenidos (Heatley & Russell, 2019). Para reducir al máximo el estrés de los animales de estudio, la manipulación se realizó siempre en el menor tiempo posible, procediendo de manera ordenada y sistemática, con personal altamente cualificado y experimentado en el manejo de tortugas gigantes, y reduciendo al máximo el tiempo que las tortugas permanecían en decúbito dorsal (máximo 15 min). A pesar de estas dificultades, conseguimos recolectar muestras de un total de 164 tortugas adultas y 46 subadultas, y realizar la determinación de los intervalos de referencia en los individuos adultos, de acuerdo a las directrices internacionales de la ASVCP (Friedrichs et al., 2012).

Esta primera línea base con intervalos de referencia para la especie *C. porteri* pone de manifiesto la necesidad de contar con esta herramienta diagnóstica en las diferentes especies de tortuga gigante de Galápagos. Las tortugas son una de las especies más amenazadas del archipiélago y la única para la que se establecieron programas de cría en cautividad desde los años 60, lo que ha supuesto el mantenimiento de miles de estos ejemplares en cautividad a lo largo de los años, bien individuos adultos reproductores o crías nacidas en cautividad que eventualmente fueron devueltas a su hábitat natural (Gibbs et al., 2014b). A pesar de esto, hasta la fecha no se contaba con esta información básica, que es ampliamente utilizada en medicina veterinaria como primera línea diagnóstica en individuos débiles o enfermos. Recomendamos, por tanto, seguir trabajando para obtener valores de referencia de hematología y bioquímica de las diferentes especies de tortuga presentes en el archipiélago.

Entendemos, sin embargo, los retos asociados a este trabajo, que requiere de recursos económicos para realizar la recolección de las muestras (especialmente en lugares remotos y de difícil acceso) y de una cierta experiencia para la toma de muestras de calidad y para la realización de las técnicas hematológicas manuales (recuentos celulares, evaluación morfológica y detección de hemoparásitos). Durante el desarrollo de esta tesis doctoral hemos tenido acceso a la recolección de numerosas muestras de tortugas terrestres, de manera que contamos con un banco de muestras significativo para la realización al menos de valores de referencia de algunas especies de tortuga gigante adicionales. Lamentablemente, no contamos con muestras suficientes ( $n > 120$ ) de ninguna otra especie para realizar los cálculos necesarios para establecer intervalos de referencia de acuerdo a los estándares internacionales (Flatland et al., 2013), pero esperamos en un futuro cercano poder al menos brindar a la comunidad científica información adicional referente a valores de hematología y bioquímica de otras especies de tortuga gigante, así como comparaciones preliminares entre éstas, que permitan lograr un mayor conocimiento sobre las salud y las particularidades de cada especie.

Este estudio ha encontrado diferencias significativas en ciertos parámetros hematológicos y bioquímicos dependiendo de la estación climática, el sexo, la edad de los individuos o la ubicación de éstos (potencialmente asociado también con la dieta). El elevado número de factores que pueden influir en estos valores, sumado a la falta de literatura disponible acerca de cómo estos factores pueden modificar ciertos parámetros sanguíneos sugiere que la interpretación de los datos obtenidos debe realizarse con cautela y que es necesario contar con estudios adicionales donde se puedan conocer y/o controlar ciertas variables (p. ej. mismo sexo, misma localización, misma época del año, misma alimentación) o contar con estudios que monitoreen los mismos animales a lo largo del tiempo, para poder extraer conclusiones más precisas acerca de cómo las diferentes variables fisiológicas, ecológicas y ambientales pueden condicionar los valores basales de hematología y bioquímica en las tortugas gigantes de Galápagos.

### *Descripción de nuevos agentes infecciosos*

En esta tesis se describe la presencia de dos herpesvirus (CheHV1 y 2) y dos adenovirus (CheAdV1 y 2) en tortugas silvestres de las islas Santa Cruz e Isabela que no habían sido identificados con anterioridad, y se propone su posible clasificación filogenética. Este constituye el primer estudio llevado a cabo en múltiples especies de tortuga de Galápagos para determinar la presencia de microorganismos potencialmente patógenos que afectan a la conservación de otros quelonios a nivel mundial. Aunque el objetivo inicial del proyecto incluía solo el análisis y comparación entre dos especies de tortuga expuestas a un distinto grado de impacto antropogénico, a lo largo del proyecto tuvimos la posibilidad de incluir tres especies adicionales. Los muestreos adicionales realizados fueron llevados a cabo de manera oportunista durante viajes o periodos cortos, por lo que no pudimos tener acceso a muestrear un gran número de animales, como sí sucedió con las tortugas del oeste de Santa Cruz y del volcán Alcedo. A pesar de ello, los análisis estadísticos realizados aportan datos significativos, que reflejan por ejemplo una mayor prevalencia de adenovirus en las tortugas del oeste de Santa Cruz (*C. porteri*), la especie más expuesta a las modificaciones antropogénicas del ecosistema. Para algunas especies, sin embargo, hubiera sido recomendable contar con un tamaño muestral mayor, como en el caso de las tortugas de Española (n = 45).

Resulta interesante la diferente prevalencia de adenovirus y herpesvirus encontrada en las distintas especies de tortuga terrestre. Esta prevalencia podría estar relacionada con la filogenia de las especies muestreadas, como describen Poulakakis et al., (2020) en la más reciente clasificación filogenética de las tortugas de Galápagos. En este trabajo se describen tres grandes grupos filogenéticos; el primero estaría conformado por las tortugas del centro y suroeste del archipiélago (islas Pinzón, Floreana, Isabela sur y Santa Cruz oeste), el segundo grupo correspondería a las tortugas del noroeste (volcán Wolf en Isabela e isla Santiago) y el tercer grupo a las especies del centro y noreste (islas Pinta, Española, San Cristóbal y Santa Cruz este). Nuestros resultados relativos a la prevalencia de adenovirus y herpesvirus confirman ciertas similitudes entre las tortugas del oeste de Santa Cruz y el volcán Alcedo en Isabela, que estarían incluidas en este primer grupo descrito por Poulakakis, y donde se encontraron individuos positivos tanto a adenovirus como a herpesvirus. En el volcán Wolf, perteneciente al segundo grupo, solo se evidenció la presencia de herpesvirus, pero

encontramos dos variedades de este virus, una que también está presente en otras especies de tortugas (CheHV1) y otra que hasta el momento solo se ha podido detectar en Wolf (CheHV2). Por último, en la isla Española, correspondiente al tercer grupo, no se halló la presencia de ningún virus, y en el este de Santa Cruz, también perteneciente a este último grupo, solo se encontró un individuo positivo a adenovirus, que podría haber sido trasladado por la acción del ser humano desde el oeste de Santa Cruz (Figura 25).

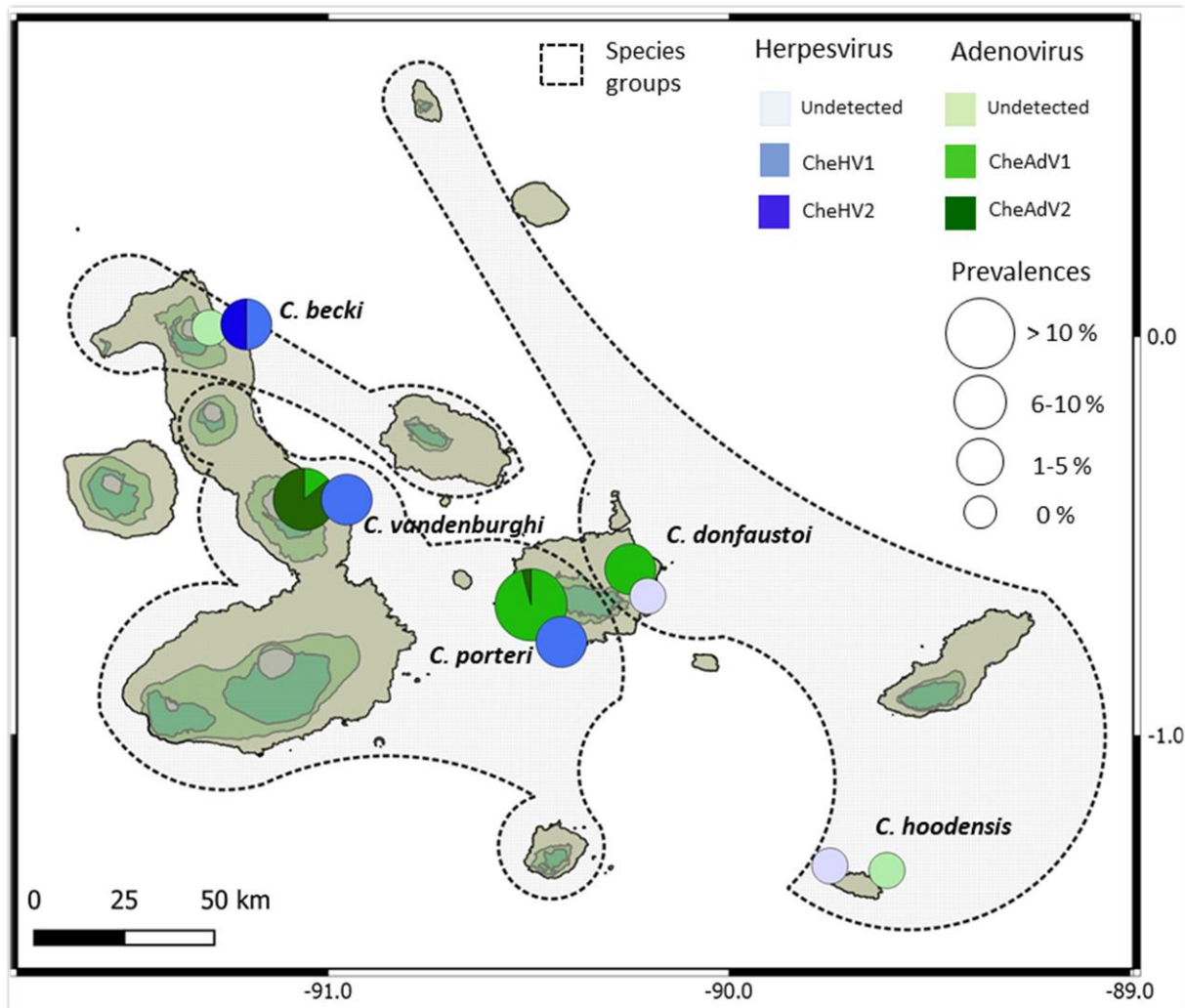


Figura 25. Mapa de prevalencias obtenidas para adenovirus (verde) y herpesvirus (azul) en las diferentes islas y especies de tortuga terrestre. Adaptado de Nieto-Claudin et al. (2021).

Los resultados obtenidos en este estudio generan numerosas preguntas adicionales, por ejemplo, cuál es la prevalencia de estos virus en otras especies de tortuga terrestre, si existirán islas y/o especies de tortuga libres de estos patógenos, o si otras especies de reptiles que conviven con las tortugas (p. ej. iguanas terrestres) podrían también presentar estos u

otros virus emparentados filogenéticamente. En ese contexto, estudiar la presencia y prevalencia de estos microorganismos en las demás especies de tortuga sería relevante por varios motivos; por un lado, para poder comprender mejor la filogenia de estos virus y si existe una coevolución patógeno-hospedador; por otro lado, para establecer si existe alguna isla y/o especie de tortuga potencialmente libre de estos agentes, donde deberían extremarse las medidas de cuarentena con vistas a posibles programas de repatriación o reintroducción de tortugas. Por otro lado, entender la fisio-patogenia de estos virus y los potenciales impactos que pueden causar en las tortugas sería muy relevante, ya que nuestros datos sugieren que en determinadas circunstancias (p. ej. estrés, cautividad, hacinamiento) estos agentes podrían ser causantes de enfermedad, y potencial mortalidad en tortugas de Galápagos. En este sentido, nuestro estudio estuvo basado únicamente en el muestreo de animales adultos a subadultos, pero no contamos con muestras de crías o juveniles, por lo que desconocemos si estos agentes están presentes en los individuos desde su nacimiento, o son patógenos adquiridos por el contacto con otras tortugas u otras especies animales durante su desarrollo. Por tanto, muestrear crías y juveniles procedentes de diferentes zonas de anidación sería interesante para ahondar en la epidemiología de estos microorganismos y determinar si existe morbilidad y/o mortalidad potencialmente asociada a estos patógenos en los individuos más jóvenes. Por último, estudiar la presencia y prevalencia de estos virus en las colecciones de tortugas mantenidas en cautividad por la DPNG y algunas fincas privadas de Santa Cruz, San Cristóbal e Isabela sería de gran importancia, más aún cuando algunos de estos centros actúan como criaderos de tortugas que son posteriormente reubicadas en otras islas, sin realizar controles sanitarios previos. Los hallazgos realizados durante nuestra investigación mostraron que al menos un individuo adulto mantenido en cautividad en el Centro de Crianza Fausto Llerena (Santa Cruz) podría haber sufrido un cuadro agudo originado o coadyuvado por la presencia de herpesvirus (letargia severa, conjuntivitis, blefaritis, estomatitis con placas diftéricas, descarga nasal mucopurulenta y signos neurológicos incluyendo torticolis e incoordinación motora) que podría haber sido mortal sin el tratamiento de soporte llevado a cabo por el servicio veterinario de la DPNG. En cuanto al adenovirus, varios individuos provenientes del tráfico ilegal que presentaron síntomas respiratorios y digestivos compatibles con este agente (conjuntivitis, blefaritis, descarga oculonasal y diarrea), y que estaban siendo mantenidos en cautividad en condiciones de hacinamiento, fueron diagnosticados como positivos a adenovirus tras realizar el análisis

molecular de los hisopados orales. Si bien la mayoría de virus que han coevolucionado con sus hospedadores (coevolución interespecífica) no poseen un riesgo elevado de causar enfermedad y/o mortalidad en dichos hospedadores, existe la posibilidad de que aparezcan formas más virulentas debidas a mutaciones (Mandl et al., 2015), o que estos virus puedan resultar virulentos si se presentan en otras especies (Rosenberg, 2015). No podemos por tanto establecer una relación causa-efecto entre el hallazgo de estos virus en individuos enfermos y la sintomatología presentada, si bien es importante considerar que tanto CheAdV como CheHV podrían actuar como potenciales patógenos para las tortugas gigantes de las Galápagos en ciertas circunstancias, llegando a ser causantes de morbilidad e incluso mortalidad en estas especies, por lo que su epidemiología y fisio-patogenia deberían ser estudiadas en profundidad (Figura 26).



Figura 26. Tortuga del volcán Wolf (*C. becki*) mantenida en cautividad en el Centro de Crianza Fausto Llerena y con sintomatología compatible con un cuadro severo de herpesvirus, con resultado PCR positivo a CheHV1. Se observa letargia, blefaritis (izquierda) y descarga nasal (derecha). Imágenes de archivo personal.

En la especie *C. porteri*, que habita en el oeste de la isla Santa Cruz, resulta interesante haber hallado una mayor prevalencia de adenovirus y herpesvirus en ciertas fincas ganaderas del sector El Carmen, ubicado en la parte alta de la isla. Este lugar corresponde con un *punto caliente* descrito en nuestro trabajo sobre genes de resistencia, donde se encontró que los animales muestreados en ese sector contenían en su microbioma un mayor número de genes de resistencia a antimicrobianos. En esta finca encontramos un total de seis animales positivos a uno de estos agentes víricos y cuyo microbioma presentaba un promedio de ARGs significativamente mayor ( $p = 0,001$ ) al observado en esa población de tortugas. Este hallazgo sugiere que podría existir una correlación positiva entre la prevalencia y diversidad de genes

resistentes y la presencia de patógenos. Esto podría explicarse considerando que una mayor carga de ARGs puede ir asociada a una menor diversidad bacteriana, en cuyo caso podría existir cierta disbiosis que comprometiera el sistema inmunológico del hospedador y favoreciera la expresión de ciertos virus (Vittecoq et al., 2016; Thomason et al., 2017). Encontramos además en el oeste de Santa Cruz que la prevalencia de adenovirus es significativamente más alta que en las otras localidades donde está presente, lo que podría también ser explicado por el mayor grado de impacto antropogénico al que se ven sometidos los individuos de esta especie. Las tortugas de esta especie no solo se pueden ver afectadas por una mayor prevalencia de bacterias resistentes y multirresistentes, sino que están expuestas a la ingestión de agroquímicos y plásticos (Ramón et al., 2022; manuscrito en preparación), sufren el impacto de vehículos, el ataque de perros silvestres y conviven en estrecho contacto con animales domésticos y seres humanos que podrían ser portadores de otras enfermedades que aún no han sido estudiadas (p. ej. leptospirosis).

La investigación realizada nos permite transferir estos resultados a la práctica clínica y, por ello, se recomienda implementar protocolos para el monitoreo sistemático del estado de salud de las tortugas mantenidas en los centros de cría de Santa Cruz, Isabela y San Cristóbal, donde el Parque Nacional Galápagos mantiene cientos de tortugas terrestres en condiciones de cautividad para programas de recuperación ecológica de los ecosistemas. Estos protocolos deberían incluir la realización de hematología y bioquímica de todos los animales adultos con una cierta periodicidad, lo que permita realizar el seguimiento de cada uno de los individuos y detectar la presencia de potenciales enfermedades, desequilibrios nutricionales, patologías crónicas, etc. Se debería incluir en este protocolo el muestreo aleatorio de un grupo de animales de cada corral (tanto individuos adultos como juveniles), para el diagnóstico de adenovirus y herpesvirus, empleando al menos un hisopado cloacal y un hisopado oral por individuo.

### *Detección y cuantificación de AMR*

Este trabajo recoge la primera descripción de genes de resistencia a antimicrobianos (ARGs) en las Islas Galápagos, empleando a las tortugas gigantes como especies

bioindicadoras de la salud de los ecosistemas en los que habitan. Se encontró una mayor prevalencia de resistencias a las tetraciclinas, aminoglucósidos, número de ARGs y multiresistencias en las tortugas que habitan en ecosistemas modificados por los seres humanos (isla Santa Cruz), en comparación con el remoto volcán Alcedo (isla Isabela). Además, dentro de la isla Santa Cruz se observaron diferencias significativas en la prevalencia de ARGs en función de los lugares de muestreo. Se encontró una mayor prevalencia de ARGs en aquellas tortugas muestreadas en zonas urbanas y agroganaderas, en comparación con los animales muestreados en zonas protegidas o fincas ecoturísticas. Se identificaron también ciertos lugares en Santa Cruz donde existe una prevalencia relativa más alta en el número de ARGs, que corresponden con fincas donde se cría ganado vacuno en sistemas semiextensivos y zonas urbanas con una elevada contaminación por desechos humanos. Estos últimos datos relativos a las zonas de muestreo de la isla Santa Cruz contradicen nuestra hipótesis, que enunciaba que debido al comportamiento migratorio de las tortugas gigantes de Galápagos, no encontraríamos una diferencia significativa entre las diferentes áreas de muestreo. Si bien se ha descrito con detalle la ecología de movimiento de las tortugas en la isla Santa Cruz (Blake et al., 2013; Bastille-Rousseau et al., 2016, 2017, 2019), donde se concluye que existe un sistema de migración parcial en el cuál la mayoría de los individuos adultos realizan una migración anual desde las zonas bajas de Parque Nacional hasta la parte alta (donde se encuentra la zona agropecuaria), este sistema parcial también establece que existen ciertos individuos que no migran (en especial aquellos animales de menor tamaño), bien debido a su estado de salud o a otros factores ambientales, ecológicos y/o fisiológicos. Por otro lado, estudios recientes realizados por Pike et al., (2021) establecen que las tortugas adultas pueden permanecer hasta 8 meses en las tierras altas de la isla Santa Cruz, alimentándose en las fincas privadas, y que existe además una elevada afinidad por los lugares de alimentación, de manera que una tortuga adulta utiliza un promedio de 4 a 7 fincas cada año, regresando con seguridad a ese mismo entorno cada año. Considerando estos datos, es posible, por un lado, que al escoger animales menores de 200 kg para nuestro estudio hayamos podido muestrear un buen número de animales no migratorios, que serían aquellos de menor tamaño, que tal vez no han alcanzado la madurez sexual y por tanto han permanecido en las zonas del Parque Nacional, no habiendo estado expuestos a bacterias resistentes y por tanto presentando una menor carga de ARGs. Sería posible también que algunos individuos relativamente pequeños y muestreados en la parte alta, hubieran realizado ya su primera

migración, pero no necesariamente hubieran regresado ese mismo año a la zona baja, si sus reservas energéticas no lo permitían, de manera que estos animales podrían haber pasado meses o incluso más de un año dentro de las fincas privadas. Existe también la posibilidad de que los animales muestreados dentro de las fincas ganaderas llevaran varios meses en ese lugar, alimentándose de pastos y aguas contaminadas por bacterias resistentes, lo que podría explicar los resultados obtenidos por nuestro estudio.

El microbioma de las tortugas gigantes de la isla Santa Cruz está caracterizado por la presencia de genes resistentes a las tetraciclinas y los aminoglucósidos. El predominio de genes que codifican resistencias para las tetraciclinas está en consonancia con todos los demás estudios realizados hasta la fecha en especies silvestres empleando esta metodología (Cevitanes et al., 2020; Sacristán et al., 2020; Ewbank et al., 2021), pero esto no sucede con los aminoglucósidos, que no han sido hallados de manera predominante en ninguno de los estudios previamente mencionados. De acuerdo con las visitas realizadas a los centros de venta de productos agroganaderos, donde se pueden adquirir sin prescripción numerosos medicamentos para uso animal, los antibióticos más comercializados en Santa Cruz para su uso en animales de producción (vacuno y porcino) y pequeños animales son: penicilina, oxitetraciclina, gentamicina, eritromicina y estreptomina. Esta información concuerda con los hallazgos obtenidos en las tortugas muestreadas en los ambientes más antropizados, donde se encontraron mayores prevalencias de los genes *tetM*, *tetS*, *tetW*, *tetY*, *str*, *aadA*, and *ermF*, en contraposición con los resultados obtenidos en las tortugas del volcán Alcedo. La presencia de genes de resistencia a los aminoglucósidos aumenta en las zonas con una mayor intensificación de las actividades humanas (zonas urbanas y ganaderas). Los aminoglucósidos son antibióticos de amplio espectro categorizados como *importancia crítica* de acuerdo con la OMS (WHO, 2018). Estos antibióticos se emplean en medicina humana para el tratamiento de enfermedades nosocomiales y ciertas zoonosis (tularemia, leishmaniosis), así como en preparados de uso tópico (Krause et al., 2016; Van Duijkeren et al., 2019). En la práctica veterinaria, los aminoglucósidos son ampliamente empleados para tratar infecciones gastrointestinales, respiratorias y genitourinarias, en septicemias y como profilaxia y metafilaxia en la producción avícola y porcina fundamentalmente. En la Unión Europea, los aminoglucósidos están incluidos dentro de la categoría C (cautela), de acuerdo con la clasificación sobre el uso de antibióticos en medicina veterinaria. Conforme a los datos

publicados por la OIE en 2019, el 57 % de los países del continente americano que participaron en el estudio empleaban antibióticos como promotores de crecimiento, cifra muy por encima de la registrada en Asia (38,7 %), África (20,5 %) o Europa (4,2 %) (Gochez et al., 2021). Esta información podría sustentar las prevalencias relativamente altas de ARGs encontradas en las tortugas gigantes de Santa Cruz, que conviven en estrecho contacto con la ganadería de la isla, considerando además que la comercialización y uso de antibióticos no está regulada en Ecuador y estos medicamentos pueden adquirirse fácilmente sin receta médica ni veterinaria.

Los resultados de esta tesis han arrojado una prevalencia de microbiomas multirresistentes en las tortugas de Santa Cruz (34 %) que supera la encontrada en otro estudio similar que empleó la misma metodología en el remoto archipiélago brasileño de Fernando de Noronha, donde encontraron una prevalencia de multirresistencias de un 11,1 % en aves marinas (Ewbank et al., 2021). Sin embargo, Sacristán et al. (2020) encontró una prevalencia de microbiomas multirresistentes del 43 % en carnívoros silvestres en Chile. Todos estos estudios, que han empleado la misma metodología para el estudio de genes de resistencia, han confirmado un incremento de las multirresistencias en la fauna silvestre asociado a los ambientes más antropizados. El hecho de que la prevalencia de multirresistencias encontrada en las tortugas silvestres de Santa Cruz (un archipiélago remoto y cuyos asentamientos humanos datan de menos de un siglo) sea significativamente superior a la encontrada en el archipiélago de Brasil y más cercana a la encontrada en el continente chileno resulta interesante. Estos resultados pueden explicarse debido al significativo incremento poblacional e intensificación ganadera que ha experimentado Santa Cruz en los últimos años, la ausencia de alcantarillado y de un adecuado sistema de tratamiento y depuración de aguas residuales, las diferencias en las comunidades microbianas de las distintas especies, así como los diferentes factores climáticos, ecológicos y geológicos de cada biotopo, que podrían favorecer la permanencia de las bacterias resistentes en el ambiente (Wang et al., 2014; Álvarez-Martínez et al., 2020). Se debe considerar también que ciertas especies como las aves migratorias podrían estar influyendo en la dispersión de bacterias portadoras de ARGs a lo largo del archipiélago de Galápagos, llegando a movilizar genes de importancia en salud pública como el *mcr-1* o los genes del grupo de las  $\beta$ -lactamasas (Hernández & González-Acuña, 2016; Cao et al., 2020). La prevalencia de bacterias resistentes en la fauna silvestre está asociada también al uso del hábitat y las estrategias de forrajeo de

cada especie, que pueden hacerlas más o menos susceptibles de entrar en contacto con dichas bacterias provenientes de los animales domésticos y de producción y/o los seres humanos (Ramey & Ahlstrom, 2020). Por último, otro estudio sugiere que puede existir una correlación entre la presencia de microplásticos y las bacterias resistentes, al poder actuar estos microplásticos como sustratos en los que puedan permanecer y desarrollarse las bacterias resistentes (Pham et al., 2021). Este estudio resulta muy pertinente ya que se ha observado una creciente ingesta de plásticos y residuos de origen antropogénico por parte de las tortugas de Santa Cruz, sobre todo en aquellas zonas aledañas a los núcleos poblados y las vías de acceso principales (Ramón et al., 2022, manuscrito en preparación), lugares donde se han muestreado las tortugas con una mayor presencia de ARGs y multirresistencias. Ramey & Ahlstrom (2020) proponen identificar aquellas especies que por su ecología, biología y hábitos alimenticios puedan actuar como centinelas o bioindicadoras de la dispersión y contaminación de AMR en los diferentes ecosistemas (Figura 27). Los animales resultan cruciales en la evolución y diseminación de bacterias y microorganismos potencialmente patógenos y, en consecuencia, desempeñan un papel fundamental en el desarrollo y dispersión de resistencias antimicrobianas. En base a los resultados obtenidos en este estudio proponemos emplear a las tortugas gigantes de Galápagos como especies centinelas del resistoma ambiental y por tanto del estado de salud de los ecosistemas en que habitan.



Figura 27. Tortuga gigante de Alcedo (*C. vandenburghi*) y pinzón de Darwin (*Geospiza* sp.), dos especies endémicas e "ingenieras" de los ecosistemas del archipiélago. Imagen cedida por Juan Manuel García, FCD.

En resumen, este trabajo evidencia potenciales nuevas amenazas para la conservación de las tortugas gigantes, contribuyendo a elaborar una hoja de ruta para futuras investigaciones, tomadores de decisiones e instituciones locales responsables del manejo y conservación de los recursos naturales y la biodiversidad única del archipiélago.

Durante el desarrollo de este trabajo pudimos evidenciar que existen numerosas amenazas para la salud de las tortugas que hasta ahora no han sido abordadas o estudiadas en profundidad; la ingestión de plásticos y otros desechos de origen humano, la presencia de tumores en las extremidades de etiología desconocida, la aparición de cuadros edematosos en el cuello (también de etiología desconocida hasta la fecha), lesiones ulcerativas y crecimiento de hongos en el caparazón, impactos por vehículos y depredación por perros asilvestrados. Todos estos eventos, cuyo impacto sobre el estado de salud y conservación de las tortugas terrestres (principalmente en áreas antrópicas) es hasta ahora desconocido, son algunos de los aspectos que consideramos prioritarios para abordar en futuras investigaciones, y que deberían ser tomadas en cuenta e incluidas en el Plan de Manejo de la Dirección del Parque Nacional Galápagos, entidad reguladora de la investigación, manejo y conservación de las especies endémicas y nativas del archipiélago. Considerando que las tortugas terrestres de Galápagos son los vertebrados endémicos terrestres más grandes del archipiélago, el importante papel ecológico que desempeñan como “ingenieras” y modificadoras de los ecosistemas, su longevidad y amplia distribución a lo largo del archipiélago, y la importancia que tienen en la idiosincrasia e identidad galapagueñas y en la economía local por su atractivo turístico, las tortugas gigantes de Galápagos deben ser consideradas como bioindicadoras de la salud de los ecosistemas en los que habitan, diseñando planes de vigilancia epidemiológica adecuados para la detección temprana de potenciales patógenos y contaminantes ambientales.

Galápagos es un lugar único en el mundo, no solo por las emblemáticas especies que lo habitan, que no se hallan en ningún otro lugar, sino por su idiosincrasia y su organización a nivel institucional y geográfica. En Galápagos, las áreas protegidas rodean a los núcleos urbanos, y no viceversa, como puede suceder en otros lugares del planeta. Esta diferencia organizacional redundante en que los asentamientos humanos se encuentren inmersos en el Parque Nacional y no existan zonas de amortiguamiento entre los núcleos poblados (que crecen y se desarrollan rápidamente) y las áreas protegidas donde residen las especies

silvestres. Parte del encanto del archipiélago reside ahí: en que los animales y las personas conviven en estrecho contacto, pudiendo apreciar la “vida silvestre” en cada esquina y siendo partícipes en muchos casos de este fenómeno de selección natural (se podría argumentar ahora si es “antinatural”) en el que solo los más resilientes sobreviven. Este escenario permite representar el concepto de *One Health*, que aboga por la interdependencia entre la salud de los animales, los seres humanos y el medio ambiente. En Galápagos, esta conexión es evidente y visible todos los días. Y las tortugas terrestres son las especies que mejor ilustran esta interrelación. Desde los volcanes remotos de Isabela, pasando por la seca e inhóspita isla de Española, hasta los núcleos urbanos de Santa Cruz o las fincas ganaderas de la parte alta, las tortugas están presentes en todos los ecosistemas, recibiendo todos y cada uno de los impactos, positivos o negativos, asociados a esta estrecha convivencia. Es aquí donde esta tesis confluye, cerrando el círculo de *One Health* que tan bien ilustran las tortugas gigantes, que en su devenir sobre la Tierra sobrevivieron a los dinosaurios, y que quién sabe, tal vez, no puedan sobrevivir al ser humano.



*Figura 28. Tortuga gigante de Galápagos recién nacida. Imagen cedida por Joshua Vela, FCD.*

**CONCLUSIONES**

*CONCLUSIONS*



**Primera**

Este trabajo contribuye a la creación de una primera línea base sobre el estado de salud de las tortugas terrestres de Galápagos, incluyendo intervalos de referencia de parámetros hemáticos, prevalencia de agentes infecciosos y perfiles de resistencia y multirresistencia a antimicrobianos.

**Segunda**

Se describen por primera vez los intervalos de referencia de hematología y bioquímica de la tortuga gigante de la especie *Chelonoidis porteri*, como modelo para la creación de valores de referencia para las otras once especies de tortuga gigante de Galápagos, y como herramienta diagnóstica para los programas de cría en cautividad, reintroducción y/o conservación de tortugas terrestres, así como para las colecciones zoológicas que mantengan estas especies.

**Tercera**

Las actividades humanas están relacionadas con la prevalencia de genes de resistencia a antimicrobianos en las tortugas gigantes de las Islas Galápagos. El crecimiento y la expansión urbanas, en conjunto con las actividades ganaderas, un deficiente manejo de los residuos y las aguas servidas y la ausencia de control en el acceso a los antimicrobianos pueden estar contribuyendo a la dispersión de bacterias resistentes y multirresistentes en el medio ambiente del archipiélago.

#### **Cuarta**

Se ha detectado la presencia de cuatro agentes infecciosos en las tortugas terrestres de Galápagos: dos adenovirus y dos herpesvirus. La prevalencia de *Chelonoidis adenovirus 1* es mayor en las tortugas que viven en contacto más estrecho con las actividades humanas (*C. porteri*) mientras que *Chelonoidis adenovirus 2* es más prevalente en el volcán Alcedo (*C. vandenburghi*). *Chelonoidis herpesvirus 1* se encuentra distribuido en varias localidades del archipiélago, mientras que *Chelonoidis herpesvirus 2* está potencialmente restringido al volcán Wolf en la isla Isabela. Se han observado signos clínicos compatibles con la presencia de estos agentes infecciosos en algunos individuos sometidos a cautividad y/o estrés, lo que sugiere que pueden ser causantes de enfermedad en determinadas circunstancias.

#### **Quinta**

La detección de nuevos microorganismos potencialmente patógenos urge a establecer un sistema integral de vigilancia epidemiológica en el archipiélago que englobe a diversas especies nativas, endémicas, introducidas e invasoras, que puedan servir como especies centinelas para la detección temprana de potenciales agentes con carácter patógeno o incluso zoonótico.

#### **Sexta**

La presencia de perfiles multirresistentes detectados en la isla Santa Cruz impera a esclarecer el origen de dichas resistencias y la ruta de contaminación de las bacterias resistentes al medio ambiente y la fauna silvestre, así como el potencial impacto que estas resistencias tienen o pueden tener sobre la salud de los seres humanos que habitan en el archipiélago.

**First**

This work contributes to the establishment of the first baseline on the health status of Galapagos tortoises, including reference intervals for blood parameters, prevalence of infectious agents, and antimicrobial resistance and multi-resistant profiles.

**Second**

This is the first description of hematology and biochemistry reference intervals for the Western Santa Cruz giant tortoise (*Chelonoidis porteri*) that may also be used as a template for the description of reference values for other Galapagos tortoise species. Reference intervals are an important diagnostic tool for captive breeding programs, reintroduction and/or conservation programs of Galapagos tortoises, and for tortoises in human care at zoological institutions.

**Third**

Human activities are related to the prevalence of antimicrobial resistance genes in Galapagos giant tortoises. Urban growth and expansion, together with livestock activities, poor waste and sewage management, and uncontrolled access to antimicrobials are contributing to the spread of resistant and multi-resistant bacteria in the environment of the archipelago.

#### **Fourth**

We detected the presence of four infectious agents in Galapagos tortoises: two adenoviruses and two herpesviruses. The prevalence of *Chelonoidis adenovirus 1* is higher in tortoise living in closer contact with human activities (*C. porteri*), while *Chelonoidis adenovirus 2* is more prevalent in Alcedo Volcano (*C. vandenburghi*). *Chelonoidis herpesvirus 1* was detected in several tortoise species, whereas *Chelonoidis herpesvirus 2* is potentially restricted to Wolf Volcano on Isabela Island. Clinical signs consistent with the presence of these viruses have been observed in some captive and/or stressed individuals, suggesting that they may be pathogenic under various conditions.

#### **Fifth**

The detection of novel and potentially pathogenic microorganisms provides evidence for the need to establish a comprehensive epidemiological surveillance system in the archipelago that encompasses native, endemic, introduced, and invasive species that may act as sentinel species for the early detection of pathogens that may impact conservation and may also be zoonotic.

#### **Sixth**

Multi-resistant profiles detected on Santa Cruz Island makes it imperative to clarify the origin and contamination routes of resistant bacteria in both wildlife species and the environment, as well as the potential impact of these resistances for the health of domestic animals and humans inhabiting the archipelago.

## **BIBLIOGRAFÍA**



- ABG (2019). *Plan Estratégico Institucional 2019-2022*. Agencia de Regulación y Control de la Biodiversidad y Cuarentena para Galápagos. Galápagos, Ecuador.
- Agius, J. E., Phalen, D. N., Rose, K., & Eden, J. S. (2019). New insights into Sauropsid Papillomaviridae evolution and epizootiology: Discovery of two novel papillomaviruses in native and invasive island geckos. *Virus Evolution*, *5*(2), 1–12. <https://doi.org/10.1093/ve/vez051>
- Ahlstrom, C. A., van Toor, M. L., Woksepp, H., Chandler, J. C., Reed, J. A., Reeves, A. B., Waldenström, J., Franklin, A. B., Douglas, D. C., Bonnedahl, J., & Ramey, A. M. (2021). Evidence for continental-scale dispersal of antimicrobial resistant bacteria by landfill-foraging gulls. *Science of the Total Environment*, *764*(April), 144551. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144551>
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(4), 251–259. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
- Allender, M. C., Abd-Eldaim, M., Schumacher, J., McRuer, D., Christian, L. S., & Kennedy, M. (2011). PCR prevalence of Ranavirus in free-ranging eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*) at rehabilitation centers in three southeastern US states. *Journal of wildlife diseases*, *47*(3), 759–764. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.3.759>
- Allender, M. C. (2012). *Characterizing the epidemiology of ranavirus in North American chelonians: diagnosis, surveillance, pathogenesis, and treatment*. (Doctoral dissertation, Department of Veterinary Clinical Medicine, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, USA).
- Allender, M. C., Bunick, D., & Mitchell, M. A. (2013). Development and validation of TaqMan quantitative PCR for detection of frog virus 3-like virus in eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). *Journal of Virological Methods*, *188*(1–2), 121–125. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2012.12.012>
- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, *1*(DEC), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- Arteaga, A., Bustamante, L., Vieira, J., Tapia, W., Guayasamin, J. M. (2019). *Reptiles of the Galápagos: Life on the Enchanted Islands*. Tropical Herping. Quito, Ecuador.
- Atkins, A., Jacobson, E., Hernandez, J., Bolten, A. B., & Lu, X. (2010). Use of a Portable Point-of-Care (Vetscan Vs2) Biochemical analyzer for measuring plasma biochemical levels in free-living loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *41*(4), 585–593. <https://doi.org/10.1638/2009-0023.1>
- Bastille-Rousseau, G., Yackulic, C. B., Frair, J. L., Cabrera, F., & Blake, S. (2016). Allometric and temporal scaling of movement characteristics in Galapagos tortoises. *Journal of Animal Ecology*, *85*(5), 1171–1181. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12561>

- Bastille-Rousseau, G., Gibbs, J. P., Yackulic, C. B., Frair, J. L., Cabrera, F., Rousseau, L. P., Wikelski, M., Kümmeth, F., & Blake, S. (2017). Animal movement in the absence of predation: environmental drivers of movement strategies in a partial migration system. *Oikos*, *126*(7), 1004–1019. <https://doi.org/10.1111/oik.03928>
- Bastille-Rousseau, G., Yackulic, C. B., Gibbs, J. P., Frair, J. L., Cabrera, F., & Blake, S. (2019). Migration triggers in a large herbivore: Galápagos giant tortoises navigating resource gradients on volcanoes. *Ecology*, *100*(6), 1–11. <https://doi.org/10.1002/ecy.2658>
- Benkő, M.; Harrach, B.; Both, G. W.; Russell, W. C.; Adair, B. M.; Ádám, É.; de Jong, J. C.; Hess, M.; Johnson, M.; Kajon, A.; Kidd, A. H.; Lehmkuhl, H. D.; Li, Q. G.; Mautner, V.; Pring-Akerblom, P.; Wadell, G. (2005). Adenoviridae. In: Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L. A. (Eds.), *Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (pp. 213–228). Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands.
- Bensted-Smith, R., Bustamante, R., Gardener, M., Hernandez, J., Snell, H. & Tye, A. (1999). Mysterious disease in Santa Cruz tortoises studied. In: Rojas I. (Ed.). *Annual Report of the Charles Darwin Research Station*. Galápagos, Ecuador.
- Bicknese, E. J., Childress, A. L., & Wellehan, J.F. (2010). A novel herpesvirus of the proposed genus *Chelonivirus* from an asymptomatic bowsprit tortoise (*Chersina angulata*). *Journal of zoo and wildlife medicine*, *41*(2), 353–358. <https://doi.org/10.1638/2009-0214R.1>
- Blake, S., Wikelski, M., Cabrera, F., Guezou, A., Silva, M., Sadeghayobi, E., Yackulic, C. B., & Jaramillo, P. (2012a). Seed dispersal by Galapagos tortoises. *Journal of Biogeography*, *39*(11), 1961–1972. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02672.x>
- Blake, S., Yackulic, C. B., Cabrera, F., Tapia, W., Gibbs, J. P., Kümmeth, F., & Wikelski, M. (2012b). Vegetation dynamics drive segregation by body size in Galapagos tortoises migrating across altitudinal gradients. *Journal of Animal Ecology*, *82*(2), 310–321. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12020>
- Blake, S., Guézou, A., Deem, S. L., Yackulic, C. B., & Cabrera, F. (2015). The dominance of introduced plant species in the diets of migratory Galapagos tortoises increases with elevation on a human-occupied island. *Biotropica*, *47*(2), 246–258. <https://doi.org/10.1111/btp.12195>
- Blake, S., Yackulic, C. B., Cabrera, F., Deem, S. L., Ellis-Soto, D., Gibbs, J. P., Kümmeth, F., Wikelski, M., Bastille-Rousseau, G. (2021). Movement ecology. In: Gibbs, J.P., Cayot, L.J., Tapia, W.A. (Eds.), *Biodiversity of the world: conservation from genes to landscape series, Galapagos giant tortoises* (pp. 261-277). Elsevier, USA.
- Blanco-Peña, K., Esperón, F., Torres-Mejía, A. M., de la Torre, A., de la Cruz, E., & Jiménez-Soto, M. (2017). Antimicrobial resistance genes in pigeons from public parks in Costa Rica. *Zoonoses and Public Health*, *64*(7), e23–e30. <https://doi.org/10.1111/zph.12340>
- Boers, K. L., Allender, M. C., Novak, L. J., Palmer, J., Adamovicz, L., & Deem, S. L. (2020). Assessment of hematologic and corticosterone response in free-living eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*) at capture and after handling. *Zoo Biology*, *39*(1), 13–22. <https://doi.org/10.1002/zoo.21518>

- Brown, M. B., Schumacher, I. M., Klein, P. A., Harris, K., Correll, T., & Jacobson, E. R. (1994). *Mycoplasma agassizii* causes upper respiratory tract disease in the desert tortoise. *Infection and immunity*, *62*(10), 4580–4586. <https://doi.org/10.1128/iai.62.10.4580-4586.1994>
- Brown, M. B., McLaughlin, G. S., Klein, P. A., Crenshaw, B. C., Schumacher, I. M., Brown, D. R., & Jacobson, E. R. (1999). Upper respiratory tract disease in the gopher tortoise is caused by *Mycoplasma agassizii*. *Journal of clinical microbiology*, *37*(7), 2262–2269. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.7.2262-2269.1999>
- Brun, V. (2003). Traditional Thai Medicine. In: Selin, H. (Ed.), *Medicine across cultures. Science across cultures: the history of non-western science*, 3. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/0-306-48094-8\\_6](https://doi.org/10.1007/0-306-48094-8_6)
- Burnett, E., Ishida, M., De Janon, S., Naushad, S., Duceppe, M., Gao, R., Jardim, A., Chen, J. C., Tagg, K. A., Ogunremi, D., & Vinueza-burgos, C. (2021). Whole-genome sequencing reveals the presence of the bla<sub>ctx-m-65</sub> gene in extended-spectrum salmonella serovar infantis isolated from broiler chicken environments in the Galapagos Islands. *Antibiotics*, *10*(3), 267.
- Burse, C. R., & Flanagan, J. P. (2002). *Atractis marquezii* n. sp. (Nematoda: Atractidae) and a revision of *Atractis* Dujardin, 1845, sensu Baker, 1987. *Journal Parasitology*, *88*:320-324.
- Cajiao, D., Izurieta, J. C., Casafont, M., Reck, G., Castro, K., Santamaría, V., Cárdenas, S., & Leung, Y. F. (2020). Tourist use and impact monitoring in the Galápagos: An evolving programme with lessons learned. *Parks*, *26*(2), 89–102. <https://doi.org/10.2305/IUCN.CH.2020.PARKS-26-2DC.en>
- Calero-Cáceres, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J., & Muniesa, M. (2014). Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions. *Environmental Science and Technology*, *48*(13), 7602–7611. <https://doi.org/10.1021/es501851s>
- Calle, P. (2015). *Taller para desarrollar el plan de acción para las contribuciones de la salud a la conservación en las Galápagos*. Galápagos, Ecuador.
- Calle, P., Rodríguez, J. & Matamoros, Y. (Eds.). Con la colaboración de: Cunningham, A., Travis, D., Rideout, B., Jiménez, G., Sutherland-Smith, M., Ponder, J., Nieto, A., Huyvaert, K., Dary, L., Lewbart, G. & Arguedas, R. (2017). *Taller para desarrollar un Plan de Salud para la Vida Silvestre de las Islas Galápagos*. Galápagos, Ecuador.
- Carlton, J. T., Keith, I., & Ruiz, G. M. (2019). *Assessing marine bioinvasions in the Galápagos Islands : implications for conservation biology and marine protected areas*. *14*(1), 1–20.
- Carrion, V., Donlan, C. J., Campbell, K. J., Lavoie, C., & Cruz, F. (2011). Archipelago-wide island restoration in the Galápagos Islands: reducing costs of invasive mammal eradication programs and reinvasion risk. *PloS one*, *6*(5), e18835.
- Cayot, L. J., & Louis, E. (1994). Recent increase in killing of giant tortoise on Isabela Island: News from Academy Bay. *Noticias de Galápagos*, *54*:2-7.
- Cayot, L. J. (2021a). Restoration Case Studies: Española Island: From near extinction to recovery. In: Gibbs, J. P., Cayot, L. J. & Tapia, W. A. (Eds.), *Biodiversity of the world*:

- conservation from genes to landscape series, Galapagos giant tortoises* (pp. 435-449). Elsevier, USA.
- Cayot, L. J. (2021b). Restoration Case Studies: Pinzón Island: A century of zero tortoise hatchlings to a growing population. In: Gibbs, J. P., Cayot, L. J., Tapia, W. A. (Eds.), *Biodiversity of the world: conservation from genes to landscape series, Galapagos giant tortoises* (pp. 451-463). Elsevier, USA.
- Cayot, L. J. (2021c). The history of Galapagos tortoise conservation. In: Gibbs, J. P., Cayot, L. J., Tapia, W. A. (Eds.), *Biodiversity of the world: conservation from genes to landscape series, Galapagos giant tortoises* (pp. 333-349). Elsevier, USA.
- Cayot, L.J. & Hunter, E.A. (2021d). Restoration Case Studies: Floreana and Pinta Islands: Restoring tortoise populations through lost lineage recovery. In: Gibbs, J. P., Cayot, L. J., Tapia, W. A. (Eds.), *Biodiversity of the world: conservation from genes to landscape series, Galapagos giant tortoises* (pp. 465-479). Elsevier, USA.
- Cevidanes, A., Esperón, F., Di Cataldo, S., Neves, E., Sallaberry-Pincheira, N., & Millán, J. (2020). Antimicrobial resistance genes in Andean foxes inhabiting anthropized landscapes in central Chile. *Science of the Total Environment*, 724. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138247>
- Chee-Sanford, J. C., Mackie, R. I., Koike, S., Krapac, I. G., Lin, Y. F., Yannarell, A. C., Maxwell, S., & Aminov, R. I. (2009). Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *Journal of Environmental Quality*, 38(3), 1086–1108. <https://doi.org/10.2134/jeq2008.0128>
- Chen, J., Yu, Z., Michel Jr, F. C., Wittum, T., & Morrison, M. (2007). Development and application of real-time PCR assays for quantification of erm genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. *Applied and environmental microbiology*, 73(14), 4407-4416.
- Conrad, C. & Gibbs, J. P. (2021). History of Human-Tortoise Interactions: The era of exploitation: 1535-1959. In: Gibbs, J. P., Cayot, L. J., Tapia, W. A. (Eds.), *Biodiversity of the World: Conservation from Genes to Landscape Series, Galapagos Giant Tortoises* (pp. 63-79). Elsevier, USA.
- Couch, L., Stone, P. A., Duszynski, D. W., Snell, H. L., & Snell, H. M. (1996). A survey of the coccidian parasites of reptiles from islands of the Galapagos archipelago: 1990-1994. *The Journal of Parasitology*, 82(3), 432. <https://doi.org/10.2307/3284081>
- Corley-Smith, G. T. (1990). A brief history of the Charles Darwin Foundation for the Galapagos Islands 1959-1988. *Noticias de Galapagos*, 49:1-36.
- Cummings, D. E., Archer, K. F., Arriola, D. J., Baker, P. A., Faucett, K. G., Laroya, J. B., Pfeil, K. L., Ryan, C. R., Ryan, K. R. U., & Zuill, D. E. (2011). Broad Dissemination of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Sediments of Two Urban Coastal Wetlands. *Environmental Science & Technology*, 45(2), 447–454. <https://doi.org/10.1021/es1029206>

- Darwin, C. R. 1839. Narrative of the surveying voyages of His Majesty's ships Adventure and Beagle between the years 1826 and 1836: Describing their examination of the southern shores of South America, and the Beagle's circumnavigation of the globe. *Journal and Remarks, 1832-1836*. Henry Colburn, London.
- Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. *Science*, 287(5452), 443-449.
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/mubr.00016-10>
- Deem, S. L., Karesh, W. B., & Weisman, W. (2001). Putting theory into practice: wildlife health in conservation. *Conservation Biology*, 15(5), 1224–1233. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.00336.x>
- Deem, S. L., Norton, T. M., Mitchell, M., Segars, A., Alleman, R., Cray, C., Poppenga, R. H., Dodd, M., & Karesh, W. B. (2009). Comparison of blood values in foraging, nesting, and stranded loggerhead turtles (*Caretta caretta*) along the coast of Georgia, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(1), 41–56. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.1.41>
- Deem, S. L., Parker, P. G., Cruz, M., Merkel, J., & Hoeck, P. (2011). Comparison of blood values and health status of Floreana mockingbirds (*Mimus trifasciatus*) on the islands of Champion and Gardner-by-Floreana, Galápagos Islands. *Journal of Wildlife Diseases*, 47(1), 94–106. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.1.94>
- Deem, S. L., Lane-deGraaf, K. E. & Rayhel, E. A. (2019). *Introduction to One Health: An interdisciplinary approach to Planetary Health*. Wiley, USA.
- Deem, S. L., Nieto-Claudín, A., Bastille-Rousseau, G., Gibbs, J., Cabrera, F. & Blake, S. (2022a). *Health and reproduction status of migrating and non-migrating female Galapagos tortoises on Santa Cruz Island, Galapagos*. [Manuscrito inédito].
- Deem, S. L., Rivera, S., Emmel, E., Cabrera, F. & Blake, S. (2022b). *Altitudinal determinants of Galapagos tortoise sex ratios: implications of climate change on species conservation*. [Manuscrito inédito]. Biology Letters.
- Devarajan, N., Laffite, A., Mulaji, C. K., Otamonga, J. P., Mpiana, P. T., Mubedi, J. I., Prabakar, K., Ibelings, B. W., & Poté, J. (2016). Occurrence of antibiotic resistance genes and bacterial markers in a tropical river receiving hospital and urban wastewaters. *PLoS ONE*, 11(2), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149211>
- Dolejska, M., & Literak, I. (2019). Wildlife is overlooked in the epidemiology of medically important antibiotic-resistant bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(8), 1–5. <https://doi.org/10.1128/AAC.01167-19>
- Dospoly, A., Wellehan, J. F., Childress, A. L., Tarján, Z. L., & Kovács, E. R. (2013). Partial characterization of a new adenovirus lineage discovered in testudinoid turtles. *Infection, Genetics and Evolution*, 17, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.049>
- DPNG (2014). *Plan de Manejo Parque Nacional Galápagos: un pacto por la conservación y el desarrollo sustentable del archipiélago*. Ministerio del Ambiente, Parque Nacional Galápagos.

- Duffus, A. L., Waltzek, T. B., Stöhr, A. C., Allender, M. C., Gotesman, M., Whittington, R. J., Hick, P., Hines, M. & Marschang, R. E. (2015). Distribution and Host Range of Ranaviruses. In: *Ranaviruses* (pp. 9–57). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-13755-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-13755-1_2)
- Durán, M. (2008). Sanidad animal y seguridad alimentaria: viejos problemas, nuevos enfoques. Impresiones y reflexiones. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental* 21, 133-158.
- Ellis-Soto, D., Blake, S., Soutan, A., Guézou, A., Cabrera, F., & Lötters, S. (2017). Plant species dispersed by Galapagos tortoises surf the wave of habitat suitability under anthropogenic climate change. *PLoS ONE*, 12(7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181333>
- EMA Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) & EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Murphy, D., Ricci, A., Auce, Z., Beechinor, J. G., Bergendahl, H., Breathnach, R., Bureš, J., Duarte Da Silva, J. P., Hederová, J., Hekman, P., Ibrahim, C., Kozuharov, E., Kulcsár, G., Lander Persson, E., Lenhardsson, J. M., Mačiulskis, P., Malemis, I., Markus-Cizelj, L., Michaelidou-Patsia, A., ... Jukes, H. (2017). EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA). *EFSA journal. European Food Safety Authority*, 15(1), e04666. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4666>
- EMA., (2019). Categorization of Antibiotics Used in Animals Promotes Responsible Use to Protect Public and Animal Health EMA/688114/2020. Available on: <https://www.ema.europa.eu/en/news/categorisation-antibiotics-used-animals-promotes-responsible-use-protect-public-animal-health>
- Emmel, E. S., Rivera, S., Cabrera, F., Blake, S., & Deem, S. L. (2021). Field anesthesia and gonadal morphology of immature western Santa Cruz tortoises (*Chelonoidis* spp.). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 51(4), 848–855. <https://doi.org/10.1638/2019-0240>
- Errecalde, J. O. (2004). *Uso de antimicrobianos en animales de consumo: incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública* (No. V538 ERRu). Roma, Italia: FAO. <https://www.fao.org/3/y5468s/y5468s00.htm#Contents>
- Esperón, F., Sacristán, C., Carballo, M., & Torre, A. (2018). Antimicrobial Resistance Genes in Animal Manure, Manure-Amended and Nonanthropogenically Impacted Soils in Spain. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 09(09), 469–480. <https://doi.org/10.4236/abb.2018.99032>
- Ewbank, A. C., Esperón, F., Sacristán, C., Sacristán, I., Krul, R., Macedo Cavalcanti, E., Calatayud, O., Bueno, I., de Francisco Strefezzi, R., & Catão-Dias, J. L. (2021). Seabirds as anthropization indicators in two different tropical biotopes: A One Health approach to the issue of antimicrobial resistance genes pollution in oceanic islands. *Science of the Total Environment*, 754, 142141. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142141>

- FAO (2011). Feeding the Future. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Ed.), *World Livestock 2011: Livestock in Food Security* (pp. 78-80). Rome, Italy. Available on: [www.fao.org/docrep/014/i2373e/i2373e.pdf](http://www.fao.org/docrep/014/i2373e/i2373e.pdf)
- Farkas, S. L., & Gál, J. (2009). Adenovirus and mycoplasma infection in an ornate box turtle (*Terrapene ornata ornata*) in Hungary. *Veterinary microbiology*, 138(1-2), 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.016>
- Flatland, B., Freeman, K. P., Vap, L. M., & Harr, K. E. (2013). ASVCP guidelines: Quality assurance for point-of-care testing in veterinary medicine. *Veterinary Clinical Pathology*, 42(4), 405–423. <https://doi.org/10.1111/vcp.12099>
- Fleming, G. J., Heard, D. J., Uhl, E. W. & Johnson, C. M. (2004). Thymic hyperplasia in subadult Galapagos tortoises, *Geochelone nigra*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 14, 24-27.
- Fordham, D. A., & Brook, B. W. (2010). Why tropical island endemics are acutely susceptible to global change. *Why Tropical Island Endemics Are Acutely Susceptible to Global Change, Biodiversi*(19), 329–342. <https://doi.org/10.1007/s10531-008-9529-7>
- Fournié, G., Goodman, S. J., Cruz, M., Cedeño, V., Vélez, A., Patiño, L., Millins, C., Gibbons, L. M., Fox, M. T., & Cunningham, A. A. (2015). Biogeography of parasitic nematode communities in the Galápagos giant tortoise: Implications for conservation management. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135684>
- Francois, P., Pittet, D., Bento, M., Pepey, B., Vaudaux, P., Lew, D., & Schrenzel, J. (2003). Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from sterile or nonsterile clinical samples by a new molecular assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 254–260. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.254-260.2003>
- Frazier, J. (2021a). The Galapagos: island home of giant tortoises. In: Gibbs, J. P., Cayot, L. J., Tapia, W. A. (Eds.), *Biodiversity of the World: Conservation from Genes to Landscape Series, Galapagos Giant Tortoises* (pp. 3–13). Elsevier, USA.
- Frazier, J. (2021b). Galapagos tortoises: protagonists in the spectacle of life on Earth. In: Gibbs, J. P., Cayot, L. J., Tapia, W. A. (Eds.), *Biodiversity of the World: Conservation from Genes to Landscape Series, Galapagos Giant Tortoises* (WHOpp. 23-38). Elsevier, USA.
- Friedrichs, K. R., Harr, K. E., Freeman, K. P., Szladovits, B., Walton, R. M., Barnhart, K. F., & Blanco-Chavez, J. (2012). ASVCP reference interval guidelines: Determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(4), 441–453. <https://doi.org/10.1111/vcp.12006>
- García-Carrasco, J. M., Tapia, W., & Muñoz, A. R. (2020). Roadkill of birds in galapagos islands: A growing need for solutions. *Avian Conservation and Ecology*, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.5751/ACE-01596-150119>
- Getis, A. & Ord, J. K. (1992). The analysis of spatial association by use of distance statistics. *Geographical Analysis*. 24, 189–206.
- Gibbons, P. M., & Steffes, Z. J. (2013). Emerging Infectious Diseases of Chelonians. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, 16(2), 303–317. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2013.02.004>

- Gibbons, P., Whitaker, B., Carpenter, J., McDermott, C., Klaphake, E. & Sladky, K. (2019) Hematology and biochemistry tables. In: Divers, S. & Stahl, S. (Eds.), *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery* (pp. 333–350), Ed3rd. Elsevier, St. Louis (MO).
- Gibbs, J. P., Hunter, E. A., Shoemaker, K. T., Tapia, W. H., & Cayot, L. J. (2014a). Demographic outcomes and ecosystem implications of giant tortoise reintroduction to Española Island, Galapagos. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110742>
- Gibbs, J. P., Hunter, E. A., Shoemaker, K. T., Tapia, W. H., & Cayot, L. J. (2014b). Demographic Outcomes and Ecosystem Implications of Giant Tortoise Reintroduction to Española Island, Galapagos. *PLoS ONE*, 9(10), e110742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110742>
- Gill, J. L. (2014). Ecological impacts of the Late Quaternary megaherbivore extinctions. *New Phytologist* 201:1163-1169.
- Gochez, D., Moulin, G., & Erlacher-Vindel, E. (2021). OIE Annual Report on Antimicrobial Agents Intended for Use in Animals. better understanding of the global situation. Fifth report.
- Heatley, J. J. & Russell, K. E. (2019) Hematology and clinical chemistry. In: Divers, S. J. & Stahl, S. J. (Eds.), *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery* (pp. 301–318), Ed3rd. Elsevier, St. Louis (MO).
- Heldstab, A., & Bestetti, G. (1982) Spontaneous viral hepatitis in a spur-tailed Mediterranean land tortoise. *Journal of Zoo Animal Medicine*, 13, 113–120.
- Hoogstraal, H., Clifford, C. M. & Keirans, J. E. (1973). Argas (Microargas) transversus (Ixodoidea: Argasidae) of Galapagos giant tortoises: Description of the female and nymph. *Annals Entomological Society America*, 66, 727-732.
- Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance (2019). *No Time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections*. Report to the Secretary-General of the United Nations. Available from: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/en/2>.
- INEC, (2015). *Censo de población y vivienda Galápagos 2015*. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos de Ecuador.
- IUCN (2022). *The IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2021-3. <https://www.iucnredlist.org> (Acceso 14 enero 2022).
- Jacobson, E. R., Brown, M. B., Wendland, L. D., Brown, D. R., Klein, P. A., Christopher, M. M., & Berry, K. H. (2014). Mycoplasmosis and upper respiratory tract disease of tortoises : A review and update. *The Veterinary Journal*, 201(3), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.05.039>
- Jiang, L., Hu, X., Xu, T., Zhang, H., Sheng, D., & Yin, D. (2013). Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China. *Science of The Total Environment*, 458, 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.038>

- Johnson, A. J., Pessier, A. P., Wellehan, J. F., Brown, R., & Jacobson, E. R. (2005). Identification of a novel herpesvirus from a California desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *Veterinary microbiology*, *111*(1-2), 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.09.008>
- Johnson, A. J., Pessier, A. P., Wellehan, J. F. X., Childress, A., Norton, T. M., Stedman, N. L., Bloom, D. C., Belzer, W., Titus, V. R., Wagner, R., Brooks, J. W., Spratt, J., & Jacobson, E. R. (2008). Ranavirus Infection of Free-Ranging and Captive Box Turtles and Tortoises in the United States. *Journal of Wildlife Diseases*, *44*(4), 851–863. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-44.4.851>
- Jones-Dias, D., Manageiro, V. & Caniça, M. (2016). Influence of agricultural practice on mobile *bla* genes: Incl1-bearing CTX-M, SHV, CMY and TEM in *Escherichia coli* from intensive farming soils. *Environmental Microbiology*, *18*(1), 260–272. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13021>
- Kahn, L. (2016). *One Health and the politics of antimicrobial resistance*. Johns Hopkins University Press.
- Kane, L. P., Allender, M. C., Archer, G., Dzhaman, E., Pauley, J., Moore, A. R., Ruiz, M. O., Smith, R. L., Byrd, J., & Phillips, C. A. (2017). Prevalence of *Terrapene Herpesvirus 1* in free-ranging Eastern Box Turtles (*Terrapene Carolina Carolina*) in Tennessee and Illinois, USA. *Journal of Wildlife Disease*. *53*(2), 285–295. <https://doi.org/10.7589/2016-06-138>
- Keirans, J. E., Hoogstraal, H. & Clifford, C. M. (1973). The *Amblyomma* (Acarina: Ixodidae) parasitic on giant tortoises (Reptilia: Testudinidae) of the Galapagos Islands. *Annals Entomological Society America* *66*, 673-688.
- Kimble, S. J., Karna, A. K., Johnson, A. J., Hoverman, J. T., & Williams, R. N. (2015). Mosquitoes as a Potential Vector of Ranavirus Transmission in Terrestrial Turtles. *EcoHealth*, *12*(2), 334–338. <https://doi.org/10.1007/s10393-014-0974-3>
- Kolesnik, E., Mittenzwei, F., & Marschang, R. E. (2016). Detection of testudinid herpesvirus type 4 in a leopard tortoise (*Stigmochelys pardalis*). *Tierärztliche Praxis Kleintiere*, *44*(4), 283–286. <https://doi.org/10.15654/TPK-150843>
- Kolesnik, E., Obiegala, A., & Marschang, R.E. (2017). Detection of *Mycoplasma* spp., herpesviruses, topiviruses, and ferlaviruses in samples from chelonians in Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *29*(6), 820–832. <https://doi.org/10.1177/1040638717722387>
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *6*(6), a027029.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular biology and evolution*, *33*(7):1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Landázuri, S. (2000). Biometría hemática y estado de salud de los órganos externos de *Geochelone elephantopus* en la isla Santa Cruz, Galápagos. (Doctoral dissertation, Tesis de Biología. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador).
- Latorre, O. (1999). *El hombre en las Islas Encantadas: la historia humana de Galápagos*. O. Latorre.

- Latorre, O. (2001). *La maldición de la tortuga. Historias trágicas de las Islas Galápagos*. 4a edición.
- Lavoie, C., Cruz, F., Carrion, G. V., Campbell, K., Donlan, C. J., Harcourt, S., & Moya, M. (2007). *The Thematic Atlas of Project Isabela: An illustrative document describing, step-by-step, the biggest successful goat eradication project on the Galapagos Islands, 1998-2006*. Charles Darwin Foundation.
- Lavoie, C., Donlan, C. J., Campbell, K., Cruz, F., & Carrion, G. V. (2007). Geographic tools for eradication programs of insular non-native mammals. *Biological Invasions*, 9(2), 139–148. <https://doi.org/10.1007/s10530-006-9011-y>
- Lee, K., Brumme, Z.L. (2013). Operationalizing the One Health approach: the global governance challenges. *Health Policy Plan* 28, 778-785.
- Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10(12s), 122–129. <https://doi.org/10.1038/nm1145>
- Lewbart, G. A., Savo, A., Ortega, C., Loyola, A., Roberts, S., Schaaf, G., Steinberg, D., Osegueda, S. B., & Levy, M. G. (2018). Biochemistry and hematology parameters of the San Cristóbal Galápagos tortoise ( *Chelonoidis chathamensis* ). *Conservation Physiology*, 6(February), 1–8. <https://doi.org/10.1093/conphys/coy004..>
- Lu, A. P., Jia, H. W., Xiao, C., & Lu, Q. P. (2004). Theory of traditional chinese medicine and therapeutic method of diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 10(13), 1854–1856. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i13.1854>
- Mandl, J. N., Ahmed, R., Barreiro, L. B., Daszak, P., Epstein, J. H., Virgin, H. W., & Feinberg, M. B. (2015). Reservoir host immune responses to emerging zoonotic viruses. *Cell*, 160(1–2), 20–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.003>
- Márquez, C. (1983). Ecology of *Microargas transversus* on Galapagos giant tortoises (*Geochelone elefantopus darwini*) on Santiago Island. *Charles Darwin Research Station Annual Report*, 128-134.
- Márquez, C., Wiedenfeld, D., Snell, H., Fritts, T., Belen, M., MacFarland, C., Tapia, W., & Naranjo, S. (2004). Population status of giant land tortoises (*Geochelone* spp., *Chelonia*: Testudinae) from the galapagos Islands. *Ecologia Aplicada*, 3(1,2), 98–111.
- Márquez, C., Wiedenfeld, D. A., Landázuri, S. & Chávez, J. (2007). Human-caused and natural mortality of giant tortoises in the Galapagos Islands during 1995-2004. *Oryx* 41, 337-342.
- Márquez, C. (2019). *Misceláneas; la tortuga terrestre gigante de Galápagos, su historia natural*. Casa de la Cultura Ecuatoriana. Ecuador.
- Marschang, R. E., Bergmann, S. M., & Miller, D. L. (2008). Ranavirus infection in amphibians. *EAZWV Transmissible Disease Fact Sheet*, 50, 1–3.
- Marschang, R. E. (2011). Viruses infecting reptiles. *Viruses*, 3(11), 2087–2126. <https://doi.org/10.3390/v3112087>

- Marschang, R. E. (2019). Virology. In: Divers, S. J. & Stahl, S. J. (Eds.), *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery 3rd Ed.* (pp. 247-269). St. Louis, Missouri, USA. Elsevier Inc
- Marti, E., Jofre, J., & Balcazar, J. L. (2013). Prevalence of Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Community Composition in a River Influenced by a Wastewater Treatment Plant. *PLoS ONE*, 8(10), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078906>
- MacFarland, C. G., Villa, J. & Toro, B. (1974a). The Galapagos giant tortoises (*Geochelone elephantopus*): Part 1: Status of the surviving populations. *Biological Conservation*, 6, 118-133.
- MacFarland, C. G., J. Villa, & B. Toro. (1974b). The Galapagos giant tortoises (*Geochelone elephantopus*): Part 2: Conservation methods. *Biological Conservation*, 6, 198-212.
- MacFarland, C.G. & Reeder, W.G. (1975). Breeding, raising, and restocking of giant tortoises (*Geochelone elephantopus*) in the Galapagos Islands. In: Martin, D. (Ed.) *Breeding Endangered Species in Captivity*. Academic Press, London, United Kingdom.
- McAllister, C. T., Duszynski, D. W. & Roberts, D. T. (2014). A new Coccidian (Apicomplexa: Eimeriidae) from Galapagos Tortoise, *Chelonoidis* sp. (Testudines: Testudinidae) from the Dallas Zoo. *Journal of Parasitology*, 100, 128-132.
- Naula, E., Erazo, G., Casafont, M., Vinueza, C., Nieto-Claudin, A., & Tapia, J. (2018). *Plan de Manejo de Especies Invasoras para Galápagos, Galapagos Invasive Species Management Plan (2019-2029)*. Fondo de Inversión Ambiental Sostenible.
- Nesme, J. & Simonet, P. (2015). The soil resistome: A critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. *Environmental Microbiology*, 17(4), 913–930. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12631>
- Observatorio de Turismo de Galápagos (2018). *Estadísticas del turismo en Galápagos en 2018*. Ministerio de Turismo del Ecuador, Galápagos, Ecuador. [https://www.observatoriogalapagos.gob.ec/wpcontent/uploads/2019/05/Estad%C3%A9sticas\\_turismo\\_Gal%C3%A1pagos\\_2018\\_V1.pdf](https://www.observatoriogalapagos.gob.ec/wpcontent/uploads/2019/05/Estad%C3%A9sticas_turismo_Gal%C3%A1pagos_2018_V1.pdf).
- O'Neil, J. (2014). Review on Antibiotic resistance. *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations*. *Heal. Wealth Nations*, 1-16. Available on: [https://amr-review.org/sites/default/files/AMR\\_Review\\_Paper\\_-\\_Tackling\\_a\\_crisis\\_for\\_the\\_health\\_and\\_wealth\\_of\\_nations\\_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR_Review_Paper_-_Tackling_a_crisis_for_the_health_and_wealth_of_nations_1.pdf)
- Origi, F. C. (2012). Testudinid Herpesviruses: A Review. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 22(1–2), 42–54. <https://doi.org/10.5818/1529-9651-22.1-2.42>
- Overbey, K. N., Hatcher, S. M., & Stewart, J. R. (2015). *Water quality and antibiotic resistance at beaches of the Galápagos Islands*. *Frontiers in Environmental Science*, 3, 64. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00064>
- Palmer, J. L., Blake, S., Wellehan, J. F. X., Childress, A. L., & Deem, S. L. (2016). Clinical Mycoplasma sp. Infections in Free-living Three-toed Box Turtles (*Terrapene carolina triunguis*) in Missouri, USA. *Journal of Wildlife Diseases Association*, 52(2), 378–382. <https://doi.org/10.7589/2015-07-189>

- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), 1–61. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Patel, S. J., Wellington, M., Shah, R. M., & Ferreira, M. J. (2020). Antibiotic Stewardship in Food-producing Animals: Challenges, Progress, and Opportunities. *Clinical Therapeutics*, 42(9), 1649–1658. <https://doi.org/10.21037/TP-20-134>
- Pham, D. N., Clark, L., & Li, M. (2021). Microplastics as hubs enriching antibiotic-resistant bacteria and pathogens in municipal activated sludge. *Journal of Hazardous Materials Letters*, 2(January), 100014. <https://doi.org/10.1016/j.hazl.2021.100014>
- Poulakakis, N., Edwards, D. L., Chiari, Y., Garrick, R. C., Russello, M. A., Benavides, E., Watkins-Colwell, G. J., Glaberman, S., Tapia, W., Gibbs, J. P., Cayot, L. J., & Caccone, A. (2015). Description of a New Galapagos giant tortoise species (*Chelonoidis*; Testudines: Testudinidae) from Cerro Fatal on Santa Cruz Island. *PLoS ONE*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138779>
- Poulakakis, N., Miller, J. M., Jensen, E. L., Beheregaray, L. B., Russello, M. A., Glaberman, S., Boore, J., & Caccone, A. (2020). Colonization history of Galapagos giant tortoises: Insights from mitogenomes support the progression rule. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 58(4), 1262–1275. <https://doi.org/10.1111/jzs.12387>
- Porter, D. (1815). *Journal of a cruise made to the Pacific Ocean, by Captain David Porter, in the United States frigate Essex, in the years 1812, 1813, and 1814*. Bradford and Inskeep. Philadelphia, Pennsylvania USA.
- Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H., & Carlson, K. H. (2006). Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environmental Science & Technology*, 40(23), 7445–7450. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17181002>
- Pu, X. Y., Pan, J. C., Zhang, W., Zheng, W., Wang, H. Q., & Gu, Y. M. (2015). Quinolone resistance-determining region mutations and the plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrS* played important roles in decreased susceptibility to fluoroquinolones among *Shigella* isolates in southeast China between 1998 and 2013. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(4), 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.12.004>
- Quiroga, D. (2009a). Crafting nature: the Galapagos and the making and unmaking of a “natural laboratory.” *Journal of Political Ecology*, 16(1). <https://doi.org/10.2458/v16i1.21695>
- Quiroga, D. (2009b). Galápagos, laboratorio natural de la evolución: una aproximación histórica. In: Tapia, W., Ospina, P., Quiroga, D., González Novoa, J. A., & Montes del Olmo, C. (Eds.) *Ciencia para la sostenibilidad en Galápagos: el papel de la investigación científica y tecnológica en el pasado, presente y futuro del archipiélago* (pp. 13-64). Quito, Ecuador.
- R Core Team (2021). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.

- Ramey, A. M., & Ahlstrom, C. A. (2020). Antibiotic resistant bacteria in wildlife: Perspectives on trends, acquisition and dissemination, data gaps, and future directions. *Journal of Wildlife Diseases*, 56(1), 1–15. <https://doi.org/10.7589/2019-04-099>
- Ramón, K., Ron, S., Deem, S.L., Izurieta, J.C. & Nieto-Claudín, A. (2022). *Plastic consumption in Galapagos giant tortoises from Santa Cruz Island* [Manuscrito inédito]. Universidad Central de Quito, Ecuador.
- Rebello, A. R., Parker, L., & Cai, H. Y. (2011). Use of high-resolution melting curve analysis to identify *Mycoplasma* species commonly isolated from ruminant, avian, and canine samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(5), 932–936. <https://doi.org/10.1177/1040638711416846>
- Riegelman, R. & Kirkwood, B. (2018). *One Health: from AIDs to Zika*. Jones & Bartlett Learning. MA. USA.
- Rivera, S., Wellehan, J. F. X., McManamon, R., Innis, C. J., Garner, M. M., Raphael, B. L., Gregory, C. R., Latimer, K. S., Rodriguez, C. E., Diaz-Figueroa, O., Marlar, A. B., Nyaoke, A., Gates, A. E., Gilbert, K., Childress, A. L., Risatti, G. R., & Frasca, S. (2009). Systemic adenovirus infection in Sulawesi tortoises (*Indotestudo forsteni*) caused by a novel siadenovirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(4), 415–426. <https://doi.org/10.1177/104063870902100402>
- Rodhouse, P., Barling, R. W. A., Clark, W. I. C., Kinmonth, A. L., Mark, A. L., Roberts, D., Armitage, L. E., Austin, P. R., Baldwin, S. P., Bellairs, A. D. & Nightingale, P. J. (1975). The feeding and ranging behaviour of Galapagos giant tortoises (*Geochelone elephantopus*). The Cambridge and London University Galapagos Expeditions, 1972 and 1973. *Journal of Zoology* 176(3),297-310.
- Rosenberg, R. (2015). Detecting the emergence of novel, zoonotic viruses pathogenic to humans. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(6), 1115–1125. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1785-y>
- Sacristán, I., Esperón, F., Acuña, F., Aguilar, E., García, S., López, M. J., Cevitanes, A., Neves, E., Cabello, J., Hidalgo-Hermoso, E., Poulin, E., Millán, J., & Napolitano, C. (2020). Antibiotic resistance genes as landscape anthropization indicators: using a wild felid as sentinel in Chile. *Science of the Total Environment*, 703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134900>
- Sadeghayobi, E., Blake, S., Wikelski, M., Gibbs, J., Mackie, R., & Cabrera, F. (2011). Digesta retention time in the Galápagos tortoise (*Chelonoidis nigra*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 160(4), 493–497. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.08.008>
- Sadler, J. P. (1999). Biodiversity on oceanic islands: a palaeoecological assessment. *Journal of Biogeography*, 26(1), 75–87. doi:10.1046/j.1365-2699.1999.00285.x
- Schwabe, C. W. (1984). Food safety. *Veterinary Medicine and Human Health*, Third ed. Williams and Wilkins, Baltimore/London, 539-560.

- Scope, A., Schwendenwein, I., & Schaubberger, G. (2013). Characterization and quantification of the influence of season and gender on plasma chemistries of Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*, Gmelin 1789). *Research in Veterinary Science*, *95*(1), 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.02.017>
- Segawa, T., Takeuchi, N., Rivera, A., Yamada, A., Yoshimura, Y., Barcaza, G., Shinbori, K., Motoyama, H., Kohshima, S., & Ushida, K. (2013). Distribution of antibiotic resistance genes in glacier environments. *Environmental Microbiology Reports*, *5*(1), 127–134. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12011>
- Sevillano, G. (2017). *Identificación de organismos del Filo Apicomplexa y Orden Rickettsiales en tortugas gigantes (Chelonoidis spp) en las Islas Galápagos* (Doctoral dissertation, Tesis de Ingeniero Biotecnólogo. Ecuador: Univ. de las Fuerzas Armada-ESPE).
- Sevillano, G., Tapia, W., Loyola, A., Reyna-Bello, A., & Proaño-Pérez, F. (2019). Molecular characterization of *Eimeria* sp. from Galápagos giant tortoises (*Chelonoidis* spp.). *Parasitology Research*, *118*(12), 3443–3447.
- Sheldon, J. D., Stacy, N. I., Blake, S. C. V. P., Cabrera, F., & Deem, S. L. (2016). Comparison of total leukocyte quantification methods in free-living Galapagos tortoises (*Chelonoidis* spp.). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *47*(1), 196–205.
- Sillankorva, S., Pereira, M. O., & Henriques, M. (2019). Editorial: Antibiotic Alternatives and Combinational Therapies for Bacterial Infections. *Frontiers in microbiology*, *9*, 3359. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03359>
- Sim, Richard R, Norton, T. M., Bronson, E., Allender, M. C., Stedman, N., Childress, A. L., & Wellehan, J. F. X. (2015). Identification of a novel herpesvirus in captive Eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). *Veterinary Microbiology*, *175*(2–4), 218–223. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.11.029>
- Sim, R. R., Allender, M. C., Crawford, L. K., Wack, A. N., Murphy, K. J., Mankowski, J. L., & Bronson, E. (2016). Ranavirus epizootic in captive Eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*) with concurrent herpesvirus and mycoplasma infection: management and monitoring. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *47*(1), 256–270. <https://doi.org/10.1638/2015-0048.1>
- Slevin, J. R. (1959). *The Galapagos Islands: a history of their exploration*. California Academy of Sciences, San Francisco, USA.
- Snell, H. M., Stone, P. A., & Snell, H. L. (1996). Special paper: A summary of geographical characteristics of the Galápagos Islands. *Journal of Biogeography*, *23*(5), 619–624.
- Snow, D.W. (1964). The giant tortoises of the Galapagos Islands: Their present status and future chances. *Oryx*, *7*, 277–290.
- Stacy, N. I., Alleman, A. R., & Sayler, K. A. (2011). Diagnostic Hematology of Reptiles. *Clinics in Laboratory Medicine*, *31*(1), 87–108. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.10.006>
- Stahl, P. W., Astudillo, F. J., Jamieson, R. W., Quiroga, D., & Delgado, F. (2020). *Historical ecology and archaeology in the Galapagos Islands: a legacy of human occupation*. University Press of Florida, Gainesville, USA.

- Sutton, D. A., Marín, Y., Thompson, E. H., Wickes, B. L., Fu, J., García, D., Swinford, A., De Maar, T., & Guarro, J. (2013). Isolation and characterization of a new fungal genus and species, *Aphanoascella galapagosensis*, from carapace keratitis of a Galapagos tortoise (*Chelonoidis nigra* microphyes). *Medical Mycology*, *51*(2), 113–120. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.701767>
- Tacconelli, E., Magrini, N., Kahlmeter, G., & Singh, N. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *World Health Organization*, *27*, 318-327.
- Tan, L., Li, L., Ashbolt, N., Wang, X., Cui, Y., Zhu, X., Xu, Y., Yang, Y., Mao, D., & Luo, Y. (2018). Arctic antibiotic resistance gene contamination, a result of anthropogenic activities and natural origin. *Science of the Total Environment*, *621*, 1176–1184. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.110>
- Tapia, W. (2019). The most unexpected discovery of my life. *Galapagos News* (pp.12-13). Galápagos, Ecuador.
- Tapia, W. (2021a). *Española tortoises return home following closure of successful breeding program*. Giant Tortoise Restoration Initiative. Available from: <https://www.galapagos.org>
- Tapia, W. (2021b). *Breaking: Giant tortoise population on Alcedo deemed healthiest in Galapagos*. Giant Tortoise Restoration Initiative. Available from: <https://www.galapagos.org>
- Thaller, M. C., Migliore, L., Marquez, C., Tapia, W., Cedeño, V., Rossolini, G. M., & Gentile, G. (2010). Tracking acquired antibiotic resistance in commensal bacteria of Galápagos land iguanas: No Man, No Resistance. *PLoS ONE*, *5*(2), e8989. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008989>
- Thomason, C. A., Mullen, N., Belden, L. K., May, M., & Hawley, D. M. (2017). Resident microbiome disruption with antibiotics enhances virulence of a colonizing pathogen. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16393-3>
- Toral-Granda, M. V., Causton, C. E., Jäger, H., Trueman, M., Izurieta, J. C., Araujo, E., Cruz, M., Zander, K. K., Izurieta, A., & Garnett, S. T. (2017). Alien species pathways to the Galapagos Islands, Ecuador. *PloS One*, *12*(9), e0184379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184379>
- Torres, M. (2002). *Distribución Espacial, Preferencia de Hábitat y Demografía de la Tortuga Gigante Geochelone Nigrita (Testudinata: Testudinidae) en la Isla Santa Cruz, Galápagos*. (Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador).
- Townsend, C. H. (1925). The Galapagos tortoises in relation to the whaling industry: a study of old logbooks. *Zoologica*, *4*, 55-135.
- Tseui, J. J. (1978). Eastern and western approaches to medicine. *Western Journal of Medicine*, *128*(6), 551–557.
- Tye, A. (Ed.) (2018). *Guidelines for invasive species planning and management on islands*. International Union for Conservation of Nature, IUCN.

- Une, Y., Uemura, K., Nakano, Y., Kamiie, J., Ishibashi, T., & Nomura, Y. (1999). Herpesvirus infection in tortoises (*Malacochersus tornieri* and *Testudo horsfieldii*). *Veterinary pathology*, 36(6), 624–627. <https://doi.org/10.1354/vp.36-6-624>
- Van, T. T. H., Yidana, Z., Smooker, P. M., & Coloe, P. J. (2020). Antibiotic use in food animals worldwide , with a focus on Africa: pluses and minuses. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 170–177.
- Van Duijkeren, E., Schwarz, C., Bouchard, D., Catry, B., Pomba, C., Baptiste, K. E., Moreno, M. A., Rantala, M., Ružauskas, M., Sanders, P., Teale, C., Wester, A. L., Ignate, K., Kunsagi, Z., & Jukes, H. (2019). The use of aminoglycosides in animals within the EU: Development of resistance in animals and possible impact on human and animal health: A review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(9), 2480–2496. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz161>
- Van Goethem, M. W., Pierneef, R., Bezuidt, O. K. I., Van De Peer, Y., Cowan, D. A., & Makhalanyane, T. P. (2018). A reservoir of “historical” antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils. *Microbiome*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0424-5>
- VanDevanter, D. R., Warrener, P., Bennett, L., Schultz, E. R., Coulter, S., Garber, R. L., & Rose, T. M. (1996). Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(7), 1666–1671. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8784566>
- Veron, S., Mouchet, M., Govaerts, R., Haevermans, T., & Pellens, R. (2019). Vulnerability to climate change of islands worldwide and its impact on the tree of life. *Scientific Reports*, 9, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51107-x>
- Vittecoq, M., Godreuil, S., Prugnolle, F., Durand, P., Brazier, L., Renaud, N., Arnal, A., Aberkane, S., Jean-Pierre, H., Gauthier-Clerc, M., Thomas, F., & Renaud, F. (2016). Antimicrobial resistance in wildlife. *Journal of Applied Ecology*, 53(2), 519–529. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12596>
- Vlachos, E. & Rabi, M. (2018). Total evidence analysis and body size evolution of extant and extinct tortoises (Testudines: Cryptodira: Pan-Testudinidae). *Cladistics* 34:652-683.
- Vries, T. (1984). The giant tortoises: a natural history disturbed by man. In: R. Perry, (Ed.) *Key Environments: Galapagos* (Chapter 10). Pergamon Press. Oxford, United Kingdom.
- Wadsworth, J., & Berthe, F. (2019). *Pulling together to beat superbugs*. World Bank.
- Wang, F. H., Qiao, M., Su, J. Q., Chen, Z., Zhou, X., & Zhu, Y. G. (2014). High Throughput Profiling of Antibiotic Resistance Genes in Urban Park Soils with Reclaimed Water Irrigation. *Environmental Science and Technology*, 48(16), 9079–9085. <https://doi.org/10.1021/es502615e>
- Wang, F., Stedtfeld, R. D., Kim, O. S., Chai, B., Yang, L., Stedtfeld, T. M., Hong, S. G., Kim, D., Lim, H. S., Hashsham, S. A., Tiedje, J. M., & Sul, W. J. (2016). Influence of soil characteristics and proximity to antarctic research stations on abundance of antibiotic resistance genes in soils. *Environmental Science and Technology*, 50(23), 12621–12629. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02863>

- Watson, J., Trueman, M., Tufet, M., Henderson, S., Atkinson, R., Gibbs, J. P., Shriver, W. G., & Vargas, H. (2010). Mapping terrestrial anthropogenic degradation on the inhabited islands of the Galapagos Archipelago. *Oryx*, 44(01), 79. <https://doi.org/10.1017/S0030605309990226>
- Wellehan, J. F. X., Johnson, A. J., Harrach, B., Benkö, M., Pessier, A. P., Johnson, C. M., Garner, M. M., Childress, A., & Jacobson, E. R. (2004). Detection and Analysis of Six Lizard Adenoviruses by Consensus Primer PCR Provides Further Evidence of a Reptilian Origin for the Atadenoviruses. *Journal of Virology*, 78(23), 13366–13369. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.23.13366-13369.2004>
- Wellehan, J. F. X. & Divers, S. J. (2019). Bacteriology. In: Divers, S. J. & Stahl, S. J. (Eds.). *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery 3rd Ed.* (pp. 235-246). St. Louis, Missouri, USA. Elsevier Inc.
- Wheeler, E., Hong, P.-Y., Bedon, L. C., & Mackie, R. I. (2012). Carriage of antibiotic-resistant enteric bacteria varies among sites in Galápagos reptiles. *Journal of Wildlife Disease*, 48(1), 56–67. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.1.56>
- Wielinga, P.R. & Schlundt, J. (2013). Food Safety: at the center of a One Health approach for combating zoonoses. In: Mackenzie, J.S., Jeggo, M., Daszak, P. & Richt, J.A. (Eds.) *One Health: the human-animal-environmental interfaces in emerging infectious diseases* (pp. 3-17). Springer.
- Wilkinson, R. (2004). Clinical pathology. In: McArthur, S., Wilkinson, R., & Meyer, J. (Eds.) *Medicine and surgery of tortoises and turtles* (pp. 141-186). Blackwell Publishing Hoboken, NJ, USA. <https://doi.org/10.1002/9780470698877.ch7>
- Winter, J. M., Stacy, N. I., Adamovicz, L. A., & Allender, M. C. (2019). Investigating the Analytical Variability and Agreement of Manual Leukocyte Quantification Methods in Eastern Box Turtles (*Terrapene carolina carolina*). *Frontiers in Veterinary Science*, 6(11), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00398>
- World Bank (2016). Drug-Resistant Infections: A Threat to Our Economic Future. *World Bank Report*, 2(9), 1–132. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0181-3>
- World Health Organization (2001). *WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance* (No. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2). World Health Organization.
- World Health Organization (2008). *Contributing to one world, one health; a strategic framework for reducing risk of infectious diseases at the animal-human-ecosystems interface*. Consultation document by BM, OMS, UNICEF, FAO, OIE, UNSIC. Available on: [https://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/remesa/library/1\\_One%20world%20one%20health.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/remesa/library/1_One%20world%20one%20health.pdf)
- World Health Organization. (2017). *WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals: web annex A: evidence base* (No. WHO/NMH/FOS/FZD/17.2). World Health Organization.

- World Health Organization. (2018). Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use. World Health Organization, Geneva. Available from <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf>.
- Wright, G. D. (2010). Antibiotic resistance in the environment: A link to the clinic? *Current Opinion in Microbiology*, 13(5), 589–594. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.08.005>
- Yackulic, C. B., Blake, S. & Bastille-Rousseau, G. (2017). Benefits of the destinations, not costs of the journeys, shape partial migration patterns. *Journal of Animal Ecology*, 86(4), 972–982. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12679>
- Yonkers, S.B., Schneider, R., Reavill, D.R., Archer, L.L., Childress, A.L. & Wellehan, J.F.X. (2015). Coinfection with a novel fibropapilloma-associated herpesvirus and a novel *Spirorchis* sp. in an eastern box turtle (*Terrapene carolina*) in Florida. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(4), 408–413. <https://doi.org/10.1177/1040638715589612>
- Zap, A. M., Desprez, I. L., Ortega, A. G., Bravo, D., Larrat, S., Hunt, K. & Rush, M. (2019). *Evaluación de la función tiroidea y establecimiento de intervalos de referencia en tortugas endémicas de Galápagos (Chelonoidis spp)*. [Simposio]. III Simposio de Investigación y Conservación Dirección del Parque Nacional Galápagos y Galapagos Science Center, Galápagos, Ecuador.
- Zhang, T. (2008). Limiting distribution of the G statistics. *Statistics & Probability Letters*, 78(12), 1656–1661.
- Zunino, P. (2018). Historia y perspectivas del enfoque “Una Salud.” *Veterinaria (Montevideo)*, 54(210), 46–51. <https://doi.org/10.29155/vet.54.210.8>