

Trabajo de Fin de Grado en Ciencias Ambientales:

Estudio de la relación entre  
nematodos endobiontes e índices de  
condición física en *Testudo graeca*.  
Evaluación de métodos para la  
conservación de muestras fecales.

Autor: Álvaro Maiz García

Tutores: Eva Graciá Martínez y Moisés González Juan

Departamento de Biología Aplicada. Área de Ecología.  
Facultad de Ciencias Experimentales.  
Universidad Miguel Hernández

Curso 2023-2024

## Resumen:

Las poblaciones silvestres de tortuga mora *Testudo graeca* se ven amenazadas por la introducción de ejemplares domésticos que pueden ser portadores de patógenos. Los objetivos de este proyecto son (I) estudiar la comunidad de nematodos endobiontes de tortugas presentes en el C.R.F.S. El Valle (Murcia), (II) evaluar posibles relaciones entre la intensidad parasitaria, variables biológicas y tres índices de condición física y (III) evaluar distintos métodos de conservación de huevos de estos helmintos en heces. Para ello, se recogieron datos biométricos y se realizaron análisis coprológicos por flotación de las muestras de heces de tortugas. Las mismas muestras se utilizaron para valorar la eficacia de diferentes métodos de conservación (congelación, etanol y DESS). Los resultados obtenidos muestran la presencia de oxiúridos (Pharingodonidae) y de ascáridos (Ascarididae) en un 100% (25/25) y 36% (9/25) de los individuos, respectivamente. Nuestros resultados evidencian una relación inversa del índice corporal 1 (IC1; peso/longitud) con la parasitación de oxiúridos y el sexo de las tortugas. Además, se relacionó IC2 (peso/volumen) con el tiempo de permanencia en el centro. La congelación demostró ser el método más efectivo, seguido por el DESS, independientemente de la temperatura. Este conservante se sugiere como una opción práctica para la conservación de muestras fecales cuando la refrigeración no es posible.

**Palabras clave:** Ascáridos, DESS, índice corporal, oxiúridos, tortuga mora

## Abstract:

Wild populations of *Testudo graeca* tortoises are at risk from the introduction of domestic specimens that may carry pathogens. The objectives of this project are as follows: (I) to study the endobiont nematode community of tortoises present in the C.R.F.S. El Valle (Murcia), (II) to evaluate possible relationships between parasitic intensity, biological variables and three physical condition indices, and (III) to evaluate different methods of preserving eggs of these helminths in faeces. For this purpose, biometric data were collected, and flotation coprological analysis of tortoise faecal samples was performed. The same samples were used to assess the efficacy of different preservation methods (freezing, ethanol and DESS). The results demonstrate the presence of oxyurids (Pharingodonidae) and ascarids (Ascarididae) in 100% (25/25) and 36% (9/25) of the individuals, respectively. Our results indicate an inverse relationship of body index 1 (CI1; weight/length) with oxyurid parasitism and sex of tortoises. Furthermore, CI2 (weight/volume) was found to be related to the time spent in the centre. Freezing was demonstrated to be the most effective method, followed by DESS, regardless of temperature. This preservative is therefore recommended as a practical alternative for the preservation of faecal samples when refrigeration is not possible.

**Keywords:** Ascarids, body index, DESS, oxyurids, spur-thighed tortoise

## Índice de contenido

Agradecimientos .....	5
1. Introducción .....	6
1.1. Características generales de la tortuga mora ( <i>Testudo graeca</i> ) .....	6
1.2. Reintroducción de tortugas domésticas .....	9
1.3. Helmintofauna y condición física .....	10
1.4. Técnicas de conservación .....	12
2. Antecedentes y objetivos .....	13
2.1. Antecedentes .....	13
2.2. Objetivos .....	14
3. Materiales y métodos .....	15
3.1. Toma de datos y muestras .....	15
3.2. Procesamiento y examen coprológico .....	16
3.3. Análisis estadístico .....	19
4. Resultados .....	22
4.1. Índices de condición física .....	22
4.2. Métodos de conservación .....	24
5. Discusión .....	27
5.1. Índices de condición física .....	28
5.2. Métodos de conservación .....	29
6. Conclusiones y proyección futura .....	32
7. Bibliografía .....	33

## Índice de Figuras

Figura 1. Ubicación del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre El Valle respecto a las poblaciones naturales de <i>Testudo graeca</i> en Murcia .....	15
Figura 2. Cámara de McMaster de cuadrícula segmentada con muestra fecal en solución de Sheather.....	17
Figura 3. Imagen al microscopio óptico de huevos de oxiúridos y ascáridos en cámara de McMaster:.....	18
Figura 4. Gráfico de dispersión del logaritmo del peso de tortuga mora respecto a logaritmo de la longitud del espaldar con ecuación y línea de tendencia. ....	20
Figura 5. Diagrama de cajas de A. Logaritmo del Índice Corporal 1 (IC1) calculado como $\text{Peso (g)} \cdot 10 / \text{Longitud del Espaldar (mm)}$ y B. Huevos por gramo (hpg) de oxiúridos. Ambos en función del sexo de la tortuga mora <i>T. graeca</i> .....	22
Figura 6. Gráfico de dispersión del logaritmo del índice corporal 1 ( $\log \text{IC1}$ ) de tortuga mora <i>T. graeca</i> calculado como $\text{Peso (g)} \cdot 10 / \text{Longitud del Espaldar (mm)}$ respecto a Intensidad de parasitación por oxiúridos (hpg) con ecuación y línea de tendencia.....	23
Figura 7. Diagrama de cajas del logaritmo del Índice Corporal 2 (IC2) calculado como $\text{Peso (g)} \cdot 1000 / \text{Longitud del Espaldar (mm)} \cdot \text{Altura} \cdot \text{Anchura a nivel del 5}^\circ \text{ par de placas marginales (mm)}$ en función del sexo de la tortuga mora <i>T. graeca</i> .....	24
Figura 8. Diagrama de cajas de huevos por gramo (hpg) de A, ascáridos y B, oxiúridos en función del método de conservación de las muestras.....	25

## Índice de Tablas

Tabla 1. Descripción de las medidas corporales (Braza <i>et al.</i> , 1981) tomadas en las tortugas moras del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre El Valle.....	15
Tabla 2. Descripción de las variables de estudio.....	16
Tabla 3. Media, mediana y desviación típica de la intensidad de parasitación de oxiúridos y ascáridos por gramo de heces (hpg) en función del método de conservación.....	25
Tabla 4. Diferencia porcentual entre las medias de cada par de grupos y p-valor asociado calculado mediante las pruebas de Kruskal-Wallis con corrección de Bonferroni y prueba post-hoc de Dunn. En verde se representan los p-valores significativos para un intervalo de confianza del 95%.....	26

## **Agradecimientos**

A todo el Área de Ecología, mil gracias por acogerme y enseñarme durante todo este proceso; y especialmente a Eva y Moisés, gracias por vuestra infinita paciencia y dedicación, sin vuestra perseverancia esto no habría sido posible.

A mis amigos, por haber hecho de estos años de estudio una etapa inolvidable.

A mi familia, gracias por los valores que me habéis inculcado y por vuestra ayuda incondicional.

Y finalmente a Laura, por estar siempre ahí, en lo bueno y en lo malo, todo tiene sentido gracias a ti.



## 1. Introducción

El orden Testudines (tortugas) es el taxón de reptiles más amenazado a nivel mundial y el segundo de los principales grupos de vertebrados más amenazado del planeta, sólo por detrás de primates no humanos (Turtle Taxonomy Working Group & Rhodin, 2021). Se estima que el 51%-56% de las especies de tortugas se encuentran amenazadas: en peligro crítico (CR), en peligro (EN) o vulnerable (VU), según la Lista Roja de la UICN (Stanford *et al.*, 2018; Böhm *et al.*, 2013). Los principales factores causantes de este rápido declive son la destrucción de los ecosistemas y la caza descontrolada por parte del ser humano (Böhm *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2004), generando conflictos que han llevado a la extinción reciente de algunas especies, como la tortuga gigante de Pinta en las islas Galápagos (*Chelonoidis niger abingdonii*), la tortuga pecho quebrado de Viesca (*Kinosternon hirtipes megacephalum*) en México o las cinco especies del género *Cylindraspis* en las islas Mascareñas (A. Rhodin *et al.*, 2021; Turtle Taxonomy Working Group & Rhodin, 2021; Lovich *et al.*, 2018).

### 1.1. Características generales de la tortuga mora (*Testudo graeca*)

La tortuga mora (*Testudo graeca* Linnaeus 1758) se distribuye por el sur y el este de la cuenca mediterránea, los Balcanes, el Cáucaso, Oriente Medio y Asia Central hasta Irán. También existen tres pequeños núcleos poblacionales de tortuga mora en España que habitan áreas aisladas de Mallorca, la Reserva Biológica de Doñana y las provincias de Murcia y Almería (Graciá, 2013; López Jurado & Andreu, 1997). En este último núcleo de población encontramos *Testudo graeca whitei* (Bennett *in* White), una de las diez subespecies reconocidas de tortuga mora (Turtle Taxonomy Working Group & Rhodin, 2021; Graciá *et al.*, 2017a), cuya distribución principal es el norte de Argelia. Según estudios filogeográficos realizados por Graciá, (2013), el origen de las poblaciones de tortuga mora en Murcia y Almería se remonta a unos 100 individuos de *T. graeca whitei* que llegaron a la península ibérica hace 20.000 años desde el norte de África. El punto estimado de entrada se ha localizado en la cuenca de Vera (Almería), desde donde se fue expandiendo hasta alcanzar la distribución actual (Graciá, 2013).

*Testudo graeca* es una tortuga de tamaño mediano, cuyo caparazón tiene forma de cúpula convexa y, desde arriba, se aprecia una forma ovalada en las hembras y trapezoidal en los machos. El color de fondo del caparazón es amarillento, oliva pálido o marrón rojizo, con algunas manchas negras dispuestas asimétricamente, a menudo con una mancha central en las placas vertebrales y costales. El espaldar está compuesto por 5 placas vertebrales, 8 costales y 22 marginales, más una placa nucal y a diferencia de la tortuga mediterránea (*Testudo hermanni* Linnaeus 1758) tiene la placa supracaudal indivisa. En la parte media posterior del muslo

presenta un espolón característico que ayuda a diferenciarlo de otras especies del género *Testudo*, aunque a veces está ausente (Escoriza *et al.*, 2022; Pérez *et al.*, 2004). La cabeza es redondeada y oscura, cubierta por escamas pequeñas e irregulares, entre las que destacan la prefrontal y la frontal por su mayor anchura (a veces dividida). Las mandíbulas conforman una boca en forma de pico córneo ligeramente curvado (Díaz-Paniagua & Andreu, 2015).

En las subespecies occidentales los machos son más pequeños que las hembras, pero sus colas son proporcionalmente más largas y anchas, y normalmente tienen el plastrón más corto, pero más cóncavo, con la placa supracaudal más convexa que las hembras (Lambert, 1982). En *T. g. whitei* la longitud del espaldar (LE) media de las hembras varía entre 113,7 y 302,8 mm y en los machos entre 83,2 y 241,1 mm. Sin embargo, el tamaño corporal presenta gran variabilidad entre distintas poblaciones, siendo las tortugas adultas de las poblaciones del norte de África un 60% mayores que las del sudeste ibérico, y en promedio, las hembras norafricanas son un 30% mayores que las ibéricas y los machos un 50% (Semaha *et al.*, 2024). La subespecie *T. g. whitei* presenta una coloración variable que va desde el amarillo a un verde oliva pálido o marrón verdoso, con manchas negras en el centro y líneas negras bordeando las placas del espaldar (Escoriza *et al.*, 2022).

En el sureste de España (provincias de Murcia y Almería) *T. g. whitei* habita montañas costeras semiáridas con preferencia por suelos silíceos y pendientes moderadas, con una precipitación anual cercana a los 260 mm y paisajes de media montaña. Evita las zonas de vegetación densa, asociándosele con matorrales de baja cobertura, como albaida, esparto y romero. Muestra preferencia por áreas donde esta vegetación se intercala con pinares y con cultivos arbóreos tradicionales. Se encuentran con mayor abundancia en las laderas de orientación noroeste, con niveles moderados o altos de radiación solar y con abundancia de alimento, y en llanos al fondo de los valles, donde encuentran zonas de anidación y hábitats de borde entre cultivos y matorrales (Anadón *et al.*, 2005). La tortuga mora cumple una serie de funciones ecológicas en el ecosistema, pudiendo actuar como dispersora de semillas (Cobo & Andreu, 1988), o como alimentación suplementaria de especies en peligro, como el águila real en áreas con escasez de conejos (Gil-Sánchez *et al.*, 2022; Martínez Pastor, 2016).

Las poblaciones de tortuga mora del sureste ibérico son consideradas las únicas poblaciones naturales de la especie en el oeste de Europa, las cuales se encuentran en progresivo declive debido a una baja densidad poblacional que se ve agravada por la alteración de su hábitat (Graciá *et al.*, 2020a; Graciá & Giménez, 2015). Por ello, la especie ha alcanzado un alto estatus de protección internacional, nacional y local. En este sentido, la tortuga mora está incluida en el apéndice II de la Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas (CITES,

2017), en el apéndice II del Convenio de Berna (Convenio de Berna, 1979) y se clasifica como "Vulnerable" en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN (IUCN, 1996). En la Unión Europea, la especie se incluye en los apéndices II y IV de la Directiva Hábitats y 243.000 ha de su hábitat han sido propuestas como zonas de especial conservación (LIC) para su inclusión en la Red Natura 2000 (Directiva 92/43/CEE del Consejo, 1992). En España esta tortuga está considerada "En Peligro" (Pleguezuelos *et al.*, 2004). Gracias a esta protección, podemos considerar a la tortuga mora en el sureste ibérico una "especie paraguas", ya que con su estatus de protección especial ayuda a conservar los ambientes semiáridos en los que vive. Una protección muy necesaria sobre todo en el levante español, en el que existen fuertes intereses económicos por urbanización y agricultura intensiva en las áreas de distribución de estas tortugas (Giménez *et al.*, 2005).

La pérdida y fragmentación de hábitat es el principal factor que contribuye a la pérdida de biodiversidad mundial (Santos & Tellería, 2006; Brooks *et al.*, 2002). La cuenca mediterránea es uno de los "puntos calientes" de biodiversidad global, aunque se estima que para final de siglo el bioma mediterráneo habrá perdido un 11-25% de su extensión actual, siendo la península ibérica el territorio donde más superficie se perderá en Europa debido a la desertización (Barredo *et al.*, 2016; Sala *et al.*, 2000). Entre las áreas más vulnerables se encuentra el sureste español, una región especialmente rica en biodiversidad dentro de Europa, con endemismos iberoafricanos que han coevolucionado durante siglos en paralelo a las prácticas agrícolas y ganaderas tradicionales (Henle *et al.*, 2004; Sainz & Moreno, 2002). En las últimas décadas, amenazas como la industrialización de la agricultura y el auge del turismo masivo han provocado la pérdida y fragmentación de los ecosistemas (Martínez-Fernández *et al.*, 2015; Martínez & Esteve, 2006; Henle *et al.*, 2004). La fragmentación del hábitat aísla poblaciones y crea efectos de borde que alteran las condiciones bióticas y ambientales de las manchas (Santos & Tellería, 2006). La tortuga mora, al tratarse de una especie longeva, con escasa abundancia, con reducida movilidad y con un nicho climático restringido, es muy susceptible a la fragmentación y alteración de su hábitat (Jiménez-Franco *et al.*, 2024, 2022; Graciá *et al.*, 2020a). Además, los paisajes altamente perturbados y homogeneizados son especialmente vulnerables a las invasiones de plagas y patógenos. Esto es un resultado de las actividades humanas que facilitan el movimiento de especies exóticas o invasoras hacia nuevas áreas y crean condiciones propicias para su establecimiento, pudiendo los huéspedes modificar su ecología fisiológica y comportamiento en respuesta a estos cambios (Suzán *et al.*, 2012; Amo *et al.*, 2007).

La captura ilegal de ejemplares es la segunda amenaza más importante a la que se enfrentan las tortugas de tierra en todo el mundo (Janssen, 2021). Tradicionalmente, la tortuga mora ha sido considerada como un animal doméstico, lo cual ha provocado desde tiempos

históricos una captura sistemática en áreas rurales de ejemplares silvestres, causando la reducción de sus poblaciones naturales (Giménez *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2004). Las capturas ilegales en Murcia y Almería se deben mayoritariamente a encuentros fortuitos con los habitantes de núcleos urbanos cercanos al hábitat natural de *T. graeca* (Giménez *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2004). Esta costumbre se mantiene todavía en zonas rurales con presencia de tortugas. De hecho, se calcula que un 60-68% de las tortugas en cautividad provienen directamente de poblaciones silvestres, de las cuales únicamente el 15% acaban regresando a su hábitat (Pérez *et al.*, 2004; Giménez *et al.*, 1999). Esta información pone en evidencia la falta de sensibilización y conocimiento de la sociedad sobre el estatus de conservación de la tortuga mora, así como del papel ecológico fundamental que desempeña en los paisajes semiáridos del sureste peninsular (Giménez *et al.*, 2005; López Jurado, 1979).

## 1.2. Reintroducción de tortugas domésticas

Desde julio de 2015, la posesión de cualquier especie animal protegida se considera un delito penal (Ley Orgánica 1/2015, de 30 de marzo, 2015). Debido a esta normativa, en estos últimos años se ha producido una entrega masiva de tortugas moras a los centros de recuperación de fauna de Murcia y Andalucía. Esta situación, y la capacidad de admisión limitada de los centros, ha conllevado la liberación no controlada de tortugas en la naturaleza por parte de la población (Graciá *et al.*, 2016).

El declive de las poblaciones silvestres de *Testudo graeca*, unido al elevado número de individuos en los centros de recuperación, plantean un desafío crucial en términos de gestión para asegurar la viabilidad de la especie. Para abordarlo, se pueden considerar varias estrategias, entre ellas la reintroducción de tortugas cautivas en hábitats naturales. Aunque esta medida podría contribuir a la conservación de la especie, su eficacia no ha sido probada y podría ser desaconsejable debido a los riesgos que presenta (Graciá *et al.*, 2020b; Moreno, 2017). En concreto, desde un punto de vista genético, la exogamia podría alterar la integridad genética de las poblaciones locales, lo que a su vez podría ocasionar la pérdida de adaptaciones locales cruciales. Es común encontrar tortugas procedentes de poblaciones africanas o híbridos en poblaciones silvestres de la península ibérica (Graciá *et al.*, 2017b; Graciá, 2013).

Además, la potencial transmisión de patógenos a las poblaciones naturales representa un riesgo significativo para las tortugas. Las poblaciones alóctonas frecuentemente presentan patógenos poco comunes en las poblaciones locales, lo que podría tener implicaciones sanitarias importantes, incluida la posibilidad de desencadenar epidemias que comprometan la

supervivencia de los grupos locales, tal y como ha sido previamente sugerido (Graciá *et al.*, 2020b; Berry *et al.*, 2015; Chávarri *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2011; Jacobson, 1993).

Conforme aumenta el número de patógenos descritos en quelonios se hace necesario incrementar su estudio para conocer con detalle cuál es el papel que desempeñan las tortugas en la epidemiológica de estos patógenos. Especial atención merecen aquellos patógenos emergentes y/o zoonóticos (eg., virus de la fiebre hemorrágica Crimea-Congo, *Salmonella* spp...) (Adamovicz *et al.*, 2020). Esta problemática ha sido constatada en un estudio con tortugas del desierto de Mojave (*Gopherus agassizii*), donde se observa una correlación positiva entre la detección de patógenos que causan clínica respiratoria en tortugas y su cercanía a núcleos urbanos. Esta relación puede estar ocasionada por capturas ilegales de *G. agassizii* para su uso como mascota, similar a la de la tortuga mora en el Mediterráneo (Berry *et al.*, 2015). En la cercanía de núcleos urbanos se producen más capturas de tortugas salvajes y se liberan domésticas (Pérez *et al.*, 2012), lo que puede generar un flujo de patógenos de las poblaciones cautivas hacia las silvestres y viceversa. En este sentido, la introducción de patógenos alóctonos en poblaciones naturales de tortugas podría ocasionar alteraciones relevantes sobre el estado sanitario de la población (González *et al.*, 2021; Graciá *et al.*, 2016; Smith, 2015).

Por estos riesgos, las acciones de refuerzo poblacional no son recomendables para la conservación de las poblaciones naturales de *T. graeca*. En consecuencia, es de suma importancia evaluar meticulosamente cualquier acción de gestión propuesta y considerar estrategias alternativas que minimicen los riesgos para la conservación de la especie (Graciá *et al.*, 2020b; Moreno, 2017).

### 1.3. Helmintofauna y condición física

Los nematodos son los principales endoparásitos y endosimbiontes en quelonios. *Testudo graeca* presenta una abundante y diversa población de especies de nematodos gastrointestinales, comunes también a otros herpetos herbívoros (Roca, 1999). Numerosos estudios epidemiológicos sobre *Testudos* cautivas de toda Europa y Asia Occidental muestran altas prevalencias de infección por nematodos (Benítez-Malvido *et al.*, 2019; Hallinger *et al.*, 2018; Miñana-Morant & Ponce-Gordo, 2018; Cervone *et al.*, 2016; Papini *et al.*, 2011; Rataj *et al.*, 2011; Traversa *et al.*, 2005).

Los oxiúridos de la familia Pharyngodonidae (Travassos, 1919) (superfamilia Oxyuroidea, Cobbold, 1864) son los principales nematodos que encontramos en muchos estudios sobre la nematofauna del género *Testudo* (Bouamer & Morand, 2006). Los oxiúridos presentan un ciclo biológico directo, en el que los huevos liberados al medio son ingeridos de nuevo por las tortugas

debido a sus hábitos geófagos y coprófagos, produciendo con frecuencia reinfecciones (Roca, 1999). Existen estudios que reportan altas prevalencias de estos parásitos en hospedadores con un estado sanitario óptimo, (Jacobson, 2007; Roca, 1999). Además, una abundante diversidad de las especies de oxiúridos en tortugas se ha asociado positivamente con las tasas de crecimiento en hábitats poco degradados, lo que refuerza la hipótesis de la existencia de una relación comensal o mutualista entre parásito y hospedador (Benítez-Malvido *et al.*, 2019). En este sentido, los oxiúridos podrían desempeñar un papel importante en la digestión de vegetales consumidos por las tortugas, aportando productos nitrogenados que resultan beneficiosos y absorbibles para el hospedador y regulando la flora bacteriana en el ciego de las tortugas (Díaz-Paniagua & Andreu, 2015; Loukopoulos *et al.*, 2007; Roca, 1999). Además, en línea con los hallazgos detectados en distintos reptiles, la prevalencia de endoparásitos aumenta con la edad, el tamaño y las tasas de crecimiento (Benítez-Malvido *et al.*, 2019; Leung & Koprivnikar, 2019; Jacobson, 2007). Sin embargo, las infecciones masivas por oxiúridos pueden ocasionar alteraciones digestivas severas (malabsorción severa, anorexia, diarrea, impactación) e incluso la muerte (Pasmans *et al.*, 2008; Loukopoulos *et al.*, 2007).

Los ascáridos (familia Ascarididae, Baird, 1853) tienen también una evidente relevancia para la conservación de las tortugas, ya que estudios previos han demostrado que estos nematodos pueden tener consecuencias sanitarias importantes sobre estos reptiles (Cervone *et al.*, 2016; Papini *et al.*, 2011; Roca, 1999). A modo general, los ascáridos suelen tener implicaciones más negativas para la salud de los quelonios que los oxiúridos, principalmente debido a la migración visceral de las larvas de estos nematodos, normalmente hacia los pulmones, donde completan su maduración antes de regresar de nuevo al intestino, ocasionando lesión tisular, inflamación, formación de granulomas, fibrosis e infecciones secundarias (Hallinger *et al.*, 2018; Papini *et al.*, 2011; Rataj *et al.*, 2011; Jacobson, 2007).

En biología es común usar índices de condición física como un método de análisis no invasivo, indicativo de la salud de los individuos. En tortugas de zonas áridas se han correlacionado con la supervivencia y el rendimiento reproductivo (Hofmeyr *et al.*, 2005; Henen, 2004). Los índices de condición física se expresan a menudo como el cociente entre la masa corporal y una medida lineal de tamaño corporal, o bien como los residuos de la gráfica entre el tamaño y el peso (Schulte-Hostedde *et al.*, 2005; Willemsen & Hailey, 2002). No obstante, la relación entre la masa corporal y una medida lineal del tamaño corporal (generalmente la longitud del caparazón en tortugas) puede tener una utilidad limitada (Jacobson *et al.*, 1993). Por ello, en trabajos de este tipo es común realizar índices que integren más medidas corporales para calcular con más precisión el volumen de los animales y así ajustar la densidad con más fidelidad.

#### 1.4. Técnicas de conservación

Para el estudio de endoparásitos de la tortuga mora, el análisis de heces frescas obtenidas directamente de la cloaca es fundamental. Sin embargo, no siempre es posible realizar un análisis inmediato, siendo necesario utilizar técnicas para la conservación óptima de las muestras (Kozlova *et al.*, 2020).

La refrigeración es un método recomendado de conservación para la coprología, pues es seguro y muy efectivo para mantener el ADN (Gee, 1984) y la estructura tisular de los nematodos (Yoder *et al.*, 2006). Pero su principal desventaja se debe a la infraestructura asociada necesaria, que requiere un suministro de energía constante para garantizar una temperatura uniforme (Beknazarova *et al.*, 2017), lo que vuelve inviable las salidas de campo prolongadas o con pocos medios en las que no es posible transportar un refrigerador (Kozlova *et al.*, 2020). Como alternativa es común almacenar las muestras inmersas en disoluciones de etanol o de formol. El formol presenta una notable capacidad de preservación de tejidos, pero destruye el ADN y es altamente tóxico y cancerígeno (tipo II por la IARC). Por su parte, el etanol preserva el ADN y la morfología de nematodos adultos, pero deforma y destruye los huevos, disminuyendo su número y dificultando la identificación morfológica (Hass *et al.*, 2024; Naem *et al.*, 2010). Otra opción es la plastinación, que consiste en la sustitución del agua de los tejidos por polímeros de silicona, pero es un método económicamente costoso que degrada por completo el material genético (González *et al.*, 2018).

Ante las desventajas de las técnicas mencionadas, surge el DESS como una alternativa viable. DESS se denomina a una disolución compuesta por Dimetilsulfóxido (DMSO), ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) y cloruro de Sodio Saturado (NaCl), la cual fue creada por Seutin *et al.* (1991) como un preservante del ADN en tejido y sangre. Desde entonces han sido utilizadas diferentes concentraciones de DMSO, EDTA y NaCl para la preservación eficaz del ADN en muestras fecales (Beknazarova *et al.*, 2017; Yoder *et al.*, 2006; Frantzen *et al.*, 1998; Wasser *et al.*, 1997). La disolución permite además conservar la morfometría de los tejidos a lo largo del tiempo gracias a la notable permeabilidad del DMSO en ellos (Seutin *et al.*, 1991), permitiendo por tanto la identificación taxonómica por microscopía (incluyendo nematodos adultos en muestras fecales) (Thaenkham *et al.*, 2022; Naem *et al.*, 2010), por lo que además, es una alternativa a las fijaciones de formol, pero sin sus efectos mutagénicos y tóxicos (Lee *et al.*, 2019; Gaither *et al.*, 2011; Yoder *et al.*, 2006). Estas características convierten al DESS en un medio prometedor para la conservación de muestras de heces en trabajos de campo, ya que permite el análisis genético y la identificación morfológica de la helmintofauna de las tortugas.

## 2. Antecedentes y objetivos

### 2.1. Antecedentes

Chávarri y colaboradores (2012) analizaron la helmintofauna de tortugas moras del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre (C.F.R.S.) de *Santa Faz* en Alicante, identificando los nematodos en heces de individuos silvestres y en cautividad para comprobar la posible relación entre su estado físico y la intensidad de parasitación. En este trabajo no se evidenció una relación estadísticamente significativa entre la intensidad de parasitación y la condición corporal, el sexo del hospedador, la edad, los síntomas de rinitis, la deformidad del caparazón o el grado de fragmentación de su hábitat. Estos resultados coinciden con otros estudios que analizan la presencia de oxiúridos y ascáridos en *Testudo sp.* en libertad o cautiverio (Laghzaoui *et al.*, 2021; Papini *et al.*, 2011).

Sin embargo, Chávarri y colaboradores (2012) sí encontraron diferencias entre las comunidades de nematodos de tortugas domésticas y silvestres. En las tortugas procedentes de poblaciones naturales encontraron un mayor número y diversidad de especies de oxiúridos, incrementándose linealmente con la edad del hospedador. A su vez, en ejemplares procedentes de cautiverio detectaron mayor presencia de ascáridos.

Benítez-Malvido *et al.*, en 2019 observaron reducciones en las tasas de crecimiento en *Testudo graeca* en hábitats perturbados y evidenciaron que las características corporales de las tortugas y el equilibrio de su helmintofauna, concretamente la infección por oxiúridos, son sensibles a la pérdida y fragmentación del hábitat, lo que podría alterar la frágil relación simbiótica nematodo-hospedador hacia el parasitismo (Laghzaoui *et al.*, 2021; Benítez-Malvido *et al.*, 2019). Estos estudios previos evidencian la necesidad de estudiar en mayor profundidad el papel que tienen las distintas especies de nematodos endobiontes en animales cautivos o presentes en hábitats degradados.

El Área de Ecología de la Universidad Miguel Hernández lleva a cabo regularmente trabajos de campo sobre las poblaciones norafricanas de tortuga mora, donde recogen muestras de heces de las tortugas *in situ* para analizarlas en el laboratorio una vez regresan a España. Sin embargo, dada la dificultad y coste de llevar equipamiento refrigerado a Marruecos se vuelve necesario encontrar métodos de conservación alternativos que permitan realizar análisis coprológicos de las poblaciones africanas. Existen multitud de estudios que han explorado comparativamente las diversas técnicas de conteo de huevos de endoparásitos en heces (Hu *et al.*, 2016; Ballweber *et al.*, 2014), pero son escasos los estudios que han comparado la eficacia de distintos medios conservantes en la preservación de muestras fecales (Hass *et al.*, 2024; Jagła *et*

al., 2013; Foreyt, 1986). Además, ninguno ha analizado específicamente el DESS como un posible medio de conservación de huevos de nematodos en heces, ni cómo podría afectar a la estimación de la intensidad parasitaria. Por ello, este estudio presenta un enfoque innovador al evaluar por primera vez la viabilidad del DESS como conservante para este propósito. El análisis de los métodos de conservación del presente estudio y sus resultados se han materializado en un artículo publicado en la revista *Research in Veterinary Science* (153) por González *et al.*, 2022.

El presente trabajo de fin de grado se enmarca en el proyecto “Cambio global, endobiontes y fitness de especies amenazadas: efectos del manejo de poblaciones en comunidades de nematodos de tortugas de tierra” (TED2021-130381B-I00) y está financiado por la convocatoria de Proyectos estratégicos orientados a la transición ecológica y la transición digital (MICIU/AEI/10.13039/501100011033).

## 2.2. Objetivos

En este Trabajo de Fin de Grado se pretende ampliar el estudio de la nematofauna en tortugas moras de origen cautivo del C.R.F.S. *El Valle*, ubicado en las proximidades del hábitat natural de *Testudo graeca* en Murcia. En él se estimará el estado de los ejemplares mantenidos en el centro a través del estudio de su morfología, condición física y grado de parasitación. Además, se evaluarán distintos medios de conservación que puedan garantizar la calidad y detectabilidad de huevos y adultos de nematodos tras largos periodos de tiempo.

Con ello, definimos tres objetivos específicos en este trabajo:

- Identificar los helmintos y estimar la intensidad de parasitación de las tortugas moras cautivas del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre *El Valle* (Murcia).
- Estudiar la relación entre la condición física y la intensidad de parasitación de helmintos en las tortugas (*huevos por gramo* de heces, “*hpg*”), así como su relación con otras características biológicas (sexo) o potenciales factores de riesgo (tiempo de permanencia en el centro).
- Evaluar cuantitativa y cualitativamente la eficacia de distintos métodos para la conservación de huevos de ascáridos y oxiúridos, así como los efectos en el tiempo de cada método en la estima de la intensidad de parasitación.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Toma de datos y muestras

Para lograr estos objetivos se recolectaron muestras de ejemplares de tortuga mora del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre *El Valle* en Murcia. Ubicado en el Parque Regional Carrascoy y El Valle, a menos de 20 km de las poblaciones naturales de tortuga, comparte las mismas características climatológicas que el hábitat natural de estas poblaciones (Figura 1).

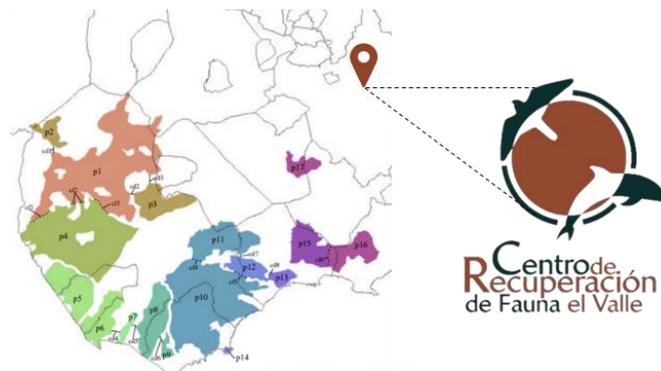


Figura 1. Ubicación del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre *El Valle* respecto a las poblaciones naturales de *Testudo graeca* en Murcia (Giménez et al., 2005).

Las recogidas de muestras se realizaron en dos jornadas, el 6 y el 13 de mayo de 2019. En ese momento, había alrededor de 30 tortugas en el centro, separadas por sexos en recintos exteriores de aproximadamente 15 m<sup>2</sup>, donde recibían diariamente una dieta compuesta de hortalizas. Las muestras fecales fueron recogidas en tubos Falcon™ de 50 ml directamente de la cloaca de cada individuo. Se tomaron las medidas biométricas descritas en la Tabla 1 de cada tortuga de la que obtuvimos una muestra, además de las variables sexo y antigüedad en el centro, descritas en la Tabla 2 junto con el resto de las variables que se utilizarán en el análisis. Cada animal fue marcado con un código alfanumérico individual para evitar coger muestras por duplicado del mismo animal. En total, se recolectaron 13 muestras el primer día y 12 el segundo; todas fueron refrigeradas a 4°C el mismo día de la recolección y se mantuvieron a esta temperatura hasta su análisis, que se realizó 48 horas después.

Tabla 1. Descripción de las medidas corporales (Braza et al., 1981) tomadas en las tortugas moras del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre *El Valle*.

Medidas	Descripción de las medidas
Peso	Masa corporal (g)
LP	Longitud del peto o plastrón (mm)
LE	Longitud del espaldar (mm)

H	Altura de la concha (mm)
AF	Anchura femoral (mm)
SV	Sutura ventral (mm)
SF	Sutura femoral (mm)
SA	Sutura anal (mm)
AC	Anchura a nivel del 5° par de placas marginales (mm)
AM	Anchura a nivel del 8° par de placas marginales (mm)

Tabla 2. Descripción de las variables de estudio

Variables	Descripción de las variables
Sexo	Sexo de los ejemplares identificados (macho o hembra)
Antigüedad	Tiempo de permanencia de las tortugas en el C.R.F.S. (años)
Oxy	Intensidad de parasitación por oxiúridos (huevos por gramo de heces o «hpg»)
Asc	Intensidad de parasitación por ascáridos (hpg)
P <sub>Asc</sub>	Variable binaria de presencia de huevos de ascáridos en heces (0 ó 1)
IC1	Índice corporal 1 (masa/longitud)
IC2	Índice corporal 2 (masa/volumen)
IC3	Índice corporal 3 (residuo de una regresión de log [Peso] y log [LE])

### 3.2. Procesamiento y examen coprológico

Las muestras de heces fueron transportadas al laboratorio y, en un plazo de máximo 48 horas se realizó la coprología. Para ello, primero se pesaron todas las muestras (« $m_{hi}$ », g de heces de cada individuo) y se disolvió cada una en un mortero con movimientos suaves en un volumen conocido de agua (~10:1) (« $V_{Ai}$ », ml de disolvente para cada muestra). Las disoluciones resultantes se filtraron con un cedazo de 160  $\mu\text{m}$  para separar los huevos de los adultos y de los restos más gruesos de la materia fecal, recogiendo los ejemplares adultos con una aguja estéril para realizar la consiguiente identificación morfológica. A partir del filtrado de cada muestra se prepararon:

- Dos alícuotas de 2 ml por cada muestra filtrada destinadas a obtener la intensidad de parasitación de cada individuo muestreado.
- Por otro lado, se juntó el sobrante del filtrado de cada muestra en un *pool* (« $V_p$ ») que se utilizará más adelante para evaluar la efectividad de cada método de conservación.

Para cuantificar ambos objetivos se utilizó la variable numérica de intensidad de parasitación en el caso de los oxiúridos («Oxy»), medido en  $n^\circ$  de huevos de helmintos / g de heces (hpg). Por otro lado, los ascáridos, se trataron como una variable binaria de presencia-ausencia

de huevos, pues su presencia fue mínima (« $P_{Asc}$ »). Las variables de estudio para el análisis coprológico en se muestran en la Tabla 2.

- Intensidad de parasitación de cada individuo

En este estudio se pretende evidenciar la presencia en heces de tortuga mora de huevos de ascáridos y oxiúridos, pertenecientes a las familias de nematodos Ascarididae y Pharyngodonidae, única familia que parasita reptiles en la superfamilia Oxyuroidea *Raillet, 1916* (Sánchez Gumiel, 2005). Para detectar la infección y cuantificar la intensidad de parasitación de cada tortuga, se utilizó un análisis coprológico de concentración parasitaria por flotación, con posterior recuento en cámara McMaster.

Con el fin de llevar a cabo el análisis se comenzó con el procesamiento de las muestras. Se centrifugaron todas las alícuotas de 2 ml previamente identificadas a 1500 rpm durante 5 minutos y con una pipeta se descartó el sobrenadante. Al sedimento resultante de cada alícuota se le añadieron 1,5 ml de solución de azúcar saturada (solución de Sheather), homogeneizando la mezcla con un agitador.

Una vez procesadas las muestras se introdujeron mediante una pipeta en la cámara de McMaster. Esta consta de dos compartimentos de 0,15 ml cada uno, con una cuadrícula graduada en su superficie (Figura 2). Con el par de alícuotas de cada muestra se rellenaron los dos espacios de la cámara. A partir de aquí, se dejó reposar la muestra 5 minutos antes de proceder al conteo e identificación morfológica. Durante este tiempo, en el medio de flotación los detritos se hunden mientras que los huevos flotan en la superficie de la cámara, donde pueden ser fácilmente contados bajo la cuadrícula segmentada a través del microscopio óptico (Ballweber *et al.*, 2014; Zajac & Conboy, 2012; Vadlejch *et al.*, 2011).

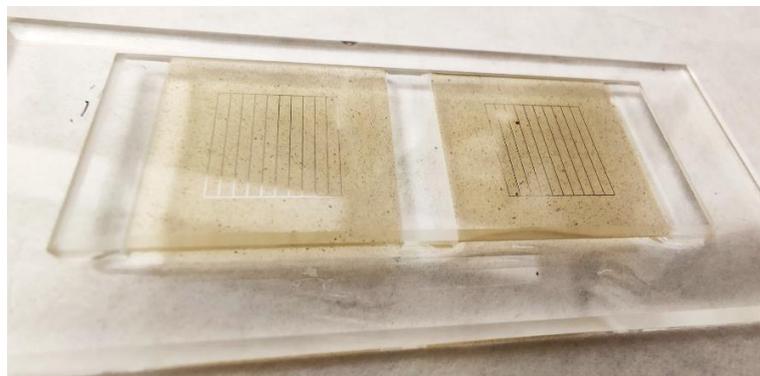


Figura 2. Cámara de McMaster de cuadrícula segmentada con muestra fecal en solución de Sheather.

Este procedimiento se repitió para cada alícuota, obteniendo la concentración de huevos en heces de cada muestra (« $R_i$ »,  $n^\circ$  de huevos / 0,3 ml de Sheather). Conociendo este dato, junto al

peso de las heces y el volumen del líquido de flotación se puede extrapolar la intensidad de parasitación en  $n^\circ$  de huevos de helmintos / g de heces (hpg).

Los huevos de cada familia de los nemátodos mencionados se pueden distinguir principalmente por su forma y por el grosor de su cutícula. Los huevos de oxiúridos son más grandes (~75 x150  $\mu$ m), elipsoidales, ligeramente aplanados en un lado, los rodea una cutícula más fina y el embrión tiende a ser más pequeño con relación al tamaño del huevo (Forstner, 1960; Greiner & Mader, 2006). Por otro lado, en ascáridos, los huevos son algo más pequeños (96-126 x 77-103  $\mu$ m en *Angusticaecum holopterum*), tienden a ser más circulares, con el embrión de mayor tamaño y destacan por el grosor de su cutícula, mucho más gruesa que en oxiúridos (Figura 3B) (Sprent, 1980; Waindok et al., 2022).

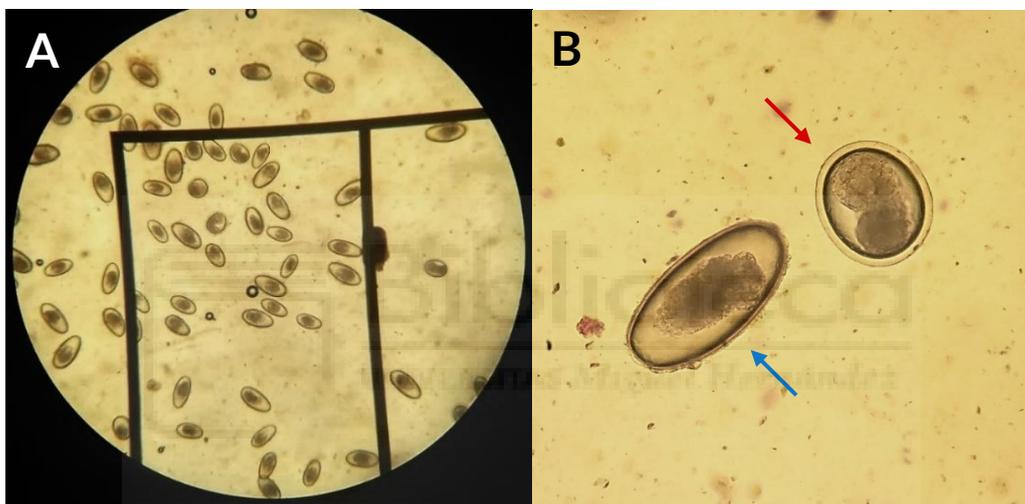


Figura 3. Imagen al microscopio óptico de huevos de oxiúridos y ascáridos en cámara de McMaster:  
A): (x10) Muestra de heces con infección masiva (ejemplar M1, jornada 1).  
B): (x40, ampliada) Huevo de oxiúrido (izquierda, flecha azul) y de ascárido (derecha, flecha roja).

- Métodos de conservación de muestras fecales

Para la preparación del DESS (DMSO, EDTA y NaCl), lo primero que se realizó fue elaborar 1 l de disolución de EDTA 0,5 M. Se calculó que se necesitarían 186,12 g de EDTA en polvo (99%). Para disolver completamente el ácido se creó un medio alcalino, añadiendo NaOH poco a poco en 500 ml de agua destilada a 30° C hasta alcanzar un pH = 8 en el pH-metro. En un matraz aforado de 1 l y se enrasó con agua destilada, obteniendo la disolución de EDTA 0,5 M. Para finalmente obtener el DESS el litro de EDTA se vertió en un vaso más grande al que se añadieron 400 ml de DMSO y 600 ml de agua destilada desionizada medidos en probeta. Seguidamente se añadió cloruro sódico (~300 g) homogeneizando con un agitador magnético hasta que saturase.

La evaluación del método de conservación más adecuado también se llevó a cabo mediante un análisis coprológico por flotación en cámaras de McMaster en los siguientes grupos de estudio:

- Congelación a -20° C
- Conservación en DESS a temperatura ambiente (~20°C)
- Conservación en DESS a -20° C
- Conservación en etanol 70% a temperatura ambiente (~20°C)

Se prepararon dos alícuotas por cada método de preservación (15 y 30 días), para lo cual se pipetearon 4,5 ml del *pool* en los 8 tubos Falcon™ correspondientes, se centrifugaron a 1500 rpm y se eliminó el sobrenadante. Para la conservación en DESS y etanol se añadieron estos al precipitado hasta obtener 15 ml en probeta. Para las muestras que iban a ser congeladas sin ningún conservante, se procedió a congelar directamente el precipitado.

A los 15 días se recogieron todos los tubos almacenados, se les añadió la solución de Sheather y se contaron en la cámara McMaster del mismo modo que en el primer análisis. A los 30 días se repitió el procedimiento con las muestras restantes. Así se obtuvieron las intensidades de parasitación para cada método a los 15 y 30 días.

### 3.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico del presente estudio se realizó en R (R Core Team, 2023) mediante RStudio (Posit team, 2023).

- Relación de las variables biométricas con el resto de las medidas

Con los datos de las variables biométricas (Tabla 1) se quiere evaluar si la intensidad de parasitación influye en la condición física de las tortugas. En el presente estudio se utilizaron 3 índices corporales habituales en la bibliografía para su medición; uno simple que relaciona longitud y peso, otro que añade altura y anchura del caparazón y el último representa los residuos del logaritmo del peso observado respecto al logaritmo del peso esperado. Estos se nombraron *IC1*, *IC2* e *IC3* respectivamente:

$$IC1 = \frac{Peso * 10}{LE} \quad (\text{Jackson, 1980; Jacobson, 1993}) \quad (1)$$

$$IC2 = \frac{Peso * 1000}{LE * H * AC} \quad (\text{Baycan \& Tosunoglu, 2023; Nagy et al., 2002}) \quad (2)$$

$$IC3 = \log\left(\frac{Peso \text{ esperado}}{Peso \text{ observado}}\right) \quad (\text{Schulte-Hostedde et al., 2005; Willemsen \& Hailey, 2002}) \quad (3)$$

En el cálculo de la tercera ecuación, el logaritmo ( $Peso/Peso'$ ) equivale al residuo de una regresión de  $\log(Peso)$  y  $\log(LE)$  (Willemsen *et al.*, 2002), por tanto, el  $Peso$  esperado ( $P'$ ) se halló mediante un gráfico de dispersión del logaritmo ( $\log_{10}$ ) del  $Peso$  observado ( $P$ ) respecto al logaritmo de  $LE$ . Con la ecuación de la recta de regresión generada (Figura 4) se obtuvieron los valores del  $Peso$  esperado, calculando así el IC3.

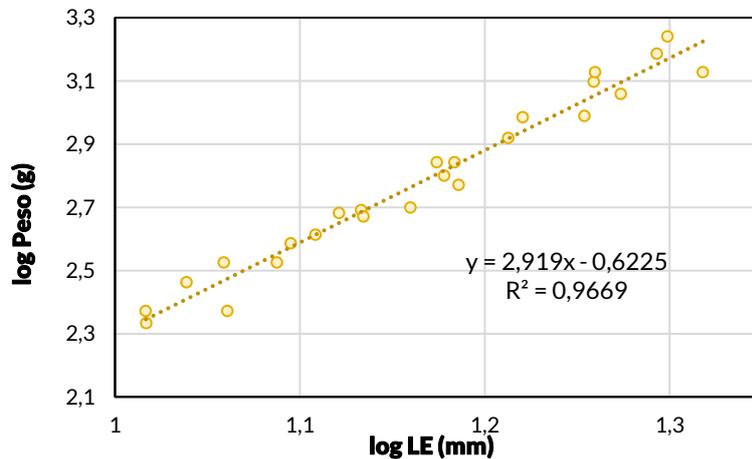


Figura 4. Gráfico de dispersión del logaritmo del peso ( $\log$  Peso) en gramos de los ejemplares de tortuga mora *Testudo graeca* respecto a logaritmo de la longitud del espaldar ( $\log$  LE) en mm con ecuación y línea de tendencia.

Una vez definidos los índices corporales, y con el objetivo de determinar la influencia que las variables independientes *Intensidad de Parasitación por Oxiúridos (Oxy)*, *Presencia de Ascáridos (P<sub>Asc</sub>)*, *Sexo* y *Antigüedad* tienen sobre las variables dependientes *IC1*, *IC2* e *IC3*, se realizó un primer análisis exploratorio visual y se construyeron diversos modelos de regresión lineal univariantes y multivariantes con cada uno de estos tres índices. Se descartaron los valores atípicos extremos para todas las variables y se realizaron contrastes de hipótesis que evaluarán si se cumplen los supuestos para el análisis paramétrico en cada modelo.

La normalidad de las variables continuas se comprobó mediante la prueba Shapiro-Wilk (*shapiro.test*, paquete "stats"), debido a que se comporta mejor que otras pruebas como Lilliefors o Jarque-Bera ante un número pequeño de observaciones (Carmona Arce, & Carrión Rosales, 2015). Los resultados de esta para un intervalo de confianza del 95% muestran que todas las variables continuas cumplen el supuesto de normalidad. Sin embargo, la prueba estadística y los histogramas sugieren que los datos de *IC1* e *IC2* siguen una distribución log-normal, por ello se aplicó la transformación logarítmica a ambas variables.

Para la construcción de los modelos de regresión lineal múltiple se evaluó la multicolinealidad de las variables independientes de *Intensidad de Parasitación (Oxy)*, *Presencia de*

Ascáridos ( $P_{Asc}$ ), Sexo y Antigüedad mediante el factor de inflación de la varianza (VIF) (*vif*, paquete “*car*”) para descartar una asociación significativa entre ellas. En general, se considera que un VIF mayor que 10 (o en algunos casos 5) indica la presencia de multicolinealidad significativa. Las medidas obtenidas para un modelo lineal múltiple de todas las variables fueron cercanas a 1 en todos los casos, confirmando la independencia de las variables explicativas. Para evaluar la especificación de los modelos y verificar así la existencia de combinaciones no lineales entre ellas se aplicó el test RESET de Ramsey (*resettest*, paquete “*lmtest*”).

Además de las pruebas anteriores, para cada modelo se utilizaron las pruebas de homocedasticidad de Breusch-Pagan (*bptest*, paquete “*lmtest*”) y Goldfield-Quandt (*gqtest*, paquete “*lmtest*”) y la prueba de independencia de residuos de Durbin-Watson (*dwtest*, paquete “*lmtest*”). En todas las pruebas se utilizó un intervalo de confianza del 95%.

Todos los modelos cumplieron los supuestos paramétricos salvo el modelo lineal de IC1 con Oxy que presentó heterocedasticidad según el test de Breusch-Pagan. Consecuentemente, se realizó un modelo de regresión lineal robusto especialmente resistente a la heterocedasticidad con muestras pequeñas (*rlm*, paquete “*MASS*”). Para obtener estimaciones robustas de los errores estándar y la prueba de hipótesis del RLM se utilizó la función *vcovHC* (paquete “*sandwich*”), que estima la matriz de covarianza de los coeficientes en modelos de regresión teniendo en cuenta la heteroscedasticidad.

- Métodos de conservación de muestras fecales

A partir de cada alícuota conservada (una por cada método de conservación y fecha) se prepararon 3 muestras para el recuento de huevos, dividiendo cada una en los dos compartimentos de la cámara McMaster, con lo que se obtuvieron 6 observaciones por cada método y fecha. A partir de los cuales se comprobará si se pueden encontrar diferencias significativas entre la intensidades de parasitación con cada método de conservación a los 15 y 30 días de la recogida, comparando estos resultados con la intensidad de parasitación en muestras frescas. Para ello, en primer lugar, se comprobó si la muestra cumplía con los supuestos de homocedasticidad y normalidad. Para el primero se utilizó el test de Levene de igualdad de varianzas (*leveneTest*, paquete “*car*”), concluyendo heterogeneidad entre grupos. Para evaluar la normalidad de datos en cada conjunto se realizó la prueba de Shapiro-Wilk. En esta se obtuvo un  $p < 0,05$  en el grupo de congelación, y un valor ligeramente superior a alfa en DESS con congelación. Al no cumplir todos los grupos de estudio con los supuestos para realizar un ANOVA, se decidió emplear la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con corrección de Bonferroni (*kruskal.test*, paquete “*stats*”), seguida de la prueba *post hoc* de Dunn (*dunn.test*, paquete “*dunn.test*”) que permite comprobar la diferencias entre cada grupo por pares.

## 4. Resultados

Tras analizar las heces de las 25 tortugas del centro de recuperación se observó que todas (100%; 25/25) presentaban huevos y adultos de oxiúridos de la familia Pharyngodonidae en heces. Se encontró que 9 tortugas (36%) presentaban huevos de la familia Ascarididae. No se detectó ningún ascárido adulto en las muestras analizadas. Todos los helmintos hallados en las muestras pertenecían al orden Spirurida (Railliet, 1915), phylum Nematoda (Rudolphi, 1808) (Hodda, 2022). La intensidad media de helmintos en las tortugas fue de  $7197 \pm 5266$  hpg para oxiúridos y  $530,1 \pm 629,2$  hpg para ascáridos. Además, la abundancia media de parasitación por ascáridos fue de  $190,8 \pm 446,5$  hpg.

### 4.1. Índices de condición física

El primer índice de condición física (IC1), correspondiente a  $\text{Peso} * 10 / LE$ , con transformación logarítmica, mostró una relación estadísticamente significativa con el sexo del animal ( $p < 0,01$ ), tal como se puede apreciar en la Figura 5A; con una media del  $\log(IC1)$  de 3,98 g/cm y una desviación típica de 0,37 g/cm para hembras y de  $3,51 \pm 0,34$  g/cm para machos, donde se observa una fuerte tendencia de las hembras a tener un mayor índice corporal.

El modelo binomial del número de huevos de oxiúridos en heces respecto al sexo no resultó significativo, aunque en la representación gráfica se puede observar una ligera tendencia positiva para los machos (Figura 5B); con una media de Oxy de  $6135 \text{ hpg} \pm 5319$  hpg para hembras y de  $8032 \pm 5266$  hpg para machos.

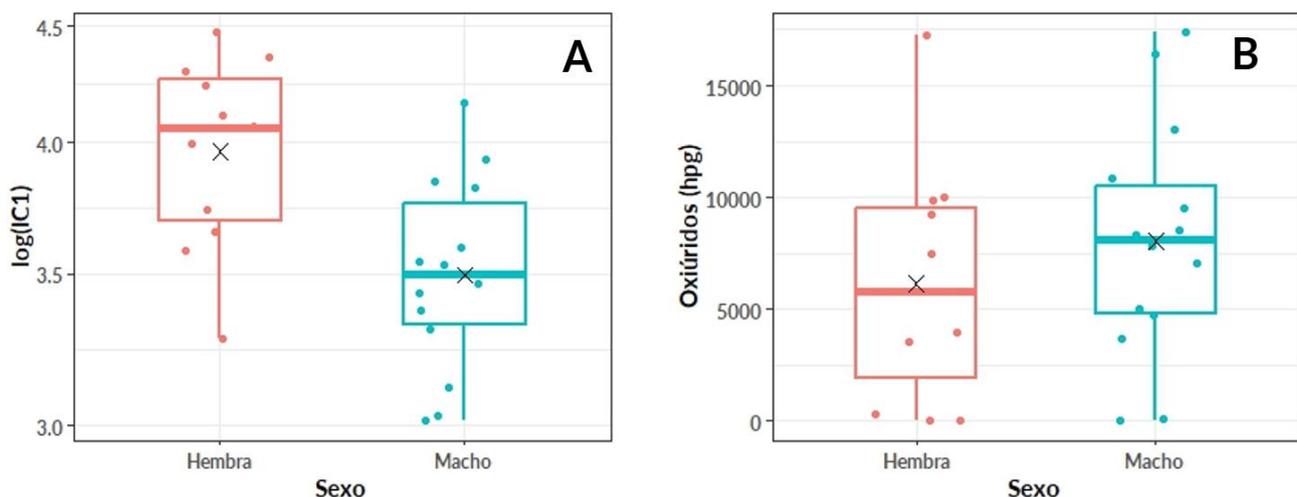


Figura 5. Diagrama de cajas de A. Logaritmo del Índice Corporal 1 (IC1) calculado como  $\text{Peso (g)} * 10 / \text{Longitud del Espaldar (mm)}$  y B. Huevos por gramo (hpg) de oxiúridos. Ambos en función del sexo de la tortuga mora *T. graeca*. La línea horizontal y la "x" representan la mediana y la media de la muestra, respectivamente. Los puntos corresponden a cada uno de los individuos de la misma.

En este modelo, la prueba de Durbin-Watson mostró una autocorrelación de los residuos estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ); por lo que podemos considerar los residuos de este modelo como no independientes. Mientras, los modelos de  $\log(IC1) \sim P_{Asc}$  (Presencia de Ascáridos) y de  $\log(IC1) \sim Antigüedad$  (Tiempo de Permanencia en el Centro) no han resultado significativos, ni se observan tendencias en los gráficos.

Con el modelo de regresión lineal robusta de  $\log IC1$  con Oxy (Intensidad de Parasitación por Oxiúridos) se encontró una relación negativa estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con un tamaño del efecto de 0,33. Indicando que a mayor concentración de huevos de oxiúridos en heces, menor es el logaritmo del primer índice corporal, como se observa en la Figura 6.

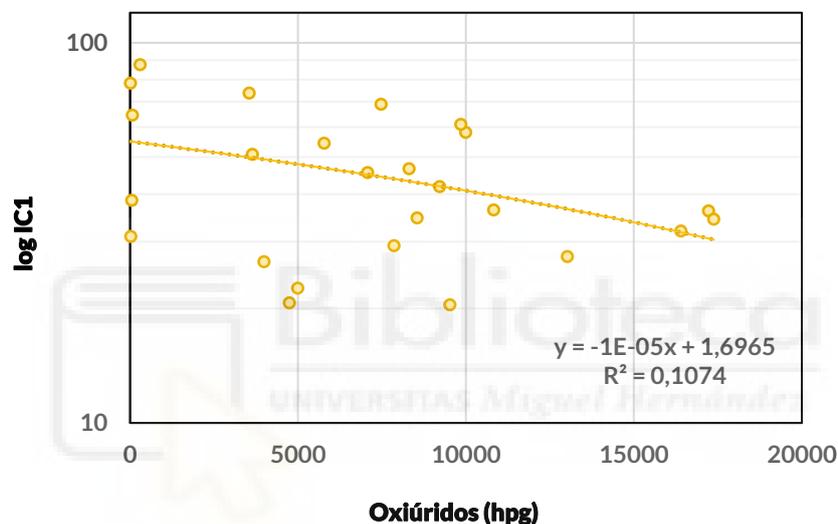


Figura 6. Gráfico de dispersión del logaritmo del índice corporal 1 ( $\log IC1$ ) de tortuga mora *T. graeca* calculado como  $\text{Peso (g)} \cdot 10 / \text{Longitud del Espaldar (mm)}$  respecto a Intensidad de parasitación por oxiúridos medida en huevos por gramos de heces (hpg) con ecuación y línea de tendencia.

El modelo de regresión lineal múltiple construido con el *logaritmo de IC1* como variable dependiente y con la intensidad de parasitación (Oxy) y el sexo como independientes obtuvo un resultado estadísticamente significativo para la variable *Sexo* con un  $p < 0,01$ , pero no para la Intensidad de Parasitación por Oxiúridos (Oxy) que resultó en un  $p = 0,19$ .

Con el segundo índice de condición física (*Peso/Volumen*) con transformación logarítmica únicamente se obtuvieron resultados significativos en función de la *Antigüedad* en el centro ( $p < 0,005$ ), presentando menor IC2 las tortugas que llevaban más tiempo en el centro de recuperación, tal como se muestra en el siguiente gráfico de cajas (Figura 7).

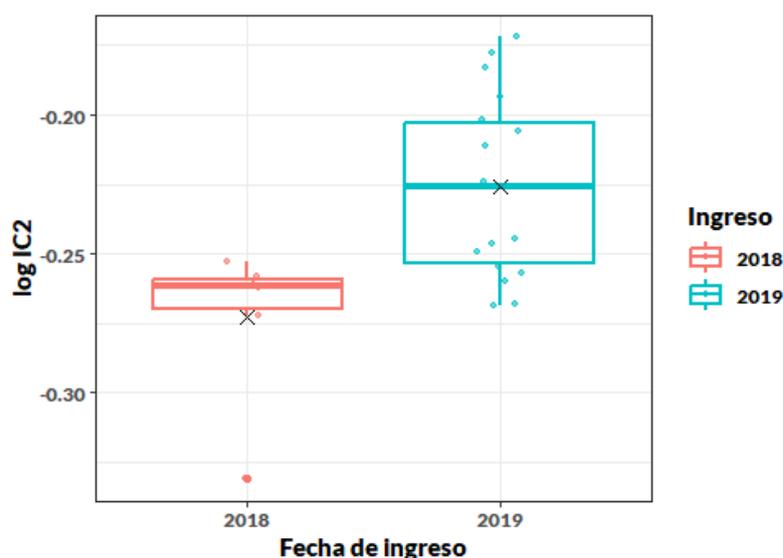


Figura 7. Diagrama de cajas del logaritmo del Índice Corporal 2 (IC2) calculado como  $\text{Peso (g)} \cdot 1000 / \text{Longitud del Espaldar (mm)} \cdot \text{Altura} \cdot \text{Anchura}$  a nivel del 5° par de placas marginales (mm) en función del sexo de la tortuga mora *T. graeca*. La línea horizontal y la "x" representan la mediana y la media de la muestra, respectivamente. Los puntos corresponden a cada uno de los individuos de la misma.

Con el tercer índice (IC3), calculado como los residuos de la recta generada con el logaritmo del peso respecto al logaritmo de la longitud del espaldar, no encontramos ningún resultado estadísticamente significativo. Aunque el modelo de IC3 respecto a la antigüedad en el centro de las tortugas nos muestra una tendencia negativa marginalmente significativa ( $p=0,055$ ).

#### 4.2. Métodos de conservación

Los grupos de 15 y 30 días no presentan una diferencia estadísticamente significativa entre sí en el número de huevos de oxiúridos. La concentración en la muestra fresca fue de 6307 hpg, siendo la media a los 15 días de  $825,3 \pm 864,8$  hpg y a los 30 días de  $586,5 \pm 396,5$  hpg. En el caso de ascáridos, la concentración de la muestra fresca fue de 230,2 hpg, la media a los 15 días fue de  $20,46 \pm 32,64$  hpg y a los 30 días de  $40,92 \pm 62,91$  hpg. El 62,5% de las muestras no presentaron ningún huevo, resultando únicamente 9 casos positivos. Teniendo esto en cuenta no se encontró diferencia significativa entre la concentración de huevos de ascáridos respecto al tiempo de conservación.

Se realizó una evaluación cualitativa de los resultados derivados de distintos métodos de conservación. La congelación demostró ser el método más eficaz, manteniendo la calidad de los huevos prácticamente en concurrencia con su estado original. Por otro lado, el uso de DESS provocó deformación en la cutícula de los huevos, sin embargo, estos permanecieron intactos. En contraste, la preservación en etanol resultó ser considerablemente menos efectiva, causando

la destrucción total de los huevos de ascáridos y dejando los de oxiúridos muy deformados, con muchos de ellos rotos o reducidos a solo la cutícula externa. Para la evaluación cuantitativa de cada técnica se calcularon estadísticos descriptivos como la media, la mediana y la desviación típica de la concentración de huevos de cada familia de nematodos. Los hallazgos correspondientes se presentan detalladamente en la Tabla 3.

Tabla 3. Media, mediana y desviación típica de la intensidad de parasitación medida en huevos de oxiúridos y ascáridos por gramo de heces (hpg) en función del método de conservación: congelación (C), DESS a temperatura ambiente (DA), DESS en congelación a -20°C (DC) y etanol al 70% (Et).

		C	DA	DC	Et
Oxiúridos (hpg)	$\mu_{ox}$ (media)	1456,13	572,90	491,06	303,50
	$Md_{ox}$ (mediana)	1227,65	491,06	470,60	265,99
	$\sigma_{ox}$ (desviación típica)	978,31	250,44	127,03	241,44
Ascáridos (hpg)	$\mu_{as}$ (media)	61,38	34,10	27,28	0,00
	$Md_{as}$ (mediana)	40,92	20,46	20,46	0,00
	$\sigma_{as}$ (desviación típica)	80,81	40,23	33,41	0,00

Para visualizar la diferencia de concentración de huevos entre cada método de conservación se generó un diagrama de cajas para cada familia de nematodos en orden decreciente según la mediana de cada grupo (Figura 8).

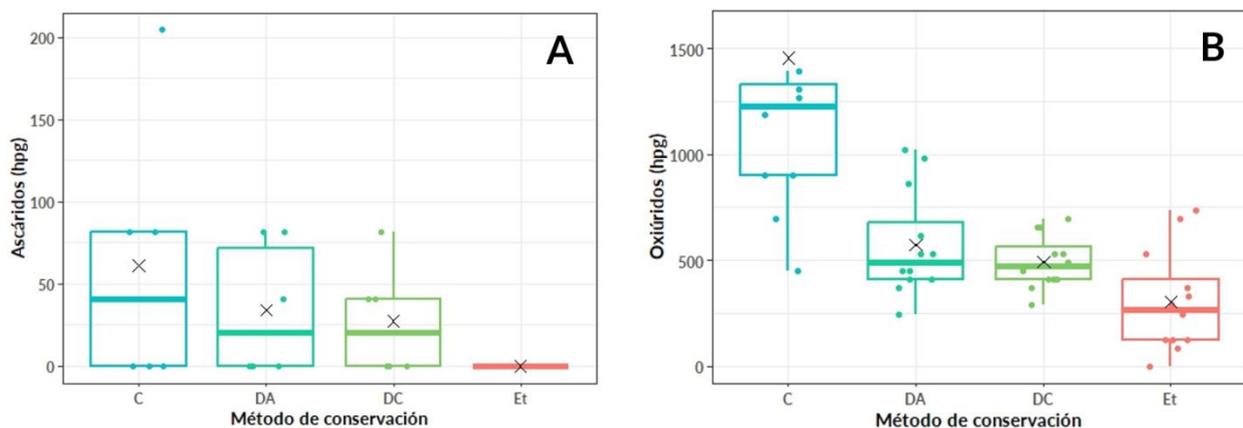


Figura 8. Diagrama de cajas del número de huevos por gramo (hpg) de A, ascáridos y B, oxiúridos en heces de *Testudo graeca* en función del método de conservación de las muestras: congelación (C), DESS a temperatura ambiente (DA), DESS en congelación a -20°C (DC) y etanol al 70% (Et). La línea horizontal y la "x" representan la mediana y la media de la muestra, respectivamente. Los puntos corresponden a cada uno de los individuos de la misma.

El estadístico de Kruskal-Wallis utilizado para cuantificar la diferencia de concentración de huevos de oxiúridos para cada método de conservación mostró significancia entre grupos ( $p=0$ ). La prueba *post-hoc* de Dunn mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de congelación y los otros tres. No se observaron diferencias entre el resto de los métodos de conservación. Estos resultados se muestran en la Tabla 4, donde los valores en color verde reflejan p-valores significativos.

Tabla 4. Diferencia porcentual entre las medias de cada par de grupos (en las filas amarillas) y p-valor asociado (en las filas blancas) calculado mediante las pruebas de Kruskal-Wallis con corrección de Bonferroni y prueba *post-hoc* de Dunn. En verde se representan los p-valores significativos para un intervalo de confianza del 95%. Los grupos representados se corresponden con los métodos de conservación de: congelación (C), DESS a temperatura ambiente (DA), DESS en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  (DC) y etanol al 70% (Et).

	C	DA	DC
DA	2,878		
	0,0120		
DC	3,308	0,431	
	0,0028	1	
Et	4,944	2,067	1,636
	0,0000	0,1162	0,3055

## 5. Discusión

En concordancia con estudios previos, los oxiúridos fueron los helmintos más frecuentemente detectados seguidos por los ascáridos. Es un hecho bien documentado que los oxiúridos presentan prevalencias altas y son muy abundantes en tortugas de tierra de todo el mundo, generalmente sin causar alteraciones fisiológicas (Roca, 1999). El 100% de las tortugas analizadas del C.R.F.S. *El Valle* tenían huevos de faringodónidos (Oxyuroidea). Si bien, esta prevalencia es superior a la de otros estudios en *Testudo graeca* domésticas, su variabilidad entre los diferentes trabajos es muy amplia a lo largo de su rango de distribución (32-84%) (Hallinger *et al.*, 2018; Cervone *et al.*, 2016; Rataj *et al.*, 2011; Traversa *et al.*, 2005), alcanzando una prevalencia del 87,5% en el trabajo de Chávarri *et al.*, 2012 en tortugas cautivas del C.R.F.S. de Santa Faz (Alicante).

En cuanto a los ascáridos, se identificaron huevos en el 36% de las muestras de tortugas analizadas. Esta prevalencia entra dentro del rango descrito en estudios previos realizados con tortugas moras domésticas, los cuales también varían notablemente, con cifras del 0% (Hallinger *et al.*, 2018), 14,81% (Cervone *et al.*, 2016), 30,77% (Traversa *et al.*, 2005), 56,94% (Rataj *et al.*, 2011) y 67,5% (Chávarri *et al.*, 2012). Estos hallazgos reafirman la presencia de ascáridos en tortugas moras cautivas del sureste ibérico, aunque en una proporción significativamente menor a la encontrada por Chávarri *et al.* (2012).

Los estudios que estiman la infección de tortugas mediante el recuento de huevos en heces son limitados en *Testudo graeca*. Las intensidades medias de oxiúridos y ascáridos obtenidas por estos fueron de 9902 y 496 hpg en Laghzaoui *et al.*, (2021), 12 337 y 1174 hpg en Chávarri *et al.*, (2012) y 1119 y <100 hpg en Traversa *et al.*, (2005), respectivamente. Salvo en el caso de Traversa, los hallazgos de este trabajo entran dentro lo previsto, con intensidades de parasitación medias en ejemplares infectados de 7198 hpg de oxiúridos y 530 hpg de ascáridos. La variabilidad encontrada en las intensidades podría deberse al limitado número de ejemplares analizados (25 tortugas). Asimismo, la recogida de una sola muestra fecal por tortuga y la baja sensibilidad del conteo mediante cámara McMaster podría llevar a subestimar los niveles reales de infección (Nielsen, 2021; Fournié *et al.*, 2015).

Ante la presencia de ascáridos en un alto porcentaje de las tortugas analizadas es fundamental promover la disminución y el control de los individuos cautivos para evitar los riesgos sobre las poblaciones silvestres. Así como invertir en el desarrollo de programas de educación ambiental y de una normativa eficaz para la persecución del tráfico ilegal de tortugas que garantice la supervivencia a largo plazo de las poblaciones naturales de tortuga mora (Graciá *et al.*, 2020b).

### 5.1. Índices de condición física

La tendencia negativa estadísticamente significativa entre el IC1 ( $\text{Peso} \cdot 10 / \text{LE}$ ) y la intensidad de parasitación de oxiúridos (Oxy) acaba siendo espuria cuando se incorpora la variable sexo al modelo. Además, contradeciría la relación simbiótica entre estos y los reptiles herbívoros atestiguada en estudios previos (Díaz-Paniagua & Andreu, 2015; Jacobson, 2007; Roca, 1999). Futuros estudios con mayor tamaño de muestra podrían aclarar si esta tendencia pudiera ser el resultado de las consecuencias que tiene un ambiente degradado o poco favorable sobre las tortugas. Se ha evidenciado que el tipo de interacción entre los oxiúridos y su huésped está determinado por el hábitat, inclinándose esta hacia el parasitismo en ambientes alterados (Benítez-Malvido *et al.*, 2019). Además, la densidad de población y el tipo de sustrato han sido relacionados con la presencia de parásitos en tortugas (Miñana-Morant & Ponce-Gordo, 2018). Por tanto, entornos domésticos con condiciones de hacinamiento, como sería el caso de un centro de recuperación de fauna o de un recinto privado podrían desembocar en infecciones patológicas de estos endoparásitos. Respecto a la parasitación con ascáridos no se relacionó significativamente IC1 ni con la presencia ni con la intensidad de parasitación. Esta falta de correlación puede ser debida al escaso número de tortugas con presencia de huevos de ascáridos en heces.

Además, en este estudio se evidenció la relación entre el IC1 y el sexo de los animales, presentando las hembras una relación masa-longitud mayor que los machos. Generalmente, conforme aumenta la longitud del caparazón aumenta el ratio masa/longitud (IC1) tal como atestiguó Jackson, 1980 en *T. graeca* y *T. hermanni*. Así, la relación hallada entre el sexo e IC1 puede explicarse porque las hembras de tortuga mora son significativamente más grandes que los machos (Semaha *et al.*, 2024) y por tanto presentan mayor IC1.

Del mismo modo, no se encontró una relación significativa entre el sexo y el número de huevos de oxiúridos, aunque los machos tenían valores marginalmente más altos. Miñana-Morant & Ponce-Gordo (2018), Chávarri *et al.* (2012) y Traversa *et al.* (2005), tampoco observaron diferencias entre la intensidad de parasitación y el sexo, aunque en los dos últimos las hembras tenían tendencia a mayores intensidades parasitarias.

IC2 e IC3 no han sido sensibles a la intensidad de parasitación ni al sexo, por otra parte, sí han disminuido con el tiempo de permanencia, aunque en IC3 de forma marginalmente significativa. En la literatura solo se ha encontrado un estudio que calcula el IC2 ( $\text{Peso} \cdot 1000 / [\text{LE} / \text{H} / \text{AC}]$ ) en tortugas moras (Baycan & Tosunoglu, 2023). En él, los autores sí observaron una relación significativa de entre la condición física y el sexo, con promedios de 0,40-0,58  $\text{g}/\text{cm}^3$  en machos y 0,42-0,51 en hembras. En nuestro estudio los machos presentaban

mayores índices que las hembras, con 0,59 y 0.56 g/cm<sup>3</sup> respectivamente. No se encontraron estudios que analicen el IC3 (log [m/m']) en *Testudo sp.* en función de las variables de este estudio. Conforme a los resultados obtenidos, las tortugas que más tiempo llevan en el centro presentan peor condición física, lo cual a su vez es coherente con los estudios que relacionaban las condiciones de hacinamiento con la proliferación de infecciones por patógenos densodependientes (Amo *et al.*, 2007; Benítez-Malvido *et al.*, 2019; Miñana-Morant & Ponce-Gordo, 2018; Suzán *et al.*, 2012). Estos resultados ponen de manifiesto que las condiciones de cautividad pueden ser un condicionante para que se produzca el parasitismo.

Las diferencias encontradas entre IC1, e, IC2 e IC3 podrían ser debidas a la simpleza del primer método. Jacobson y colaboradores (1993) indicaron que la fórmula masa/LE puede ser inexacta debido a variaciones en los pesos de las tortugas después de la hibernación, a los cambios rápidos en el peso de las tortugas a medida que beben agua, y a las variaciones en el espesor del hueso dérmico en función de la ubicación geográfica. Sin embargo, en este estudio, las variables mencionadas no deberían alterar los resultados, ya que todas las tortugas fueron muestreadas simultáneamente y se les proporcionó la misma dieta y horarios. No obstante, la densidad del hueso dérmico podría ser una excepción, ya que se desconoce el origen de las tortugas y si antes de ingresar al centro de recuperación estuvieron en condiciones de hacinamiento, lo que podría afectar los valores de IC1. Si bien, es posible que estas notables diferencias sean debidas únicamente a la incertidumbre provocada por el bajo número de ejemplares analizados. Además, los resultados de este estudio para el IC2 no coinciden con anteriores estudios previos (Baycan & Tosunoglu, 2023), mientras que para IC3 no existen trabajos previos en tortugas mora o no coinciden cuando estudian otros animales (Schulte-Hostedde *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos con el IC1 parecen más consistentes con la bibliografía de *Testudo graeca* que los índices 2 y 3. Ante estas conclusiones, el IC1 se muestra como una medida sencilla y funcional para analizar tortugas cautivas que compartan las mismas condiciones y hábitat.

## 5.2. Métodos de conservación

En el presente trabajo se aborda el DESS como un método novedoso en la conservación de huevos de nematodos en muestras fecales de *Testudo graeca*. Hasta la fecha, existen estudios que han analizado diferentes métodos de preservación para la conservación de huevos de nemátodos, aunque mayoritariamente se han centrados en parásitos de mamíferos (Hass *et al.*, 2024; Jagła *et al.*, 2013; Foreyt, 1986). Otros estudios han investigado la efectividad del DESS en la preservación de ADN de endoparásitos (Beknazarova *et al.*, 2017; Yoder *et al.*, 2006; Frantzen *et al.*, 1998; Wasser *et al.*, 1997) y, en menor medida, en la preservación de la morfometría de

nematodos adultos para su identificación taxonómica (Thaenkham *et al.*, 2022; Naem *et al.*, 2010). Sin embargo, este estudio se distingue al ser el primero en evaluar y documentar la viabilidad y eficacia del DESS como método de conservación específicamente para huevos de nematodos en heces y el primero que utiliza la tortuga mora como modelo.

De acuerdo con los resultados, no se detectaron diferencias en las concentraciones de huevos de oxiúridos y ascáridos en heces entre las dos fechas de recuento (15 y 30 días). La mayor disparidad en las concentraciones de huevos se observó con el conteo en fresco de las muestras, evidenciando un marcado descenso en su número ya en los primeros 15 días y en el propio proceso de conservación. Jagła *et al.* (2013) obtuvieron un resultado similar para el método de la congelación; observaron una drástica disminución de los hpg de los 3 a los 14 días, mientras que no encontraron diferencias significativas de los 14 a los 30 días. Aun con la falta de significancia, en el presente trabajo, la intensidad de parasitación por oxiúridos disminuyó de los 15 a los 30 días en el 71% de las muestras. En cambio, para ascáridos no se observó ninguna tendencia, posiblemente debido al reducido número de muestras positivas.

En cuanto al análisis comparativo de los métodos de conservación, se observó que la congelación indujo la mínima pérdida de huevos, seguida por la disolución DESS a temperatura ambiente, DESS a  $-20^{\circ}\text{C}$  y finalmente, el etanol. Estadísticamente, la congelación fue el único método que mostró diferencias significativas respecto a los demás. La intensidad de parasitación por oxiúridos en la congelación a los 15 días representó el 27,5% de la concentración original de huevos en la muestra fresca. Las muestras tratadas con DESS a temperatura ambiente y DESS congelado conservaron un 10,8% y 8,2% de la intensidad inicial, respectivamente, mientras que el método con etanol presentó una tasa de conservación del 5,8%. Jagła *et al.* (2013) en el mismo periodo (14 días) para huevos de estrongílicos conservó 41% en refrigeración y 29% en etanol al 40%. Estas diferencias pueden deberse al uso de otro agente de flotación o a la mayor resistencia de los huevos de *Strongylida*. Aun así, los resultados coinciden en que la congelación permite conservar mejor que el etanol las formas parasitarias estudiadas.

Para las muestras conservadas en DESS a diferentes temperaturas, no se encontró una diferencia significativa entre ambos grupos ( $4^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Por tanto, ante estos resultados se puede concluir que la eficacia de este preservante no depende de la temperatura de almacenaje.

El recuento de huevos en etanol mostró una reducción notable respecto al DESS a temperatura ambiente, aunque no resultó significativa en este caso. En lo que respecta a los ascáridos, el orden se mantuvo idéntico, aunque con diferencias significativas entre el grupo del etanol y el resto de métodos, pues no se encontró ningún huevo de ascárido en este medio. Esta limitada efectividad del etanol para conservar la morfometría de los tejidos en huevos y adultos

es bien conocida, pues provoca la deshidratación de los huevos, que se encojen, deforman o se destruyen por completo (Hass *et al.*, 2024; Jagła *et al.*, 2013; Naem *et al.*, 2010). Asimismo, el DESS mantiene la morfometría mejor que el etanol y de manera similar a la congelación, el formol y la plastinación, métodos reconocidos por preservar la morfología sin cambios apreciables respecto a las muestras frescas (Hass *et al.*, 2024; González *et al.*, 2018; Jagła *et al.*, 2013; Naem *et al.*, 2010; Yoder *et al.*, 2006).

Además, el DESS ofrece evidentes ventajas, ya que, a diferencia de la congelación y la plastinación, no requiere infraestructura especializada, lo que facilita su uso en entornos fuera del laboratorio, estando además su transporte permitido en países que restringen el uso de formol y etanol (IATA, 2024; González *et al.*, 2018; Beknazarova *et al.*, 2017). Sumado a ello, a diferencia del formol, el DESS no es tóxico ni cancerígeno (Lee *et al.*, 2019; Gaither *et al.*, 2011; Yoder *et al.*, 2006) y permite conservar el ADN de forma equivalente a la congelación (Beknazarova *et al.*, 2017; Yoder *et al.*, 2006; Frantzen *et al.*, 1998; Wasser *et al.*, 1997).

Con las muestras recogidas y analizadas en este trabajo, González *et al.*, 2022 continuaron la investigación sobre la viabilidad del DESS para preservar la morfometría de huevos y adultos de nematodos en heces, así como la viabilidad del análisis de ADN a largo plazo. En el estudio publicado se demostró que la solución DESS preserva las estructuras microscópicas clave para la identificación de los nematodos (como espículas, cola y esófago) por al menos dos años. Además, se pudo extraer ADN viable de una muestra fecal almacenada durante dos años en DESS, un período mucho más largo que los descritos previamente (Chałańska *et al.*, 2016; Bik *et al.*, 2009; Yoder *et al.*, 2006). La integración de métodos morfológicos y genéticos es particularmente beneficiosa para estudios epidemiológicos de vida silvestre, y permite la conservación rentable de parásitos, manteniendo la morfometría y el ADN de los especímenes, y facilita el trabajo de campo y el envío de muestras a nivel mundial sin restricciones (González *et al.*, 2022).

## 6. Conclusiones y proyección futura

Los resultados obtenidos en este trabajo hacen referencia directa a los objetivos propuestos al inicio. A continuación, se presenta una conclusión para cada uno de ellos:

- 1) Se confirmó la presencia de oxiúridos y ascáridos en las *Testudo graeca* del C.R.F.S. El Valle, obteniendo una prevalencia de parasitación por oxiúridos del 100% y por ascáridos del 36%.
- 2) La disminución del IC1 (peso/longitud) se relacionó con la intensidad de parasitación por oxiúridos (hpg) y con el sexo (machos). Sin embargo, la intensidad de oxiúridos se vuelve espuria cuando se construye un modelo multivariante junto al sexo. Las tortugas con mayor antigüedad en el centro presentaron un menor IC2 (peso/volumen).
- 3) La congelación es el método más apropiado para preservar huevos de nematodos en heces, pues presenta la menor variación respecto a la muestra fresca. No obstante, el DESS a temperatura ambiente es un método recomendable para trabajos de campo sin acceso a la refrigeración, a la vez que permite la conservación del ADN por largos periodos.

De cara a futuros desarrollos es fundamental considerar varios aspectos que pueden mejorar y extender el alcance de la investigación actual. Entre ellos, resultaría conveniente ampliar la cohorte del estudio para mejorar la precisión de los resultados obtenidos y reducir la incertidumbre de los modelos. Por otro lado, sería pertinente continuar investigando cómo el hábitat influye en la relación entre los oxiúridos y las tortugas moras, así como qué características específicas del mismo pueden propiciar que esta relación se incline hacia el parasitismo.

En este estudio se ha probado la efectividad en el tiempo del DESS como conservante de helmintos endobiontes. Para profundizar aún más en sus atributos, sería pertinente investigar su capacidad para preservar la microbiota en heces, lo que abriría una nueva vía para comprender más detalladamente las interacciones hospedador-endobionte.

Además, debido a la escasa investigación sobre el uso del DESS como método que permita conservar la morfometría de huevos y adultos de helmintos, no existe un protocolo estandarizado para la toma de muestras y el procesamiento en laboratorio. Por lo cual, sería interesante desarrollar un procedimiento adaptado a las características específicas del DESS. Puesto que es probable que los procedimientos convencionales diseñados para muestras frescas o conservadas con otros métodos no sean óptimos.

## 7. Bibliografía

- Adamovicz, L., Allender, M. C., & Gibbons, P. M. (2020). Emerging Infectious Diseases of Chelonians. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 23(2), 263-283. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2020.01.014>
- Amo, L., López, P., & Martín, J. (2007). Habitat deterioration affects body condition of lizards: A behavioral approach with *Iberolacerta cyreni* lizards inhabiting ski resorts. *Biological Conservation*, 135(1), 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.09.020>
- Anadón, J. D., Giménez, A., Pérez Ibarra, I., Martínez, M., & Esteve, M. Á. (2005). The role of relief in local abundance patterns of the spur-thighed tortoise *Testudo graeca graeca* in south-east Spain. *Herpetological Journal*, 15(4), 285-290.
- Ballweber, L. R., Beugnet, F., Marchiondo, A. A., & Payne, P. A. (2014). American Association of Veterinary Parasitologists' review of veterinary fecal flotation methods and factors influencing their accuracy and use—Is there really one best technique? *Veterinary Parasitology*, 204(1-2), 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.009>
- Barredo, J. I., Caudullo, G., & Dosio, A. (2016). Mediterranean habitat loss under future climate conditions: Assessing impacts on the Natura 2000 protected area network. *Applied Geography*, 75, 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.apgeog.2016.08.003>
- Baycan, B., & Tosunoglu, M. (2023). Growth and body condition of thrace region (Turkiye) populations of vulnerable tortoise *Testudo graeca* Linneaus, 1758. *International Journal of Fauna and Biological Studies*, 10(1), 23-34. <https://doi.org/10.22271/23940522.2023.v10.i1a.949>
- Beknazarova, M., Millsted, S., Robertson, G., Whiley, H., & Ross, K. (2017). Validation of DESS as a DNA Preservation Method for the Detection of *Strongyloides* spp. In Canine Feces. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6), 624. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060624>
- Benítez-Malvido, J., Giménez, A., Graciá, E., Rodríguez-Caro, R. C., De Ybáñez, R. R., Siliceo-Cantero, H. H., & Traveset, A. (2019). Impact of habitat loss on the diversity and structure of ecological networks between oxyurid nematodes and spur-thighed tortoises (*Testudo graeca* L.). *PeerJ*, 7, e8076. <https://doi.org/10.7717/peerj.8076>
- Berry, K. H., Coble, A. A., Yee, J. L., Mack, J. S., Perry, W. M., Anderson, K. M., & Brown, M. B. (2015). Distance to human populations influences epidemiology of respiratory disease in desert tortoises: Humans Influence Disease in Tortoises. *The Journal of Wildlife Management*, 79(1), 122-136. <https://doi.org/10.1002/jwmg.816>
- Bik, H. M., Hawkins, L. E., Hughes, J. A., & Lamshead, J. D. (2009). Rapid decline of PCR amplification from genomic extracts of DESS-preserved, slide-mounted nematodes. *Nematology*, 11(6), 827-834. <https://doi.org/10.1163/156854109X422922>
- Böhm, M., Collen, B., Baillie, J. E. M., Bowles, P., Chanson, J., Cox, N., Hammerson, G., Hoffmann, M., Livingstone, S. R., Ram, M., Rhodin, A. G. J., Stuart, S. N., van Dijk, P. P., Young, B. E., Aftuang, L. E., Aghasyan, A., García, A., Aguilar, C., Ajtic, R., ... Zug, G. (2013). The conservation status of the world's reptiles. *Biological Conservation*, 157, 372-385. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.07.015>
- Bouamer, S., & Morand, S. (2006). Nematodes Parasites of Testudinidae (Chelonia): List of Species and Biogeographical Distribution. *Annales Zoologici*, 56, 225-240.
- Braza, F., Delibes, M., & Castroviejo, J. (1981). Estudio biométrico y biológico de la tortuga mora (*Testudo graeca*) en la Reserva Biológica de Doñana, Huelva. *Revista de Vertebrados de la Estación Biológica de Doñana (Consejo Superior de Investigaciones Científicas)*, 8, 15-41.

- Brooks, T. M., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A. B., Rylands, A. B., Konstant, W. R., Flick, P., Pilgrim, J., Oldfield, S., Magin, G., & Hilton-Taylor, C. (2002). Habitat Loss and Extinction in the Hotspots of Biodiversity. *Conservation Biology*, 16(4), 909-923. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.00530.x>
- Carmona Arce, M., & Carrión Rosales, H. (2015). *Potencia de la prueba estadística de normalidad Jarque-Bera frente a las pruebas de Anderson-Darling, Jarque-Bera robusta, chi-cuadrada, Chen-Shapiro y Shapiro-Wilk* [Tesis Licenciatura en Actuaria, Universidad Autónoma del Estado de México]. <https://core.ac.uk/download/pdf/159384191.pdf>
- Cervone, M., Fichi, G., Lami, A., Lanza, A., Damiani, G. M., & Perrucci, S. (2016). Internal and External Parasitic Infections of Pet Reptiles in Italy. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 26(3-4), 122. <https://doi.org/10.5818/1529-9651-26.3-4.122>
- Chafańska, A., Bogumił, A., Malewski, T., & Kowalewska, K. (2016). The effect of two fixation methods (TAF and DESS) on morphometric parameters of *Aphelenchoides ritzemabosi*. *Zootaxa*, 4083(2), 297. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4083.2.9>
- Chávarri, M., Berriatua, E., Giménez, A., Gracia, E., Martínez-Carrasco, C., Ortiz, J. M., & Ybáñez, R. R. de. (2012). Differences in helminth infections between captive and wild spur-thighed tortoises *Testudo graeca* in southern Spain: A potential risk of reintroductions of this species. *Veterinary Parasitology*, 187(3-4), Article 3-4. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.02.007>
- CITES. (2017, enero 2). *CITES Appendix II FAMILY listing Testudinidae spp. Included in Appendix II, except for the species included in Appendix I.* [https://checklist.cites.org/#/en/search/output\\_layout=alphabetical&level\\_of\\_listing=0&show\\_synonyms=1&show\\_author=1&show\\_english=1&show\\_spanish=1&show\\_french=1&scientific\\_name=Testudo+graeca&page=1&per\\_page=20](https://checklist.cites.org/#/en/search/output_layout=alphabetical&level_of_listing=0&show_synonyms=1&show_author=1&show_english=1&show_spanish=1&show_french=1&scientific_name=Testudo+graeca&page=1&per_page=20)
- Cobo, M., & Andreu, A. C. (1988). Seed Consumption and Dispersal by the Spur-Thighed Tortoise *Testudo graeca*. *Oikos*, 51(3), 267. <https://doi.org/10.2307/3565307>
- Convenio de Berna (1979).
- Díaz-Paniagua, C., & Andreu, A. C. (2015). Tortuga mora – *Testudo graeca*. En A. Salvador & A. Marco (Eds.), *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles* (p. 40). <http://www.vertebradosibericos.org/>
- Directiva 92/43/CEE del Consejo, BOE-A-1988-13682 (1992).
- Escoriza, D., Díaz-Paniagua, C., Andreu, A. C., & Hassine, B. (2022). *Testudo graeca* Linnaeus 1758 (Western Subspecies Clade: *Testudo g. Graeca*, *T. g. Cyrenaica*, *T. g. Marokkensis*, *T. g. Nabeulensis*, *T. g. Whitei*) – Mediterranean Spur-thighed Tortoise, Moorish Tortoise, Libyan Tortoise, Moroccan Tortoise, Tunisian Tortoise, Souss Valley Tortoise. En A. G. J. Rhodin, J. B. Iverson, P. P. Van Dijk, C. B. Stanford, E. V. Goode, K. A. Buhmann, & R. A. Mittermeier, *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises* (p. 117.1-117.18). Chelonian Research Foundation and Turtle Conservancy. <https://doi.org/10.3854/crm.5>
- Foreyt, W. (1986). Recovery of nematode eggs and larvae in deer: Evaluation of fecal preservation methods. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 189(9), 1065–1067.
- Forstner, Max J. (1960). Ein Beitrag zur Kenntnis parasitischer Nematoden aus griechischen Landschildkröten. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 20(1). <https://doi.org/10.1007/BF00259580>
- 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



- Frantzen, M. A. J., Silk, J. B., Ferguson, J. W. H., Wayne, R. K., & Kohn, M. H. (1998). Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology*, 7(10), 1423-1428. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00449.x>
- Gaither, M. R., Szabó, Z., Crepeau, M. W., Bird, C. E., & Toonen, R. J. (2011). Preservation of corals in salt-saturated DMSO buffer is superior to ethanol for PCR experiments. *Coral Reefs*, 30(2), 329-333. <https://doi.org/10.1007/s00338-010-0687-1>
- Gee, G. F. (1984). Value of frozen tissue collections for gene pool preservation. En Herbert C. Dessauer & Mark S. Hafner (Eds.), *Collections of Frozen Tissues: Value, Management, Field and Laboratory Procedures, and Directory of Existing Collections* (pp. 14-16). Association of Systematics Collections; USGS Publications Warehouse. <https://pubs.usgs.gov/publication/5210339>
- Gil-Sánchez, J. M., Rodríguez-Caro, R. C., Moleón, M., Martínez-Pastor, M. C., León-Ortega, M., Eguía, S., Graciá, E., Botella, F., Sánchez-Zapata, J. A., Martínez-Fernández, J., Esteve-Selma, M. A., & Giménez, A. (2022). Predation impact on threatened spur-thighed tortoises by golden eagles when main prey is scarce. *Scientific Reports*, 12(1), 17843. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22288-9>
- Giménez, A., Esteve-Selma, M. Á., Pérez, I., Anadón, J. D., Martínez, M. A., & Martínez-Fernández, J. (2005). *La tortuga mora en la Región de Murcia. Conservación de una especie amenazada*.
- Giménez, A., Pérez, I., Martínez, M., Anadón, J. D., Sánchez, J. A., Martínez, J., Esteve, M. Á., & Pardo, R. (1999). Las recolecciones de tortuga mora en el sureste ibérico: Implicaciones para su conservación. *Quercus*, 24-28.
- González, M., Moreno, E., Pérez-Cutillas, P., Gilbert, T., Ortiz, J., Valera, F., Espeso, G., Benzal, J., Ibáñez, B., & De Ybáñez, M. D. R. R. (2021). Zoological institutions as hotspots of gastrointestinal parasites that may affect the success of ungulate reintroduction programmes. *Veterinary Record*, 189(7), e506. <https://doi.org/10.1002/vetr.506>
- González, M., Ortiz, J., Navarro, M., & Latorre, R. (2018). Preservation of macroparasite species via classic plastination: An evaluation. *Folia Parasitologica*, 65. <https://doi.org/10.14411/fp.2018.019>
- González, M., Ruiz De Ybáñez, R., Rodríguez-Caro, R. C., Maíz-García, A., Gómez, L., Giménez, A., & Graciá, E. (2022). Assessing DESS solution for the long-term preservation of nematodes from faecal samples. *Research in Veterinary Science*, 153, 45-48. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.10.010>
- Graciá, E. (2013). *Patrones genéticos y cambios en la distribución de especies: Filogeografía de la tortuga mora (Testudo graeca L.) en el Mediterráneo Occidental* [Tesis Doctoral]. Universidad Miguel Hernández.
- Graciá, E., & Giménez, A. (2015). La tortuga mora (*Testudo graeca*) en la península ibérica y en las islas Baleares. *Bol. Asoc. Herpetol. Esp.* (2015) 26(2), 26(2), Article 2.
- Graciá, E., Rodríguez-Caro, R. C., Andreu, A. C., Fritz, U., Giménez, A., & Botella, F. (2017). Human-mediated secondary contact of two tortoise lineages results in sex-biased introgression. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04208-4>
- Graciá, E., Rodríguez-Caro, R. C., Ferrández, M., Martínez-Silvestre, A., Pérez-Ibarra, I., Amahjour, R., Aranda, C., Benelkadi, H. A., Bertolero, A., Biaggini, M., Botella, F., Budó, J., Cadenas, V., Chergi, B., Corti, C., Esperón, F., Esteve-Selma, M. Á., Fahd, S., García De La Fuente, M. I., ... Giménez, A. (2020). From troubles to solutions: Conservation of

- Mediterranean tortoises under global change. *Basic and Applied Herpetology*, 34, 5-16. <https://doi.org/10.11160/bah.196>
- Graciá, E., Rodríguez-Caro, R. C., Sanz-Aguilar, A., Anadón, J. D., Botella, F., García-García, A. L., Wiegand, T., & Giménez, A. (2020). Assessment of the key evolutionary traits that prevent extinctions in human-altered habitats using a spatially explicit individual-based model. *Ecological Modelling*, 415, 108823. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2019.108823>
- Graciá, E., Rodríguez-Caro, R., Giménez, A., Botella, F., & Andreu, A. C. (2016). Alarma por la entrega masiva de tortugas moras cautivas—Una tortuga mediterránea donde solo debía haber tortugas moras. *Quercus*, 361, 66-67.
- Graciá, E., Vargas-Ramírez, M., Delfino, M., Anadón, J. D., Giménez, A., Fahd, S., Corti, C., Jdeidi, T. B., & Fritz, U. (2017). Expansion after expansion: Dissecting the phylogeography of the widely distributed spur-thighed tortoise, *Testudo graeca* (Testudines: Testudinidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 121(3), 641-654. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blx007>
- Greiner, E. C., & Mader, D. R. (2006). Parasitology. En *Reptile Medicine and Surgery* (pp. 343-364). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-72-169327-X/50025-0>
- Hallinger, M. J., Taubert, A., Hermosilla, C., & Mutschmann, F. (2018). Occurrence of health-compromising protozoan and helminth infections in tortoises kept as pet animals in Germany. *Parasites & Vectors*, 11(1), 352. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2936-z>
- Hass, J. K., Henriquez, M. C., Churcher, J., Hamou, H., Morales, S. R., & Melin, A. D. (2024). Assessing morphological preservation of gastrointestinal parasites from fecal samples of wild capuchin monkeys (*Cebus imitator*) stored in ethanol versus formalin. *Scientific Reports*, 14(1), 3623. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53915-2>
- Henen, B. T. (2004). Capital and income breeding in two species of desert tortoise. *Transactions of the Royal Society of South Africa*, 59(2), 65-71. <https://doi.org/10.1080/00359190409519164>
- Henle, K., Davies, K. F., Kleyer, M., Margules, C., & Settele, J. (2004). Predictors of Species Sensitivity to Fragmentation. *Biodiversity and Conservation*, 13(1), 207-251. <https://doi.org/10.1023/B:BIOC.0000004319.91643.9e>
- Hodda, M. (2022). Phylum Nematoda: A classification, catalogue and index of valid genera, with a census of valid species. *Zootaxa*, 5114(1), 1-289. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5114.1.1>
- Hofmeyr, M. D., Henen, B. T., & Loehr, V. J. T. (2005). Overcoming environmental and morphological constraints: Egg size and pelvic kinesis in the smallest tortoise, *Homopus signatus*. *Canadian Journal of Zoology*, 83(10), 1343-1352. <https://doi.org/10.1139/z05-132>
- Hu, X. L., Liu, G., Wang, W. X., Zhou, R., Liu, S. Q., Li, L. H., & Hu, D. F. (2016). Methods of preservation and flotation for the detection of nematode eggs and coccidian oocysts in faeces of the forest musk deer. *Journal of Helminthology*, 90(6), 680-684. <https://doi.org/10.1017/S0022149X15000942>
- IATA. (2024). *Reglamentacion Sobre Mercancias Peligrosas (DGR)* (65.<sup>a</sup> ed.). <https://www.iata.org/en/publications/dgr/#tab-1>
- IUCN. (1996). *Testudo graeca: Tortoise & Freshwater Turtle Specialist Group: The IUCN Red List of Threatened Species 1996: e.T21646A9305693* [dataset]. International Union for Conservation of Nature. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.1996.RLTS.T21646A9305693.en>



- Jackson, O. F. (1980). Weight and measurement data on tortoises (*Testudo graeca* and *Testudo hermanni*) and their relationship to health. *Journal of Small Animal Practice*, 21(7), 409-416. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1980.tb01269.x>
- Jacobson, E. R. (1993). Implications of Infectious Diseases for Captive Propagation and Introduction Programs of Threatened/Endangered Reptiles. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 24(3), Article 3.
- Jacobson, E. R. (2007). Parasites and Parasitic Diseases of Reptiles. En E. R. Jacobson (Ed.), *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles* (pp. 571-665). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420004038.ch12>
- Jacobson, E. R., Weinstein, M., Berry, K., Hardenbrook, B., Tomlinson, C., & Freitas, D. (1993). Problems with using weight versus carapace length relationships to assess tortoise health. *Veterinary Record*, 132(9), 222-223. <https://doi.org/10.1136/vr.132.9.222>
- Jagła, E., Śpiewak, J., Zalesny, G., & Popiołek, M. (2013). Effect of Storage and Preservation of Horse Faecal Samples on the Detectability and Viability of Strongylid Nematode Eggs and Larvae. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 57(2), 161-165. <https://doi.org/10.2478/bvip-2013-0030>
- Janssen, J. (2021). A Primer to the Global Trade of Reptiles: Magnitude, Key Challenges, and Implications for Conservation. En S. C. Underkoffler & H. R. Adams (Eds.), *Wildlife Biodiversity Conservation* (pp. 439-461). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-64682-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-030-64682-0_17)
- Jiménez-Franco, M. V., Graciá, E., Rodríguez-Caro, R. C., Anadón, J. D., Wiegand, T., Botella, F., & Giménez, A. (2022). Problems seeded in the past: Lagged effects of historical land-use changes can cause an extinction debt in long-lived species due to movement limitation. *Landscape Ecology*, 37(5), 1331-1346. <https://doi.org/10.1007/s10980-021-01388-3>
- Jiménez-Franco, M. V., Graciá, E., Rodríguez-Caro, R. C., Anadón, J. D., Wiegand, T., & Giménez, A. (2024). Alternative vegetation trajectories through passive habitat rewilding: Opposite effects for animal conservation. *Landscape Ecology*, 39(4), 78. <https://doi.org/10.1007/s10980-024-01880-6>
- Kozlova, V. A., Pokrovskaya, M. S., Meshkov, A. N., & Drapkina, O. M. (2020). Actual approaches to the transportation of biological samples at low temperatures. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 65(10), 619-625. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-619-625>
- Laghzaoui, E.-M., Amahmid, O., Abbad, A., & El Mouden, E. H. (2021). Prevalence and intensity of gastrointestinal parasites in the vulnerable spur-thighed tortoise (*Testudo graeca*) from the central-western of Morocco. *Basic and Applied Herpetology*, 35, 63-75. <https://doi.org/10.11160/bah.194>
- Lambert, M. R. K. (1982). Studies on the growth, structure and abundance of the Mediterranean spur-thighed tortoise, *Testudo graeca* in field populations. *Journal of Zoology*, 196(2), 165-189. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1982.tb03499.x>
- Lee, K. M., Adams, M., & Klassen, J. L. (2019). Evaluation of DESS as a storage medium for microbial community analysis. *PeerJ*, 7, e6414. <https://doi.org/10.7717/peerj.6414>
- Leung, T. L. F., & Koprivnikar, J. (2019). Your infections are what you eat: How host ecology shapes the helminth parasite communities of lizards. *Journal of Animal Ecology*, 88(3), 416-426. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12934>
- Ley Orgánica 1/2015, de 30 de marzo, Pub. L. No. 1, BOE-A-2015-3439 (2015). <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2015-3439>

- López Jurado, L. F. (1979). Testudo graeca. En *Las Tortugas terrestres Testudo graeca y Testudo hermanni en España* (17.<sup>a</sup> ed., pp. 1-63). Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza.
- López Jurado, L. F., & Andreu, A. C. (1997). Testudo graeca. En J. M. Pleguezuelos (Ed.), *Distribución y biogeografía de los anfibios y reptiles en España y Portugal* (pp. 178-180). Asociación Herpetológica Española.
- Loukopoulos, P., Komnenou, A., Papadopoulos, E., & Psychas, V. (2007). LETHAL OZOLAIMUS MEGATYPHLON INFECTION IN A GREEN IGUANA (IGUANA IGUANA RHINOLOPA). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 38(1), 131-134. <https://doi.org/10.1638/2006-0018R.1>
- Lovich, J. E., Ennen, J. R., Agha, M., & Gibbons, J. W. (2018). Where Have All the Turtles Gone, and Why Does It Matter? *BioScience*, 68(10), 771-781. <https://doi.org/10.1093/biosci/biy095>
- Martínez, J., & Esteve, M. Á. (2006). El modelo urbanístico litoral de la Región de Murcia. *Sociedad y utopía: Revista de ciencias sociales*, 28, 223-246.
- Martínez Pastor, M. C. (2016). *Depredación del águila real sobre la tortuga mora en el sureste ibérico* [Trabajo de Fin del Grado en Ciencias Ambientales]. Universidad Miguel Hernández.
- Martínez-Fernández, J., Ruiz-Benito, P., & Zavala, M. A. (2015). Recent land cover changes in Spain across biogeographical regions and protection levels: Implications for conservation policies. *Land Use Policy*, 44, 62-75. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2014.11.021>
- Miñana-Morant, O., & Ponce-Gordo, F. (2018). Prevalencia de parásitos intestinales en tortugas terrestres en cautividad y análisis de factores de riesgo. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales. AVEPA*, 38(2), 79-90.
- Moreno, M. (2017). *Factores ambientales y genéticos que influyen en la presencia de anomalías morfológicas en Testudo graeca* [Trabajo de Fin de Grado]. Universidad Miguel Hernández.
- Naem, S., Pagan, C., & Nadler, S. A. (2010). Structural Restoration of Nematodes and Acanthocephalans Fixed in High Percentage Alcohol Using Dess Solution and Rehydration. *Journal of Parasitology*, 96(4), 809-811. <https://doi.org/10.1645/GE-2402.1>
- Nagy, K., Henen, B., Vyas, D. B., & Wallis, I. R. (2002). A condition index for the desert tortoise (Gopherus agassizii). *Chelonian Conservation and Biology*, 4, 425-429.
- Nielsen, M. K. (2021). What makes a good fecal egg count technique? *Veterinary Parasitology*, 296, 109509. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109509>
- Papini, R., Manetti, C., & Mancianti, F. (2011). Coprological survey in pet reptiles in Italy. *Veterinary Record*, 169(8), 207-207. <https://doi.org/10.1136/vr.d4398>
- Pasmans, F., Blahak, S., Martel, A., & Pantchev, N. (2008). Introducing reptiles into a captive collection: The role of the veterinarian. *The Veterinary Journal*, 175(1), 53-68. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.12.009>
- Pérez, I., Giménez, A., & Pedreño, A. (2011). A qualitative examination of the social practices and representations towards a species of endangered tortoise. *Wildlife Research*, 38(4), 323. <https://doi.org/10.1071/WR10209>
- Pérez, I., Giménez, A., Sánchez-Zapata, J. A., Anadón, J. D., Martínez, M., & Esteve, M. Á. (2004). Non-commercial collection of spur-thighed tortoises (Testudo graeca graeca): A cultural problem in southeast Spain. *Biological Conservation*, 118(2), 175-181. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2003.07.019>



- Pérez, I., Tenza, A., Anadón, J. D., Martínez-Fernández, J., Pedreño, A., & Giménez, A. (2012). Exurban sprawl increases the extinction probability of a threatened tortoise due to pet collections. *Ecological Modelling*, 245, 19-30. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2012.03.016>
- Pleguezuelos, J. M., Márquez, R., & Lizana, M. (Eds.). (2004). *Atlas y libro rojo de los anfibios y reptiles de España*. Organismo Autónomo de Parques Nacionales.
- Posit team. (2023). *RStudio: Integrated Development Environment for R* (2023.6.1.524) [R]. Posit Software, PBC. <http://www.posit.co/>
- R Core Team. (2023). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (R version 4.3.1 (2023-06-16 ucrt)) [R]. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Rataj, A. V., Lindtner-Knific, R., Vlahović, K., Mavri, U., & Dovč, A. (2011). Parasites in pet reptiles. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-33>
- Rhodin, A., Pritchard, P., Van Dijk, P. P., Saumure, R., Buhlmann, K., Iverson, J., & Mittermeier, R. (Eds.). (2021). Conservation Status. En A. Rhodin, *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises* (9th ed., Vol. 8, pp. 19-22). Chelonian Research Foundation. <https://doi.org/10.3854/crm.5>
- Roca, V. (1999). Relación entre las faunas endoparásitas de reptiles y su tipo de alimentación. *Revista Española de Herpetología*, 13, 101-121.
- Sainz, H., & Moreno, J. C. (2002). Flora vascular endémica española. En F. D. Pineda & CYTED (Organization) (Eds.), *La diversidad biológica de España* (pp. 175-196). Prentice Hall.
- Sala, O. E., Stuart Chapin, F., Armesto, J. J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L. F., Jackson, R. B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D. M., Mooney, H. A., Oesterheld, M., Poff, N. L., Sykes, M. T., Walker, B. H., Walker, M., & Wall, D. H. (2000). Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. *Science*, 287(5459), 1770-1774. <https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1770>
- Sánchez Gumiel, N. (2005). *Parasitofauna de Podarcis dugesii del Archipiélago de Madeira* [Memoria para optar al grado de Doctor]. Universidad Complutense de Madrid.
- Santos, T., & Tellería, J. (2006). Pérdida y fragmentación del hábitat: Efecto sobre la conservación de las especies. *Ecosistemas*, 15(2), 1-7.
- Schulte-Hostedde, A. I., Zinner, B., Millar, J. S., & Hickling, G. J. (2005). Restitution of mass-size residuals: Validating body condition indices. *Ecology*, 86(1), 155-163. <https://doi.org/10.1890/04-0232>
- Semaha, M. J., C. Rodríguez-Caro, R., Fahd, S., Mira-Jover, A., Giménez, A., & Graciá, E. (2024). *Body size variation in a lineage of spur-thighed tortoises (Testudo graeca whitei) contrasts with that expected from the species level*. 192009 Bytes. <https://doi.org/10.6084/M9.FIGSHARE.25109138>
- Seutin, G., White, B. N., & Boag, P. T. (1991). Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology*, 69(1), 82-90. <https://doi.org/10.1139/z91-013>
- Smith, P. (2015). First do no harm: Recognizing and mitigating the risk of disease introduction associated with chelonian head-starting initiatives. *Herpetological Conservation and Biology*, 10, 550-558.
- Sprent, J. F. A. (1980). Ascaridoid nematodes of amphibians and reptiles: *Angusticaecum* and *Krefftascaaris* n.g. *Journal of Helminthology*, 54(1), 55-73. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00006350>

- Stanford, C. B., Rhodin, A. G. J., & van Dijk, P. P. (2018). *Turtles in trouble: The worlds 25+ most endangered tortoises and freshwater turtles*.
- Suzán, G., Esponda, F., Carrasco-Hernández, R., & Aguirre, A. A. (2012). Habitat fragmentation and infectious disease ecology. En R. S. Ostfeld & P. Daszak (Eds.), *New directions in conservation medicine: Applied cases of ecological health* (pp. 135-150). Oxford University Press Inc.
- Thaenkham, U., Chaisiri, K., & Hui En Chan, A. (2022). Parasitic Helminth Sample Preparation for Taxonomic Study. En U. Thaenkham, K. Chaisiri, & A. Hui En Chan, *Molecular Systematics of Parasitic Helminths* (pp. 225-242). Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-1786-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-19-1786-8_9)
- Traversa, D., Capelli, G., Iorio, R., Bouamer, S., Cameli, A., & Giangaspero, A. (2005). Epidemiology and biology of nematodofauna affecting *Testudo hermanni*, *Testudo graeca* and *Testudo marginata* in Italy. *Parasitology Research*, 98(1), 14-20. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-0019-5>
- Turtle Taxonomy Working Group, & Rhodin, A. G. J. (2021). *Turtles of the World: Annotated Checklist and Atlas of Taxonomy, Synonymy, Distribution, and Conservation Status (9th Ed.)*. (First, Vol. 8). Chelonian Research Foundation and Turtle Conservancy. <https://doi.org/10.3854/crm.8.checklist.atlas.v9.2021>
- Vadlejch, J., Petrtyl, M., Zaichenko, I., Čadková, Z., Jankovská, I., Langrová, I., & Moravec, M. (2011). Which McMaster egg counting technique is the most reliable? *Parasitology Research*, 109(5), 1387-1394. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2385-5>
- Waindok, P., Raulf, M.-K., & Strube, C. (2022). Potentials and challenges in the isolation and detection of ascarid eggs in complex environmental matrices. *Food and Waterborne Parasitology*, 28, e00174. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2022.e00174>
- Wasser, S. K., Houston, C. S., Koehler, G. M., Cadd, G. G., & Fain, S. R. (1997). Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Molecular Ecology*, 6(11), 1091-1097. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00281.x>
- Willemsen, R. E., & Hailey, A. (2002). Body Mass Condition in Greek Tortoises: Regional and Interspecific variation. *Herpetological Journal*, 12, 105-114.
- Willemsen, R. E., Hailey, A., Longepierre, S., & Grenot, C. (2002). Body mass condition and management of captive european tortoises. *Herpetological Journal*, 12, 115-121.
- Yoder, M., De Ley, I. T., Wm King, I., Mundo-Ocampo, M., Mann, J., Blaxter, M., Poiras, L., & De Ley, P. (2006). DESS: A versatile solution for preserving morphology and extractable DNA of nematodes. *Nematology*, 8(3), 367-376. <https://doi.org/10.1163/156854106778493448>
- Zajac, A., & Conboy, G. A. (2012). *Veterinary clinical parasitology* (8th ed). Wiley-Blackwell.

