UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE VETERINARIA

PRIMERA DESCRIPCIÓN DE LA PARASITACIÓN POR OÉSTRIDOS EN CORZOS DE EXTREMADURA

TRABAJO FIN DE GRADO

CURSO 2015-2016

Autor: Ricardo Garrido Alarcón

Director: Miguel Ángel Habela Martínez-Estéllez

Codirector: Rafael Calero Bernal

ÍNDICE

RESUMEN _____ *1*

ABSTRACT _____ *3*

1. INTRODUCCIÓN _____ *5*

2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN _____ *8*

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA _____ *9*

3.1. El corzo _____ **9**

3.2. Las miasis _____ **11**

3.3. *Cephenemyia stimulator* _____ **15**

3.4. Antecedentes históricos de la enfermedad _____ **22**

3.5. Situación actual de la enfermedad _____ **25**

4. MATERIAL Y MÉTODOS _____ *27*

4.1. Muestreos _____ **27**

4.2. Material y Métodos _____ **32**

4.2.1. Necropsia _____ 32

4.2.2. Técnicas de diagnóstico parasitológico _____ 34

4.2.3. Estudio molecular de larvas de Oéstridos _____ 34

5. RESULTADOS _____ *45*

5.1. Procesado de las muestras e identificación morfológica de las larvas. _____ **45**

5.2. Estudio molecular de larvas de Oéstridos _____ **51**

5.2.1. PCR _____ 51

5.2.2. Secuenciación _____ 52

5.2.3. Análisis filogenético _____ 52

6. DISCUSIÓN _____ *55*

6.1. Estudio parasitológico _____ **55**

6.2. Estudio molecular _____ **57**

7. CONCLUSIONES _____ *59*

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS _____ *60*

9. AGRADECIMIENTOS _____ *64*

10. ADENDA _____ *65*

RESUMEN

En este trabajo describimos los trece primeros casos de parasitación por larvas del díptero *Cephenemyia stimulator* en corzos *Capreolus capreolus* (Linnaeus, 1758) de Extremadura. En mayo de 2012, se detectó el primer caso en un corzo macho de un coto privado (39°24´ N, 5°32´ W) de Berzocana (Cáceres). El contaje de las larvas de *C. stimulator* recolectadas arrojó la cifra total de 77, de las cuales 34 correspondieron al estado II (L-II) y 43 al III (L-III), todas ellas localizadas en vías respiratorias altas. El segundo caso se diagnosticó en mayo de 2012 en un corzo, igualmente macho, procedente de un coto local (39°19´ N, 5°22´ W) de Logrosán (Cáceres), en el cual se recogieron un total de 37 larvas (2 L-II y 35 L-III) todas ellas halladas en cavidades oronasales. En mayo de 2013, se detectó el tercer caso en un corzo macho de un coto privado (39°25’ N, 5°29’ W) de Berzocana (Cáceres), en el cual se recogieron un total de 49 larvas (30 L-II y 19 L-III). El cuarto caso se detectó en mayo de 2013 en un corzo macho procedente de un coto local (39°17’ N, 5°40’ W) de Zorita (Cáceres) en el que se recogieron un total de 25 larvas III (L-III). Los tres siguientes casos (nº 5, 6 y 7) se diagnosticaron en mayo de 2015 en corzos procedentes de un coto privado (39°26’ N, 5°45’ W) de Madroñera (Cáceres) en los cuales se llegaron a contabilizar 4 L-III en el primero, 10 L-III en el segundo, y 6 L-III en el tercero. En mayo de 2015, se detectó el octavo caso en un corzo macho de un coto local (39°24’ N, 5°37’ W) de Garciaz (Cáceres) en el cual se recogieron un total de 8 larvas (1 L-II y 7 L-III). El noveno caso se diagnosticó en junio de 2015 en un corzo macho de un coto privado (39°27’ N, 5°19’ W) de Guadalupe (Cáceres) del que se llegaron a recoger un total de 14 larvas (3L-II y 11L-III). Los últimos casos (nº 10, 11, 12 y 13) se diagnosticaron en mayo de 2016 en cuatro corzos machos, dos procedentes de un coto privado (39°26’ N, 5°45’ W) de Madroñera (Cáceres) y otros dos de un coto privado (39°24’ N, 5°37’ W) de Garciaz (Cáceres). Del primero se recogieron 10 larvas (7L-II y 3L-III), del segundo 7 larvas (6L-II y 1L-III), del tercero 4 larvas (2L-II y 2L-III) y del cuarto 8 larvas (4L-II y 4L-III).

Este estudio revela los primeros datos moleculares de larvas de *C. stimulator* en nuestro país, proporcionando una base de datos esencial para la identificación molecular de estos parásitos y la evaluación de las relaciones filogenéticas dentro de la familia Oestridae. Nuestros resultados de secuenciación del gen mitocondrial COX I demostraron un nivel de divergencia evolutiva intraespecífica del 0,4% entre las secuencias de las larvas de *C. stimulator* de Extremadura y la secuencia de *C. stimulator* de Francia.

Se trata de la primera cita de este parásito para Extremadura y la detección más meridional de la infestación por *C. stimulator* en corzos europeos. Se recomienda la puesta en práctica de medidas de vigilancia epidemiológica en las poblaciones de corzos de nuestro país, y el diseño de pautas estrictas de bioseguridad en las translocaciones, especialmente de animales provenientes de zonas afectadas. La presencia del parásito en Extremadura refleja una perfecta adaptación de *C. stimulator* a las condiciones ecológicas de la mitad sur de la Península Ibérica.

Palabras clave: Oestridae, *Cephenemyia stimulator*, corzos, Extremadura, España, identificación molecular, filogénesis.

ABSTRACT

Present work, we describe the first thirteen cases of parasitization by the dipterous parasite *Cephenemyia stimulator* in roe deer *Capreolus capreolus* (Linnaeus, 1758) in Extremadura (all in Cáceres province). In May 2012, the first case was detected in an adult male from a privately owned hunting estate (39°24' N, 5°32' W) in Berzocana (Cáceres, Spain). A total of 77 *C. stimulator* larvae were counted, of which 34 corresponded to instar II (L-II) and 43 to instar III (L-III), all of which were located in the upper airways. The second case was diagnosed in May 2012 in another male roe deer from a local-public hunting estate (39°19' N, 5o22' W) in Logrosán (Cáceres, Spain), from which a total of 37 larvae (2 L-II and 35 L-III) were collected, all of which were located in the oronasal cavities. In May 2013, the third case was detected in a male roe deer from a privately owned hunting estate (39°25' N, 5°29' W) in Berzocana (Cáceres, Spain), from which a total of 49 larvae (30 L-II y 19 L-III). The fourth case was detected in May 2013 in a male roe deer from a local-public hunting estate (39°17' N, 5°40' W) in Zorita (Cáceres, Spain), from which a total of 25 larvae III (L-III). The following three cases (5th, 6th and 7th) were diagnosed in May 2015 in roe deer from a privately owned hunting estate (39°26' N, 5°45' W) in Madroñera (Cáceres, Spain), from which count reached 4 L-III in the first, 10 L-III in the second and 6 L-III in the third. In May 2015, the eighth case was detected in a male roe deer from a local-public hunting estate (39°24' N, 5°37' W) in Garciaz (Cáceres, Spain) from which a total of 8 larvae (1 L-II y 7 L-III) were collected. The ninth case was diagnosed in June 2015 in a male roe deer from a privately owned hunting estate (39°27' N, 5°19' W) in Guadalupe (Cáceres, Spain) from which a total of 14 larvae (3L-II y 11L-III). The latest cases (10th, 11th, 12th and 13th were diagnosed in May 2016 in four male roe deer, two from a privately owned hunting estate (39°26' N, 5°45' W) in Madroñera (Cáceres, Spain) and two from a privately owned hunting estate (39°24' N, 5°37' W) in Garciaz (Cáceres, Spain). Were collected 10 larvae (7L-II y 3L-III) in the first, 7 larvae (6L-II y 1L-III) in the second, 4 larvae (2L-II y 2L-III) in the third and 8 larvae (4L-II y 4L-III) in the fourth.

This study provides the first molecular data of *C. stimulator* in our country, providing an essential database for the molecular identification of these parasites and the assessment of phylogenetic relationships within family Oestridae. Our results sequencing of mitochondrial gene COX I showed a level of interspecific evolutionary divergence of 0.4% between the sequences of the larvae of *C. stimulator* of Extremadura and the sequence of *C. stimulator* of France.

This study not only provides the first report of this parasite in Extremadura, but also describes the southernmost occurrence infestation by *C. stimulator* in European roe deer. We recommend implementing surveillance measures in roe deer populations in Spain and creating strict biosecurity guidelines on translocations, especially regarding animals from affected areas. The presence of *C. stimulator* in the Extremadura region in Spain reflects that it has adapted well to the ecological conditions in the southern Iberian Peninsula.

Keywords: Oestridae, *Cephenemyia stimulator*, roe deer, Extremadura, Spain, molecular identification, phylogenesis.

1. INTRODUCCIÓN

El corzo es uno de los ungulados silvestres cuyas poblaciones más se han incrementado en la Península Ibérica en las últimas décadas, aumentando su dispersión al colonizar nuevas áreas. En consecuencia, algunos factores de riesgo de contagio de procesos infecto-contagiosos como consecuencia del contacto con otros ungulados domésticos y silvestres, aumento de poblaciones y limitación de los recursos, pueden llegar a tener repercusiones sobre su estado sanitario. En España existen pocos trabajos referidos a esta especie silvestre y la escasa información existente, mayormente de tipo divulgativo, se encuentra dispersa en publicaciones de difícil acceso (Gortázar y Vicente, 2008).

Los procesos parasitarios son una de las principales causas de enfermedad citadas (hasta 50% de las bajas) en los cérvidos europeos, siendo las nematodosis pulmonares e intestinales y las distomatosis hepáticas las más importantes. Sin embargo, no siempre queda claramente demostrada la etiología parasitaria de estas muertes, habiendo autores que sugieren que las infestaciones parasitarias elevadas son más bien una consecuencia de otros procesos infecciosos o de deficiencias nutricionales. En todo caso, el corzo parece ser uno de los cérvidos más sensibles a las parasitosis y posiblemente sea el que mayor diversidad de formas parasitarias presenta, al menos en lo referente a helmintos. El grado de parasitación del corzo puede tener relación con la calidad cinegética del trofeo, también los problemas sanitarios limitan su cría en cautividad (Gortázar y Vicente, 2008).

Las miasis (del griego *myia* = mosca) son aquellos procesos patológicos producidos en un hospedador vertebrado por larvas de dípteros. También podrían definirse como la infestación por larvas de moscas en animales vivos (Zumpt, 1965).

Estos procesos patológicos son bien conocidos desde tiempos remotos, pues ya son citados por Homero en la "Ilíada" cuando Aquiles hace alusión a ellas al hablar de las larvas que devoran las llagas de su amigo Patroclo (Pérez *et al.,* 1997).

Las miasis, muy extendidas y diagnosticadas en los animales domésticos, especialmente en el ovino, también han sido descritas por la comunidad científica en ungulados silvestres. Concretamente, las larvas presentes en las fosas nasales y laringe de los corzos de la Península Ibérica se corresponden con una fase de desarrollo de la mosca denominada *Cephenemyia stimulator.* Se trata de un insecto díptero de la familia Oestridae que parasita casi exclusivamente a los corzos. En su fase adulta posee buena capacidad de vuelo y un aspecto similar al de un abejorro. Las larvas de esta mosca tienen que desarrollarse obligatoriamente en el interior de las vías respiratorias altas (fosas nasales-laringe) de los corzos. La acumulación de larvas de *Cephenemyia* en las vías respiratorias altas llega a causar desde irritación e inflamación hasta obstrucción (Cogley, 1987), en buena medida debido a la presencia de los ganchos bucales y de numerosas espinas situadas en la cutícula de los estadios larvarios.

Esta parasitosis del corzo, conocida más comúnmente como "gusano de la garganta/nariz del corzo" está cobrando gran importancia en los últimos años por las elevadas prevalencias alcanzadas y las numerosas bajas que se le imputan en esta especie hospedadora. Se trata de una miasis ampliamente difundida en países del centro de Europa (Vicente *et al.,* 2004), pero hasta hace unos años no se había citado en España. La primera denuncia de este parásito en corzos en España fue realizada por Notario y Castresana (2001). El estudio se realizó sobre corzos procedentes de Francia, probablemente ya infestados, que se introdujeron en la primavera de 1997 en una finca de caza mayor de la provincia de Ciudad Real.

En este trabajo, se describen los trece primeros casos de parasitación por larvas del díptero *Cephenemyia stimulator* (Oestridae) en corzos (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758) de Extremadura. Esta información es de gran interés epidemiológico, pues nos permitirá conocer la situación de este parásito, hasta ahora no descrito en nuestra comunidad autónoma. La presencia de este parásito en Extremadura refleja una perfecta adaptación de *Cephenemyia stimulator* a las condiciones ecológicas de la mitad sur de la Península Ibérica.

Además, en este estudio revelamos los primeros resultados moleculares obtenidos de larvas de *C. stimulator* en nuestro país, proporcionando una base de datos esencial para la identificación molecular de estos parásitos y la evaluación de las relaciones filogenéticas de los dípteros que componen la familia Oestridae.

2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

Con este estudio pretendemos aportar información etiológica y epidemiológica sobre la principal miasis cavitaria de los corzos (*Capreolus capreolus*) en la provincia de Cáceres, tratando de identificar morfológica y molecularmente al agente implicado y conocer su prevalencia y distribución en nuestra Provincia.

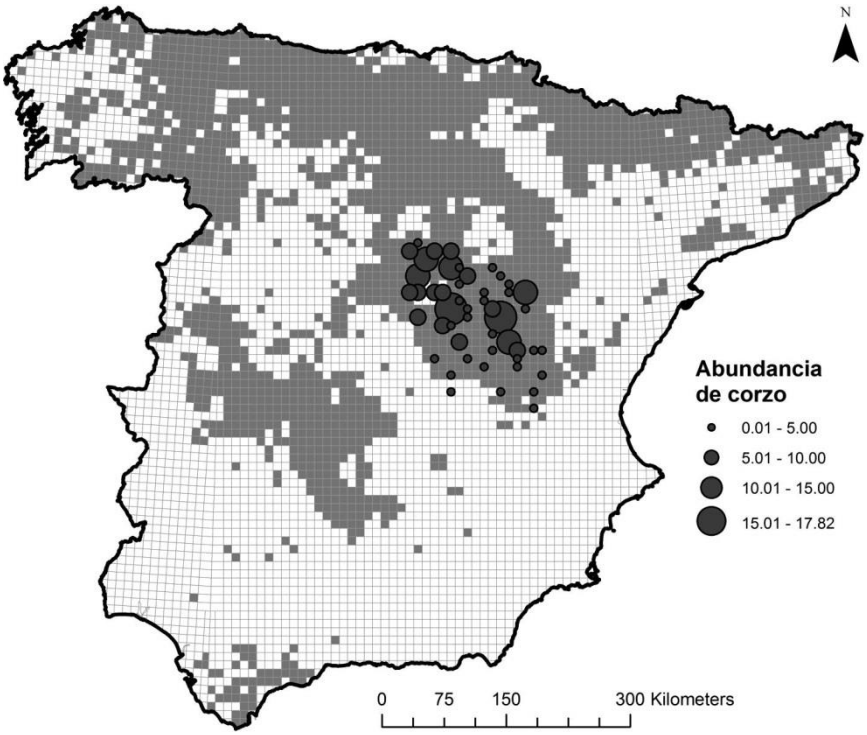
Se sospecha que esta miasis causada en otras áreas por las larvas de la mosca *Cephenemyia stimulator*, podría dar lugar a un número importante de bajas en las poblaciones de corzos de Extremadura, lo cual y consecuentemente está generando un estado de preocupación creciente.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. El corzo

El corzo se distribuye por toda Europa peninsular hasta Siberia y algunos países de Asia menor y noroeste de China. En las Islas europeas, excepto Inglaterra, no hay corzos; ni tampoco en el sur de Grecia, ni en parte de Rusia, Suecia, Noruega y Finlandia. En España ocupa prácticamente todo el norte y cornisa Cantábrica y toda la Pirenaica desde Navarra a Gerona, así como todo el sistema Ibérico y Central hasta Gredos. Castilla la Mancha tiene la población más abundante de corzos en Guadalajara, (provincia más corcera de la comunidad) y Cuenca, en contacto con el sistema Ibérico y Central de Castilla Y León. En Albacete y en toda la costa mediterránea no hay apenas corzos, aunque se han reintroducido en Castellón. Tampoco en Andalucía excepto la población singular de Cádiz y algún aprovechamiento en Málaga. La mayor concentración y capturas de corzos de calidad se han dado, hasta ahora, en la zona de Soria, Burgos y Guadalajara. En capturas, Lugo ha competido con Soria, (la provincia más densa), en estos años anteriores (Garrido, 2014).

Figura N° 1. Área de distribución del corzo en la España peninsular (Palomo *et al.,* 2007 y Acevedo *et al.,* 2010).



En Extremadura, la reintroducción del corzo (*Capreolus capreolus*) en el catálogo de especies cinegéticas de Extremadura es relativamente reciente, aunque a principios del siglo pasado (hasta donde tenemos constancia, imaginamos antes también), estuvo incluso presente en determinadas zonas de la Sierra de San Pedro. En nuestra Región su expansión se inicia con decisión hace un par de decenios, quizás algo más, desde Los Ibores-Villuercas (Matallana), llegándose a visualizar en la actualidad hasta en los riberos del río Almonte (Cáceres) (Habela *et al.,* 2013).

Hasta ahora la caza del corzo en Extremadura había carecido de tradición cinegética, de este modo los aficionados extremeños con posibilidades económicas solían y suelen practicarla en otras regiones de España (Galicia, Asturias, Castilla-León, Castilla-La Mancha, etc.), así como en otros países europeos (Polonia, Hungría, Francia, Reino Unido, etc.). En la actualidad la caza del corzo viene congregando adeptos y se ha popularizado entre los cazadores extremeños, si bien, salvo honrosas excepciones, más preocupados por cazar trofeos que implicados en mejorar la gestión de la especie. La presión cinegética excesiva, las irrespetuosas prácticas en su hábitat llevadas a cabo por el hombre, la competencia con otras especies cinegéticas y domésticas, los problemas sanitarios, etc. hacen peligrar su esperanzador proceso expansivo en Extremadura (Habela *et al*., 2013).

Figura N° 2. El corzo es una especie de creciente interés cinegético y científico (Habela *et al*., 2013).

3.2. Las miasis

El término *"miasis"* fue propuesto por Hope (1840) para definir la infestación por larvas de dípteros en humanos. Zumpt (1965) lo define como: la *"infestación de animales vertebrados y humanos con larvas de dípteros las cuales, por lo menos durante un cierto periodo de tiempo, se alimentan de tejidos vivos y muertos del hospedador, líquidos corporales o alimentos ingeridos".* Desde el punto de vista ecológico se podría también definir como: *"la utilización por parte de determinadas especies de dípteros de tejidos animales vivos como hábitat para completar su ciclo biológico"*

Las miasis cavitarias en los cérvidos se conocen desde la antigüedad, pues Aristóteles (siglo IV a. C.) ya describía este tipo de procesos en los ciervos, pero en los corzos no se han conocido hasta épocas muy recientes y en nuestro país no se detectó su presencia hasta 2001 (Habela *et al.,* 2013).

Las miasis se pueden **clasificar** atendiendo fundamentalmente a 3 criterios (Soler Cruz, 2000):

1.- Comportamiento reproductor

Miasis obligatorias o específicas. Causadas por dípteros parásitos obligados, que necesitan un hospedador para el desarrollo de sus fases larvarias. Se nutren siempre de tejidos vivos, sin tener otro modo de vida que la invasión de éstos.

Miasis semiespecíficas y miasis accidentales. Originadas por dípteros parásitos facultativos u oportunistas. Aunque su medio de vida normal es la invasión de cadáveres y la materia orgánica en descomposición, en ocasiones, de forma facultativa, invaden tejidos vivos.

2.- Punto de vista clínico

Dependiendo de la localización sobre el hospedador, estas especies pueden producir:

Miasis cutáneas. Las larvas se sitúan entre epidermis y dermis.

Miasis profundas. Se produce colonización de los tejidos por las larvas que penetran activamente en el organismo: oculares, oftálmicas, nasofaríngeas, urogenitales.

Un resumen entre la correlación localización/especie sería:

— **Miasis traumáticas**, producidas por: *Megaselia rufipes, Chrysomyia albicans, Phormia regina, Calliphora* spp*., Lucilia* spp*., Sarcophaga* spp*. y Wohlfahrtia magnifica.*

— **Miasis nasales, bucales y sinusales**, producidas por dípteros tales como, *W. magnifica, Sarcophaga carnaria, Calliphora vomitoria, Oestrus ovis, Rhinoestrus purpureus, Pharyngomyia picta, Cephenemyia auribarbis y* ***Cephenemyia stimulator****.*

— **Miasis ocular**, *O. ovis, R. purpureus, M. scalaris, W. magnífica* y *S. carnaria.*

— **Miasis auricular***, O. ovis y W. magnífica*.

— **Miasis anal y vaginal**, *W. magnífica, S. carnaria y Sarcophaga hemoroidalis.*

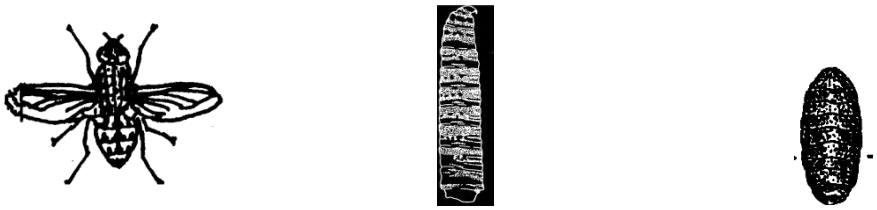
3.- Tipos biológicos y procesos de invasión

Invasor primario. Penetran a través de la piel intacta o aprovechando orificios del hospedador.

Invasor segundario o terciario. Aprovechan discontinuidades traumáticas de la piel. De forma general, se pueden considerar las especies incluidas en las familias Sarcophagidae y Oestridae como parásitas obligadas, productoras de miasis específicas e invasoras primarias, y a las especies de la familia Calliphoridae como semiespecíficas y accidentales e invasoras secundarias y terciarias.

En general, los dípteros productores de miasis presentan varias formas en su ciclo biológico. Un adulto alado, huevo, fase de larva, que pasa por tres estadios, L-I, L-II y L-III, vermiformes y una pupa. Adulto y pupa (se encuentra en el suelo) son fases de vida libre. Sólo las larvas son parásitas (Soler Cruz, 2000).

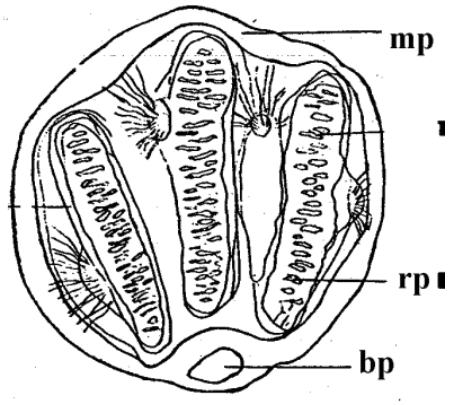
Figura N° 3. Adulto, larva y pupa de díptero (Soler Cruz, 2000).



Adulto **Larva** **Pupa**

El diagnóstico morfológico específico se basa en el estudio de los estigmas respiratorios (peritremas) situados en el último segmento de la larva III. En base a la morfología de membrana peritremal, botón peritremal y ranuras peritremales, puede identificarse la especie de díptero productor de miasis. (Soler Cruz, 2000).

Figura N° 4. Membrana peritremal (mp), botón peritremal (bp) y ranuras peritremales (rp) (Soler Cruz, 2000).



La **Tabla N° 1** incluye una relación de las especies productoras de miasis citadas en España, su distribución geográfica, el hospedador más habitual, y el tipo de miasis, obligatoria o accidental, así como la localización más frecuente en el hospedador (Cordero del Campillo, 1994).

Tabla N° 1. Lista de especies productoras de miasis en España (Cordero del Campillo, 1994).

Especie	Distribución	Hospedador	Tipo miasis
C. vicina	Toda la Península	hombre, animales	Accidental, invasor
C. vomitoria	Toda la Península	hombre, animales domésticos	Accidental, nasal, bucal y sinusal.
C. stimulator	Aún en estudio	corzo	Obligatoria, nasal, bucal y sinusal.
Chrysomyia albiceps	Granada	hombre (cadáveres)	Accidental, traumática
E. diminuta	Toda la Península	mamíferos	accidental
E. tenax	Toda la Península	hombre	accidental
Gasterophilus equi	(ver *G. intestinalis)*	(*G. intestinalis*)	(*G. intestinalis*)
G. haemorrhoidalis	Ávila, Córdoba, Madrid,	caballo, asno, mulo	obligatoria
G. inermis	Córdoba	caballo, mulo	obligatoria
G. intestinalis	Álava, Burgos, Cáceres, Córdoba	caballo	obligatoria
G. nigricornis	Toda la Península	caballo	obligatoria
G. pecorum	Burgos, Cáceres, Castellón, Córdoba	caballo	obligatoria
G. veterinus	Córdoba	caballo, mulo	obligatoria
Hermetia illucens	Alicante, Lérida, Tenerife y Valencia	hombre	accidental**,** intestinal
Hypoderma bovis	Toda la Península	vacuno, equino, hombre	obligatoria
H. diana	Cáceres, Ciudad Real y Córdoba	ciervo, corzo	obligatoria
H. lineatum	Badajoz, Córdoba, Salamanca, y Soria.	Vacuno, ciervo, hombre	obligatoria
Lucilia ampulacea	Asturias, Cantabria**,** Huesca, Granada Pontevedra	desconocido	accidental
L. caesar	Toda la Península	Mamíferos	accidental
Oestrus ovis	Toda la Península	ovejas, cabras, hombre	Obligatoria, nasal, bucal, sinusal, ocular y auricular.
P. sericata	Toda la Península	oveja	accidental
Pharyngomyia picta	Cáceres, Ciudad Real, Córdoba, Jaén y Toledo	ciervo	obligatoria
Phormia regina	Toda la Península	mamíferos	accidental, traumática
Rhinoestrus. purpureus	Andalucía	bóvidos y équidos	obligatoria, nasal, bucal
S. carnaria	Toda la Península	oveja, hombre?	accidental, nasal, bucal
Wohlfahrtia bella	Canarias	desconocido	obligatoria
W. magnifica	Excepto Norte Peninsular	Hombre, cabra y oveja	Obligatoria

3.3. *Cephenemyia stimulator*

Cephenemyia stimulator es una mosca perteneciente a la familia de los Oestridos (Clark, 1815). Es un parásito díptero que causa miasis cavitaria con elevada especificidad por el corzo (Zumpt 1965). Ullrich (1936) fue el primero en destacar la importancia veterinaria de este parásito debido a la repercusión clínica en sus hospedadores. Otras especies del género se han descrito en cérvidos silvestres, tales como *C. auribarbis* en ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y gamo (*Dama dama*), *C. trompe* en Reno (*Rangifer tarandus*) y *C. ulrichii* en alces (*Alces alces*) (Zumpt 1965, Nilssen *et al.,* 2008).

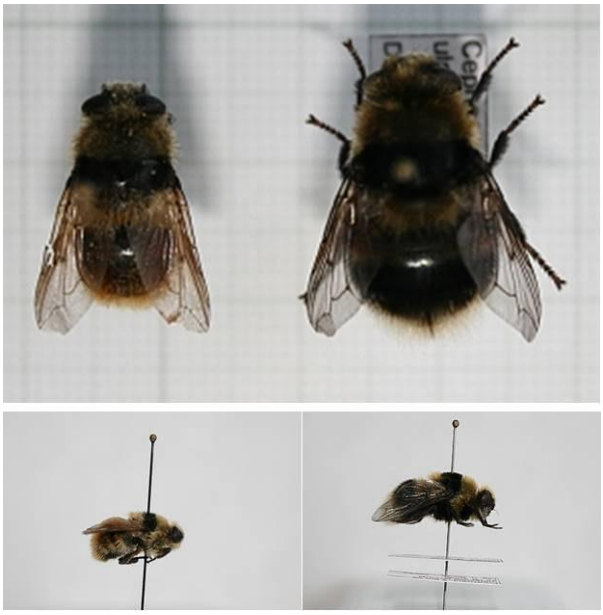
Tabla N° 2. Encuadre taxonómico de *Cephenemyia stimulator*

Phylum Arthropoda
Subphylum Hexapoda
Clase Insecta
Orden Diptera
Suborden Brachycera
Familia Oestridae
Género *Cephenemyia*
Especie *Cephenemyia stimulator*

La **morfología** de *C. stimulator* fue descrita por Ullrich en 1936 y por Zumpt en 1965:

Imago. Apariencia similar a la de un abejorro. Abdomen con pelos amarillentos-rojizos y en la región bucal de color amarillo-blanquecino. Ojos ampliamente separados en ambos sexos. A diferencia de *C. trompe* carece de surco antenal. Cuerpo de longitud de 13-17 mm.

Figura N° 5. Imago de *C. stimulator* (Jogisalu I., 2010).



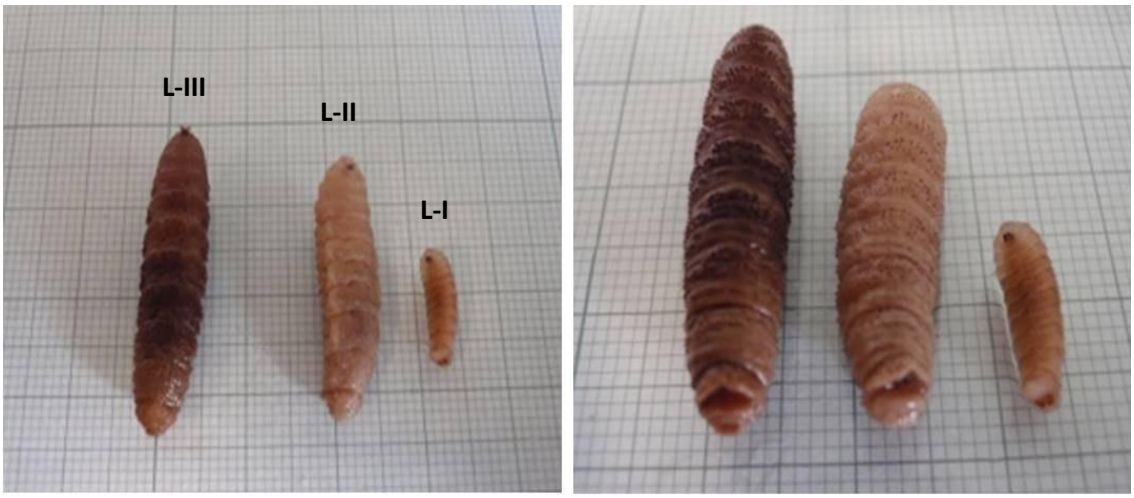
Larva I. Según Ullrich (1936) los lados ventral y dorsal de los segmentos II a XII presentan numerosas filas de dentículos. Las larvas recién eclosionadas son de aproximadamente 1 mm de largo, y antes de convertirse en larva II puede llegar a alcanzar una longitud de hasta 3 mm.

Larva II. Puede llegar a alcanzar una longitud de hasta 13 mm. Según Ullrich el lado dorsal presenta menor densidad de espinas que en el estadio larvario I. El décimo segmento está desnudo (sin espinas), el undécimo a veces desnudo también o provisto de un máximo de cuatro hileras de espinas. Ventralmente la larva presenta mayor densidad de espinas que en la parte dorsal, y desde el segmento III al XI presenta de cinco a ocho hileras de espinas. Los peritremas posteriores presentan una forma ovalada.

Larva III. La larva madura puede llegar a alcanzar una longitud de hasta 30 mm. Es de color marrón oscuro casi negro, a diferencia de las larvas inmaduras, que presentan una coloración amarillenta. Todo el cuerpo está densamente cubierto de espinas, pero los segmentos V a IX presentan sólo cinco o seis filas de espinas dorsales, mientras que ventralmente presentan de siete a ocho filas. Los peritremas posteriores presentan una forma arriñonada.

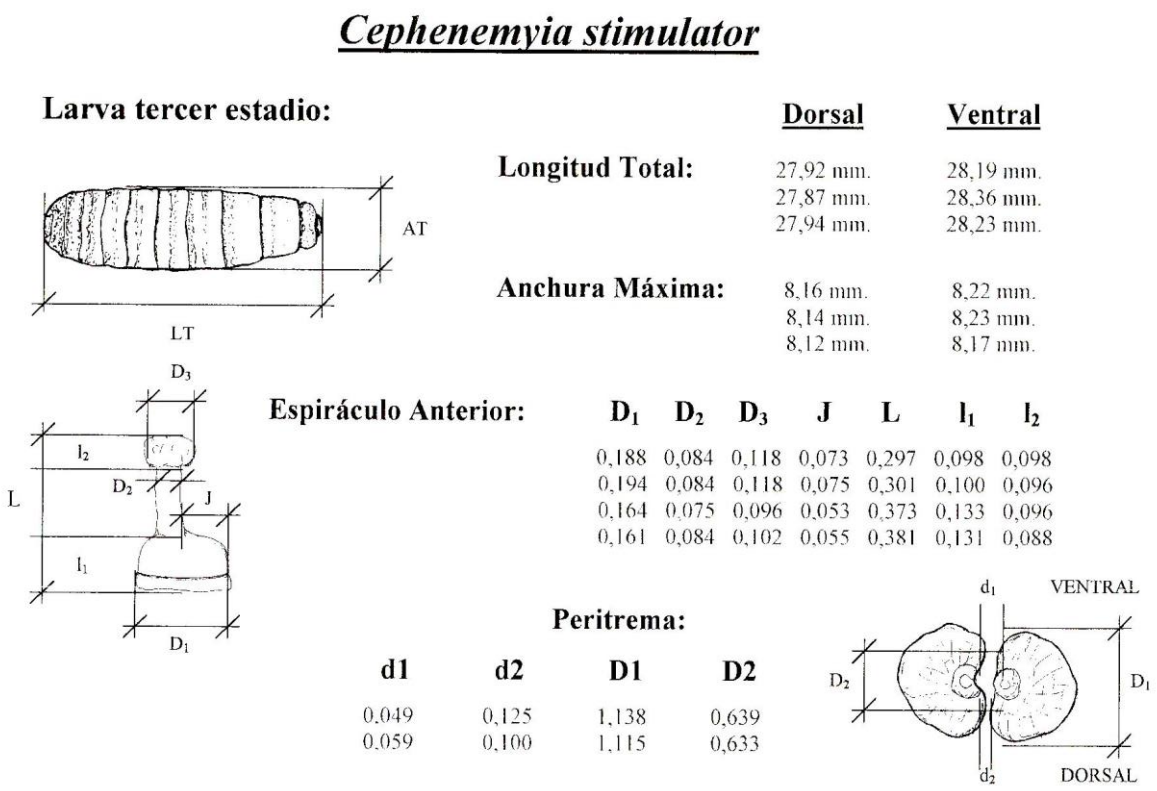
Pupa. Es de color negruzco y presenta una longitud de 16-20mm. Se trata de la última etapa larval que dará lugar al imago.

Figura N° 6. Estadios larvarios I, II, III de *C. stimulator* (Jogisalu I., 2010).



En 2001, Notario y Castresana en el primer hallazgo de *C. stimulator* en corzos de la Península Ibérica, hicieron un estudio de las características morfométricas de las larvas que encontraron: las larvas III obtenidas presentaron una longitud media de 28mm, mientras que su anchura fue de 8,17mm. El espiráculo anterior, ensanchado en su base y aparentemente no centrado en ella, medía 0,34mm de longitud, 0,18mm de diámetro en su base y 0,11mm en su ápice externo. El peritrema posterior, de forma arriñonada, presentó una media de 1,13mm en su diámetro mayor; la separación entre sus extremos anteriores y posteriores fue de 0,055mm y 0,11mm respectivamente.

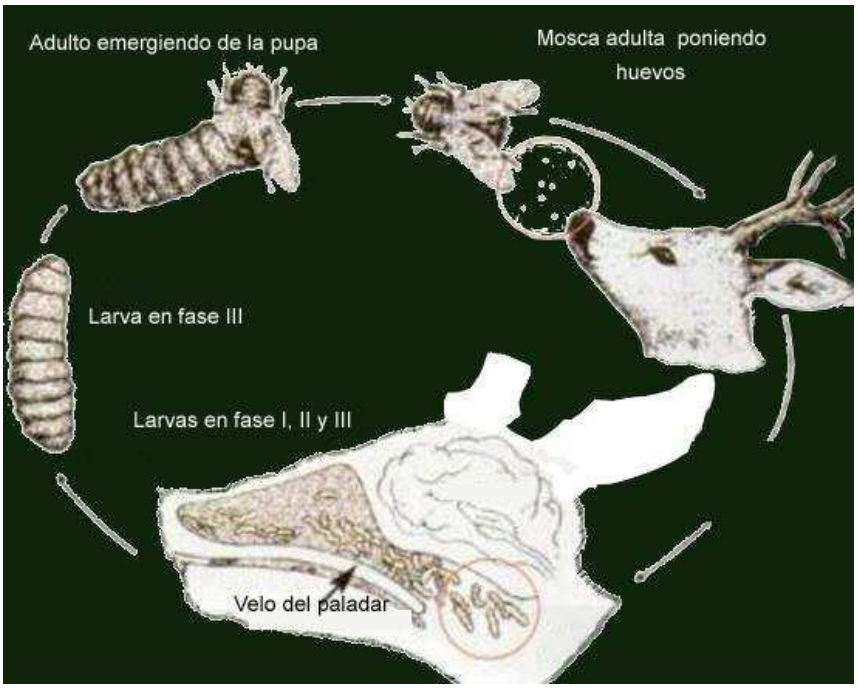
Figura N° 7. Características morfométricas de *C. stimulator* (Notario y Castresana, 2001).



Para el control de parásitos resulta imprescindible conocer su biología, por ello, vamos a tratar de resumir a continuación el **ciclo biológico** de esta mosca: *Cephenemyia stimulator* es parecida a un abejorro (13-17 mm) con cabeza y ojos grandes, antenas pequeñas y cuerpo cubierto de pelos de color amarillento-anaranjado incluso ligeramente rojizos. Los adultos son buenos voladores, lo hacen preferentemente en espacios abiertos, no se alimentan y en determinados países como Alemania se encuentran activos desde junio a final de septiembre, preferentemente durante la mañana y entre las 11-12 A.M., muy posiblemente existan variaciones con respecto a nuestro país y también entre nuestras regiones, pues debido a nuestra climatología es de esperar que el ciclo comience antes y concluya después, a medida que nos desplazamos hacia el sur. Los machos viven una media de 5 días, tiempo que emplean en copular. Las hembras viven unos 16 días y una vez fecundadas (pueden albergar hasta 500 larvas en su abdomen) buscan a los corzos (hospedador específico) depositando sus larvas-I (L-I, 1-3 mm de longitud) en los ollares; éstas se adentran y localizan

en senos nasales y paranasales, donde pueden permanecer en letargia durante meses, posteriormente se desarrollan y mudan a larvas-II (L-II, 3-13 mm de largo) y larvas-III (L-III, 13-30 mm de largo) en laringe y faringe, hasta abandonarlos a final de la primavera del año siguiente, para a continuación formar las pupas de las cuales al cabo de pocas semanas emergerán los nuevos adultos, tratándose por tanto de un ciclo biológico interanual (Zumpt, 1965 y Colwell, 2001).

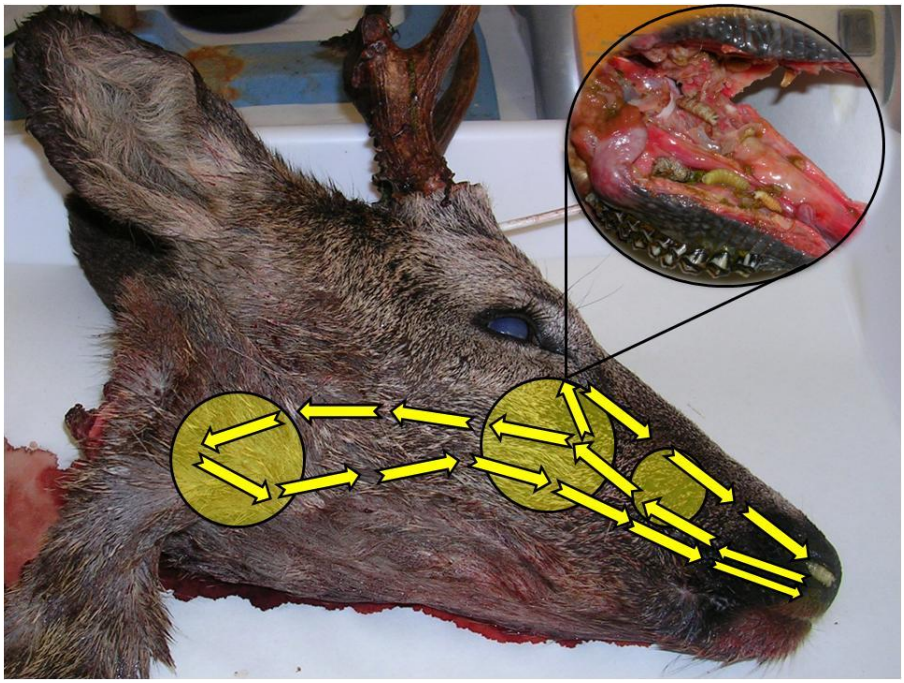
Figura N° 8. Ciclo biológico de *C. stimulator* (Anónimo, 2011).



Desde el punto de vista **patológico**, además del estrés que la mosca ocasiona a los corzos durante la larviposición, cabe destacar una serie de síntomas derivados de la presencia de las larvas en vías respiratorias altas, más o menos intensos dependiendo del estadio larvario, (a mayor tamaño de la larva, más dificultad respiratoria e irritación/ulceración de las mucosas del paraje orgánico donde se ubiquen), número de larvas alojadas, localización y resistencia del hospedador. Son frecuentes las disneas respiratorias, toses, estornudos, problemas de deglución y asfixias en los casos de parasitaciones masivas. Las larvas se alimentan de secreciones mucosas, sangre y provocan descargas nasales a veces sanguinolentas, también se puede apreciar sinusitis, laringitis,

faringitis y en ocasiones bronconeumonías al pasar las larvas al árbol bronquial, pudiéndose complicar el cuadro y tener severas consecuencias cuando participan en el proceso otros nematodos parásitos o gérmenes neumotropos, habituales en el pulmón de estos ungulados (Cogley, 1987).

Figura N° 9. Localización y trayecto seguido por las larvas en las cavidades nasofaríngeas (Habela *et al.,* 2013).



Las diferentes publicaciones consultadas al respecto coinciden en afirmar que los jóvenes son más vulnerables debido a su menor capacidad inmune y menor habilidad para evadir los ataques de la mosca, seguidos por los machos (sin diferencia entre grupos de edad), lo cual pudiera relacionarse con el esfuerzo que ponen en custodiar sus territorios, estrés social, perdidas de energía y por las bajadas de defensas que conlleva el apareamiento, lo que conduce a una predisposición por inmunocompromiso (Király, 2007).

Aunque por lo general se considera que se trata de una parasitosis de baja gravedad para el corzo en bajas cargas parasitarias, existen múltiples evidencias de que su primera aparición puede llevar aparejada una acusada elevación de la tasa de mortalidad. Se ha asociado esto a un estado previo de

desequilibrio poblacional, por el mantenimiento de densidades elevadas y en una situación no balanceada con el medio natural (problemas de estructura de sexos y edades, disponibilidad de recursos, estrés poblacional, etc.) (Cogley, 1987).

Finalmente, otro aspecto que conviene aclarar es que no existe riesgo para la población humana. Es decir, *Cephenemyia stimulator* no es causa zoonosis (Habela *et al.,* 2013).

Con respecto a la **prevención y tratamiento**, cabe decir que no existe ninguna medida o tratamiento que resulte medianamente eficaz por las complicaciones derivadas de su aplicación en este tipo de poblaciones silvestres, por tanto, se debe confiar en el natural desarrollo de la inmunidad natural y el restablecimiento de la población por mecanismos de selección natural. Los corzos de amplias zonas de Europa conviven desde hace milenios con este parásito sin que aparentemente les suponga mayores problemas. No obstante, es esperable que esa situación de equilibrio entre hospedador y parásito tarde algunos años en alcanzarse una vez establecida la enfermedad (Anónimo, 2011).

En parte si es posible prevenir su aparición mediante el establecimiento de estrategias de gestión y manejo que incidan en mantener situaciones del mejor balance con el medio, de equilibrio entre sexos y una adecuada distribución de edades. Para ello, deben mantenerse densidades medias o incluso bajas ante la llegada previsible del parásito, para que así el estado de salud general sea el mejor posible (Anónimo, 2011).

Se recomienda la puesta en práctica de medidas de vigilancia epidemiológica en las poblaciones de corzos de nuestro país, y el diseño de pautas estrictas de bioseguridad en las translocaciones, especialmente de animales provenientes de zonas afectadas (Habela *et al*., 2013).

3.4. Antecedentes históricos de la enfermedad

Hace más de dos décadas y precisamente como consecuencia del interés mostrado por la administración competente del momento y contando con su inestimable colaboración, se tuvo la oportunidad de realizar algunos estudios parasitológicos sobre 12 corzos de Extremadura (Coto Regional de Matallana, Cáceres). Así, se reveló la presencia de diversos tipos de parásitos en este hospedador, poco estudiado en nuestro país y menos aún en nuestra región. Estos hallazgos fueron presentados en el 32º Simposium Internacional sobre Fauna Silvestre celebrado en Eskilstuna (Suecia) en el año 1990 (Navarrete *et al.* 1990).

En este estudio se obtuvieron resultados interesantes, pues se identificaron parásitos que hasta la fecha no habían sido descritos para este hospedador en la Península Ibérica. Cabe destacar al respecto, la observación de protozoos musculares como *Sarcocystis capreolicanis* y larvas de tenidos de localización en serosas abdominales identificadas como *Cysticercus tennuicollis*; el primero de ellos ha sido recientemente detectado en elevadas cantidades en musculatura cardíaca y esquelética en corzos de Galicia. Ambos parásitos están íntimamente asociados a perros y carnívoros salvajes, pues estos actúan en su ciclo biológico como hospedadores definitivos de las formas parasitas adultas. También se observó la presencia de nematodos (gusanos redondos) tanto a nivel de aparato digestivo como de vías respiratorias, en algunos casos en cantidades preocupantes como para comprometer la vida de los animales. Destacamos igualmente la identificación de diferentes especies de garrapatas, entre ellas algunas de especial relevancia (*Ixodes ricinus*) por su papel desempeñado en la transmisión de determinados patógenos que pueden afectar también a los humanos (zoonosis), como es el caso de las borrelias causantes de la Enfermedad de Lyme. Esta dolencia ha sido frecuentemente diagnosticada en el norte de España, aunque en Extremadura a día de hoy no es muy prevalente, sin embargo, es considerada en determinadas zonas de Estados Unidos como una de las principales enfermedades infecciosas. En Europa la presencia de esta enfermedad, inicialmente se asoció a los corzos, pero en realidad los reservorios

de la bacteria son estas garrapatas, las cuales están presentes en zonas boscosas y húmedas; los helechos son buenos indicadores de la existencia de unos y otras, por tanto conviene extremar las precauciones cuando frecuentemos este tipo de hábitat. Por último, señalar la observación de larvas de moscas (género *Hypoderma*, Oestridae) en tejido subcutáneo de algunos corzos capturados en primavera, similares a los "barros" descritos para el ganado bovino. Sin embargo, en aquella ocasión no se detectó la presencia del parásito que nos ocupa en este estudio y que en los últimos años ha sido motivo de conversaciones en los correspondientes ambientes cinegéticos al ser implicado en el descenso de las poblaciones de corzos en nuestra región y fuera de ella, ya que su observación en senos nasales y faringe ha resultado ser frecuente por los propios cazadores, e incluso algunos comentan que los oyen estornudar/toser durante los recechos como consecuencia de la presencia de las larvas en vías respiratorias altas (Habela *et al.,* 2013).

La enfermedad que las larvas de *C. stimulator* producen en los corzos (Zumpt 1965) es conocida en ambientes corceros como *"La Enfermedad del gusano del Corzo"* como se comentó anteriormente. En nuestro país la primera descripción que se realiza de este parásito fue publicada por Notario y Castresana en 2001. En esta ocasión se trataba de corzos procedentes de Francia y trasladados en la primavera de 1997 a la finca "La Rivera Alta" de Ciudad Real. A finales de junio se pudieron observar estas larvas en corzos aislados en cercas y en período inicial de adaptación, recién muertos. Concluyen estos autores que el poco espacio de tiempo transcurrido desde su llegada hasta la observación de las larvas, hace pensar que estas ya se encontraban asentadas en los animales antes de su introducción en España.

En 2004-05 fue detectada su presencia en el concejo de Valdés (noroeste de Asturias), siendo publicado este hallazgo en el Boletín de la Asociación del Corzo Español nº 11 en 2009, tras ser identificada la especie por el Dr. Lucientes (Facultad de Veterinaria, Zaragoza). Según esta información los corzos parasitados procedían de zonas al norte del Pirineo. En 2011, se detectó su

presencia en otras zonas de Asturias, provincias de Lugo (Ancares y otras), León (El Bierzo, Babia, Omaña, Laciana, etc.), Palencia y Burgos, pensando en todo caso que su presencia se debe a la introducción irregular de corzos procedentes de zonas endémicas, lo cual parece razonable hasta cierto punto; de cualquier modo y aunque estas prácticas se hayan efectuado puntualmente no han sido generalizadas, y según nuestra opinión también debería tenerse en consideración el incremento del interés general (sirva de ejemplo la constituida Asociación del Corzo Español dotada de abundantes medios de difusión: Boletín, página web, etc.) y no sólo cinegético, sino también científico, socio-económico, etc., despertado por esta especie, lo que ha propiciado la realización de estudios de toda índole, avances en los conocimientos acerca del corzo y consecuentemente mejoras en su gestión, lo cual ha favorecido el innegable aumento de sus poblaciones y por extensión los problemas sanitarios. Por tanto, e independientemente de un origen remoto del parásito en nuestro país o como consecuencia de las translocaciones sin medidas de bioseguridad previas, pensamos que, en la actualidad, *C. stimulator* se encuentra asentada en las poblaciones de corzos del norte y centro, con ramificaciones hacia el sur peninsular con consecuencias que pudieran llegar a ser graves debido al daño que ocasiona y a las dificultades que entrañan su control (Habela *et al.,* 2013).

3.5. Situación actual de la enfermedad

La Oestrosis del corzo es un proceso parasitario muy frecuente en países Centroeuropeos como Hungría, República Checa y Francia, con prevalencias del 34,6%, 44% y 68% respectivamente (Király y Egri 2007; Curlik *et al*., 2001; Maes y Boulard, 2001).

En España, en base a los datos provisionales del estudio "Bases epidemiológicas para el control de *Cephenemyia stimulator* en corzos en España", promovido por FEDENCA (Fundación para el Estudio y la Defensa de la Naturaleza y la Caza), se comprobó que en nuestro país están afectados el 21% de los corzos y que la gran mayoría de los ejemplares parasitados se encuentran en el noroeste peninsular (Fidalgo *et al.,* 2012).

La prevalencia en este estudio fue estimada en el 20,79% (47 de 226 corzos examinados). Además, se destacó que la gran mayoría de los corzos con larvas de *Cephenemyia stimulator* procedían del noroeste peninsular (Galicia, Asturias y León), donde 43 de los 143 estudiados estaban parasitados (30,06%). Para el resto de los corzos analizados (84), procedentes fundamentalmente de ambas Castillas, se cifró la prevalencia en el 5,95% (5 de 84) (Fidalgo *et al.,* 2012).

Tabla Nº 3. Nº de casos estudiados en las diferentes provincias y % de corzos afectados por *C. stimulator* (tomado de Fidalgo *et al.,* 2012).

PROVINCIA/CCAA	TOTAL DE CASOS	POSITIVOS	% AFECTADOS
Asturias	8	2	25
Burgos	20	0	0
Ciudad Real	1	0	0
Guadalajara	15	2	13,33
La Coruña	16	0	0
León	47	15	31,91
Lérida	3	0	0
Lugo	58	26	44,82
Madrid	1	0	0

Orense	9	0	0
Palencia	1	1	100
Pontevedra	6	0	0
Segovia	13	0	0
Sevilla	1	0	0
Soria	24	1	4,16
Zamora	4	0	0
TOTAL	**226**	**47**	**20,79**

Estos resultados parciales, son un indicio de que, aunque la mayoría de los corzos parasitados son del noroeste peninsular (y más concretamente en las provincias de Lugo, Asturias y León), nos encontramos frente a un problema sanitario que podría afectar a todas las zonas del centro peninsular en donde hay corzos y, por tanto, es presumible que también se encuentren animales parasitados por *Cephenemyia stimulator* en provincias con poblaciones de corzos que aún no han sido muestreadas en el marco del estudio realizado por FEDENCA (Fidalgo *et al.,* 2012).

Esto se confirma con el presente estudio, en el que se citan los trece primeros casos de parasitación por larvas de *C. stimulator* en corzos de Extremadura, lo que sugiere una posible adaptación de *C. stimulator* a las condiciones ecológicas de la mitad sur de la Península Ibérica.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Muestreos

Desde mayo de 2012 a mayo de 2016 se han muestreado trece corzos (Tabla N° 4) procedentes de diferentes cotos de la provincia de Cáceres.

En mayo de 2012, la Patrulla del Seprona de Guadalupe perteneciente a 2032ª Comandancia de la Guardia Civil, traslada a la Facultad de Veterinaria de la UEX en Cáceres, dos corzos machos adultos. El primero de ellos procedía de un coto privado (39º24´ N, 5º32' W) de Berzocana (Cáceres) y el segundo del Coto Local "Los Pinos" (39°19´ N, 5°22´ W) del término municipal de Logrosán (Cáceres).

En mayo de 2013, nos llegan dos corzos machos. El primero de ellos nos lo envió la Patrulla del Seprona de Guadalupe procedente de un coto privado (39°25' N, 5°29' W) de Berzocana (Cáceres). El segundo nos lo remitió un antiguo alumno de la Universidad de Extremadura procedente de un coto local (39°17' N, 5°40' W) de Zorita (Cáceres).

En mayo de 2015, colaboradores del Departamento de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, nos remiten a la Facultad de Veterinaria de Cáceres cuatro corzos machos. Tres de ellos, procedentes de un coto privado (39°26' N, 5°45' W) de Madroñera (Cáceres) y uno de un coto privado (39°24' N, 5°37' W) de Garciaz (Cáceres).

El 15 de junio de 2015 la Patrulla del Seprona de Guadalupe envía a la Unidad de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres un corzo macho procedente de un coto privado (39°27' N, 5°19' W) de Guadalupe (Cáceres).

Finalmente, en mayo de 2016, nos remiten a la Unidad de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, larvas de cuatro corzos machos. Dos de ellos, procedentes de un coto privado (39°26' N, 5°45' W) de Madroñera (Cáceres) y otros dos de un coto privado (39°24' N, 5°37' W) de Garciaz (Cáceres).

Tabla Nº 4. Corzos pertenecientes a la provincia de Cáceres muestreados en este estudio.

Número de casos	Tipo de corzo	Fecha	Lugar
Caso 1	Corzo adulto macho	14 de mayo de 2012	Berzocana
Caso 2	Corzo adulto macho	27 de mayo de 2012	Logrosán
Caso 3	Corzo adulto macho	23 de mayo de 2013	Berzocana
Caso 4	Corzo adulto macho	28 de mayo de 2013	Zorita
Caso 5	Corzo adulto macho	18 de mayo de 2015	Madroñera
Caso 6	Corzo adulto macho	18 de mayo de 2015	Madroñera
Caso 7	Corzo adulto macho	18 de mayo de 2015	Madroñera
Caso 8	Corzo adulto macho	18 de mayo de 2015	Garciaz
Caso 9	Corzo adulto macho	15 de junio de 2015	Guadalupe
Caso 10	Corzo adulto macho	8 de mayo de 2016	Madroñera
Caso 11	Corzo adulto macho	18 de mayo de 2016	Madroñera
Caso 12	Corzo adulto macho	18 de mayo de 2016	Garciaz
Caso 13	Corzo adulto macho	18 de mayo de 2016	Garciaz

Figura N° 10. Localización de los casos de infestación por *Cephenemyia stimulator* en corzos de Extremadura:

Corzo 1: Macho, adulto, capturado el 14 de mayo de 2012 en un coto privado (39º24´ N, 5º32' W) de Berzocana (Cáceres). **Corzo 2**: Macho, adulto, capturado el 27 de mayo de 2012 en un coto local (39°19´ N, 5°22´ W) de Logrosán (Cáceres). **Corzo 3:** Macho, adulto, capturado el 23 de mayo de 2013 en un coto privado (39°25' N, 5°29' W) de Bezocana (Cáceres). **Corzo 4:** Macho, adulto, capturado el 28 de mayo de 2013 en un coto local (39°17' N, 5°40' W) de Zorita (Cáceres). **Corzos 5, 6 y 7:** Machos, adultos, capturados el 18 de mayo de 2015 en un coto privado (39°26' N, 5°45' W) de Madroñera (Cáceres). **Corzo 8:** Macho, adulto, capturado el 18 de mayo de 2015 en un coto privado (39°24' N, 5°37' W) de Garciaz (Cáceres). **Corzo 9:** Macho, adulto, capturado el 15 de junio de 2015 en un coto privado (39°27' N, 5°19' W) de Guadalupe (Cáceres). **Corzos 10 y 11:** Machos, adultos, capturados el 8 y 18 de mayo de 2016 en un coto privado (39°26' N, 5°45' W) de Madroñera (Cáceres). **Corzos 12 y 13:** Machos, adultos, capturados el 18 de mayo de 2016 en un coto privado (39°24' N, 5°37' W) de Garciaz (Cáceres).

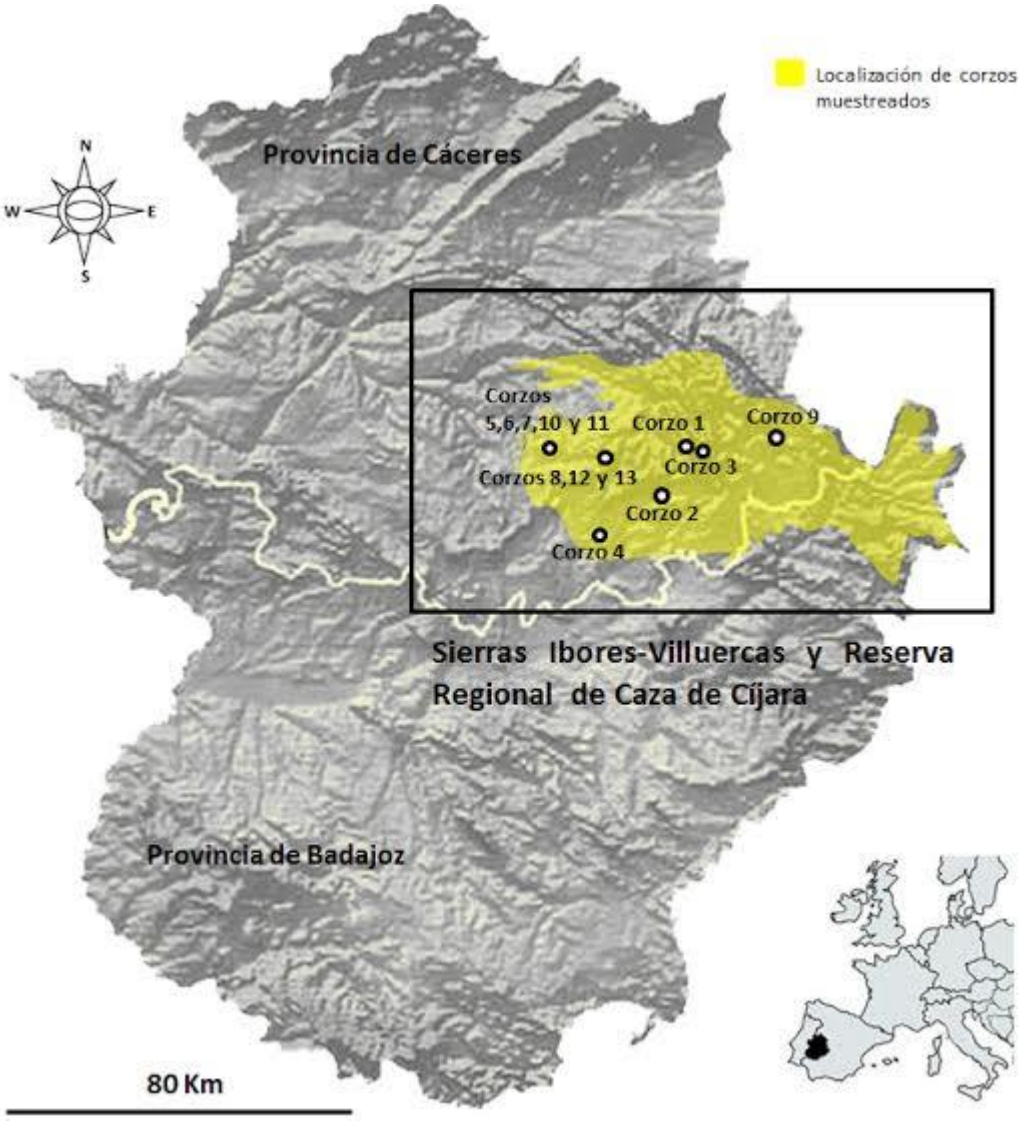


Figura Nº 11. Mapa de la situación geográfica de Berzocana, Cáceres (Google maps). Berzocana se sitúa en las faldas de La Sierra de las Villuercas, cuenta con una superficie de 133,59 km cuadrados, una altitud de 728 metros, 39º26'16" N de latitud y 5º27'43" W de longitud. (Google maps).

Figura Nº 12. Mapa de la situación geográfica de Logrosán, Cáceres (Google maps). Logrosán es la capital de la mancomunidad Villuercas-Ibores-Jara, tiene una superficie de 365,3 km cuadrados, una altitud de 477 metros, 39º20'14" N de latitud y 5º29'32" W de longitud. (Google maps).

Figura N° 13. Mapa de la situación geográfica de Madroñera, Cáceres (Google maps). Madroñera está situada en las tierras de la Sierra de las Villuercas, cuenta con una superficie de 132,91 km cuadrados, una altitud de 589 metros, 39°25’31” N de latitud y 5°45’26” W de longitud. (Google maps).

Figura N° 14. Mapa de la situación geográfica de Garciaz, Cáceres (Google maps). Garciaz tiene una superficie de 150,28 km cuadrados, una altitud de 650 metros, 39°24’49” N de latitud y 5°37’36” W de longitud. (Google maps).

Figura Nº 15. Mapa de la situación geográfica de Guadalupe, Cáceres (Google maps). Guadalupe se sitúa en la mancomunidad Villuercas-Ibores-Jara, cuenta con una superficie de 68,2 km cuadrados, una altitud de 640 metros, 39º27'00" N de latitud y 5º19'00" W de longitud. (Google maps).

4.2. Material y Métodos

El material utilizado en este estudio es el que se utiliza habitualmente en un muestreo de campo, material fungible desechable de plástico (guantes, tubos, etc.) y diverso material quirúrgico (pinzas, bisturí, tijeras, etc.).

En el laboratorio empleamos estereomicroscópios como herramienta fundamental para la identificación microscópica de las larvas encontradas.

4.2.1. Necropsia

A todos los cadáveres se les practicó la correspondiente necropsia reglada que resumimos a continuación:

En primer lugar, examinamos externamente al animal para comprobar el estado general y la posible presencia de parásitos externos (garrapatas etc.).

Seguidamente, se recogen heces del propio recto del animal para su posterior examen coprológico utilizando las correspondientes técnicas de diagnóstico parasitológico convencional.

En segundo lugar, procedemos a la evisceración del animal y examen detallado de las vísceras. También, se recogen las muestras necesarias de vísceras para el estudio bacteriológico en el Departamento de Patología Infecciosa de la Facultad de Veterinaria de Cáceres.

El paso siguiente consiste en separar la cabeza del cuello. Para ello, cortamos a nivel de la unión de la primera vértebra cervical (atlas) con los cóndilos del occipital. Una vez separada la cabeza, podemos ver la apertura posterior de la cavidad nasal (coanas), observándose ya en algunas ocasiones larvas en los corzos parasitados, aunque hay veces que se encontrarán en posiciones más profundas y no las veremos.

Finalmente, seccionamos la cabeza longitudinalmente desde el ángulo dorsal de la protuberancia occipital en el borde rostral del hueso nasal, permitiendo un examen completo y detallado de las cavidades nasales, faríngeas y senos paranasales.

Figura N° 16. Apertura posterior de la cavidad nasal con larvas de *C. stimulator*.

Todas las larvas encontradas se recogen y lavan con solución salina para posteriormente ser mantenidas en un tubo con alcohol de 70°. Tras su recolección, se procede a su contaje e identificación utilizando las claves dicotómicas correspondientes (Zumpt, 1965). Las larvas III más desarrolladas se ponen en terrarios (pupario) para que puedan completar el ciclo y dar lugar a los imagos.

4.2.2. Técnicas de diagnóstico parasitológico

Las técnicas de diagnóstico parasitológico que hemos utilizado en este trabajo han sido: técnicas coprológicas convencionales (flotación, sedimentación y contaje *McMaster*) y el examen de vísceras para tratar de hallar formas parasitarias en su localización orgánica. Como referencia para su realización, hemos utilizado el Manual Práctico de Parasitología Veterinaria (Serrano *et al.*, 2010).

4.2.3. Estudio molecular de larvas de Oéstridos

La identificación molecular de larvas de Oéstridos se realizó mediante secuenciación del gen mitocondrial que codifica para la **citocromo *c* oxidasa I** (abreviado: *COX I*). Después de la secuenciación se procedió a comparar las secuencias obtenidas con aquellas secuencias disponibles del mismo gen en bases de datos públicas para especies del mismo género existentes en bases de datos de secuencias (DDBJ/EMBL/GenBank en el "International Nucleotide Sequence Collaboration databases") del NCBI ("National Center for Biotechnology Information"). El rastreo de bases de datos se realizó usando la opción "BLAST Search" en el software MEGA 6.06 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, y Kumar 2013). Por un lado, el tamaño relativamente grande de este gen y por otro lado, la presencia de regiones molecularmente variables observadas en estudios previos (Otranto *et al.* 2003) sugieren que el gen COX I podría ser útil para analizar a nivel molecular las larvas recogidas en los corzos.

Así, hemos caracterizado la porción (688 pb) más variable del gen COX I, que se localiza en la región que abarca desde el bucle externo 4 (E4) hasta la secuencia -COOH terminal. Esta región será amplificada por PCR utilizando un

juego de cebadores (Zhang y Hewitt, 1996). Los datos obtenidos nos servirán para la identificación molecular de las larvas y realizar el análisis filogenético posterior.

4.2.3.1. Muestras

Las muestras analizadas en este estudio fueron un total de ocho larvas (n= 8) de Oéstridos en estadio de desarrollo L-3 (previo a pupa) obtenidas de ocho corzos (*Capreolus capreolus*). Además, se incorporó una larva (n=1) de oéstrido de ciervo (*Cervus elaphus*) que se utilizará como muestra control positivo tanto para el proceso de PCR como el de secuenciación. La identificación morfológica de las larvas de corzo ha sido realizada utilizando las claves dicotómicas de Zumpt (1965) y observadas bajo luz directa usando una lupa binocular. De acuerdo con este examen se determinó que las larvas estudiadas se corresponden con las siguientes especies de oéstridos:

- Muestras de corzo: *Cephenemyia stimulator* (n=8).
- Muestra de ciervo: *Pharyngomyia picta* (n=1).

Todas las larvas se almacenaron en tubos con etanol 70% para su conservación y posterior estudio genético. Además, cada una de ellas se registró de forma separada al pertenecer a un animal diferente y, también, por proceder de distintos orígenes geográficos.

Figura N° 17. L-III utilizadas para el estudio molecular.

4.2.3.2. Extracción de ADN molde

Se extrajo material genético de las larvas usando sus tejidos conservados. Se tomaron de 20-30 mg de tejido de cada larva. Cada tejido se disgregó individualmente en un tubo cónico estéril de tipo eppendorf (1,5 ml) mediante un protocolo de extracción de ácidos nucleicos basado en lisis con detergentes y proteinasa K (Martínez et al., 2002 y Fernández-García, 2012), pero usando columnas Zymo-Spin IIC (Zymi Reseach Corporation, Irvine, CA 92614, USA) para mejorar la purificación del ADN. El ADN se eluye de la columna con 300 µL de agua grado biología molecular (Accugene©). El ADN fue evaluado visualmente mediante electroforesis submarina en gel de agarosa al 0,8% (m/v) en TBE 0.5X teñido con bromuro de etidio.

4.2.3.3. Cebadores PCR

Para las amplificaciones mediante PCR se utilizaron un par de cebadores evolutivamente conservados y de uso general en muchos insectos diseñados por Zhang y Hewitt (1997) (Tabla N° 5). Así asumimos en primera instancia que podrían garantizar en cierta medida el éxito de la amplificación del COX I en nuestras muestras, sin más estudios o pruebas previas.

Tabla N° 5. Cebadores utilizados en el estudio molecular.

Cebadores Oestridae del gen COI			
Nombre	**Posición relativa**	**Secuencias cebadoras**	**Tamaño**
OVIS-UEA7	E4	5´-TACAGTTGGAATAGACGTTGATAC-3´	688 pb
OVIS-UEA10	tRNAleu	5´-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3´	

4.2.3.4. Amplificación mediante PCR convencional

El fragmento del gen COX I se obtuvo mediante PCR convencional utilizando los cebadores indicados en la Tabla N° 5.

Materiales

-Termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems)
-Tubos de 1,5ml
-Tubos AXYGEN de 0,2ml
-Pipetas de 0.5-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL y de 20-200 µL
-Guantes de látex sin polvo.

Reactivos

-Taq DNA polimerasa
-Buffer 10X de la reacción
-$MgCl_2$ 50mM
-Cebadores (OVIS-UEA7 y OVIS-UEA10)
-dNTPs
-Agua MilliQ

La **reacción de la PCR convencional** se llevó a cabo usando las condiciones modificadas sobre las descritas por Zhang y Hewitt (1997) por nosotros. Aproximadamente se usó como molde 50-100ng de ADN molde (1 µL) que se añadió a un volumen total de reacción de 10 µL por cada muestra. En el experimento se reservó siempre un último tubo como control negativo.

La pre-mezcla de PCR convencional se preparó de acuerdo con el siguiente protocolo (Tabla N° 6):

Tabla Nº 6. Protocolo de elaboración de la pre-mezcla de PCR convencional.

Reactivos	Concentración Inicial	Volúmenes
Tampón de reacción (proveedor)	10X	10 µL
dNTPs (elaboración propia)	10X	10 µL
OVIS-UEA7	2,5 µM	10 µL
OVIS-UEA10	2,5 µM	10 µL
Mg Cl_2	50 mM	5 µL
H_2O (Accugene©)		55 µL
Polimerase (Supreme, NZYTECH®)	5 ud/µL	0,4µL
Total disponible		100,4 µL
Volumen premezcla		10 µL
Volumen ADN		1 µL
Volumen de reacción		11 µL

Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: predesnaturalización a 95 º C durante 5 minutos y 35 ciclos [94 ºC: 60 s, 50 ºC: 60 s, 72 ºC: 90 s], y una extensión final a 72 º C durante 7 minutos. Nota [Tª desn.: t desn., Tª anillado: t anillado, Tª extensión: t extensión].

Los productos de PCR fueron corridos en gel de agarosa LM (Low Melting) al 1,8% (Pronadisa®) mediante electroforesis submarina en cubetas Agagel Midi-Wide (Biometra®) a 100 voltios durante 30-40 minutos al objeto de visualizar los fragmentos. Una vez terminada la carrera, el gel se tiñó por inmersión en 0,5 x TBE adicionado de bromuro de etidio (1 µL/mL) durante al menos 30-40 minutos. Los tamaños resultantes fueron visualizados mediante luz ultravioleta y fotografiados en un equipo de documentación de geles (BioDoc-it ™ imaging system; UVP). Además, los tamaños de los fragmentos se compararon con una escalera de fragmentos de tamaño molecular conocido (100 pb Ladder; NZItech®).

4.2.3.5. Secuenciación de productos de PCR

Materiales

-Termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems).
-Tubos de 1,5ml
-Tubos AXYGEN de 0,2ml
-Pipetas de 0.5-10uL, 2-20uL, 10-100uL y de 20-200uL
-Guantes de látex sin polvo.

Reactivos

-Big Dye Terminator v3.1 (kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems)).
-Buffer 5X reacción de secuencia (kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing).
-Producto de PCR
-Cebadores por separado (OVIS-UEA7 y OVIS-UEA10).
-Agua MilliQ

Todos los productos de PCR han de ser **purificados** para obtener unos resultados satisfactorios.

En nuestro caso, los productos de la PCR fueron purificados siguiendo el protocolo del kit ExoSap IT (USB®). Este kit consiste en el tratamiento de los productos de PCR con dos enzimas: exonucleasa I y SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase). La función de la exonucleasa I es degradar los restos de cebadores de PCR y la SAP de-fosforila los dNTPs residuales.

La purificación se lleva a cabo con un protocolo de activación /inactivación de 30 minutos. Para ello, se mezclan 5µL de producto de PCR y 2 µL de ExoSAP. Luego se incuba a 37°C durante 15 minutos para su activación. Después se inactivan las ExoSAP-IT por simple calentamiento a 80 ^{o}C durante 15 min y finalizando a 4 ^{o}C. Finalmente, se diluye hasta 10 microlitros y está listo para su uso en la secuenciación de ADN.

La **reacción de secuenciación** se llevó a cabo usando las condiciones habituales en nuestro laboratorio.

La pre-mezcla de PCR de secuenciación se preparó de acuerdo con el siguiente protocolo (Tabla N° 7):

Tabla N° 7. Protocolo de elaboración de la pre-mezcla de PCR de secuenciación.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración en la reacción	Cantidad para una reacción (µL)
Terminator (Big Dye)			**1,0**
Buffer kit(Big Dye)	5X	1X	**1,5**
Cebador OVIS-UEA7 u OVIS-UEA10	10µM		**1,0**
Producto de PCR		-	**5,0**
Completar con Agua MQ			**1,5**
Total mezcla reacción			**10**

La mezcla de reacción se instala en el **termociclador** usando tubos AXYGEN de 0,2ml. A continuación se describe el protocolo usado en el termociclador:

Tabla N° 8. Condiciones de termociclado en la secuenciación.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	30s	**1 ciclo**
50 °C	5s	**26 ciclos**
60 °C	2min	
4 °C	∞	**1 ciclo**

Todas las muestras son **precipitadas** mediante precipitación manual en tubos eppendorf de 1,5 mL con el fin de eliminar los restos de la reacción y los terminadores sobrantes.

El proceso a seguir para cada muestra es el siguiente:

- Añadir 1µL de 125 mM de EDTA y 1 µL de acetato sódico (3M) diluido en 50 µL de etanol al 100%. Dejar 15 min a RT.
- Centrifugación a 14000rpm 30 min a 4 ^{o}C. Desechar el sobrenadante y añadir etanol al 70%.
- Centrifugación a 1000rpm 2 min a 4 ^{o}C. Descartar sobrenadante y secar el precipitado (se repite dos veces este paso).
- Añadir 10 µL de formamida Hi-Di, esperar 15 min y la añadimos a todos los pocillos de la placa de 96, ya que el capilar del secuenciador leerá toda la placa. Ponemos la placa en el termociclador a 95 ^{o}C y posteriormente 10 min en frío.

4.2.3.6. Protocolo de carrera de secuenciación en ABI 3130.

Para realizar las carreras en el secuenciador necesitamos tres pasos:

1.- Preparación de las muestras (desnaturalización del ADN y montaje en la placa de carrera) por resuspensión de la muestra en formamida Hi-Di que se cargarán en placas 96 pocillos del secuenciador.

2.- Preparación del archivo con las condiciones de carrera. Esto consiste en nombrar muestra, posicionarla en la placa de secuenciación e indicar al equipo los protocolos a usar (secuenciación en nuestro caso) en el software "Data Collection" dentro de la ventana *Plate Manager*.

3.- Montaje de las muestras en el equipo y activación del análisis.

3.1- Sacamos la bandeja del secuenciador presionando el botón *Tray* para montar la placa. Luego se cierra la puerta del secuenciador.

3.2- Asociamos la placa con el archivo de parámetro de carrera en la ventana *Run Scheduler*. Esto se hace seleccionando la planilla y después la placa. Presionar el icono de la flecha verde en la ventana *Run View.*

3.3- Vemos las lecturas de las carreras en el software AB DNA Sequencing Analisys. Los resultados se editan en el mismo y se preparan ficheros .abi que se leen en el software Chromas de MEGA 6.06.

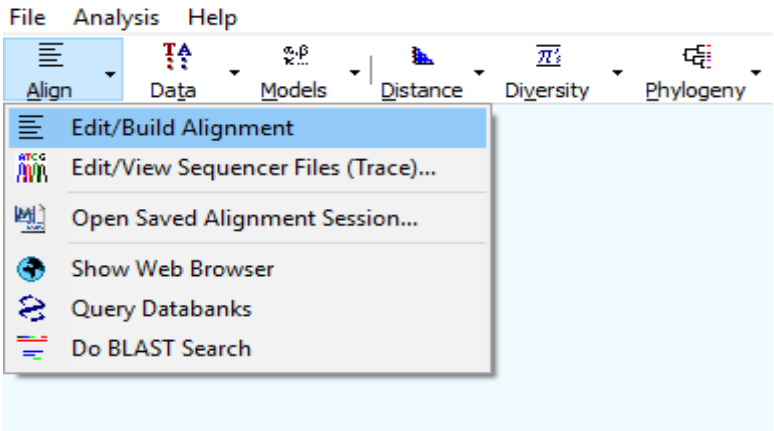
4.2.3.7. Alineamiento de secuencias y comparación:

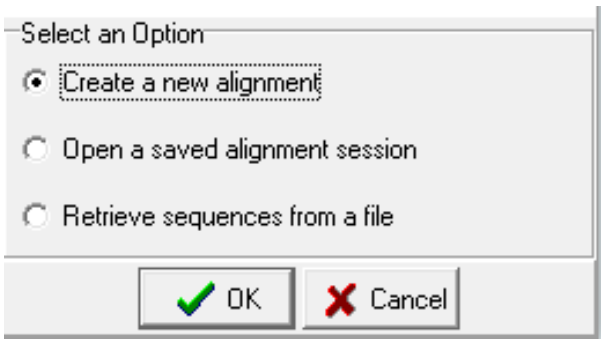
Para el análisis de los resultados de secuenciación hemos utilizado el software MEGA 6.06., que está disponible de forma gratuita en la siguiente página web: http://www.megasoftware.net.

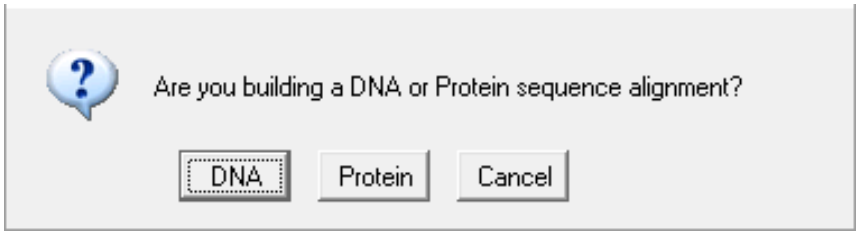
En nuestro caso, para el alineamiento de nuestros datos de secuencias se usó como secuencia de referencia aquella obtenida de la especie *Pharyngomyia picta*. Una vez alineadas, se localizaron mediante la opción "do BLAST search" secuencias similares existentes en bases de datos del NCBI. Las secuencias similares (similitud ≥87%) a la secuencias de referencia (*Pharyngomyia picta*) fueron cargadas a nuestro archivo de datos en MEGA. Un total de 5 secuencias fueron incorporadas e identificadas por los siguientes números de acceso: AF497768.1, AF497769.1, AF497770.1, DQ160209.1 y DQ160210.1.

Procedimiento:

Al abrir el programa, seleccionamos "Align | Edit/Build Alignment", creamos una nueva alineación, en la que seleccionaremos "Create a new alignment DNA".







Desde la ventana "Alignment Explorer" seleccionamos "Data |Open|Retrieve sequences from File". Desde archivo importaremos las secuencias que queremos alinear. Finalmente, insertaremos una secuencia en blanco y ahí podemos pegar la secuencia de referencia. Seleccionamos la secuencia de referencia y los resultados de las dos reacciones de secuenciación. Alineamos por el algoritmo "ClustalW".

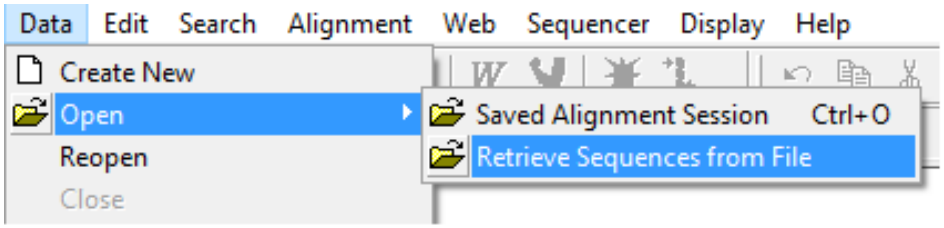
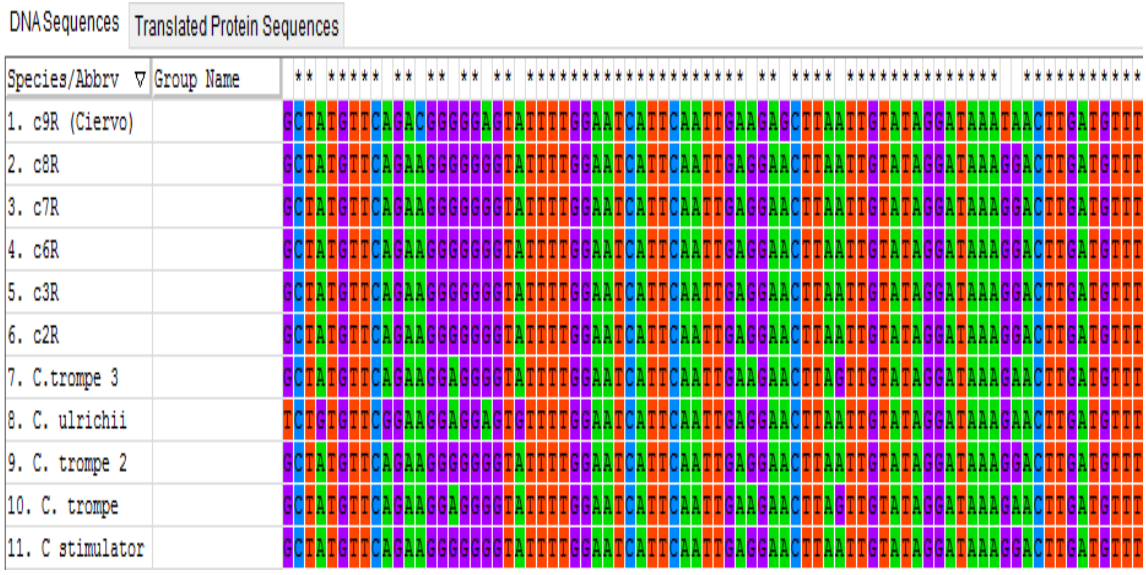


Figura N° 18. Comparación de secuencias de ADN en el software MEGA 6.06



4.2.3.8. Análisis molecular y filogenético

Se evaluó la aparición de diferencias intraespecíficas en todas las secuencias obtenidas para cada muestra por comparación con las depositadas en la base de datos del NCBI. El análisis filogenético se realizó con el método de Máxima Verosimilitud (**Maximum Likelihood method**) para inferir distancias genéticas usando el modelo de dos parámetros de Kimura (the Kimura 2-parameter model with 5000 bootstrap). Como grupo externo se usó la secuencia de *Pharyngomyia picta* (c9R).

5. RESULTADOS

5.1. Procesado de las muestras e identificación morfológica de las larvas.

En primer lugar, hay que señalar que todas las larvas recogidas de los trece corzos (n = 259) fueron identificadas como *Cephenemyia stimulator.* Los corzos presentaron una carga parasitaria media de 20 larvas por animal con una media de 7 L-II y 13 L-III. En todos los casos, los estadios II y III fueron identificados sobre la base de sus características morfológicas y morfométricas. Para ello, se han utilizado las claves dicotómicas correspondientes descritas por Ullrich en 1936 y por Zumpt en 1965.

Las características las larvas estudiadas fueron:

Larvas II. Longitud de la larva de hasta 13mm y de color amarillento. Presencia de espinas en la zona dorsal, excepto en el décimo y undécimo segmento. Zona ventral con mayor densidad de espinas que la dorsal, presentando desde el III al XI segmento de cinco a ocho hileras de espinas. Peritremas posteriores con forma ovalada.

Larvas III. Longitud de la larva de hasta 30mm y de color marrón oscuro. Presencia de espinas por todo el cuerpo. Los segmentos V a IX presentan cinco o seis filas de espinas dorsales y de siete a ocho filas ventrales. Los peritremas posteriores presentan forma arriñonada.

Pupa. Es de color negruzco y presenta una longitud de 16-20mm. Las pupas se incubaron para completar el ciclo y dar lugar a los imagos, sin embargo, los resultados no fueron los esperados, ya que no conseguimos que los imagos llegaran a eclosionar.

Este hallazgo ha resultado ser primicia para Extremadura, donde hasta la fecha no había sido documentada su presencia, supone además la observación más meridional de este parásito en poblaciones de corzos de la Península Ibérica, y por lo tanto en Europa.

A continuación se describen más detalles de interés para cada uno de los casos:

Caso Nº 1.- El animal presentaba malestar general, debilidad, pobre condición corporal y con terciopelo aún presente en los cuernos. El animal había expuesto también apatía y baja vitalidad antes de morir. Los resultados anatomopatológicos revelaron abundante moco verdoso en los orificios nasales, sinusitis, laringitis y faringitis; la neumonía también era evidente por la hepatización pulmonar, congestión y presencia de abundante exudado. Los análisis bacteriológicos revelaron la presencia de *Pasterella spp.* en los pulmones. Los análisis parasitológicos demostraron la presencia de ninfas de garrapata de la especie *Rhipicephalus bursa,* así como el nematodo *Gongylonema pulchrum* en la submucosa del esófago y el protozoario *Sarcocystis spp*. en el músculo cardíaco. Finalmente, se recogieron 77 larvas de *C. stimulator* de las cuales 34 eran L-II y 43 fueron L-III. Las L-II se encontraron principalmente en la faringe y las L-III en la orofaringe y cornetes nasales. Esta localización se debe a la necesidad del parásito de salir del cuerpo del hospedador, ya que su ubicación natural es siempre la cavidad retrofaríngea. No había más resultados de interés, aunque tal vez vale la pena destacar la presencia de algunos huevos de nematodos correspondientes a las especies: *Teladorsagia circumcincta*, *Spiculopteragia asymmetrica*, *Nematodirus filicollis*, *Muellerius capillaris* en cantidades bajas (< 100 huevos/gramo de heces).

Caso Nº 2.- El examen externo del animal sólo reveló una mala apariencia general. Sin embargo, macroscópicamente se observaron signos de laringitis, faringitis y sinusitis. Se recogieron adultos de la garrapata *Rhipicephalus bursa* y 37 larvas de *Cephenemyia stimulator* de las cuales 2 se encontraban en estadio de L-II y 35 en estadio L-III. Las larvas estaban situadas principalmente en las cavidades nasales y retrofaríngeas preparándose para salir del hospedador.

Caso Nº 3.- En el examen externo el animal presentaba una pobre condición corporal y la presencia de moco en las aberturas nasales. El estudio anatomopatológico reveló la existencia de sinusitis, faringitis y laringitis. Los análisis parasitológicos no revelaron ningún resultado de interés, tan sólo la existencia de algunos huevos de Estrongylidos en pequeñas cantidades tras el análisis coprológico. Finalmente, se recogieron 49 larvas de *Cephenemyia stimulator* de las cuales 30 eran L-II y 19 L-III.

Caso Nº 4.- Al igual que en los casos anteriores la apariencia general del animal era mala con una pobre condición corporal y la presencia de moco en las aberturas nasales. Macroscópicamente se observaba inflamación de los senos nasales, faringe y laringe debida a la presencia de larvas. La tráquea presentaba abundante edema y el pulmón zonas de hepatización resultando en el análisis bacteriológico positivo a *Pasterella spp.* En total se recogieron 25 larvas de *Cephenemyia stimulator* pertenecientes al estadio larvario L-III.

Casos Nº 5, 6, 7 y 8.- De estos casos tan solo nos remitieron las cabezas de los corzos por lo que no pudimos hacer un estudio completo de los animales. Los estudios parasitológicos demostraron la presencia, en todos los casos, de *Sarcocystis spp* en los músculos de la lengua. Todas las larvas recogidas fueron identificadas como *Cephenemyia stimulator.* Del caso Nº 5 se recogieron 4 L-III; del caso Nº 6 diez L-III; del caso Nº 7 seis larvas L-III y del caso Nº 8 se recogieron ocho larvas, de las cuales una larva era L-II y 7 L-III.

Caso Nº 9.- En el examen externo el animal presentaba mal estado general, baja condición corporal, presencia de moco en fosas nasales y ano muy manchado de heces. Los resultados anatomopatológicos revelaron sinusitis, faringitis y laringitis. Los análisis parasitológicos demostraron la presencia del protozoario *Sarcocystis spp* en los músculos de la lengua y del nematodo *Trichuris spp* en el ciego, observando sus huevos en elevado número tras el análisis coprológico. Se recogieron 14 larvas de *Cephenemyia stimulator* de las vías respiratorias altas, de las cuales 3 resultaron pertenecer al estadio L-II y 11 al estadio L-III. Finalmente, recogimos un gran número de garrapatas, que posteriormente identificamos al estereomicroscopio, resultando ser:

- 19 machos de *Rhipicephalus bursa*
- 13 hembras de *Rhipicephalus bursa*
- 6 machos de *Rhipicephalus turanicus*
- 3 machos de *Hyalomma marginatum*

Casos Nº 10, 11, 12 y 13.- De estos cuatro últimos casos, tan sólo nos remitieron las larvas y las lenguas de los corzos. El examen muscular de las lenguas de los corzos reveló, en todos ellos, la presencia de *Sarcocystis spp.* Todas las larvas fueron identificadas como *Cephenemyia stimulator.* Del caso Nº 10 identificamos

10 larvas de las cuales siete eran L-II y tres L-III. Del caso Nº 11 identificamos siete larvas, seis en estadio de desarrollo L-II y una en estadio L-III. Del caso Nº 12 identificamos dos L-II y dos L-III. Por último, del caso Nº 13 identificamos 8 larvas de las cuales cuatro fueron L-II y cuatro L-III.

Tabla N° 9. Resumen de larvas recogidas de cada caso.

Caso	L-I	L-II	L-III	Total larvas/caso
Caso 1	0	34	43	77
Caso 2	0	2	35	37
Caso 3	0	30	19	49
Caso 4	0	0	25	25
Caso 5	0	0	4	4
Caso 6	0	0	10	10
Caso 7	0	0	6	6
Caso 8	0	1	7	8
Caso 9	0	3	11	14
Caso 10	0	7	3	10
Caso 11	0	6	1	7
Caso 12	0	2	2	4
Caso 13	0	4	4	8
TOTAL	**0**	**89**	**170**	**259**

Gráfico N° 1: Número y porcentaje de larvas recogidas de cada estadio evolutivo.

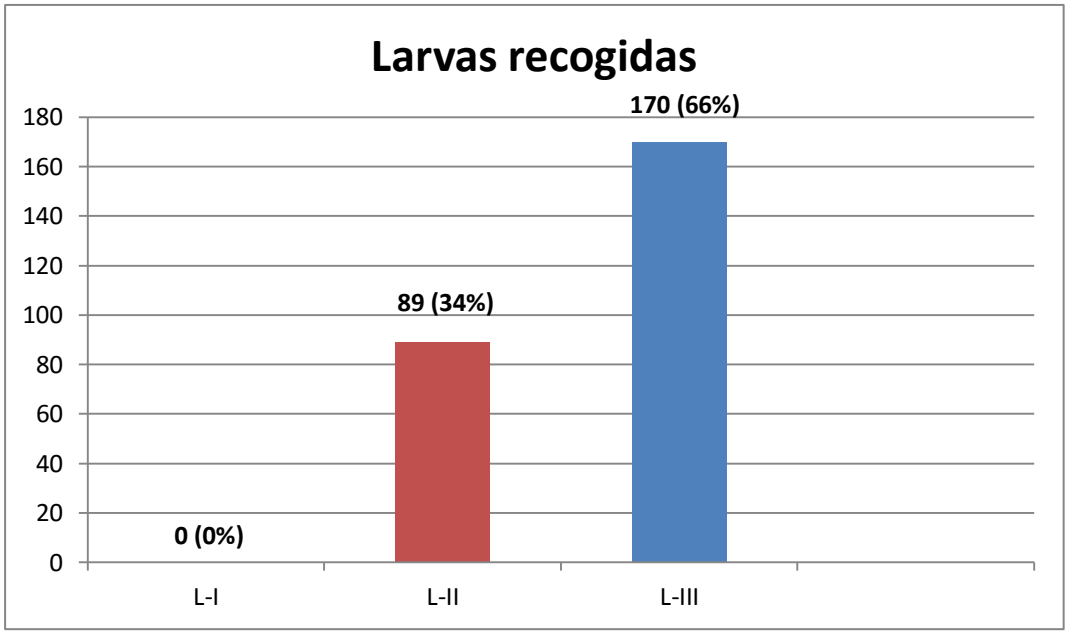


Figura N° 19. Cefaloesqueleto de larva II (A) y larva III (B) de *C. stimulator*. Se trata de una estructura queratinizada, ubicada en el extremo anterior de las larvas, constituido por dos ganchos bucales fuertes y curvos, cuya función principal es la fijación de la larva en los territorios nasales y paranasales de los animales parasitados. Dicha función permite el avance de la larva en dichos parajes y evita su expulsión durante las descargas nasales y estornudos emitidos por los corzos afectados.

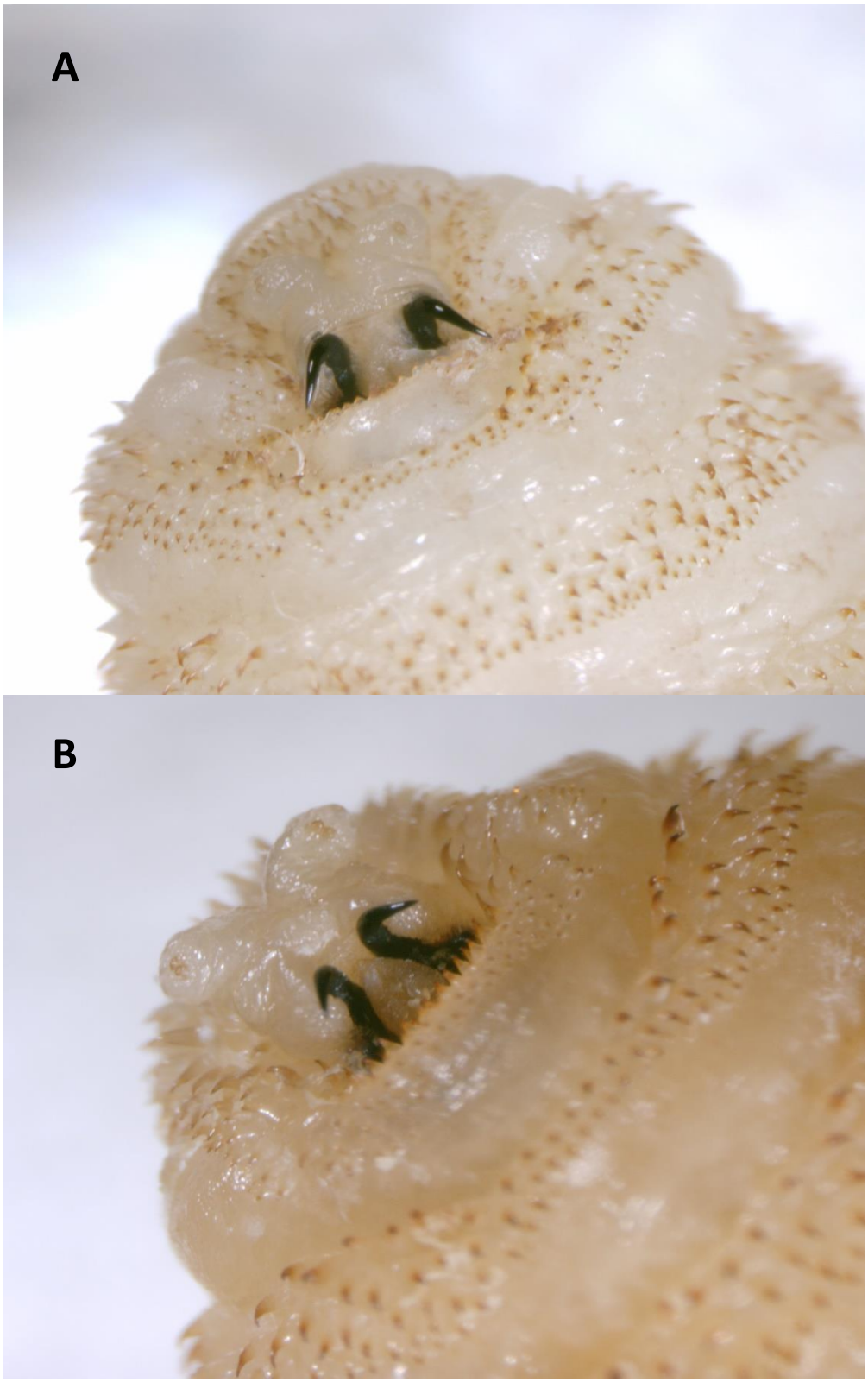


Figura N° 20. Peritremas de larva II (C) y larva III (D) de *C. stimulator*. Los peritremas o estigmas respiratorios son dos grandes placas situadas en el extremo final de las larvas, presentando ángulos redondeados y un botón central. En todo caso están rodeados de pequeños orificios que cubren toda su superficie. Poseen valor taxonómico.

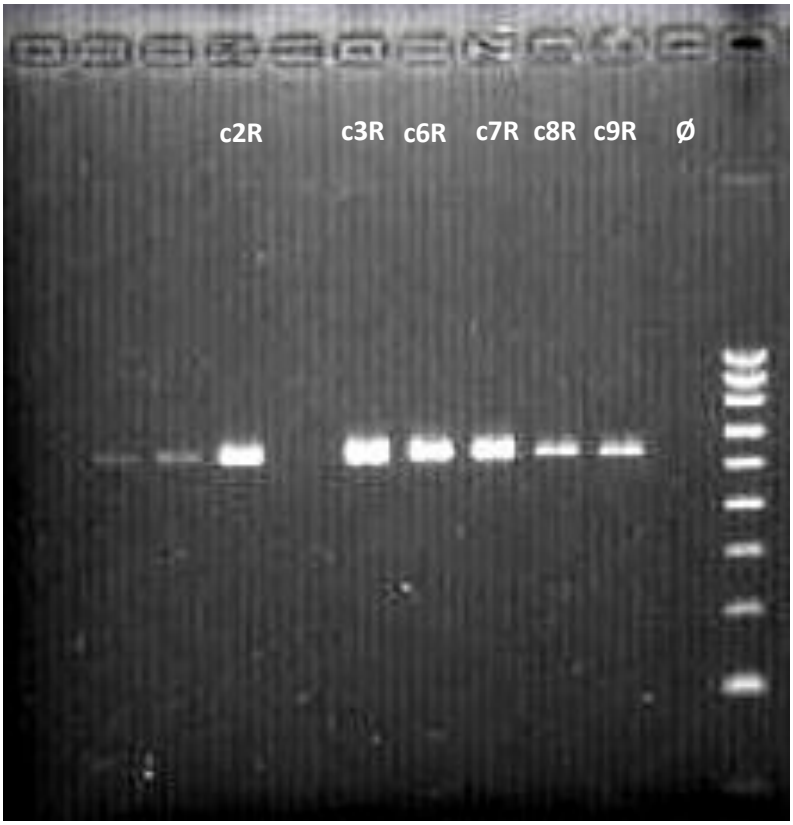
5.2. Estudio molecular de larvas de Oéstridos

5.2.1. PCR

La PCR fue realizada para verificar si los cebadores OVIS-UEA7 Y OVIS-UEA10 permiten amplificar con éxito el gen COX I del ADN extraído en larvas de oéstridos recogidas de vías respiratorias altas en corzos (*Capreolus capreolus*) y ciervos *(Cervus elaphus)*, puesto que no disponíamos de estudios o pruebas previas en estas especies en España.

Los cebadores mencionados anteriormente produjeron productos PCR del tamaño esperado (688 pb) en las larvas recogidas en corzos y ciervo. De las nueve muestras utilizadas (8 de corzo identificadas con los acrónimos c1R, c2R, c3R, c4R, c5R, c6R, c7R y c8R y 1 de ciervo identificada con el acrónimo c9R) los cebadores produjeron amplificado en seis de ellas (5 de corzo: c2R, c3R, c6R, c7R y c8R y la de ciervo: c9R). De las otras tres muestras restantes de corzo no se consiguió un amplificado visible, debido probablemente al pobre estado de conservación de las larvas.

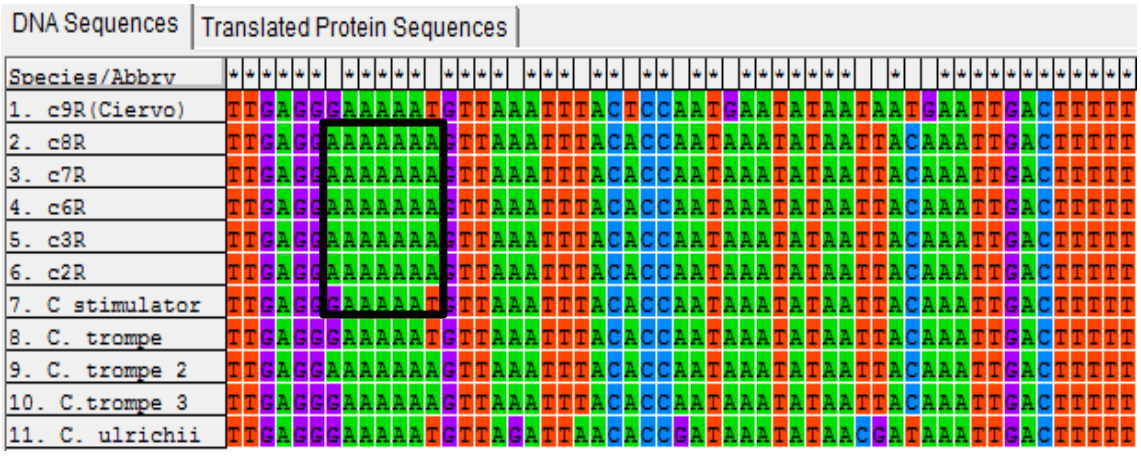
Figura N° 21. Perfiles genéticos en gel de agarosa obtenidos por PCR usando los cebadores Ovis-Uea7 y Ovis-Uea10. Los acrónimos c2R, c3R, c6R, c7R y c8R corresponden a ADN molde de corzo y el acrónimo c9R a ADN molde de ciervo.



5.2.2. Secuenciación

La comparación de secuencias con respecto a nuestra secuencia de referencia nos permite localizar variación genética. En la Figura N° 22 se observan dos variaciones nucleotídicas entre la secuencia de *C. stimulator* de Francia y *C. stimulator* estudiadas aquí. Esto sugiere que las larvas de *C. stimulator* de Extremadura difieren de las vecinas de Francia. Esto es importante por dos razones: (1) debido a que Notario y Castresana (2001) afirman que la especie *C. stimulator* del Norte de España parece proceder de una infestación con su origen en Francia y (2) permite proponer nuevas hipótesis de estudio sobre la especie *C. stimulator* en relación a su origen geográfico real. Por tanto, debe estudiarse en profundidad mediante el análisis de larvas de otras localizaciones geográficas.

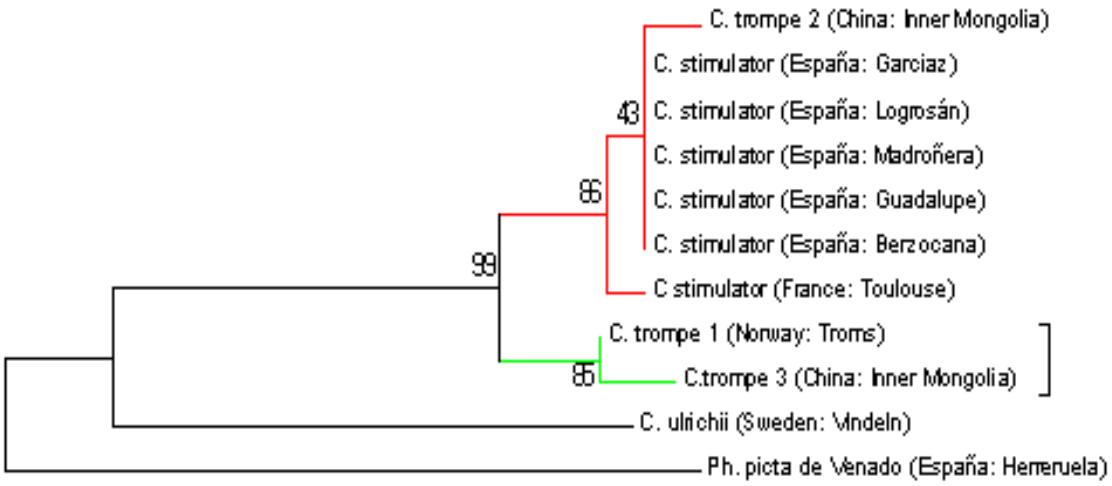
Figura N° 22. Secuencias de ADN de las diferentes especies de Oéstridos. Los acrónimos c2R, c3R, c6R, c7R y c8R corresponden a las secuencias de las larvas de *C. stimulator* de los corzos de este estudio.



5.2.3. Análisis filogenético

La filogenia se ha construido a partir de todas las secuencias de nucleótidos utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Kimura (Kimura M, 1980). En el árbol se muestra junto a las ramas el porcentaje de árboles con igual distribución de taxones (secuencias). Porcentajes elevados confirman la fiabilidad del análisis filogenético. El árbol está dibujado a escala y las longitudes de las ramas dependen del número de sustituciones entre taxones.

Figura N° 23. Filogenia molecular mediante el método de Máxima Verosimilitud.



En la Tabla N° 10 se muestran las divergencias mediante distancias genéticas entre las secuencias obtenidas en este trabajo y las procedentes de GenBank (Otranto *et al.,* 2003). Los análisis se realizaron utilizando el método de Máxima Probabilidad Compuesta (Tamura K. *et al.,* 2004). Se usaron un total de 481 posiciones en el último conjunto de datos. Reagrupando por un lado, secuencias de *C. stimulator* y por otro, secuencias de *C. trompe*, el número de sustituciones de bases por sitio promediando todos las pares de secuencias fue de 2,2%. Este análisis incluyó a 9 secuencias de nucleótidos distribuidas de la siguiente manera: 3 secuencias de *C. trompe* (Otranto *et al.,* 2003) y 6 secuencias de *C. stimulator* (una de ellas de Otranto *et al.,* 2003).

Tabla N° 10. Divergencia evolutiva entre secuencias (%). *C. stimulator* (España: Garciaz)(**C2r**), *C. stimulator* (España: Logrosán)(**C3r**), *C. stimulator* (España: Madroñera)(**C6r**), *C. stimulator* (España: Guadalupe)(**C7r**), *C. stimulator* (España: Berzocana)(**C8r**), *Ph. picta* de venado (España: Herreruela)(**C9r**), *C. stimulator* (France: Tolouse)(**Cstim**), *C. trompe* 1 (Norway: Troms)(**Trp1**), *C. ulrichii* (Sweden: Vndeln)(**Ulri**), *C. trompe 2* (China: Inner Mongolia)(**Trp2**), *C. trompe 3* (China: Inner Mongolia)(**Trp3**).

	C2r	**C3r**	**C6r**	**C7r**	**C8r**	**C9r**	**Cstim**	**Trp1**	**Ulri**	**Trp2**
C3r	0									
C6r	0	0								
C7r	0	0	0							
C8r	0	0	0	0						
C9r	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5					
Cstim	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	14,9				
Trp1	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	14,9	2,3			
Ulri	12,4	12,4	12,4	12,4	12,4	15,9	11,9	11,6		
Trp2	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	14,6	1,1	2,6	11,6	
Trp3	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	15,5	3,2	0,8	11,7	3

6. DISCUSIÓN

6.1. Estudio parasitológico

Este es el primer estudio sobre *Cephenemyia stimulator* en corzos de Extremadura. Con este trabajo se confirman nuestras sospechas de que *C. stimulator* es el oéstrido que podría actuar como agente causal de gran número de bajas en las poblaciones de corzos de las áreas mencionadas y que, a menudo, es descrito por personas que participan en la gestión y caza de esta especie.

Es difícil determinar el origen de este parásito en corzos de Extremadura. Posibles razones de su presencia en el área de estudio incluyen su introducción después de desplazamientos/translocaciones de corzo (sin confirmar en Extremadura), la expansión desde zonas cercanas potencialmente endémicas y los cambios ambientales derivados del calentamiento global, con otoños más cálidos que podrían prolongar el período de actividad del imago y su área de distribución (Taylor, 2009). En cualquier caso, todas estas hipótesis son difíciles de confirmar.

Nuestros resultados son semejantes a los publicados por otros autores (Rivosecchi *et al.*, 1978; Maes y Boulard, 2001; Vaca, 2001; Király y Egri, 2004) quienes consideran que *Cephenemyia stimulator* es la especie de oéstridos que parasita al corzo. Sin embargo, ha habido denuncias de infestaciones accidentales por *Pharyngomyia picta* (Sugar, 1974) en corzo y también por *Cephenemyia stimulator* en ciervo (Király y Egri, 2004).

Varios autores (Király y Egri, 2004; Sugar *et al*., 2004) están de acuerdo en que los animales jóvenes son más vulnerables al parasitismo por *Cephenemyia stimulator* debido a la menor competencia inmune y su reducida capacidad para evadir los ataques de la mosca. Los machos forman el siguiente grupo más vulnerable sin diferencia entre los grupos de edad. La susceptibilidad de los machos podría estar relacionada con el esfuerzo involucrado en la vigilancia de sus territorios, estrés social, la pérdida de energía en el apareamiento y así sucesivamente. Estas restricciones asociadas al comportamiento pueden conducir a un estado de inmunocompromiso dejándolos susceptibles no solo a este parásito, sino también a otras enfermedades.

Las cargas parasitarias medias de larvas de *Cephenemyia stimulator* en los corzos muestreados en este trabajo (20L/animal) pueden considerarse elevadas, siendo mucho más alta que los niveles de infestación medios descritos por Barth *et al.* (1976) en corzos de Alemania (3-11 L/animal), por Curlik *et al.* (2001) en la República Checa (13L/animal), o por Király y Egri (2004) en Hungría (8,8 L/animal). Esta elevada carga muy probablemente pudo ser la causa del evidente deterioro del animal correspondiente al caso Nº 1, pues en ausencia de otras patologías de mayor relevancia no se puede explicar el mal estado de salud presentado por el animal en cuestión.

En relación con el desarrollo de los estadios larvarios y su dinámica poblacional, cabe destacar, por ejemplo, que durante los 15 días transcurridos entre la captura del primer corzo (14 de mayo) y el segundo (27 de mayo), las larvas L-III fueron las predominantes, lo que nos indica el rápido desarrollo de las larvas en primavera. Esto concuerda con los estudios de Dudzinski (1970), quien afirmaba que las L-II pueden estar presentes entre abril y julio y las L-III entre abril y agosto en países de Europa Central. En nuestro estudio, no fue posible crear las condiciones necesarias para la eclosión del imago de *Cephenemyia stimulator*. Esto se debió probablemente a las relativas bajas temperaturas y niveles de humedad en los terrarios de pupación. Éstas fueron mucho más bajas que las condiciones (14.8ºC [7.5-21]; 64.4%RH [37-91]) propuestas para *Hypoderma diana* por Jorrín y Gasca (1992) y presumiblemente inferiores a las encontradas en sus nichos ecológicos (Vaca, 2001; Király y Egri, 2004; Nilssen *et al.*, 2008), lo cual podría ser objeto de estudio en futuras investigaciones.

En general, la elevada presencia de larvas de *Cephenemyia stimulator* en la mayoría de los corzos podría haber sido la causa de la debilidad, mala condición corporal y estado de inmunosupresión, similar al observado en otras especies domésticas y silvestres debido al parasitismo por Oestridae (Alcaide *et al.,* 2003); este nivel de infestación puede, por lo tanto, hacerlos susceptibles a enfermedades causadas por patógenos oportunistas, a veces con consecuencias fatales. Infestaciones más bajas pueden causar debilidad, fallo reproductivo y mala calidad del trofeo. En cualquier caso y dado los altos niveles de parasitismo observados, se necesitan más estudios acerca de la relación de *Cephenemyia stimulator* con la disminución de las

poblaciones de corzos en determinadas zonas de España y de Extremadura. Para ello, es necesario que se establezca una estrecha colaboración entre cazadores, gestores, autoridades e investigadores con el fin de obtener información epidemiológica básica y necesaria para el desarrollo de futuros programas de control de ésta y otras enfermedades del corzo.

Recomendamos encarecidamente controlar los desplazamientos bajo estrictas medidas de bioseguridad. Al menos, sugerimos el uso de quimioprofilaxis usando lactonas macrocíclicas (ivermectina y milbemicinas) para el control de estos parásitos y otros sensibles a estos medicamentos. En definitiva medidas necesarias con el fin de evitar la propagación de patógenos y enfermedades que pueden tener graves consecuencias en la vida silvestre, la ganadería y las poblaciones humanas.

6.2. Estudio molecular

Con respecto al análisis molecular de larvas de Oéstridos y de acuerdo con Otranto *et al.* (2003), se puede extraer ADN a partir de muestras de larvas (III). Además, es la fase más fácil de visualizar en las vías respiratorias altas de los corzos y también porque su presencia en estas localizaciones orgánicas más o menos coincide con los períodos hábiles de caza para esta especie cinegética. Los tejidos internos de L-III se separaron fácilmente a partir de la cutícula externa rica en quitina y, por tanto, una gran cantidad de tejido (esencial para la replicación) estaba disponible para la extracción del ADN. Por otra parte, las L-III contienen menos enzimas (que pueden comprometer la fiabilidad de la extracción y calidad del ADN resultante) que larvas en estadio L-I o L-II (Otranto *et al.,* 2003).

El gen COX I y, en particular, la región diana específica que codifica la porción que abarca desde E4 a COOH fue elegido al demostrarse ser útil no sólo para fines de identificación, sino también para estudios filogenéticos a través de una gama amplia de insectos (Zhang y Hewitt, 1996). Esta región es muy variable entre los insectos y es, por lo tanto, adecuado para abordar cuestiones filogenéticas de especies estrechamente relacionadas entre sí. Un ejemplo de ello es el estudio realizado por Sperling *et al.* (1994) en el que llevaron a cabo el análisis de la secuencia del gen COX I en 18 especies diferentes que pertenecen a la familia Calliphoridae (moscardones de la carne), siendo capaces de diferenciarlas con gran rapidez.

En conjunto, nuestros resultados de secuenciación del gen COX I concuerdan con los de Otranto *et al.* (2003). Este último autor también afirma que sus datos moleculares concuerdan con los de Lunt *et al.* (1996), Caterino y Sperling (1999) y Cognato y Sperling (2000).

La mayor divergencia genética se obtuvo para la larva de *Pharyngomyia picta* de ciervo (Herreruela, Cáceres) (15,5%) pero tiene fácil justificación, al ser de un género diferente. Además, hemos observado que la divergencia de *Pharyngomyia picta* de ciervo respecto a *C. stimulator* fue muy similar (16,5%) a la observada por Otranto *et al.* (2003) en otro oéstrido de oveja (*Oestrus ovis*). No obstante, también existe un considerable nivel de divergencia interespecífica dentro del género *Cephenemyia* (por ejemplo: *C. stimulator* de Extremadura y *C. ulrichii* divergen en un 12,4%).

A nivel interespecífico registramos un bajo nivel de diferencia (2,2%) entre *Cephenemyia trompe* y *Cephenemyia stimulator*. Estos resultados fueron muy similares (1,8%) a los obtenidos por Otranto *et al.* (2003). Estos autores justifican esta baja divergencia por la gran similitud morfológica y taxonómica entre ambas especies (subfamilia Oestrinae, género *Cephenemyia*), ambas causantes de miasis nasofaringea sólo en rumiantes salvajes (*Rangifer tarandus tarandus* - reno y *Capreolus capreolus* - corzos, respectivamente; ambos pertenecientes a la familia Cervidae, subfamilia Odocoileinae) (Otranto *et al.,* 2003).

Finalmente, hay que destacar que hay una divergencia evolutiva intraespecífica del 0,4 % entre las secuencias (del único gen estudiado: COX I), de las larvas de *C. stimulator* de Extremadura y la secuencia de *C. stimulator* de Francia. Esta divergencia evolutiva podría ser mayor para otros genes. Con respeto a la especie *C. trompe* 2 procedente de china (China: Inner Mongolia) la divergencia interespecífica fue del 0,6% (detalles en la Tabla N° 10) (Otranto *et al.,* 2003).

7. CONCLUSIONES

1.- Describimos por primera vez la presencia de *C. stimulator* en corzos de Extremadura. Se trata de la detección más meridional de la infestación por *C. stimulator* en corzos europeos.

2.- La presencia del parásito en Extremadura refleja una perfecta adaptación de *C. stimulator* a las condiciones ecológicas de la mitad sur de la Península Ibérica.

3.- La elevada presencia de larvas (20 larvas de media/animal) de *Cephenemyia stimulator* en la mayoría de los corzos estudiados, podría haber sido la causa de la debilidad, mala condición corporal y el estado de inmunosupresión, similar al observado en otras especies domésticas y silvestres parasitadas por Oéstridos.

4.- Las fases larvarias de *C. stimulator* que hemos visualizado en las vías respiratorias altas de los corzos han sido L-II y principalmente L-III, ya que su presencia coincide con los períodos hábiles de caza para esta especie cinegética (mayo y junio).

5.- Describimos los primeros resultados moleculares obtenidos de larvas de *C. stimulator* en nuestro país, proporcionando una base de datos esencial para la identificación molecular y evaluación de las relaciones filogenéticas de los dípteros que componen la familia Oestridae.

6.- Se ha observado divergencia evolutiva entre las larvas de *C. stimulator* de Extremadura y las larvas de *C. stimulator* de Francia, por lo que es posible que el origen de ambas sea diferente.

7.- Consideramos necesaria la realización de estudios acerca de la patogenicidad de *Cephenemyia stimulator,* responsable de la disminución de las poblaciones de corzos en determinadas zonas de España y especialmente en Extremadura.

8.- Resulta necesario establecer una estrecha colaboración entre los sectores implicados con el fin de disponer de material de análisis y obtener información epidemiológica para el desarrollo de futuros programas de control de ésta y otras enfermedades infecciosas del corzo.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Acevedo P., Real R., Gortázar C., 2011. Favorabilidad ecogeográfica para el corzo: distribución y abundancia. Pirineos. Revista de ecología de Montaña: Vol. 166, 9-27.

Alcaide M., Reina D., Sánchez J., Frontera E. y Navarrete I., 2003. Seasonal variations in the larval burden distribution of *Oestrus ovis* in sheep in the southwest of Spain. Veterinary Parasitology, 118, 235-241.

Anónimo, 2011. Asociación del corzo español. Ficha técnica n° 6: La Oestrosis del corzo, 3 pp.

Barth D., Kudlich H. y Schaich K. 1976. Occurrence and significance of nasal bot infestation in roe bucks (*Capreolus capreolus*). En: L.A. Page (ed.). Wildlife Diseases. Plenum Press, New York, London. Pp. 609-613.

Bueno de la Fuente, M. L., Moreno, V., Pérez, J. M., Ruiz-Martínez, I. y Soriguer, R.C.1998. Oestrosis in red deer from Spain. Journal of Wildlife Diseases. 34: 820-824.

Caterino M.S. y Sperling F.A. (1999). Papilio phylogeny based on mitochondrial cytochrome oxidase I and II genes. Molecular Phylogenetics and Evolution, 11, 122-137.

Cogley T.P. 1987. Effects of *Cephenemyia* spp. (Diptera: Oestridae) on the nasopharynx of black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). Journal of Wildlife Diseases, 23: 596-605.

Cognato A.I. y Sperling F.A. (2000). Phylogeny of ips DeGeer species (Coleoptera: Scolytidae) inferred from mitochondrial cytochrome oxidase I DNA sequence. Molecular Phylogenetics and Evolution, 14, 445-460.

Colwell D.D. 2001. Bot flies and warble flies (Order Diptera: Family Oestridae). En: W.M. Samuel, M.J. Pybus y A.A. Kocan (2001-1971) (eds.). Parasitic diseases of wild mammals (2ª ed). Iowa State University Press, pp. 46.

Cordero del Campillo M., Castañón L. y Reguera A., 1994. Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos. Ed. Universidad de León, Secretariado de Publicaciones y Medios Audiovisuales. 152 pp.

Curlik J., Letkova V. y Lazar P. 2001. The occurrence of botflies and warble flies in deer in Slovak Republic.. Eds. M. Good, M. Hall, B. Losson, *et al*. Mange and myiasis of livestock. COST Action 833, pp. 177-180.

Dudziński W., 1970. Studies on *Cephenemyia stimulator* (Clark) (Diptera, Oestridae), the parasite of the European roe deer, *Capreolus capreolus* (L.). I. Biology. Acta Parasitologica Polonica, 18: 555-572.

Fidalgo L.E., López A.M., Pérez J.M., Martínez-Carrasco C. El "gusano" de la nariz y garganta del corzo. Proyecto FEDENCA: Bases epidemiológicas para el control de *Cephenemyia stimulator.* Revista de prensa Federación Galega de Caza. 11 pp.

Garrido J.L., 2014. El gusano "de las narices" del corzo. Federcaza, volumen 343.

Gortázar C. y Vicente J., 2008. Breve revisión sobre enfermedades del corzo. Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC). 8 pp.

Habela, M. A y Calero, R (2013). El gusano de la nariz *(Cephenemyia stimulator*, Diptera, Oestridae) en corzos de Extremadura. Caza Extremadura, 119, 61-67.

Hope F.W. (1840). On insects and their larvae occasionally found in the human body. Trans. R. Entomol. Soc. London., 2: 256-271.

Inga Jogisalu y Mati Martin (2010). Metskitse-Ninakiini (*Cephenemyia stimulator* Clark, 1815) (Diptera: Oestridae) Vastsete Ja Helmintide Mojust Euroopa Metskitsele (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758). Instituut Zoologia Osakond, 48 pp.

Jorrín J. y Gasca A. 1992. Climatic condition on pupation of *Hypoderma diana* from red deer. Pp. 59-65. En: A. Gasca, S. Hernández, J. Martínez & K. Pithan (eds.). Agriculture. Improvements in control methods for warble-fly in cattle and goats. COST Action 811.

Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16:111-120.

Király I. y Egri B. 2004. A Tolna megyei őzállomány orrgaratbagócs fertőzöttségéről [Nasopharyngeal bot infestation of the roe deer population of Tolna county]. Magyar Állatorvosok Lapja, 126: 433-438.

Király, I. y Egri B., 2007. Epidemiological characteristics of *Cephenemyia stimulator* (Clark, 1815) larval infestation in European roe deer (*Capreolus capreolus*) in Hungary. Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 53: 271-279.

Lunt D.H., Zhang D.X., Szymura J.M. y Hewitt G.M. (1996). The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. Insect Molecular Biology, 5, 153-165.

Maes, S. y Boulard C. 2001. Deer myiasis in France. En: M. Good, M. Hall, B. Losson, *et al.* (eds.). Mange and myiasis of livestock. COST Action 833. Pp. 181-186

Navarrete I., Reina D., Habela M., Nieto C.G., Serrano F. y Pérez E., 1990. Parasites of roe deer (*Capreolus capreolus*) in Cáceres Province, Spain. En: Sonderdruck aus Verhandlungsbericht de 32. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere. Eskilstuna, Sweden. Akademie-Verlag, Berlin. Pp. 225-227

Notario A. y Castresana L. 2001. Contribution to the knowledge of *Cephenemyia stimulator* Clark, 1815 (Diptera, Oestridae) in Spain. Folia Venatoria, 30-31: 325-326.

Nilssen A.C., Isomursu M. y Oksanen A. 2008. The moose throat bot fly *Cephenemyia ulrichii* larvae (Diptera: Oestridae) found developing in roe deer (*Capreolus capreolus*) for the first time. Acta Veterinaria Scandinavica, 50: 14.

Otranto D., Traversa D., Guida B., Tarsitano E., Fiorente P. y Stevens J. R., 2003. Molecular characterization of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene of Oestridae species causing obligate myiasis. Medical and Veterinary Entomology, 17: 307-315.

Palomo L.J., Blanco J.C. y Gisbert J., 2007. Atlas y libro rojo de los mamíferos terrestres de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza SECEM-SECEMU, Madrid. 586 pp.

Pérez J.M., Bueno L., Granados J.E. y Moreno V., 1997. Las miasis en los ungulados silvestres. 49: 89-106.

Rivosecchi L., Zanin E., Cavallini C. y De Paoli C., 1978. Infestation of roe deer by *Cephenemyia stimulator* (Clark) (Diptera, Oestridae) in Trent province. Parassitologia, 20: 143-152.

Serrano F.J., Habela M.A., Reina D., Gómez L.C., Pérez J.E., Frontera E.M., 2010. Manual práctico de parasitología veterinaria. Cáceres: Universidad de Extremadura, Servicio de publicaciones, 120 pp.

Soler Cruz, M. D., 2000. Estudio de las miasis en España durante los últimos cien años. Departamento de Parasitología, Universidad de Granada. Ars Pharmaceutica: 41(1), 19-26.

Sperling F.A., Anderson G.S. y Hickey, D.A. (1994). A DNAbased approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. Journal of Forensic Sciences, 39, 418-427.

Sugár L. 1974. The occurence of nasal throat bot flies (Oestridae) in wild ruminants in Hungary. Parasitologia Hungarica, 7: 181-189.

Sugár L., Kovács Sz., Kovács A., Kőrös A. y Varga Gy. 2004. Orr-garatbagócs lárvák előfordulása életkor és évszak szerint egy bakonyi szarvasállományban [Distribution of the occurrence of nasopharyngeal bots by age and season in a red deer population in the Bakony mountains, Hungary]. Vadbiológia, 11: 24-29.

Tamura K., Nei M., y Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 101:11030-11035.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., y Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution: 30 2725-2729.

Taylor M. 2009. Changing patterns of parasitism in sheep. In Practice, 31: 474-483.

Ullrich H. 1936. Untersuchungen uber die Biologie der Rachenbremse (genus *Cephenomyia* Latreille), uber die pathogenen Einflusse der Rachenbremsenllarven auf ihre Wirtstiere und uber Bekampfungsmoglishkeiten der Rachenbremsenplage, Diss. Berlin, J. Neumann-Neudamm, 69 pp.

Vaca D. 2001. Biology of nasopharyngeal bot fly *Cephenemyia stimulator* Cl. (Diptera, Oestridae) and its distribution in the Czech Republic. En: M. Good, M. Hall, B. Losson, *et al.* (eds.). Mange and myiasis of livestock. COST Action 833. Pp. 189-194.

Vicente J., Fierro Y., Martinez M. y Gortázar C., 2004. Long-term epidemiology, effect on body condition and interspecific interactions of concomitant infection by nasopharyngeal bot fly larvae (*Cephenemyia auribarbis* and *Pharyngomyia picta*, Oestridae) in a population of Iberian red deer (Cervus elaphus hispanicus). Parasitology, 129: 349-361.

Zhang D.X. y Hewitt G.M. (1997). Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. Insect Molecular Biology 6(2): 143-150.

Zumpt V. 1965. Myiasis in man and animals in the old world. A Textbook for Physicians, Veterinarians and Zoologists. Butterworths, London, UK, 257 pp.

9. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento al Departamento de Parasitología y Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Veterinaria de Cáceres por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto, en especial a Miguel Ángel Habela Martínez-Estéllez por implicarse a nivel tutorial, por la supervisión, orientación y atención prestada durante todos estos años. También, agradecer a los codirectores del proyecto José Luis Fernández García y Rafael Calero Bernal por la ayuda que me han prestado para la realización de mi Trabajo de Fin de Grado.

Por último, agradecer a la Patrulla del Seprona de Guadalupe perteneciente a 2032ª Comandancia de la Guardia Civil, a D. German Fernández Corrales y D. Rodrigo Casillas Fernández por su colaboración y remisión de las muestras necesarias para la realización de este trabajo.

Gracias a todos.

10. ADENDA

Figura N° 24. Larvas de *C. stimulator* en cavidad faríngea.

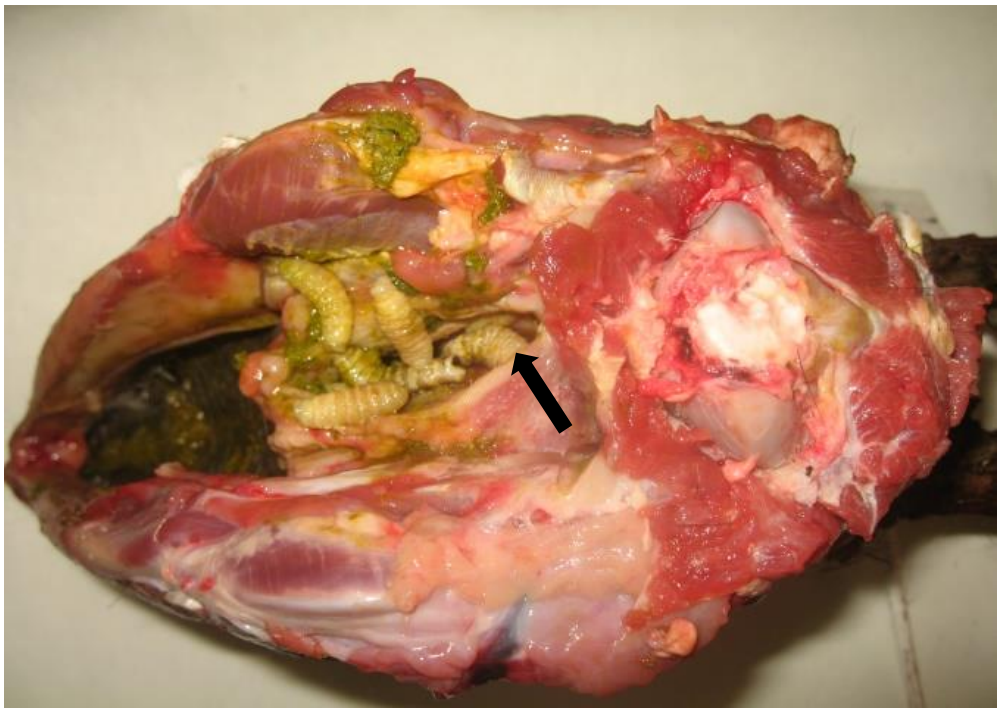


Figura N° 25. Larvas de *C. stimulator* en cavidad oronasal.

Figura N° 26. Larva II, larva III y pupa de *C. stimulator*.

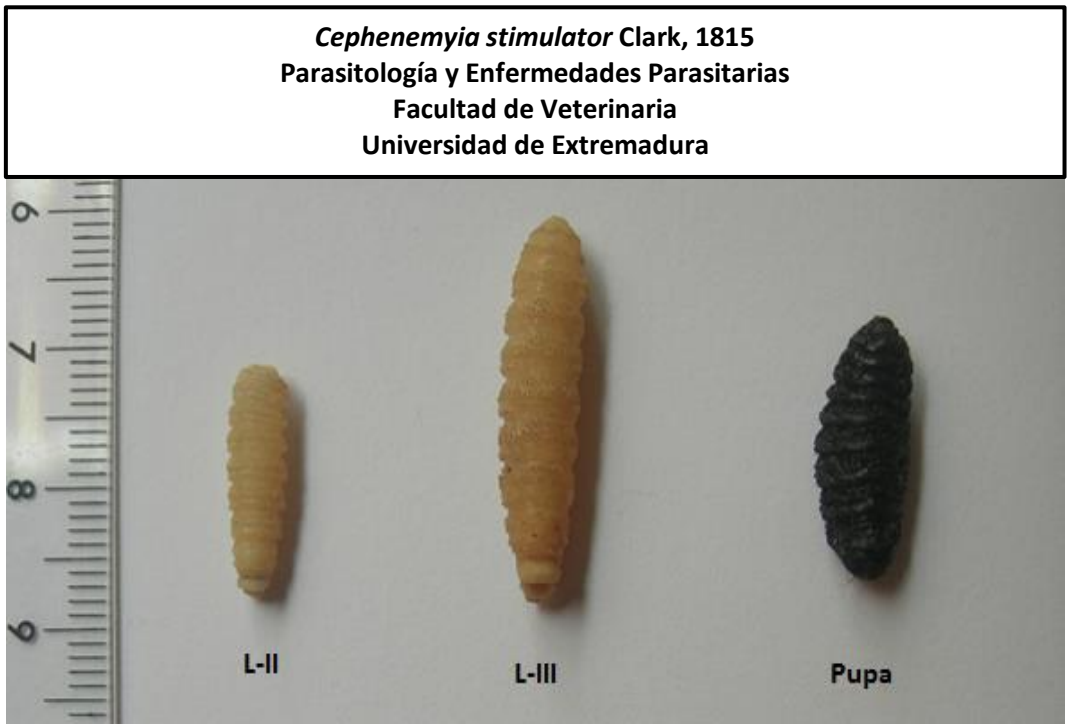


Figura N° 27. Filas de espinas dorsales de larva III de *C. stimulator.* Dichas espinas, además de colaborar con la fijación de las larvas en el interior del hospedador, generan irritación en la mucosa nasal y paranasal produciendo el subsiguiente cuadro sinusítico.

Figura N° 28. Pupas de *Cephenemyia stimulator*. Dichas pupas también denominadas "pupas coartadas" eclosionarán y darán lugar al imago de *C. stimulator*.

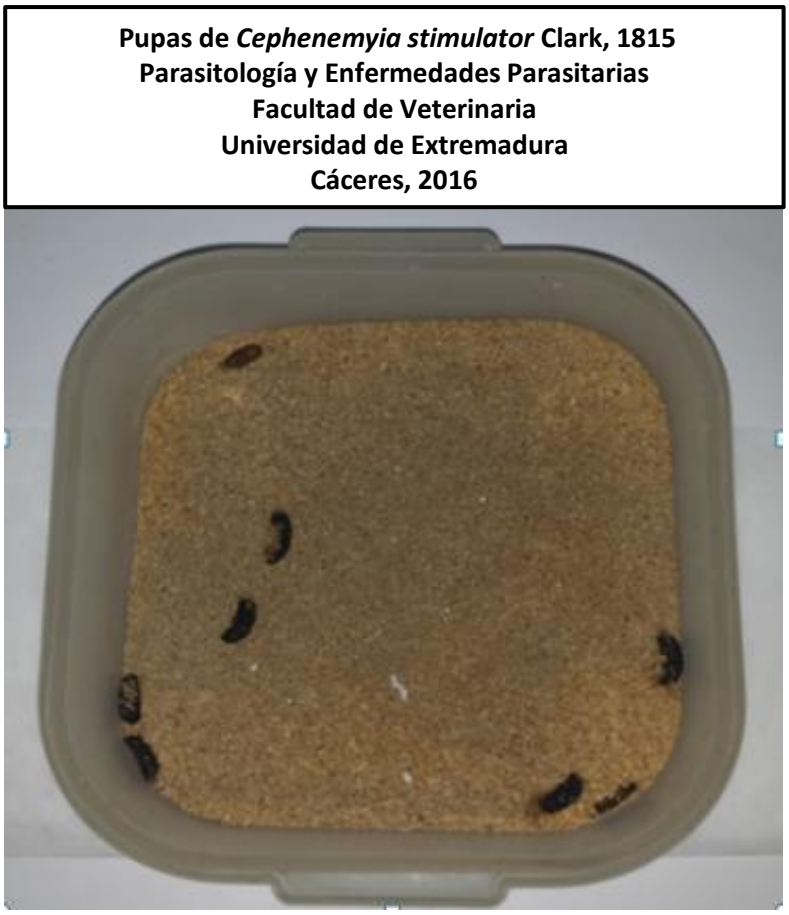


Figura N° 29. Imago de *Cephenemyia stimulator* (Huber R., 2010).

Figura N° 30. Quiste de *Sarcocystis spp* en tejido muscular de corzo.

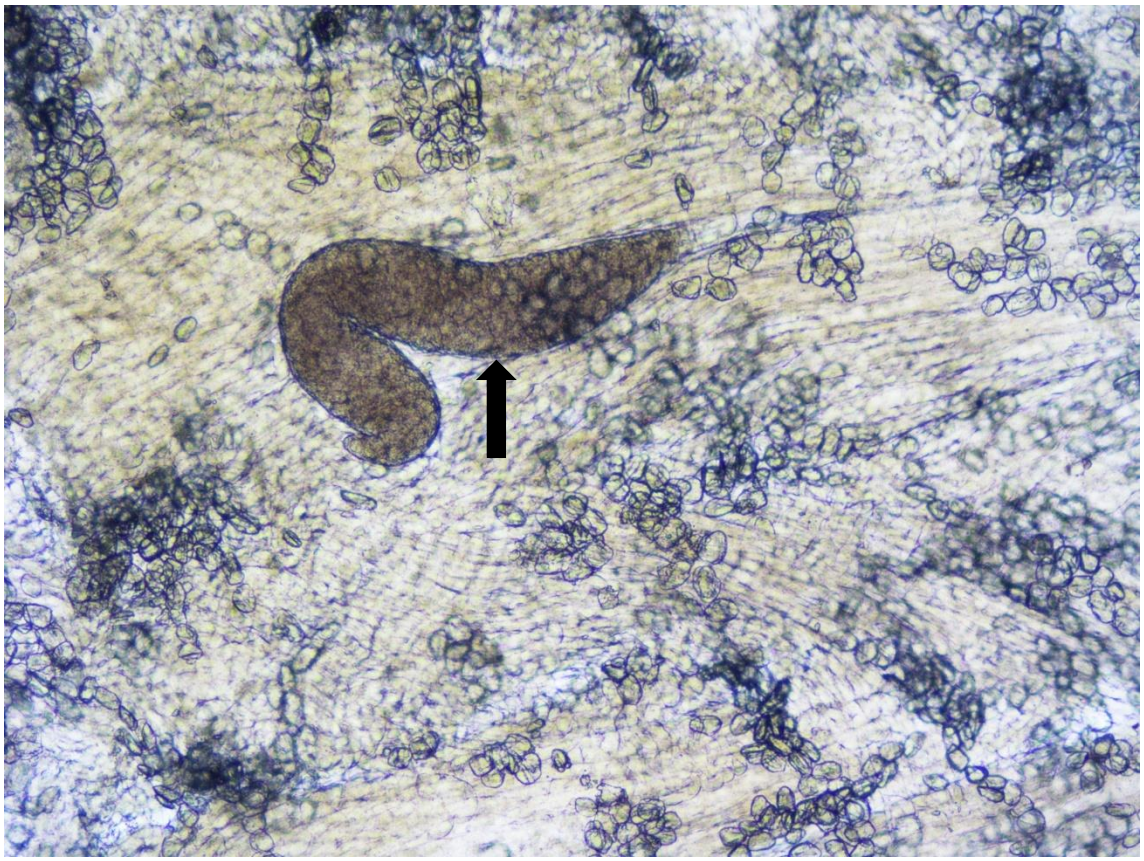


Figura N° 31. Quiste de *Sarcocystis spp* en corte histológico de lengua de corzo.

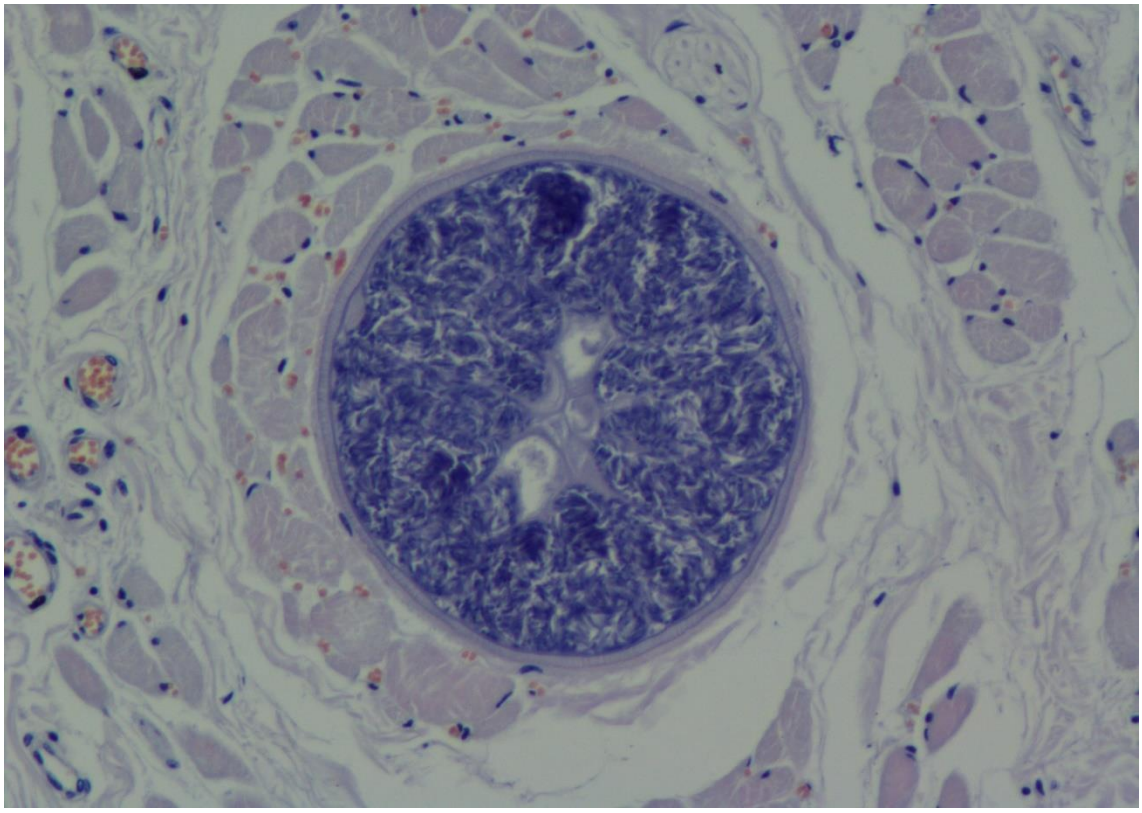


Figura N° 32. Hembra de *Rhipicephalus bursa.*

Figura N° 33. Hembra y macho de *Hyalomma marginatum.*