



Informe Final del proyecto:

“Bases epidemiológicas para el control de *Cephenemyia stimulator* en corzos en España”.

Luis E. Fidalgo Álvarez
Profesor del Dpto. de Ciencias Clínicas Veterinarias
Investigador Principal del Proyecto
Universidad de Santiago d Compostela
Julio de 2013

Informe Final del proyecto:

“Bases epidemiológicas para el control de *Cephenemyia stimulator* en corzos en España”.

Luis Eusebio Fidalgo Álvarez⁽¹⁾, Ana M^a López Beceiro⁽¹⁾, Jesús M^a Pérez Jimenez⁽²⁾ y Carlos Martínez Carrasco⁽³⁾.

⁽¹⁾Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidad de Santiago de Compostela.

⁽²⁾ Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología. Universidad de Jaén.

⁽³⁾ Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Murcia.

El presente proyecto se ha desarrollado en base al CONVENIO PARA ACTIVIDADES DE ASISTENCIA TÉCNICA ENTRE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA Y LA FUNDACIÓN FEDENCA, firmado con fecha 1 de junio de 2012 y con duración de un año.

El equipo de investigadores que desarrolla el proyecto está integrado por personal de las Universidades de Santiago de Compostela, Jaén y Murcia (Dr. Luis E. Fidalgo, Dra. Ana López Beceiro, Dr. Jesús M^a Pérez Jiménez y Dr. Carlos Martínez Carrasco).

En dicho convenio se establece, entre otras, la obligación de redactar un “Informe final del proyecto” al finalizar las actividades del mismo, motivo por el que se redacta el presente informe.

RESUMEN

Realizamos un estudio de la prevalencia de *Cephenemyia stimulator* en corzos en casi todo el territorio español con aprovechamiento cinegético de la especie, desde junio de 2012 a junio de 2013.

Todos los corzos analizados procedían de la caza legal en la modalidad de rececho (mayoritariamente) y batida, así como algunos de Centros de Recuperación de Fauna Silvestre. En total hemos examinado 303 animales de diferentes zonas, sin que se contemplase el 100% del territorio nacional ni exista una proporción ajustada del

número de muestras con la densidad de población estimada de cada lugar, lo cual debe tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

Todos los individuos fueron examinados, después de la obtención del trofeo, inspeccionando minuciosamente la tráquea, esófago, laringe, faringe y coanas, con el fin de detectar la presencia de larvas de *Cephenemyia* (en los casos remitidos por taxidermistas la exploración no pudo ser tan completa). Posteriormente se procedía a disección y retirada de estructuras blandas de la cabeza, con lo que la inspección de la presencia de larvas era mucho más minuciosa.

La prevalencia general del proceso, en los ejemplares analizados en el presente proyecto es del 16,50% (50 de 303 ejemplares). Además, en nuestro caso, la mayoría de los corzos con larvas de *Cephenemyia* procedían del noroeste peninsular (Galicia, Asturias y León) donde 44 de los 200 ejemplares analizados estaban parasitados (22%). El resto de los corzos analizados (103), procedentes fundamentalmente del resto de provincias de Castilla-León y Castilla La Mancha, presentaban una incidencia del 5,83% (6 de 103). Es de destacar que uno de estos ejemplares con larvas procedía de la provincia de Cáceres, zona con abundantes ungulados silvestres pero con una escasa población de corzos; mientras otro era el único positivo de una zona tradicionalmente corcera como es Soria.

A lo largo de esta primera aproximación al estudio del proceso en nuestro país, hemos comprobando que el porcentaje de individuos portadores de larvas de *Cephenemyia stimulator* es diferente en los distintos territorios, con una incidencia mayor en el noroeste del país, existiendo zonas concretas en las que la incidencia es muy alta mientras que otras zonas, incluso próximas a estas, no tienen ningún ejemplar positivo.

Respecto al Índice de Condición Corporar (ICC) y desarrollo de la cuerna, no hemos podido determinar diferencias entre los ejemplares parasitados y los libres de larvas.

El presente estudio recoge datos iniciales sobre la incidencia de *Cephenemyia stimulator* en corzos españoles, pero debería completarse con un proyecto más amplio en el que pudiéramos examinar un número igual al 5% de la tasa de aprovechamiento cinegético anual y de forma proporcional a las densidades de población y aprovechamiento cinegético de cada territorio. Se trataría de una segunda fase que, tal como habíamos acordado verbalmente, deberíamos iniciar este año.

INTRODUCCION

Conviene recordar que se decidió realizar el presente estudio como consecuencia de la creciente preocupación de los cazadores, FEDENCA y RFEC por los múltiples interrogantes que han surgido sobre la presencia de corzos afectados por los gusanos de la garganta (*Cephenemyia stimulator*) en España, la distribución territorial de la enfermedad y sus efectos que estos gusanos pueden ocasionar en los corzos.

El estudio se plantea partiendo de la hipótesis de que un porcentaje desconocido de corzos, posiblemente en la misma proporción de machos y hembras de diferentes edades, están parasitados, pero que la distribución territorial de la enfermedad y la incidencia en los distintos territorios es desconocida; incluso puede haber comarcas libres del parásito. Asimismo, asumimos que, a pesar de las muchas opiniones al respecto, no conocemos en realidad los efectos perjudiciales que ocasiona el parásito al corzo.

Por todo ello, nuestro interés fundamental consiste en estudiar la distribución geográfica del parásito en España y relacionar su presencia o ausencia con la condición corporal y desarrollo del trofeo del corzo (como índice del perjuicio causado por el parásito).

En una segunda fase, basándonos en los datos obtenidos en este primer estudio, podemos plantearnos un ensayo piloto de gran envergadura, en una zona controlada, para aplicar medidas encaminadas a controlar la enfermedad, si fuese necesario, pero evidentemente no es un aspecto a desarrollar en este momento, ni ha sido objetivo del presente proyecto.

Durante el desarrollo del trabajo nos hemos centrado en establecer contactos y estructurar el trabajo, contactando con posibles colaboradores en la recogida de muestras y datos, de forma que nos permitiera acceder a un número suficientemente amplio de muestras procedentes de todas las zonas de nuestro país con aprovechamiento cinegético de corzo. Aunque el objetivo para este primer año era obtener 150 muestras, el número de animales muestreados han sido en total 303, superando por tanto el objetivo establecido, lo que además demuestra que hemos alcanzado totalmente y de forma absolutamente exitosa el objetivo no explícito del proyecto, que consistía en la organización de un grupo amplio de colaboradores externos que posibilitase un amplio muestreo.

Debemos resaltar en este informe, antes de comenzar con datos concretos, que para efectuar la recogida de muestras a nivel nacional, tal como hemos mencionado, ha sido preciso la colaboración de un amplio número de personas: cazadores, gestores cinegéticos, taxidermistas de la Asociación Nacional de Taxidermistas de España y veterinarios de los Centros de Recuperación de Especies Silvestres; coordinados, en todos los casos, por el equipo investigador que desarrolla el estudio.

De los corzos analizados tomamos los datos de fecha de captura, lugar de procedencia, condición corporal (cuando ha sido posible) y desarrollo del trofeo, así como la presencia o no de larvas en el ejemplar y el tipo de larvas.

Las larvas recogidas en corzos de toda España, después de ser debidamente etiquetadas de forma individual, son analizadas para su identificación morfológica y se han dado los primeros pasos para aplicar las técnicas de PCR, con el fin de comprobar si el proceso está ocasionado siempre por *Cephenemyia stimulator* y solo por este parásito o si por el contrario existen otros géneros y especies implicados en el proceso. En este sentido existen datos procedentes de estudios realizados sobre otros Oestridos en ciervo, gamo, alce, etc., en los que diferentes investigadores han identificado más de una especie parasitando al mismo animal, incluso especies de Oestridos que no son parásitos habituales de la especie en cuestión, pero que de forma más o menos “accidental” parasitan al ungulado. En este sentido podemos citar los estudios realizados en ciervos y gamos en diferentes países, entre ellos en España, en los que se evidencia la presencia de más de un especie de Oestridos parasitando al mismo animal o el caso descrito en un corzo en la proximidades de Helsinki (Finlandia) parasitado por *Cephenemyia ulrichii*, teóricamente parásito del Alce, a pesar de que el corzo ha sido considerado hospedador específico de *Cephenemyia stimulator*.

Durante este año de estudio, aunque hemos superado ampliamente la cifra de 150 casos propuesta para el periodo, el número de ejemplares estudiados resulta claramente insuficiente para poder formular conclusiones definitivas y, además, la distribución territorial del origen de las muestras no guarda, en este momento, la proporción adecuada respecto los índices de población corcera en los diferentes territorios, tal como habíamos previsto al plantear el proyecto, por lo que el estudio actual se le consideraba sólo como una primera fase de un proyecto mucho mas amplio.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este proyecto se presentan de forma resumida y ordenada en la siguiente tabla 1 e imagen 1:

PROVINCIA	Total casos	Positivos	%Afectados
Asturias	8	2	25
Ávila	1	0	0
Burgos	22	0	0
Cáceres	1	1	100
Ciudad Real	1	0	0
Gerona	1	1	100
Guadalajara	22	2	9,09
La Coruña	50	0	0
León	61	16	26,23
Lérida	3	0	0
Lugo	60	26	43,38
Madrid	1	0	0
Orense	12	0	0
Palencia	1	1	100
Pontevedra	8	0	0
Segovia	15	0	0
Sevilla	1	0	0
Soria	29	1	3,45
Zamora	4	0	0
Zaragoza	2	0	0

Tabla 1.- Nº de casos estudiados en las diferentes provincias, con el número y porcentaje de corzos afectados por *Cephenemyia stimulator*.

La prevalencia general del proceso, en los ejemplares analizados hasta la fecha es del 16,50% (50 de 303 casos). Además, en nuestro caso, la gran mayoría de los corzos con larvas de *Cephenemyia* procedían del noroeste peninsular (Galicia, Asturias y León) donde 44 de los 200 ejemplares estudiados estaban parasitados (22%). El resto de los corzos analizados (103), procedentes fundamentalmente del resto de provincias de Castilla-León y Castilla La Mancha, presentaban una incidencia del 5,83% (6 de 103). Es de destacar que un ejemplar con larvas de este último grupo procedía de la provincia de Cáceres, zona con abundantes ungulados silvestres pero con una escasa población de corzos, mientras que otro fue cazado en Soria, donde la densidad de corzo es abundante; otros dos proceden de una zona más recientemente colonizada por los corzos (Guadalajara). Todo esto nos hace pensar que si bien es cierto que los corzos enfermos

se localizan preferentemente en el noroeste peninsular y más concretamente en las provincias de Lugo, Asturias y León, no debemos desestimar la posible presencia de *Cephenemyia stimulator* en otros lugares.



Figura 1.- Representación gráfica del origen de las muestras y de los casos positivos. Mayor tamaño de símbolo en zonas con mayor porcentaje de muestras.

En cualquier caso, los datos del presente trabajo deben interpretarse teniendo en cuenta que la toma de muestras no guarda relación exacta con las densidades de población de las diferentes provincias ni con el aprovechamiento cinegético, resultando por otra parte escaso este número de muestras para las características de un estudio epidemiológico como este. A pesar de la advertencia anterior, en nuestra opinión, los datos indican claramente la tendencia de la distribución del proceso en España, no son en absoluto datos definitivos de un estudio epidemiológico robusto pero si marcan claramente la distribución del proceso en el territorio nacional.

Debemos mencionar asimismo, que hemos recogido algunas informaciones no comprobadas científicamente pero rigurosas y en nuestra opinión totalmente veraces (en la intención del informador) en las que algunos cazadores nos informan de observaciones de “gusanos” en los corzos -posiblemente *Cephenemyia stimulator*- desde hace casi 10 años en la Sierra de Guadalupe, Puerto de San Vicente en Cáceres, asociando estos gusanos a un descenso de la poco numerosa población corcera de esa zona. También en los límites de Asturias y Lugo, algunos cazadores veteranos nos dicen que han visto estos gusanos, en su opinión “lo mismo que en las ovejas” desde hace años sin darles ninguna importancia y sin que en su opinión perjudicasen mucho a los animales. Insisto, son informaciones que no es posible contrastar en este momento, pero que he preferido mencionar en el informe.

ÍNDICE DE CONDICIÓN CORPORAL

Respecto al estado corporal, sólo se ha podido valorar en el grupo de corzos que hemos muestreado personalmente y los procedentes de Centros de Recuperación o de cazadores previamente entrenados para este tipo de valoración, pero no en el grupo de casos muestreados por taxidermistas. Por tanto, este dato se ha obtenido sólo en 76 ejemplares, 29 portadores de larvas y 47 libres del parásito, no observando diferencias entre ambos grupos.

El Índice de Condición Corporal (ICC) de la gran mayoría de los corzos examinados, en ambos grupos, era el normal para la especie, teniendo en cuenta la edad, sexo y momento del año, con un valor en trono a 3 en la escala habitual sobre 5.

Es cierto que algunos ejemplares, tanto de los parasitados como de los no parasitados presentaban Índice de Condición Corporal inferior a la normal, pero sin que se pueda establecer una relación con la presencia o no de *Cephenemyia*. En estos casos, un examen más profundo del animal permitía identificar otras lesiones y/o enfermedades, tanto en los parasitados como en los no parasitados por larvas de *Cephenemyia*, que justificaban sin lugar a dudas la alteración del estado corporal (intensas parasitosis pulmonares, fracturas de mandíbula, lesiones traumáticas (algunas compatibles con mordeduras), fracturas, desgarros, en ocasiones infectadas y supurando, etc.

ANÁLISIS GENÉTICOS DE LARVAS DE *Cephenemyia stimulator* OBTENIDAS DE CORZOS.

En este apartado del proyecto planteamos el objetivo de caracterizar la estructura genética de las infrapoblaciones de *Cephenemyia stimulator* parásitas del corzo en la Península Ibérica, con la intención de avanzar en el conocimiento de la epidemiología de estas parasitosis, así como explorar el papel de las reinfestaciones.

En esta fase preliminar del trabajo hemos procesado larvas de Galicia y de Cataluña, todas ellas extraídas mediante necropsia de corzo (*Capreolus capreolus*).

Para realizar este análisis, las larvas, una vez extraídas se mantienen fijadas en etanol (90% o absoluto) a 4°C hasta su análisis. Mediante disección de las larvas, se extrajo una pequeña porción de tejido muscular de la región anterior de las mismas. Para la extracción del ADN se empleó la técnica de HotSHOT (Truett et al., 2000 BioTechniques, 29: 52–54).

Mediante PCR se amplificó un fragmento de 0,7 Kb de la citocromo oxidasa I (COI) (Otranto et al., 2005. Medical and Veterinary Entomology, 19: 96-100; Otranto y Stevens, 2006 CABI Publishing, Wallingford: 51-66), siguiendo la metodología descrita por Moreno et al. (2012) (Citado como: Moreno V, et al. (2012). Caracterización molecular de los dípteros productores de oestrosis en bóvidos domésticos y silvestres. En: Proyectos de Investigación 2009-10. E. Castro Galiano (Ed). Universidad de Jaén, Jaén. Páginas: 49-67).

.

Tabla 1. Primers diseñados para amplificar el gen de la COI, utilizado en este estudio.		
OVIS-UEA7	5´-TACAGTTGGAATAGACGTTGATAC-3´	688 pb
OVIS-UEA10	5´-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3´	

Los diferentes amplificados fueron clonados en el vector plasmídico pGEMT-easy (Promega®) y finalmente fueron secuenciados varios clones positivos de cada una de ellos en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (Madrid).

En la siguiente figura podemos ver gráficamente el resultado del análisis (Figura 2)

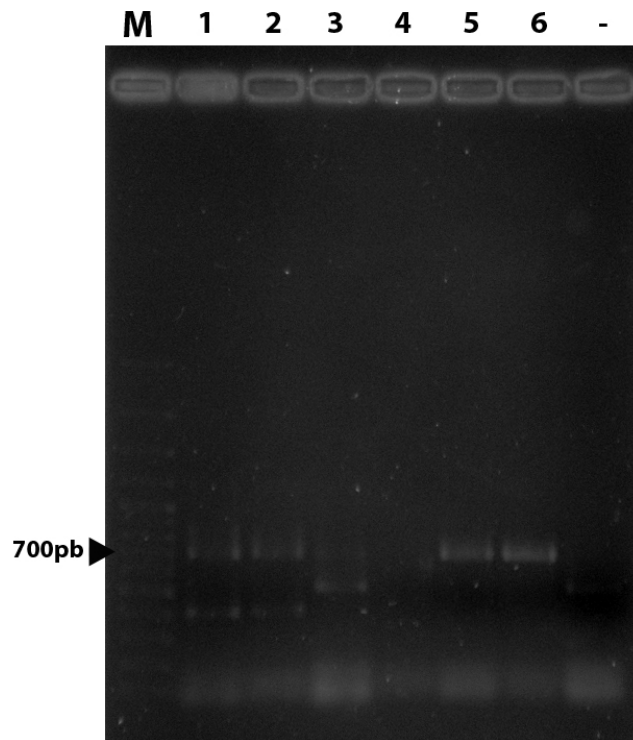


Figura 2. Resultados de la electroforesis mostrando la obtención de varias bandas para cada muestra. El pocillo de la izquierda contiene un marcador de peso molecular, mientras que el de la derecha es un control negativo.

En general, los “primers” han funcionado bien, obteniendo la banda de 700 pb esperada en la mayoría de las muestras, aunque como en otras especies de oéstridos se han obtenido además varias bandas, lo que pone de manifiesto que existe una alta heteroplasmia para este marcador mitocondrial, debida fundamentalmente a inserciones y deleciones de tamaño muy variable, como se pone de manifiesto por la amplificación de bandas de menor tamaño en este caso son debidas a deleciones (Figura 2).

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las disponibles en el GenBank y se observa que estas presentan un alto porcentaje de identidad con las de *Cephenemyia stimulator*, aunque la continuación del trabajo precisa apli

La continuación de este trabajo pasa por caracterizar la COI del resto de material obtenido, así como el desarrollo y aplicación de nuevos marcadores moleculares, como microsatélites e ITSs.

DESARROLLO EL TROFEO

El desarrollo del trofeo fue valorado en todos los corzos machos adultos considerados en el presente estudio con el fin de comparar la cuerna de los parasitados y de los no parasitados, bajo la hipótesis de que generar una nueva cuerna cada año supone un importante esfuerzo metabólico que un organismo enfermo no puede asumir con el mismo resultado que uno sano, y que, por tanto la diferencia entre el desarrollo de la cuerna en los corzo sanos y los parasitados puede servirnos como índice general del grado de perjuicio que las larvas ocasiona a su hospedador.

Antes de continuar debemos dejar bien claro que el desarrollo de la cuerna está influenciado por múltiples factores (edad, alimentación, estado de salud, estrés, etc.) entre los que parece cobrar especial importancia la edad, por lo que el llegar a comprobar diferencias entre los grupos, si estas no son muy marcadas, debería requerir el análisis detallado y profundo de una población suficientemente amplia y lo más homogénea posible, para poder responsabilizar a un factor concreto de esa diferencia.

	Larvas	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Longitud Cuerna Izda.	No	21,3514	3,62701	,29814
	Si	20,7939	2,82049	,40293
Longitud Cuerna Drcha.	No	21,2255	2,98760	,24558
	Si	20,9143	2,39296	,34185
Altura Medida Cuerna	No	21,2885	3,14084	,25818
	Si	20,8541	2,46840	,35263
Luchadera Izda.	No	5,8979	2,68517	,22147
	Si	5,1245	2,21242	,31606
Luchadera Drcha.	No	5,5073	2,80361	,23124
	Si	5,1694	1,88040	,26863
Contra Izda.	No	3,6156	1,82968	,15091
	Si	3,2918	1,69655	,24236
Contra Drcha.	No	3,6782	2,29195	,18904
	Si	3,2857	1,76009	,25144
Suma dimensiones	No	61,4066	12,21527	1,01442
Cuerna	Si	58,5796	9,47833	1,35405

Tabla 2. Estadísticos de las medidas estudiadas en la cuerna de corzos portadores de larvas *Cephenemyia stimulator* y corzos sin larvas.

En la tabla anterior (tabla 2), podemos ver los estadísticos del grupo estudiado considerado en este apartado (no se consideran los ejemplares muestreados durante el desarrollo de la cuerna, ni tampoco, como es lógico, las hembras)

Podemos comprobar que todos los valores medios de las medidas analizadas son ligeramente mayores en los corzos libres de larvas que en los parasitados, aunque también tenemos que insistir en que la mayoría de los ejemplares parasitados proceden del noroeste, donde el desarrollo de la cuerna suele ser menor que en otras zonas tradicionales de la caza del corzo como son Burgos y Soria.

En cualquier caso se hace necesario un análisis estadístico más profundo de los resultados para saber si existen diferencias, respecto al desarrollo de la cuerna, entre los corzos con larvas y los que no las tienen. Para ello aplicaremos la prueba estadística T de igualdad de medias para muestras independientes. Los resultados de esta prueba se anotan de forma ordenada en la tabla 3.

En primer lugar conviene destacar que la Prueba de Levene de igualdad de varianzas establece que se deben asumir varianzas iguales para todos los parámetros analizados excepto para los referidos a las dimensiones de la luchadera y contra (punta posterior) derechas.

Según el resultado de la Prueba T para la Igualdad de Medias, en muestras independientes, no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (corzos con y sin larvas) en ninguno de los parámetros estudiados que reflejan el desarrollo de la cuerna.

La representación gráfica en el plano X Y del valor medio del parámetro “Suma Medidas Cuerna” en los 228 casos analizados (Figura 3) nos permite comprobar que los ejemplares parasitados ocupan posiciones en la zona media y media inferior, con algunos casos entre los valores más altos.

Por tanto, los resultados de la Prueba T para la Igualdad de Medias, visto gráficamente para el parámetro “Suma Medidas Cuerna”, nos indica que no existen diferencias estadísticas entre el desarrollo de la cuerna de los corzos con y sin larvas de *Cephenemyia stimulator*.

Prueba T para Igualdad de Medias (Muestras Independientes)		Prueba de Levene				
		F	Sig.	t	gl	Sig.
Longitud Cuerna Izda.	Se asumen varianzas iguales	,124	,725	,982	195	,327
Longitud Cuerna Drcha.	Se asumen varianzas iguales	,904	,343	,662	195	,509
Altura Medida Cuerna	Se asumen varianzas iguales	,329	,567	,882	195	,379
Luchadera Izda.	Se asumen varianzas iguales	1,583	,210	1,820	194	,070
Luchadera Drcha.	No asumen varianzas iguales	13,449	,000	,953	123,243	,342
Contra Izda.	Se asumen varianzas iguales	1,089	,298	1,092	194	,276
Contra Drcha.	No se asumen varianzas iguales	5,959	,016	1,248	106,419	,215
Suma dimensiones Cuerna	Se asumen varianzas iguales	2,506	,115	1,476	192	,142

Tabla 3. Prueba de Levene y Prueba T para la Igualdad de Medias para muestras independientes. Se estudian los parámetros considerados en el desarrollo de la cuerna y no se observan diferencias significativas en ningún caso.

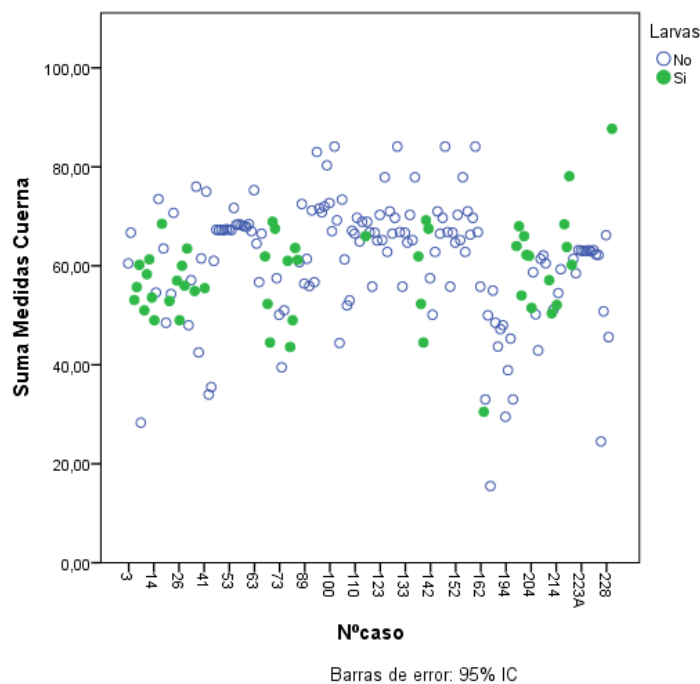


Figura 3. Representación gráfica de “Suma Medidas Cuerna” en cm.

CONCLUSIONES

- La prevalencia de *Cephenemyia stimulator* en corzos españoles, según los datos del presente proyecto, es del 16,50%.
- Los corzos enfermos se localizan, en la inmensa mayor parte de los casos, en el noroeste peninsular; con casos aislados en otras poblaciones (Cáceres, Palencia, Soria, Guadalajara o Gerona). Esto nos hace pensar en que podemos estar asistiendo a una extensión territorial progresiva del proceso.
- No se observan diferencias en el Índice de Condición Corporal entre los corzos con larvas de *Cephenemyia stimulator* y los libres del parásito.
- Tampoco hemos podido establecer diferencias entre las dimensiones de la cuerna en corzos con y sin larvas de *Cephenemyia stimulator*, aunque, debido a que son muchos los factores que influyen en el desarrollo de la cuerna, este apartado precisa un estudio concreto más profundo y amplio.

En Lugo a 9 de julio de 2013.

Firmado Luis E. Fidalgo