

*Detección molecular de patógenos vinculados a anemia hemolítica en ungulados silvestres del Parque Natural Sierras de Cazorla, Segura y las Villas.*



---

**Paz Mínguez Panadero**

Tutores: Eva Graciá Martínez, Paloma Prieto Yerro, Jose Antonio Sánchez Zapata

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA APLICADA

*Área de ECOLOGÍA*

Grado en Ciencias Ambientales

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso 2020-2021

## RESUMEN:

Las dinámicas poblacionales de ungulados silvestres se caracterizan por presentar en altas densidades episodios de fuertes mortalidades asociados a brotes de enfermedades, algunas de ellas podrían estar transmitidas por garrapatas. En este trabajo de fin de grado se analiza la presencia de varios patógenos (géneros: *Ehrlichia sp*, *Anaplasma sp*, *Neorickettsia sp*, *Babesia sp* y *Theileria sp*) en sangre de gamos (*Dama dama*), ciervos (*Cervus elaphus*) y cabra montés (*Capra pyrenaica*) del Parque Natural Sierras de Cazorla, Segura y las Villas, que murieron súbitamente y presentaron signos de anemia hemolítica. Un total de 20 (10 sanos, 10 enfermos) muestras fueron analizadas mediante PCR y se secuenciaron siempre que fue posible, para su identificación. Se encontraron 16 positivos para *Theileria spp* con una prevalencia del 80% y 14 positivos para *Anaplasma spp* con una prevalencia del 70% y coinfección en el 55% de las muestras. Las muestras analizadas fueron portadoras de *Theileria capreoli*, *T. OT3*, *T. cervi* y *Anaplasma bovis*. Los ungulados silvestres son un importante reservorio de los patógenos identificados, pero las altas prevalencias detectadas sugieren que no sean causantes directos de los episodios de mortalidad masiva sino patógenos oportunistas que contribuyen a la muerte del animal en interacción con otros factores.

**Palabras clave:** Ungulados silvestres, garrapatas, *Babesia sp*, *Theileria sp*, *Anaplasmataceae*, Parque Natural Sierras de Cazorla, Segura y las Villas.

## ABSTRACT:

The population dynamics of wild ungulates are characterized by presenting high-density episodes of high mortality associated with disease outbreaks, some of them could be transmitted by ticks. This project analyzes the presence of several pathogens (genus: *Ehrlichia sp*, *Anaplasma sp*, *Neorickettsia sp*, *Babesia sp* y *Theileria sp*) in the blood of fallow deer (*Dama dama*), deer (*Cervus elaphus*) and ibex (*Capra pyrenaica*) of the Natural Park of Sierras de Cazorla, Segura and las Villas. A total of 20 samples (10 healthy and 10 sick) were analyzed by PCR and sequenced whenever possible for its identification. Sixteen were found positive for *Theileria spp* with a prevalence of 80% and 14 positive for *Anaplasma spp* with a prevalence of 70%, and coinfection in 55% of the samples. The analyzed samples were carriers of *Theileria capreoli*, *T. OT3*, *T. cervi* and *Anaplasma bovis*. Wild ungulates are important reservoir of the identified pathogens. However, the high prevalence detected

Detección molecular de patógenos vinculados a anemia hemolítica en ungulados silvestres del Parque Natural Sierras de Cazorla, Segura y las Villas.

suggest that they do not play a role as direct responsible of massive mortalities, but act as opportunistic parasites contributing to the death of the animal in interaction with other factors.

**Keywords:** Wild ungulates, ticks, *Babesia sp*, *Theileria sp*, *Anaplasmataceae*, Natural Park of Sierras de Cazorla, Segura y las Villas.



## ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	5
1.1	Ungulados silvestres en la Sierra de Cazorla.....	7
1.2	Posibles agentes zoonóticos presentes en los ungulados silvestres.....	8
1.2.1	Ciclo biológico de <i>Babesia sp</i> .....	8
1.2.2	Ciclo biológico de <i>Theileria sp</i> .....	9
1.2.3	Ciclo biológico de <i>Anaplasmataceae</i> .....	11
2.	ANTECEDENTES.....	13
3.	OBJETIVOS.....	14
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
4.1	Sistema de estudio.....	15
4.2	Análisis de laboratorio.....	17
4.2.1	Extracción del ADN.....	17
4.2.2	Identificación de patógenos mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	18
4.2.3	Electroforesis en gel de agarosa.....	20
4.2.4	Estimas de prevalencia.....	20
4.2.5	Secuenciación Sanger de los productos PCR amplificados.....	21
4.2.6	Análisis filogenéticos para la identificación taxonómica de los patógenos.....	21
5.	RESULTADOS.....	22
5.2	Identificación de las secuencias obtenidas para el marcador BAB.....	23
5.3	Identificación de las secuencias obtenidas para el marcador EHR.....	24
6.	DISCUSIÓN.....	26
6.1	Prevalencia.....	26
6.2	Patógenos identificados.....	27
6.3	Limitaciones y proyección futura.....	28
7.	CONCLUSIÓN.....	30
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	31
9.	AGRADECIMIENTOS.....	37

## 1. INTRODUCCIÓN

La ecología es el estudio de la relación, distribución y abundancia de las comunidades o las poblaciones con el ambiente que los rodea (Dodson *et al.*, 1998), por tanto, aborda el estudio de relaciones simbióticas como el mutualismo, el comensalismo, la depredación o el parasitismo. En este trabajo abordaré el estudio del parasitismo. Este se podría definir como una asociación interespecífica entre organismos, parásito y huésped en la que el primero, generalmente de menor tamaño y único beneficiado, presenta adaptaciones para vivir en, o sobre, organismos huésped de los que depende metabólicamente y con los que realiza un intercambio mutuo de sustancias (Poulin, 2006). Es importante el estudio de la interacción entre parásito y huésped ya que los parásitos pueden afectar a la relativa abundancia de diferentes especies, lo que justifica la inclusión del parasitismo como fuerza biótica capaz de determinar la biodiversidad de las comunidades (Poulin, 1999). En el caso de los animales, su índice de transmisión depende de las interacciones entre animales infectados y los susceptibles de infectarse, así como de la probabilidad de que la infección se produzca durante cada interacción (Triguero-Ocaña *et al.*, 2020). Todos los grandes grupos de organismos conocidos (virus, bacterias, protozoos, hongos, plantas y animales) tienen especies que han desarrollado adaptaciones para la vida parasitaria, por lo que los parásitos son de naturaleza muy diversa (Price, 1980). Algunos de los organismos mencionados anteriormente son capaces de causar enfermedades infecciosas en los animales o las plantas, que pueden ser muy dañinas o incluso fatales para sus huéspedes, por lo que se les considera organismos patógenos.

Por otra parte, es clave el estudio de esta interacción ya que los parásitos pueden provocar enfermedades zoonóticas. Una enfermedad zoonótica es una enfermedad que puede transmitirse entre animales y seres humanos (Hubálek, 2003). La epidemiología general de las enfermedades zoonóticas estudia la relación entre los animales domésticos, silvestres o sinantrópicos como reservorios de diferentes patógenos para los humanos (WHO, 2006). Muchas de estas enfermedades incluyen vectores artrópodos como son las garrapatas, en sus ciclos de transmisión (Lemon *et al.*, 2008) jugando un papel importante en la ecología de estas enfermedades. Además, la vida silvestre es un factor clave en el control de estas enfermedades. En concreto, los animales salvajes son huéspedes adecuados para los vectores de garrapatas y reservorios de los patógenos (Orkun *et al.*, 2019). Por ello, representan una amenaza para los seres humanos y los animales domésticos. Existe un

número elevado de patógenos transmitidos por garrapatas de preocupación para la salud humana y animal, pero dentro de estos, se pueden destacar los parásitos intracelulares obligados como *Anaplasma* o *Ehrlichia spp.*, *Babesia* o *Theileria spp.* debido a las enfermedades infecciosas que causan (Díaz-Cao *et al.*, 2021). Estas enfermedades causan graves pérdidas económicas en la industria ganadera y los patógenos zoonóticos presentan una elevada incidencia en Europa. Actualmente, muchas de las enfermedades clasificadas como zoonóticas están en aumento a nivel mundial, y superarán las 200 especies (Reyes-Novelo *et al.*, 2011).

Las dinámicas poblacionales de ungulados silvestres se caracterizan por presentar en altas densidades episodios de fuertes mortalidades asociados a brotes de enfermedades, algunas de ellas podrían ser transmitidas por garrapatas (Espí, 2011). En este trabajo se analiza la presencia de varios patógenos zoonóticos, en sangre de gamos (*Dama dama*), ciervos (*Cervus elaphus*) y cabra montés (*Capra pyrenaica*) que murieron súbitamente en la primavera de 2018 y que en el estudio histopatológico de estos animales realizado en la Universidad de Córdoba, se detectó hemosiderosis en muchos órganos, lo que sugiere anemia hemolítica (Risalde, 2018). Los resultados de este estudio esclarecerán si alguno de estos agentes patógenos estuvo directamente implicado en este episodio de mortalidad, que afectó a decenas de animales. Identificar y entender el funcionamiento de los ungulados silvestres como reservorios de patógenos es clave tanto desde un punto de vista sanitario, como de la conservación y la gestión de especies silvestres y domésticas.

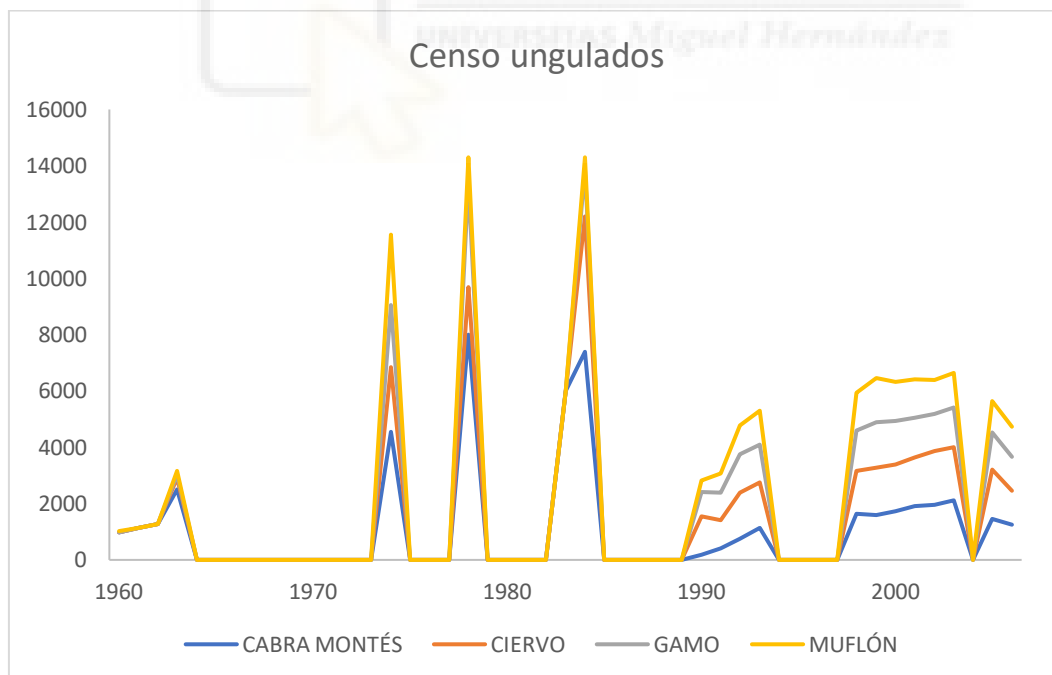


**Figura 1.** Gamo (*Dama dama*) y Ciervo (*Cervus elaphus*). Autores: Paloma Prieto y Juan Monje.

### 1.1 Ungulados silvestres en la Sierra de Cazorla

Los ungulados (*Ungulata*) pueden definirse como mamíferos placentarios que caminan apoyando los extremos de sus dedos revestidos de pezuñas o aquellos que descienden de un animal con estas características. Los ungulados se encuentran ampliamente distribuidos por todo el planeta de manera natural, menos en la Antártida y Oceanía, donde han sido introducidos.

En este estudio estudiaré algunos de los ungulados silvestres que se encuentran en Parque Natural Sierras de Cazorla, Segura y las Villas, como son el ciervo (*Cervus elaphus*), la cabra montés (*Capra pyrenaica*) y el gamo (*Dama dama*). El parque alberga una cuarta especie, el muflón (*Ovis aries musimon*), aunque con este no hemos trabajado en el laboratorio. Este hábitat posee un alto censo de los ungulados nombrados anteriormente y llegó a tener la mayor población de cabra montés registrada en España (León-Vizcaíno *et al.*, 1999). En la figura 1 se puede observar censos de ungulados comprendidos entre los años 1956 y 2007. A partir del año 2007 se cambió el método de censo y los resultados no son directamente comparables.



**Figura 2.** Censo de las poblaciones de ungulados (Cabra montés, ciervo, gamo y muflón)

Entre 1986 y 1987 se produce una disminución brusca en la población de ungulados. Esta disminución se debe al primer brote de sarna sarcóptica (*Sarcoptes scabiei*) observado por

primera vez en España en 1987 que tuvo lugar en el Parque Natural Sierras de Cazorla, Segura y las Villas. Este evento tuvo un impacto considerable sobre el número de individuos de la cabra montés, disminuyendo la población un 90% (Iacopelli *et al.*, 2019) quedando la población reducida a 150 individuos cuatro años después (Fandos, 1991). Aunque la enfermedad sigue afectando a esta población, lo hace de forma menos virulenta, contándose con más de 1.300 individuos. Las poblaciones de ciervos también se vieron seriamente afectadas disminuyendo considerablemente el número de individuos. Se destacan estas dos especies debido a que presentan mayor prevalencia de infestación en comparación con la observada en gamos y muflones. Esta enfermedad ha persistido y continúa circulando extensamente dentro de la comunidad local de ungulados y se considera imposible la erradicación en las poblaciones en libertad. Consecuentemente, las medidas de gestión deben ir dirigidas a la disminución de su impacto y gravedad en la población (León-Vizcaíno *et al.*, 1999)

## **1.2 Posibles agentes zoonóticos presentes en los ungulados silvestres.**

Aunque la sarna sarcóptica (*Sarcoptes scabiei*) ha sido identificada como el principal parásito influenciando las dinámicas poblacionales de ungulados en el Parque Natural Sierras de Cazorla, Segura y Las Villas (Iacopelli *et al.*, 2019), otros parásitos con sintomatología menos manifiesta podrían ser también relevantes. Concretamente, estudios previos han identificado la presencia de *Anaplasma sp*, *Coxiella Burnetii*, *Theileria sp* y *Babesia sp* (Pérez, 2007). A continuación, se describen los ciclos biológicos de las diferentes especies patógenas estudiadas.

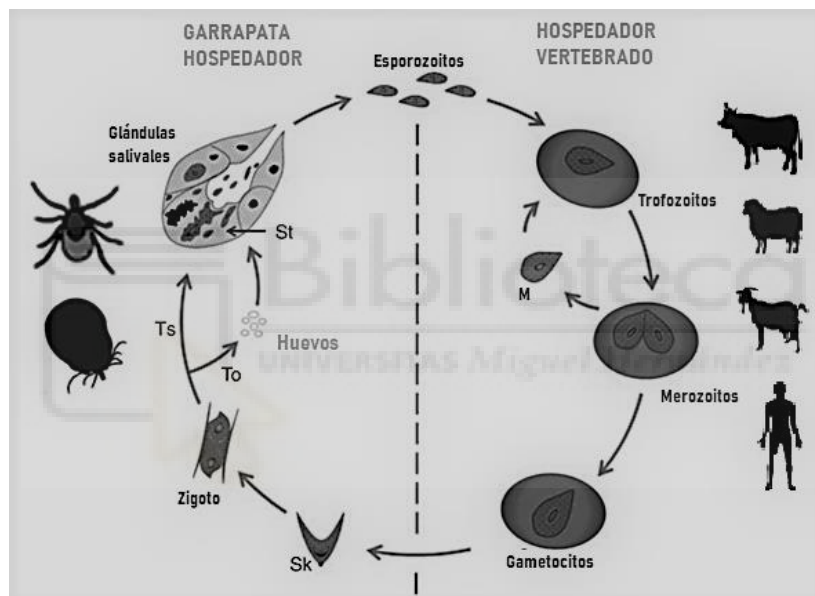
### **1.2.1 Ciclo biológico de *Babesia sp***

*Babesia sp* es un hemoparásito perteneciente al *phylum Apicomplexa*, clase *Aconoidasida*, orden *Piroplasmida*, superfamilia *Babesioidea*, familia *Babesiidae* y género *Babesia* (Schreeg *et al.*, 2016). Todas las especies de *babesia* se transmiten de forma natural por la picadura de garrapatas infectadas de la familia *Ixodidae*.

El ciclo biológico de *Babesia sp* se puede dividir en tres fases: merogonía, gametogonia y esporogonia. La esporogonia tiene lugar en el animal, mientras que las dos fases restantes acontecen en la garrapata (Ganzinelli *et al.*, 2018). Los esporozoítos de *Babesia sp* se inyectan en el torrente sanguíneo de un huésped vertebrado durante la ingestión de sangre de una garrapata infectada. Después, los esporozoítos invaden los eritrocitos y se convierten



en trofozoítos. Estos se dividen por fisión binaria y producen merozoítos (Rothschild, 2013). Algunos merozoítos se convierten en gametocitos que podrían iniciar la infección en la garrapata vector. Cuando la garrapata se alimenta de un hospedador infectado adquiere los gametocitos (Ganzinelli *et al.*, 2018). Una vez en el intestino se produce la gametogénesis, que se trata de la fase de reproducción sexual del parásito, y se forman los zigotos. Los zigotos sufren una serie de cambios morfológicos dando lugar a los kinetos (Mehlhorn *et al.*, 1993). Los kinetos acceden a la hemolinfa de la garrapata replicándose e invadiendo varios órganos como glándulas salivales y ovarios, donde se produce la esporogonia. En esta fase los kinetos maduran a esporozoítos. A través de la picadura de la garrapata en el huésped, los esporozoítos recién desarrollados se inoculan en él (Hunfeld *et al.*, 2008).

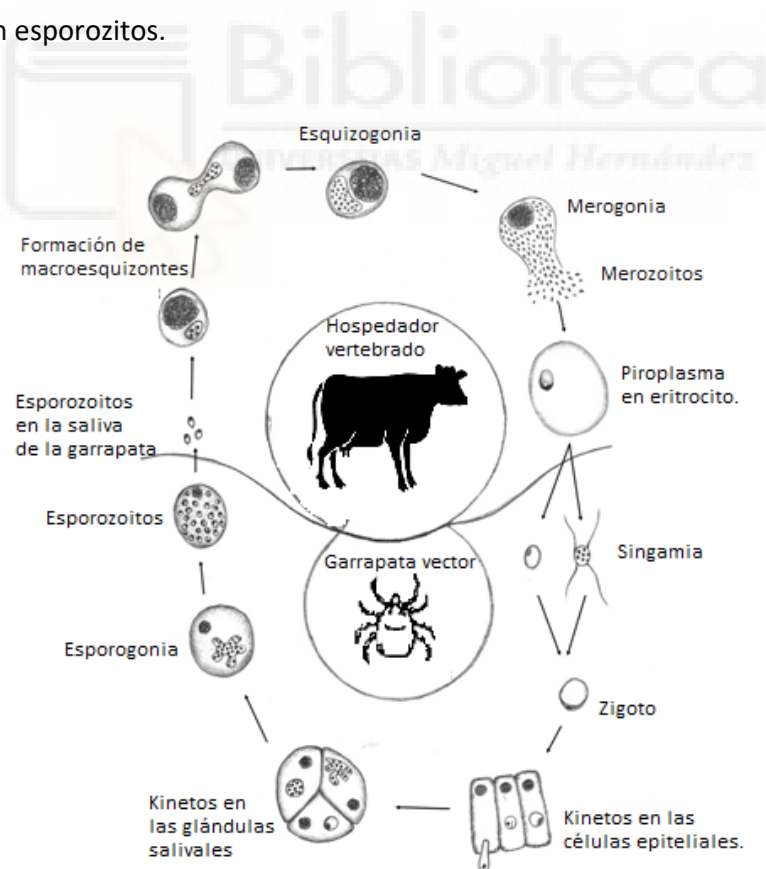


**Figura 3.** Ciclo biológico *Babesia sp.* Imagen tomada (Ganzinelli *et al.*, 2018).

### 1.2.2 Ciclo biológico de *Theileria sp*

*Theileria* son parásitos intracelulares que infectan a mamíferos por todo el mundo (Shaw, 2003). Pertenecen al *phylum Apicomplexa*, clase *Sporozoea*, orden *Piroplasmida*, familia *Theileriidae* y género *Theileria* (Mans *et al.*, 2015). Esta especie causa la enfermedad theileriosis que afecta a rumiantes domésticos y salvajes. Son los únicos parásitos de los animales domésticos que viven en los linfocitos. Esta especie es transmitida por garrapatas *Ixodidae* del género *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Amblyomma* y *Haemaphysalis* (Remesar *et al.*, 2019).

El ciclo de vida presenta varias etapas del desarrollo morfológicamente distintas en la garrapata y en las células de los mamíferos (Shaw, 2003). Implica la reproducción asexual de los parásitos en etapa sanguínea en el animal huésped y la reproducción sexual de los parásitos en un vector de garrapatas (Sivakumar *et al.*, 2014). Los parásitos se transmiten a los huéspedes cuando estos se alimentan de garrapatas infectadas. Los esporozoitos invaden las células linfáticas, donde se transforman en una estructura multinucleada conocida como macroesquizonte que posteriormente deriva en otra estructura de menor tamaño o microesquizonte. Los merozoítos se liberan y estos invadirán los glóbulos rojos (Mehlhor *et al.*, 1998). Cuando una garrapata se alimenta de sangre del animal parasitado, ingiere eritrocitos infectados con merozoítos. Estos forman cuerpos redondos capaces de introducirse en las células epiteliales del intestino de la garrapata. Una vez en el intestino se produce la gametogénesis, que se trata de la fase de reproducción sexual del parásito, y se forman los cigotos. Los cigotos sufren una serie de cambios morfológicos dando lugar a los cinetos (Mehlhorn *et al.*, 1993). Los cinetos migran a las glándulas salivales y se transforman en esporozoitos.



**Figura 4.** Ciclo biológico general de *Theileria* usando *T. parva* como ejemplo. Imagen tomada de (Mans *et al.*, 2015).

### 1.2.3 Ciclo biológico de *Anaplasmataceae*

La familia *Anaplasmataceae* incluye los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*, y *Wolbachia* (Dumler *et al.*, 2015). Estas bacterias son transmitidas por garrapatas ixódidas (*Anaplasma* y *Ehrlichia*) o por helmintos (*Neorickettsia*), así como endosimbiontes de invertebrados (*Wolbachia*) (Rar *et al.*, 2011). Todos estos géneros infectan huéspedes invertebrados específicos (garrapatas, insectos, trematodos, nematodos o moluscos) que son abundantes en la naturaleza (Rikihisa, 2011). A diferencia de *Neorickettsia* y *Wolbachia*, que pueden ser transmitidas a través de generaciones de huéspedes invertebrados, *Anaplasma* y *Ehrlichia* no pueden pasar de garrapatas adultas a descendencia (transmisión transovárica) (MacLeod *et al.*, 1933).

A continuación, se describen brevemente la ecología de los géneros pertenecientes a la familia *Anaplasmataceae*, con mayor interés en el ciclo biológico de *Anaplasma*.

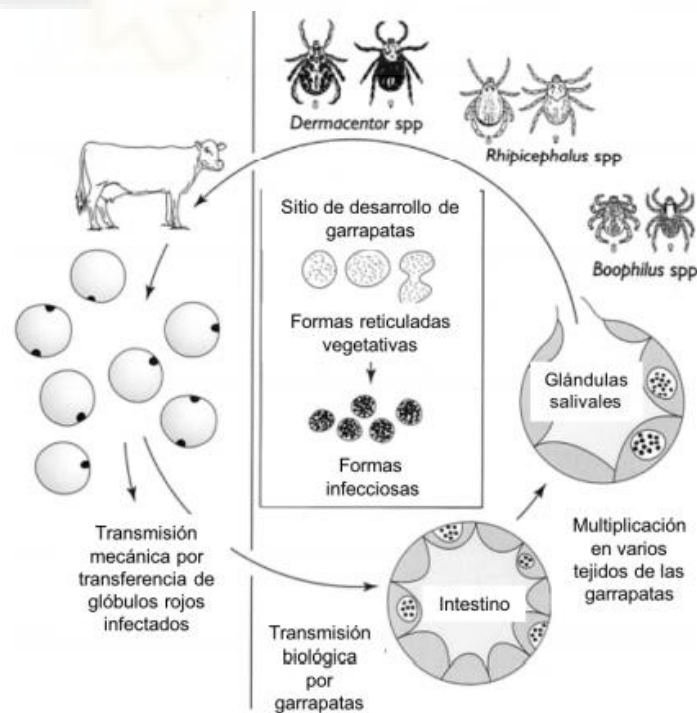
Las bacterias del género *Neorickettsia* se transmiten y mantienen en los trematodos que se encuentran en los caracoles *Pleuroceridae* (Rollinson., 2012). Se requiere la infección de mamíferos para completar el ciclo de vida de los trematodos, pero no se requiere directamente para el mantenimiento de *Neorickettsia*. Los perros, caballos, murciélagos y humanos adquieren accidentalmente *Neorickettsia* por ingestión de la etapa metacercaria de los trematodos en peces o insectos acuáticos adultos (Rikihisa *et al.*, 2015).

El género *Wolbachia* presenta una proximidad filogenética a estos patógenos mamíferos, pero a pesar de ello, *Wolbachia* desarrolló un estilo de vida endosimbiótico distinto dentro de una amplia gama de huéspedes Ecdysozoa que abarca taxones dentro del filo *Arthropoda* y nematodos *filariales* (Bordenstein *et al.*, 2005). Si bien, *Wolbachia* ya está muy extendida en el medio ambiente, está restringida a vivir exclusivamente dentro de las células huésped y se propaga al cambiar la biología de su especie huésped (Hoffmann *et al.*, 2015). Consecuentemente, no se consideró este género como potencial patógeno implicado en la mortalidad de los ungulados analizados.

El ciclo de *Ehrlichia* comienza cuando las larvas no infectadas se infectan al ingerir sangre de un hospedador infectado y mantienen *Ehrlichiae* hasta la etapa ninfal. Las ninfas infectadas pueden transmitir la bacteria a huéspedes susceptibles y a humanos durante la adquisición de sangre. No se ha demostrado la transmisión transovárica y es de suponer que los huevos y las larvas no alimentadas no están infectados (Paddock *et al.*, 2003).

*Anaplasma* son microorganismos intracelulares estrictos. Este género incluye tres especies que afectan a leucocitos y macrófagos (*Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis* y *Anaplasma platys*) y tres que parasitan los glóbulos rojos (*Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale* y *Anaplasma ovis*) (Ait Lbacha *et al.*, 2017). Estas bacterias son las causantes de anaplasmosis, un grupo de enfermedades de transmisión vectorial (Atif, 2015). La epidemiología de esta enfermedad es compleja y algunas de estas especies que la causan son especies poco patógenas, pero otras son altamente patógenas (García-Pérez *et al.*, 2016).

El ciclo de vida de *Anaplasma* implica a hospedadores vertebrados y a varios artrópodos, destacándose las garrapatas de la familia *Ixodidae* y dípteros hematófagos de la familia *Tabanidae*, con una replicación por fisión binaria en ambos (Rikihisa, 1991). Comienza el desarrollo en la garrapata cuando ésta se alimenta con sangre de animales infectados por *Anaplasma sp*, colonizan las células del intestino, en donde se replican y pasan a otros tejidos incluyendo glándulas salivales. A través de la saliva la garrapata transmite la bacteria a la sangre del animal. *Anaplasma sp* penetra en el glóbulo rojo por una invaginación de la membrana citoplasmática que da origen a una vacuola. Dentro de la vacuola el agente se multiplica por fisión binaria formando cuerpos de inclusión que invadirán nuevas células propagando la infección (Kocan *et al.*, 2008).



**Figura 5.** Ciclo de desarrollo de *Anaplasma marginale* en garrapatas y bovinos (Kocan *et al.*, 2003).

## 2. ANTECEDENTES

Para la realización de este trabajo de fin de grado se han utilizado 20 muestras de sangre de diferentes animales, 10 de ellas de animales que presentaron una fuerte anemia hemolítica y las otras 10 muestras de animales aparentemente sanos. Las muestras de animales aparentemente sanos proceden de ejemplares cazados a rececho en la Reserva Andaluza de Caza de Cazorla y Segura, sobre los que se hace vigilancia epidemiológica rutinaria.

En la tabla 1 se muestran los datos de los animales a los que pertenecen las muestras de sangre. Cuando nos referimos a estado general quiere decir el aspecto que presentaba el animal en el momento de la toma de la muestra, refiriéndose a estado normal cuando el animal no presentaba extrema delgadez o mal aspecto.

**Tabla 1.** Datos de los animales analizados.

ID MUESTRA	TÉRMINO MUNICIPAL	ESPECIE	RANGO EDAD	SEXO	ESTADO GENERAL
1	Santiago-Pontones	Ciervo	Adulto	Hembra	Muy delgado
2	Cazorla	Gamo	Joven	Hembra	Muy delgado
3	La Iruela	Cabra montés	Subadulto	Macho	Muy delgado
4	Cazorla	Gamo	Subadulto	Macho	Muy delgado
5	Cazorla	Gamo	Subadulto	Hembra	Muy delgado
6	Cazorla	Gamo	Subadulto	Hembra	Muy delgado
7	Santiago-Pontones	Ciervo	Adulto	Hembra	Muy delgado
8	Santiago-Pontones	Ciervo	Adulto	Macho	Muy delgado
9	Santiago-Pontones	Ciervo	Joven	Hembra	Muy delgado
10	Santiago-Pontones	Ciervo	Subadulto	Macho	Muy delgado
11	Cazorla	Ciervo	Subadulto	Hembra	Normal
12	Cazorla	Ciervo	Subadulto	Hembra	Normal
13	Cazorla	Ciervo	Subadulto	Macho	Normal
14	Cazorla	Gamo	Adulto	Hembra	Normal
15	Cazorla	Gamo	Adulto	Macho	Normal
16	Santiago-Pontones	Gamo	Adulto	Hembra	Normal
17	Cazorla	Ciervo	Adulto	Hembra	Normal
18	La Iruela	Ciervo	Adulto	Hembra	Normal
19	Cazorla	Gamo	Subadulto	Macho	Normal
20	Cazorla	Gamo	Joven	Hembra	Normal

### 3. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es estudiar la relación de parasitismo como interacción ecológica que existe entre agentes zoonóticos que afectan a la sangre, cuyos vectores son garrapatas y poblaciones silvestres de ungulados en el Parque Natural Sierras de Cazorla, Segura y las Villas. Concretamente se estudiará la presencia de patógenos pertenecientes a los géneros *Babesia*, *Theileria*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, y *Neorickettsia*.

Los objetivos específicos de este estudio son:

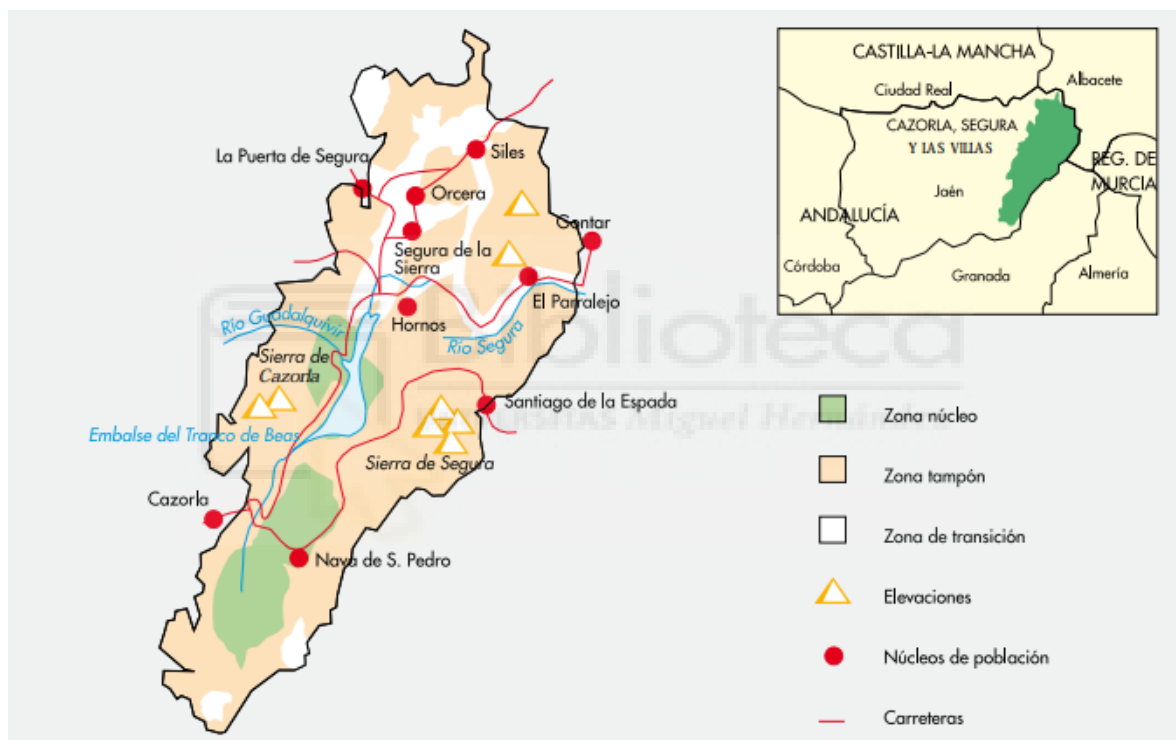
- Estudiar la prevalencia de estos patógenos en las muestras analizadas, y discutir la posible relación entre dichos patógenos y el estado general de los animales.
- Identificar a nivel de género y, cuando sea posible, a nivel de especie la presencia de patógenos pertenecientes a los géneros anteriormente citados.



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 Sistema de estudio

Este estudio se realiza sobre las poblaciones de ungulados silvestres en concreto, ciervos (*Cervus elaphus*), gamos (*Dama dama*) y cabra montés (*Capra pyrenaica*) que se encuentran en El Parque Natural Sierras de Cazorla, Segura y Las Villas. Este es un espacio natural situado en el límite noreste de Andalucía (España), ocupando todo el este de la provincia de Jaén y cuenta con una extensión de 214.300 ha. Constituye el espacio protegido más extenso de España. El Parque está integrado por 23 municipios que pertenecen a las comarcas de la Sierra de Cazorla, Sierra de Segura y Comarca de las Villas.



**Figura 6.** Geografía del Parque Natural Sierras de Cazorla, Segura y las Villas. Fuente: UNESCO. Comité español del programa MaB, 2006. Instituto Geográfico Nacional.

La amplia extensión del Parque Natural junto con la diversidad orográfica y geográfica que lo caracterizan determinan una climatología que destaca por su amplia variabilidad entre diferentes puntos del espacio natural. El clima de esta zona es de carácter continental, con inviernos fríos y en algunas zonas altas precipitaciones. Por el contrario, veranos calurosos y secos.

Las condiciones ideales que presenta este espacio dan lugar a que este Parque Natural posea la masa forestal más grande de todo el país y la más rica de toda la cuenca mediterránea.

Existen más de 1.300 especies catalogadas, 24 son exclusivas de este territorio. Como ejemplos significativos destacan la violeta (*Viola cazorlensis*) y el geranio de Cazorla (*Geranium cazorlense*) y una singular planta carnívora, la *Pinguicula vallisneriifolia*. Por otro lado, respecto a la fauna que se encuentra en el parque, existe una gran diversidad de especies. Abundan las rapaces, y los mamíferos depredadores. En relación con este trabajo, la cabra montés (*Capra pyrenaica*) comparte territorio con otras especies cinegéticas como el ciervo (*Cervus elaphus*), el gamo (*Dama dama*), el jabalí (*Sus scrofa*) y el muflón (*Ovis orientalis musimon*). Estas especies se encuentran en estado de semilibertad en algunos espacios del Parque Natural (Junta de Andalucía, 2008).



**Figura 7.** Ciervo (*Cervus elaphus*) y Cabra montés (*Capra Pyrenaica*). Autores: Paloma Prieto y Juan Monje.



**Figura 8.** Gamos (*Dama dama*)



## **4.2 Análisis de laboratorio**

### **4.2.1 Extracción del ADN**

El ADN genómico se extrajo de coágulos de sangre conservadas en etanol al 70%, mediante un kit comercial de la marca Canvax.

El protocolo de extracción del ADN consiste en los siguientes pasos:

1. Alicuotar 50  $\mu$ l de sangre, eliminar etanol y dejar secar.
2. Añadir a la muestra 15  $\mu$ l de Proteasa y 200  $\mu$ l de Buffer BLY.
3. Pasar por el vórtex e incubar a 55°C durante 10 minutos.
4. Añadir 200  $\mu$ l de etanol (96-100%) y mezclar vigorosamente en el vórtex.
5. Introducir la muestra con todos los reactivos en una Spin Column y centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto. Conservar el filtro y desechar el producto filtrado.
6. Añadir 500  $\mu$ l de Buffer WB1 y centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto. Conservar filtro y desechar el producto filtrado.
7. Añadir 500  $\mu$ l de tampón WB2 y centrifugar a 8000 rpm durante 3 minutos. Conservar el filtro y desechar el producto filtrado.
8. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto. Conservar filtro y desechar el producto filtrado.
9. Colocar el filtro sobre un tubo de 1,5 ml y añadir 100  $\mu$ l de Buffer EB. Incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
10. Centrifugar a 1300 rpm durante 1 minuto. Conservar el tubo con la extracción y desechar el filtro.

#### 4.2.2 Identificación de patógenos mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio utilizada para amplificar secuencias de ADN (Mullis, 1990). Para llevar a cabo esta técnica se requiere la presencia de ADN molde, cebadores, nucleótidos y ADN polimerasa. La ADN polimerasa es la enzima que une los nucleótidos individuales para formar el producto de la PCR. Los nucleótidos incluyen las cuatro bases: adenina, timina, citosina y guanina que se encuentran en el ADN. Estos actúan como los componentes básicos que utiliza la ADN polimerasa para crear el producto de PCR resultante. Los cebadores de la reacción especifican el producto de ADN exacto que se va a amplificar. Los cebadores son fragmentos cortos de ADN con una secuencia definida complementaria al ADN diana que se va a detectar y amplificar. Estos sirven como un punto de extensión para que la ADN polimerasa se desarrolle (Garibyan *et al.*, 2013).

En este trabajo se utilizó la técnica de PCR para identificar a los diferentes patógenos. Todos los ensayos incluyeron un control positivo y un control negativo. Las PCR se realizaron en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ : 15  $\mu\text{l}$  de *máster mix* y 5  $\mu\text{l}$  de ADN. Las concentraciones de la *máster mix* fueron:

- 2  $\mu\text{l}$  de Buffer
- 1,2  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  2.5mM, cofactor necesario para la correcta actividad de la enzima.
- 0,64  $\mu\text{l}$  de dNTPs con concentración 10 pmol/ $\mu\text{l}$
- 0,64  $\mu\text{l}$  de cada uno de los *primers* o cebadores con concentración 10 pmol/ $\mu\text{l}$
- 0,15  $\mu\text{l}$  de ADN-Polimerasa. Se empleo la enzima BIOTAQ™ ADN-Polimerasa.
- 10,03  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Se añadió  $\text{H}_2\text{O}$  destilada para completar el volumen final de la reacción.

Las condiciones de PCR y los primers utilizados para cada patógeno se encuentran descritos en las tablas 2 y 3:

**Tabla 2.** Primers utilizados para cada patógeno.

Marca dor (acrónimo)	Género detectado	Gen diana	Secuencia oligonucleótidos (5'-3')		Referencia
			Forward	Reverse	
<b>BAB</b>	- <i>Babesia sp</i>	18S	GYTTGTAATTGGAA	CCAAAGACTTTGATTT	Herwald <i>et al.</i> , (2003)
	- <i>Theileria sp</i>	rRNA	TGATGG	CTCTC	
<b>EHR</b>	- <i>Ehrlichia</i>	16S	GGTACCYACAGAAG	TAGCACTCATCGTTTA	Parola <i>et al.</i> , (2000)
	- <i>Anaplasma</i>	rRNA	AAGTCC	CAGC	
	- <i>Neorickettsia</i>				

**Tabla 3.** Condiciones de PCR.

Marcador	Condiciones PCR
<b>BAB</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Desnaturalización durante 5 min a 94 °C</li> <li>- 40 ciclos: 1 min a 94 °C, 1 min a 60 °C, 1 min a 72 °C</li> <li>- Elongación final de 10 min a 72°C.</li> </ul>
<b>EHR- NEORICKETTSIA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Desnaturalización durante 5 min a 95 °C</li> <li>- 35 ciclos: 30 s a 94 °C, 30 s a 55°C, 90 s a 72 °C</li> <li>- Elongación final de 5 min a 72°C.</li> </ul>

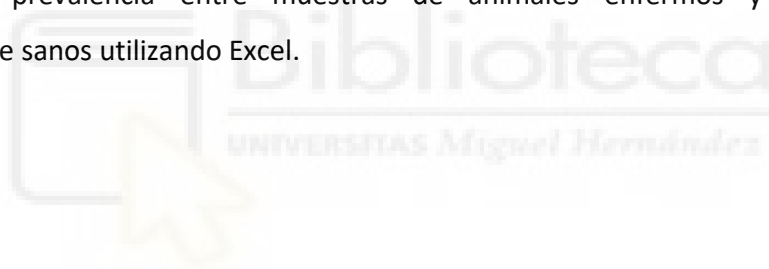
### **4.2.3 Electroforesis en gel de agarosa**

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica empleada para separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño (Ferri, 2014).

Las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas horizontales, empleando como electrolito TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA). Los geles se prepararon al 2,5% de agarosa utilizando RED-Safe para su tinción (2,5 µl/100ml de gel). Para la visualización de los productos de PCR, se utilizó un volumen de 5 µl de producto junto con un volumen equivalente de tampón de carga. Las muestras corrieron durante aproximadamente 30 minutos a 100V/h.

### **4.2.4 Estimas de prevalencia**

Para la estima de la prevalencia se consideró el porcentaje de muestras positivas por PCR (interpretada en geles de agarosa) para cada uno de los marcadores utilizados y para el conjunto de las muestras. Posteriormente, se realizó un análisis de chi-cuadrado para comparar la prevalencia entre muestras de animales enfermos y de animales aparentemente sanos utilizando Excel.

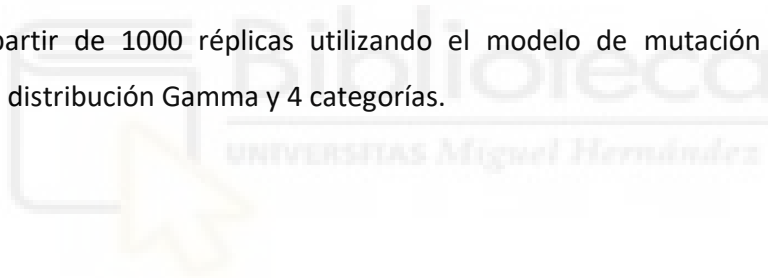


#### **4.2.5 Secuenciación Sanger de los productos PCR amplificados**

La secuenciación del ADN es un conjunto de métodos y técnicas para determinar el orden de los nucleótidos (A, C, G, T) en un oligonucleótido de ADN. Los productos de PCR con resultado positivo fueron enviados a Macorgen (Seul, Korea) para su secuenciación mediante el método de Sanger. Para la lectura, limpieza y alineamiento de las secuencias se utilizó el programa MEGA-X (Kumar *et al.* 2018).

#### **4.2.6 Análisis filogenéticos para la identificación taxonómica de los patógenos.**

Una vez obtenidas las secuencias definitivas, se llevó a cabo un análisis de BLAST en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para llevar a cabo una exploración inicial. Se descargaron aquellas secuencias homólogas que resultaron de interés por ser representativas de los géneros identificados. Para los dos grupos de secuencias obtenidas y descargadas, se obtuvieron árboles filogenéticos consensos con el programa MEGA-X, obtenidos a partir de 1000 réplicas utilizando el modelo de mutación General Time Reversible con distribución Gamma y 4 categorías.



## 5. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el gel de agarosa para los marcadores BAB y EHR se muestran en la tabla 4. La prevalencia estimada para el marcador BAB fue del 80%, mientras que para el marcador EHR fue del 70%. El análisis de chi-cuadrado sugiere que no existen diferencias significativas en la prevalencia de estos patógenos entre los grupos de animales enfermos y de animales aparentemente sanos (BAB  $p$ -valor =0,617; EHR  $p$ -valor =0,593). Cabe apuntar que 11 muestras (6 enfermos y 5 aparentemente sanos) resultaron positivas para los dos marcadores.

**Tabla 4.** Resultados de la electroforesis en gel de agarosa.

ID MUESTRA	ESPECIE	RANGO EDAD	SEXO	ESTADO GENERAL	BAB GF2 /BABGR2	EHR16SD/ EHR16SR
1	Ciervo	Adulto	Hembra	muy delgado	POSITIVO	POSITIVO
2	Gamo	Joven	Hembra	muy delgado	POSITIVO	POSITIVO
3	Cabra montés	Subadulto	Macho	muy delgado	NEGATIVO	NEGATIVO
4	Gamo	Subadulto	Macho	muy delgado	POSITIVO	NEGATIVO
5	Gamo	Subadulto	Hembra	muy delgado	POSITIVO	NEGATIVO
6	Gamo	Subadulto	Hembra	muy delgado	POSITIVO	NEGATIVO
7	Ciervo	Adulto	Hembra	muy delgado	POSITIVO	POSITIVO
8	Ciervo	Adulto	Macho	muy delgado	POSITIVO	POSITIVO
9	Ciervo	Joven	Hembra	muy delgado	POSITIVO	POSITIVO
10	Ciervo	Subadulto	Macho	muy delgado	POSITIVO	POSITIVO
11	Ciervo	Subadulto	Hembra	Normal	POSITIVO	POSITIVO
12	Ciervo	Subadulto	Hembra	Normal	POSITIVO	POSITIVO
13	Ciervo	Subadulto	Macho	Normal	POSITIVO	NEGATIVO
14	Gamo	Adulto	Hembra	Normal	NEGATIVO	POSITIVO
15	Gamo	Adulto	Macho	Normal	NEGATIVO	POSITIVO
16	Gamo	Adulto	Hembra	Normal	NEGATIVO	POSITIVO
17	Ciervo	Adulto	Hembra	Normal	POSITIVO	POSITIVO
18	Ciervo	Adulto	Hembra	Normal	POSITIVO	NEGATIVO
19	Gamo	Subadulto	Macho	Normal	POSITIVO	POSITIVO
20	Gamo	Joven	Hembra	Normal	POSITIVO	POSITIVO

No todas las muestras que resultaron positivas en el gel de agarosa produjeron secuencias de buena calidad. De las 14 muestras positivas amplificadas con BAB obtuvimos fragmentos de buena calidad para 7 de ellas. En cuanto al marcador EHR, de las 16 muestras obtuvimos 11 fragmentos con buena calidad. Sólo estos fragmentos pudieron ser considerados en los siguientes análisis. Esto probablemente sucede porque la secuencias que se generaron

fueron débiles o porque hubiera coinfección por varios patógenos y esto genera problemas a la hora de secuenciar mediante Sanger.

## 5.2 Identificación de las secuencias obtenidas para el marcador BAB

El marcador BAB permitió generar un alineamiento de secuencias con 483 pares de bases. El análisis de BLAST en GenBank apuntó a la presencia de especies del género *Theileria* en todas las secuencias obtenidas. El árbol filogenético consenso obtenido para este marcador se muestra en la figura 5. A través de este árbol podemos identificar que las muestras M2, 20, 4, 6, 5 (*Dama dama*) y 10 (*Cervus elaphus*) corresponden a *Theileria capreoli*, la muestra 18 (*Cervus elaphus*) a *T. OT3*, y la muestra 9 (*Cervus elaphus*) a *T. cervi*. Las muestras M1 y M2 corresponden a muestras de ciervo positivo de *babesia* incluidos en el análisis.

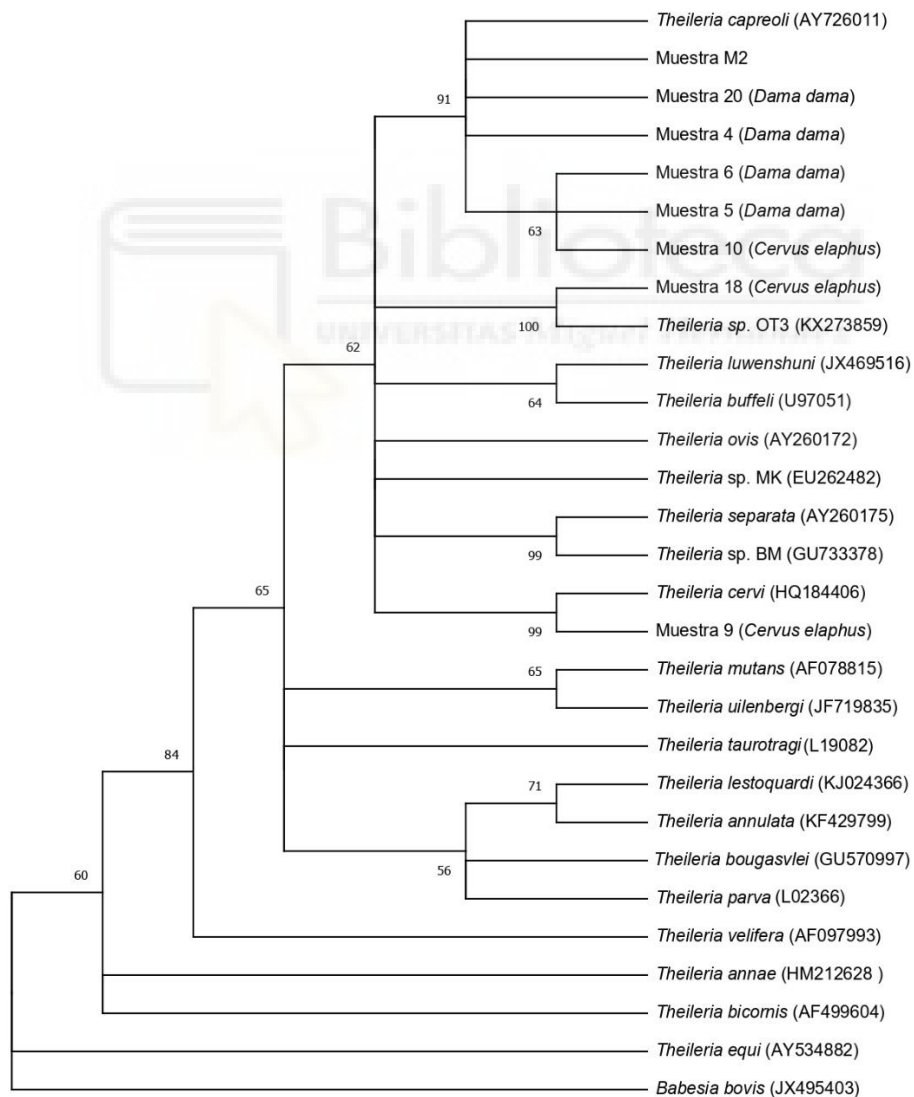


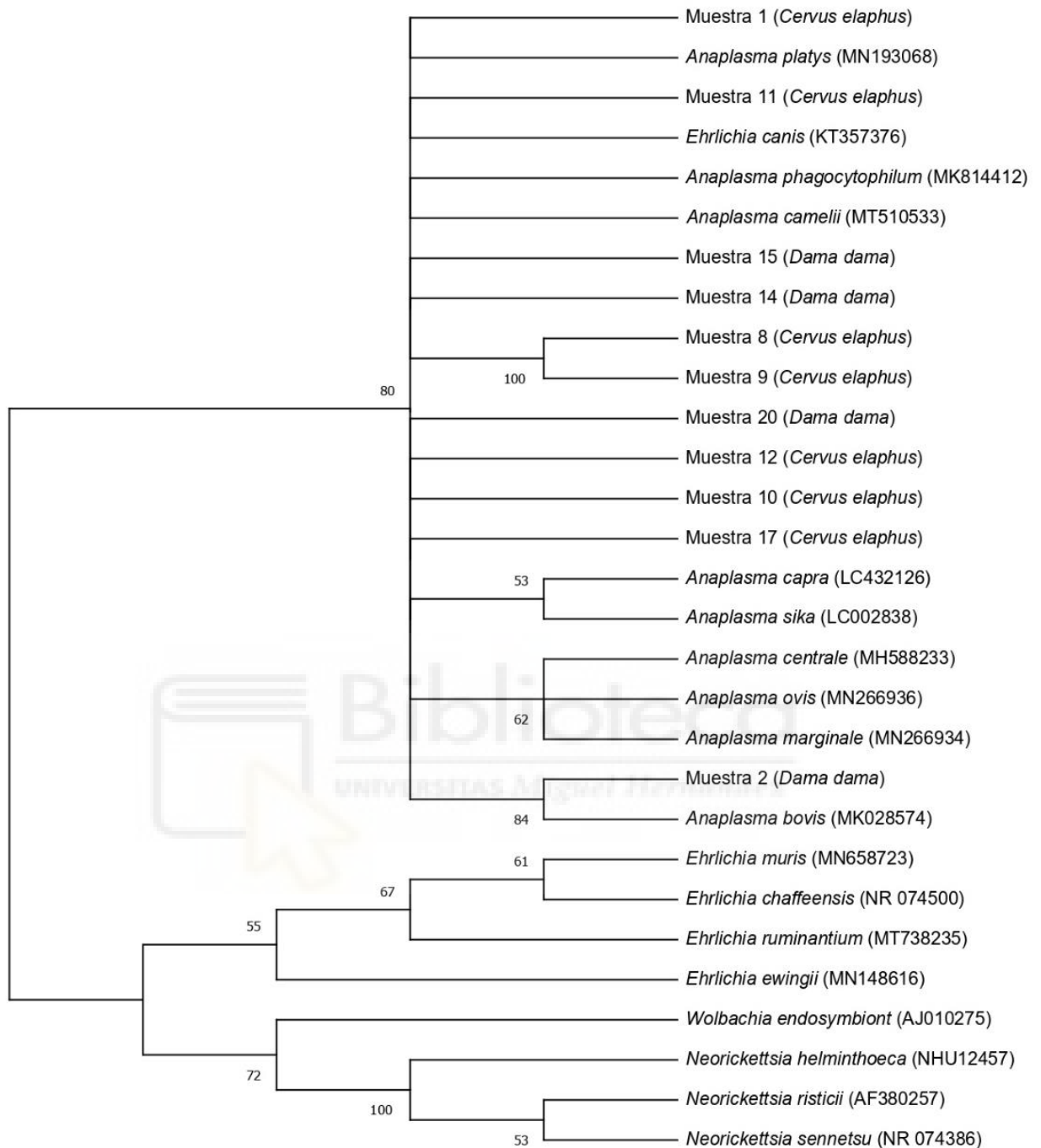
Figura 9. Árbol filogenético de *Theileria sp.* utilizando secuencias generadas mediante el marcador BAB. Se incluye una secuencia de *Babesia bovis* como grupo externo.

### 5.3 Identificación de las secuencias obtenidas para el marcador EHR

La secuenciación con el marcador EHR permitió generar un alineamiento de secuencias con 296 pares de bases. El análisis de BLAST en GenBank apuntó a la presencia de especies del género *Anaplasma*. El árbol filogenético consenso obtenido para este marcador se muestra en la figura 6. En esta ocasión no tuvimos suficiente resolución como para identificar la especie de la mayoría de las muestras y sólo pudimos determinar con exactitud la muestra 2 (*Dama dama*) como infectada por la especie *Anaplasma bovis*. En cualquier caso, la posición que ocupan las diferentes muestras a lo largo del árbol sugiere que, al menos, tres patógenos distintos infecten estas muestras.







**Figura 10.** Árbol filogenético de Anaplasmataceae, con especial representación de *Anaplasma sp.*, utilizando secuencias generadas mediante el marcador EHR.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Prevalencia

Aunque trabajo de fin de grado ha sido realizado con un número reducido de muestras, las altas prevalencias detectadas, tanto en animales enfermos, como en animales aparentemente sanos, confirman que los ungulados salvajes son un reservorio importante para patógenos zoonóticos transmitidos por garrapatas. Concretamente, encontramos unas prevalencias muy altas tanto para el marcador BAB (80%) como para el marcador EHR (70%) sin encontrar distinción entre animales enfermos y animales sanos. Incluso un 55% de las muestras presentaron coinfección. Este hecho sucede debido a que los animales salvajes grandes son clave en el mantenimiento de las poblaciones de garrapatas y éstas pueden infectarse con varios patógenos durante su ciclo de vida. Las interacciones entre los diferentes patógenos dentro del huésped vertebrado podría llevar a una mayor susceptibilidad del individuo a otras infecciones. También podría conducir a una modificación de la patogénesis de cada microorganismo causando graves consecuencias para los programas de gestión de enfermedades y la conservación de la fauna (Pereira *et al.*, 2016).

Las altas prevalencias observadas tanto en animales sanos como en enfermos sugieren que la simple presencia del patógeno no está directamente relacionada con el desarrollo de la enfermedad. La posibilidad de desarrollar la enfermedad depende en parte del sistema inmunológico del animal y de la carga parasitaria, ya que puede ser baja o insuficiente para manifestar síntomas. Por ello, sería interesante analizar, qué posibilidad tienen estos parásitos de causar eventos de mortalidad masiva al elevar su carga en situaciones en la que los sistemas inmunes se ven especialmente deprimidos. Estas situaciones podrían darse en periodos de altas densidades o en condiciones climáticas adversas, como periodos de sequías o heladas, que pueden afectar al escenario epidemiológico. Pudiera ser, que la interacción de los patógenos detectados con factores ambientales u endógenos controlasen la dinámica de estas poblaciones de ungulados en episodios concretos causando mortalidades masivas.

## 6.2 Patógenos identificados

Este estudio, que tenía como objetivo detectar la presencia de agentes zoonóticos transmitidos por garrapatas en ungulados silvestres del Parque Natural Sierras de Cazorla, Segura y las Villas, ha revelado la presencia de *Theileria sp* y *Anaplasma sp* en ciervos y gamos.

Concretamente, las muestras analizadas fueron portadoras de *Theileria capreoli*, *T. OT3*, *T. cervi* y *Anaplasma bovis*. Los patógenos encontrados se ajustan y coinciden en gran medida con los resultados de trabajos previos realizados sobre poblaciones de ungulados. Uno de los estudios se realizó sobre un total de 1.132 muestras de ungulados silvestres, incluidos ciervo (n = 578), jabalí (n = 269), muflón (n = 135), gamo (n = 121) y corzo (n = 29) que fueron recolectados en 53 fincas de caza en el sur de España. En los rumiantes silvestres se detectó la presencia de las especies *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia divergens*, *Theileria sp. OT3*, *Borrelia af zellii* y *Theileria capreoli* (Díaz-Cao *et al.*, 2021). El otro estudio se realizó sobre una población de ungulados distribuida por el centro y el sur de Portugal. El estudio contaba con 141 muestras de sangre de ungulados silvestres, incluidos ciervos (n=73), jabalís (n=65) y muflones (n=3). Se detectaron positivos de *A. marginale*, *A. ovis*, *A. platys*, *A. phagocytophilum*, *Theileria capreoli* y *T. OT3*. Todas las muestras dieron negativo en *Babesia sp.*, *B. burgdorferi (s.l.)*, *Ehrlichia sp.* y *Rickettsia sp.* (Pereira *et al.*, 2016). Por otro lado, un estudio previo encontró positivos de *Babesia sp* en corzos (*Capreolus capreolus*) de este parque natural con prevalencias elevadas (Pelayo, 2017). Cabe preguntarse si el análisis de muestras de corzo arrojaría resultados similares.

*Theileria capreoli* fue descrita en corzos en 1939 por Rukhlyadev y secuenciada a partir de muestras de ciervo por García-Sanmartín *et al.*, (2007) (código GenBank AY726011). También se ha detectado *T. capreoli* en ciervos del sur de España (Díaz-Cao *et al.*, 2021) pero con una prevalencia notablemente menor (0,3%) que el 43,8% detectado en Portugal (Pereira *et al.*, 2016).

*Theileria OT3* ha sido previamente identificada en ungulados salvajes de España (Nagore *et al.*, 2004; Díaz-Cao *et al.*, 2021) y de otros países europeos (Pereira *et al.*, 2016). Además, varios estudios han encontrado esta especie en ovejas (*Ovis orientalis aries*) de Italia (Giangaspero *et al.*, 2014), Turquía y China (Tian *et al.*, 2014). Esto permite hipotetizar la posible circulación de la especie en relación con el movimiento del ganado (Giangaspero *et al.*,

2014). En un estudio llevado a cabo en el norte de España, *T. OT3* fue la segunda especie de *Theileria* más prevalente en ovejas (42,2%) después de *T. OT1* (48,1%) (Nagore et al., 2004). Se ha sugerido el posible papel de los cérvidos como reservorios asintomáticos de esta especie, aunque aún no se ha demostrado completamente su patogenicidad para el ganado (Remesar et al., 2019).

Por su parte, *Theileria cervi* es una especie que se considera no patógena de rumiantes silvestres (Inokuma et al., 2004) cuya enfermedad clínica ocurre en huéspedes debilitados por otras cargas parasitarias o desnutrición (Chae et al., 1999).

En cuanto a *Anaplasma Bovis*, cabe decir que causa anaplasmosis tanto en rumiantes domésticos como salvajes. La infección por *A. bovis* no es una zoonosis y puede aislarse de bovinos con signos subclínicos como fiebre, linfadenopatía, depresión y condiciones anormales (Ooshiro et al. 2008). Esta bacteria infecta a los monocitos y está estrechamente relacionada con *A. phagocytophilum* (Ybanez et al., 2014). Se ha notificado la infección con *A. bovis* principalmente en ganado y garrapatas de África (Ooshiro et al. 2008) y en la vida silvestre de Japón y Corea (Kang et al., 2011). En estudios previos realizados en el norte de España ha sido detectada en corzos (*Capreolus capreolus*), pero en general se sabe poco sobre la epidemiología de este agente debido probablemente a su impacto limitado en la medicina veterinaria (García-Pérez et al., 2016).

### **6.3 Limitaciones y proyección futura**

Pese a las altas prevalencias detectadas y al importante número de patógenos distintos encontrados, este estudio se ha desarrollado con un modesto número de muestras. Con el fin de diagnosticar mejor los patógenos presentes en la comunidad de ungulados del Parque Natural Sierras de Cazorla Segura y las Villas, sería interesante incrementar el tamaño muestral, abarcar al resto de especies de ungulados (incluyendo muflones y jabalís) y a sus potenciales vectores (analizar diferentes especies de garrapatas). Un mayor número de muestras permitiría incorporar en los análisis factores como la edad o el sexo de los animales, probablemente relevantes desde el punto de vista de la respuesta inmune.

Desde un punto de vista técnico, el tamaño de las secuencias generadas con el marcador EHR no nos ha permitido identificar todas las especies de *Anaplasma* presentes. Sería conveniente utilizar marcadores específicos de este género que permitieran un mejor diagnóstico, incluso en casos de coinfección.

Finalmente, sería interesante cuantificar la carga parasitaria de los animales analizados mediante qPCR con el fin de evaluar si la carga parasitaria varía en función de su estado general. Esto permitirá evaluar mejor la posible relación de los patógenos identificados en este trabajo final de grado con los episodios de mortalidad detectados en ungulados.



## 7. CONCLUSIÓN

El presente estudio proporciona información sobre la presencia de *Theileria capreoli*, *T. OT3*, *T. cervi* y *Anaplasma bovis* en ciervos y gamos del Parque Natural Sierras de Cazorla, Segura y las Villas. Observando los resultados obtenidos podemos concluir que los ungulados silvestres son portadores y reservorios importantes de estos patógenos, pero dado las altas prevalencias observadas (tanto en animales sanos como en enfermos), no parece que sean responsables directos o únicos de los episodios de mortalidad detectados. Alternativamente, la interacción de estos patógenos con factores ambientales u endógenos sí podría ser determinante en la dinámica de las poblaciones estudiadas.

En cualquier caso, es necesario ampliar el estudio e investigar sobre la potencial patogenicidad tanto de las diferentes especies de *Theileria* y *Anaplasma* como de otras especies patógenas que infectan a los ungulados silvestres, considerando en el análisis a sus vectores las garrapatas.

Finalmente, el seguimiento epidemiológico de la población permitiría establecer medidas de gestión, no dirigidas a la erradicación de los patógenos sino al control de su impacto y gravedad en la población de ungulados, en tanto que fuera necesario.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Ait Lbacha, H., Zouagui, Z., Alali, S. et al. (2017) "*Candidatus anaplasma camelii*" in one-humped camels (*Camelus dromedarius*) in Morocco: a novel and emerging *Anaplasma* species?. *Infect Dis Poverty* 6, 1. <https://doi.org/10.1186/s40249-016-0216-8>
- Atif, F.A. (2015). *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitology Research*, 114(11), 3941–3957. doi:10.1007/s00436-015-4698-2
- Bordenstein, S., & Rosengaus, R. B. (2005). *Discovery of a Novel Wolbachia Supergroup in Isoptera*. *Current Microbiology*, 51(6), 393–398.
- Bonnet, S., Jouglin, M., Malandrin, L., Becker, C., Agoulon, A., l'Hostis, M., & Chauvin, A. (2007). *Transstadial and transovarial persistence of Babesia divergens DNA in Ixodes ricinus ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique*. *Parasitology*, 134(2), 197.
- Chae, J. S., Waghela, S. D., Craig, T. M., Kocan, A. A., Wagner, G. G., & Holman, P. J. (1999). *Two Theileria cervi SSU RRNA gene sequence types found in isolates from white-tailed deer and elk in North America*. *Journal of wildlife Diseases*, 35(3), 458-465.
- Díaz-Cao, J. M., Adaszek, Ł., Dzięgiel, B., Paniagua, J., Caballero-Gómez, J., Winiarczyk, S., ... & García-Bocanegra, I. (2021). *Prevalence of selected tick-borne pathogens in wild ungulates and ticks in southern Spain*. *Transboundary and Emerging Diseases*.
- Dodson SI, Allen TF, Carpenter SR, Ives AR, Jeanne RL, Kitchell JF, Langston NE, Turner MG. (1998). *Ecology*. Oxford University Press, Estados Unidos, p. 1–24.
- Dumler, J. S., Rikihisa, Y., & Dasch, G. A. (2015). *Anaplasmatataceae*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–3. doi:10.1002/9781118960608.fbm00176
- Espí, A. (2011) *Las garrapatas como agentes transmisores de enfermedades para los animales y el hombre*. *Tecnología Agroalimentaria*.; (9) : 21-24
- Fandos, P. (1991). *La cabra montes (Capra pyrenaica) en el Parque Natural de las Sierras de Cazorla, Segura y Las Villas*. Instituto Nacional para la conservación

de la naturaleza/Consejo Superior de Investigaciones Agrarias, Madrid, España, 215 pp

- Fierro, F. F. (2014). *Electroforesis de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 27.
- García-Pérez, A. L., Oporto, B., Espí, A., Del Cerro, A., Barral, M., Povedano, I., Barandika, J.F., & Hurtado, A. (2016). *Anaplasmatataceae in wild ungulates and carnivores in northern Spain*. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(2), 264-269.
- García-Sanmartín, J., Aurtenetxe, O., Barral, M., Marco, I., Lavin, S., García-Pérez, A. L., & Hurtado, A. (2007). *Molecular detection and characterization of piroplasms infecting cervids and chamois in Northern Spain*. *Parasitology*, 134(3), 391.
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). *Polymerase Chain Reaction*. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. doi:10.1038/jid.2013.1
- Ganzinelli, S., Rodriguez, A., Schnittger, L., & Florin-Christensen, M. (2018). *Babesia in Domestic Ruminants*. Springer International Publishing AG, (July), 438.
- Giangaspero, A., Marangi, M., Papini, R., Paoletti, B., Wijnveld, M., & Jongejan, F. (2015). *Theileria sp. OT3 and other tick-borne pathogens in sheep and ticks in Italy: molecular characterization and phylogeny*. *Ticks and tick-borne diseases*, 6(1), 75-83.
- Hoffmann, A. A., Ross, P. A., & Rašić, G. (2015). *Wolbachia strains for disease control: ecological and evolutionary considerations*. *Evolutionary applications*, 8(8), 751-768.
- Hubálek, Z. (2003). *Emerging human infectious diseases: Anthroponoses, Zoonoses, and Sapronoses*. *Emerging Infectious diseases* 9: 403-404.
- Hunfeld, K. P., Hildebrandt, A., & Gray, J. S. (2008). *Babesiosis: Recent insights into an ancient disease*. *International Journal for Parasitology*, 38(11), 1219–1237. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.001>
- Iacopelli, F., Fanelli, A., Tizzani, P., Berriatua, E., Prieto, P., Martínez-Carrasco, C., Leon, L., Rossi, L., Candela, M.G., (2019). *Spatio-temporal patterns of sarcoptic mange in red deer and Iberian ibex in a multi-host natural park*. *Res. Vet. Sci.* 128, 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.11.014>.



- Inokuma, H., Tsuji, M., Kim, S. J., Fujimoto, T., Nagata, M., Hosoi, E., Arai, S., Ishihara, C & Okuda, M. (2004). *Phylogenetic analysis of Theileria sp. from sika deer, Cervus nippon, in Japan*. *Veterinary parasitology*, 120(4), 339-345.
- Kang, J.G., Ko, S., Kim, Y.J., Yang, H.J., Lee, H., Shin, N.S., Choi, K.S., Chae, J.S., (2011). *New genetic variants of Anaplasma phagocytophilum and Anaplasma bovis from Korean water deer (Hydropotes inermis argyropus)*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 929–938.
- Kocan, K. M., De la Fuente, J., Guglielmone, A. A., Meléndez, R. D. (2003). *Antigens and alternatives for control of Anaplasma marginale infection in cattle*. *Clinical Microbiology Reviews*; 16(4):698-712.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Coetzee, J.F., Ewing, S.A., (2008) *The Natural History of Anaplasma marginale, Veterinary Parasitology*. doi:10.1016/j.vetpar.2009.09.012
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nknyaz, C., & Tamura, K. (2018). *MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms*. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.
- León-Vizcaíno, L., Ruíz de Ybáñez, M. R., Cubero, M. J., Ortíz, J. M., Espinosa, J., Pérez, L., Alonso, F. (1999). *Sarcoptic mange in spanish ibex from spain*. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(4), 647–659. doi:10.7589/0090-3558-35.4.647
- Lemon, S. M., Sparling, P. F., Hamburg, M. A., Relman, D. A., Choffnes, E. R., Mack, A. (2008). *Vectorborne diseases. Understanding the environmental, human health, and ecological connections*. The National Academies Press. Washington, USA.
- Mans B.J, Pienaar R, Latif A.A. (2015). *A review of Theileria diagnostics and epidemiology*. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl* ;4(1):104–118.
- Mehlhorn, H. and Schein, E. (1993) *"The piroplasms: "A long story in short" or "Robert Koch has seen it""*, *European Journal of Protistology*, 29(3), pp. 279–293. doi:10.1016/S0932-4739(11)80371- 8.

- Mehlhorn, H. and Schein, E. (1998) *Redescription of Babesia equi Laveran, 1901 as Theileria equi Mehlhorn, Schein 1998*, Parasitology Research, 84(6), pp. 467–475. doi:10.1007/s004360050431w.
- Mullis KB. (1990) *The unusual origin of the polymerase chain reaction*. Scientific American. 1990;262(4):56–61. 64–5
- Nagore, D., Garcia-Sanmartín, J., García-Pérez, A. L., Juste, R. A., & Hurtado, A. (2004). *Identification, genetic diversity and prevalence of Theileria and Babesia species in a sheep population from Northern Spain*. International Journal for Parasitology, 34(9), 1059-1067.
- Ooshiro, M., Zakimi, S., Matsukawa, Y., Katagiri, Y., & Inokuma, H. (2008). *Detection of Anaplasma bovis and Anaplasma phagocytophilum from cattle on Yonaguni Island, Okinawa, Japan*. Veterinary parasitology, 154(3-4), 360-364.
- Orkun, O., Çakmak, A., (2019). *Molecular identification of tick-borne bacteria in wild animals and their ticks in Central Anatolia, Turkey*. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 63, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.12.007>
- Paddock, C. D., & Childs, J. E. (2003). *Ehrlichia chaffeensis: a Prototypical Emerging Pathogen*. Clinical Microbiology Reviews, 16(1), 37–64.
- Parola, P., and D. Raoult. (2001). *Ticks and tick-borne bacterial human diseases, an emerging infectious threat*. Clin. Infect. Dis. 32:897–928.
- Poulin, R. (1999). *The functional importance of parasites in animal communities: many roles at many levels?* Inter. J. Parasitol. 29: 903-914.
- Poulin, R. (2006). *Evolutionary Ecology of Parasites: Second Edition* (2nd Revised ed.). Princeton University Press, p. 5-6.
- Price, P.W. (1980). *Evolutionary biology of parasites*. Princeton University Press.
- Ramasamy, R., Ramasamy, M., Yasawardena, S. 2001. *Antibodies and Plasmodium falciparum merozoites*. Trends Parasitol. 17: 194-197.
- Remesar, S., Díaz, P., Prieto, A., Markina, F., Díaz Cao, J. M., López-Lorenzo, G., ... Morrondo, P. (2019). *Prevalence and distribution of Babesia and Theileria species in roe deer from Spain*. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife.
- Reyes-Novelo, E., Ruíz-Pina, H., Escobedo-Ortegón, J., Rodríguez-Vivas, R.I., Bolio-González, M., Polanco-Rodríguez, A., Manrique-Saide, P., (2011). *Situación*

*actual y perspectiva para el estudio de las enfermedades zoonóticas emergentes, reemergentes y olvidadas en la península de Yucatán, México.* Trop. Subtrop. Agroecosyst. 14 (1), 35–54.

- Rikihisa, Y., (1991). *The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases.* Clin. Microbiol. Rev. 4, 286-308.
- Rikihisa, Y., (2011). *Mechanisms of obligatory intracellular infection with Anaplasma phagocytophilum.* Clin. Microbiol. Rev. 24, 469-489.
- Rikihisa, Y., Stephen Dumler, J., & Dasch, G. A. (2015). *Neorickettsia.* *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-12.
- Rollinson, D., & Hay, S. I. (Eds.). (2012). *Advances in parasitology* (Vol. 79). Academic Press.
- Rothschild, C. M. (2013) *Equine piroplasmosis.* Journal of Equine Veterinary Science, 33(7), pp. 497– 508. doi:10.1016/j.jevs.2013.03.189.
- Rymaszewska, A., Grenda, S., 2008. *Bacteria of the genus Anaplasma— characteristics of Anaplasma and their vectors: a review.* Vet. Med. 53, 573-584.
- Schreeg, M., Marr, H., Tarigo, J., Cohn, L., Bird, D., Scholl, E., ... Birkenheuer, A. (2016). *Mitochondrial genome sequences and structures aid in the resolution of Piroplasmida phylogeny.* PLoS ONE, 11(11), 1–27.
- Shaw, M. K. (2003). *Cell invasion by Theileria sporozoites.* Trends in parasitology, 19(1), 2-6.
- Sivakumar, T., Hayashida, K., Sugimoto, C., & Yokoyama, N. (2014). *Evolution and genetic diversity of Theileria.* Infection, Genetics and Evolution, 27, 250-263.
- Tian, Z., Liu, G., Yin, H., Xie, J., Wang, S., Yuan, X., Wang, F & Luo, J. (2014). *First report on the occurrence of Theileria sp. OT3 in China.* Parasitology international, 63(2), 403-407.
- Triguero-Ocaña, R., Martínez-López, B., Vicente, J., Barasona, J. A., Martínez-Guijosa, J., & Acevedo, P. (2020). *Dynamic Network of Interactions in the Wildlife-Livestock Interface in Mediterranean Spain: An Epidemiological Point of View.* Pathogens, 9(2), 120. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020120>
- UNESCO. (2006). *Geografía del Parque Natural de la Sierra de Cazorla, Segura y las Villas.* Comité español del programa MaB, 2006. Instituto Geográfico Nacional.

- WHO. (2006). *The control of neglected zoonotic diseases. A route to poverty alleviation*. Organization, W. H. World Health Organization. Geneva.
- Ybanez, A.P., Sashika, M., Inokuma, H. (2014). *The phylogenetic position of Anaplasma bovis and inferences on the phylogeny of the genus Anaplasma*. J. Vet. Med. Sci. 76, 307–312.



## 9. AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mi tutora Eva por su gran esfuerzo y dedicación, por acompañarme y guiarme en este camino. A pesar de las circunstancias ha estado ahí siempre que lo he necesitado y ha hecho todo lo posible para que el trabajo de laboratorio se haya podido realizar de la mejor manera posible. Gracias por tu ayuda y por enseñarme tanto.

También me gustaría darle las gracias a Andrea Mira por ayudarme con todo el trabajo de laboratorio, por tu implicación y sobre todo gracias por tus consejos, he aprendido mucho de ti. Agradecer a Paloma toda la información facilitada y todas sus aportaciones que han sido de gran ayuda. A Toni por su colaboración. A los miembros de la RAC por su gran labor.

Gracias a toda la gente que ha formado parte de esta etapa académica y la he hecho especial. A mis amigas de la residencia por regalarme unos momentos increíbles, que sin vosotras nada hubiera sido igual. A todos mis amigos del Erasmus por el mejor año de mi vida y por la gran familia que hemos creado.

A mi familia por el apoyo que siempre me han brindado. En especial a mis padres por confiar en mí y apoyarme en todo momento. Sois los padres más guais del mundo. A mi hermana, por aguantarme y sacarme siempre una sonrisa.

¡Muchas gracias a todos!