



# Limitada diversidad del género *Sarcocystis* (Apicomplexa) en los ungulados de montaña de la Península Ibérica

Guillermo E. Delgado-de las Cuevas, Petras Prakas, Eglė Rudaitytė-Lukošienė,  
Iván Plasencia Gutiérrez, Miguel A. Habela, y Rafael Calero-Bernal.

**39 Encuentro del GEEFSM**  
**Córdoba, 12 al 15 octubre 2022**

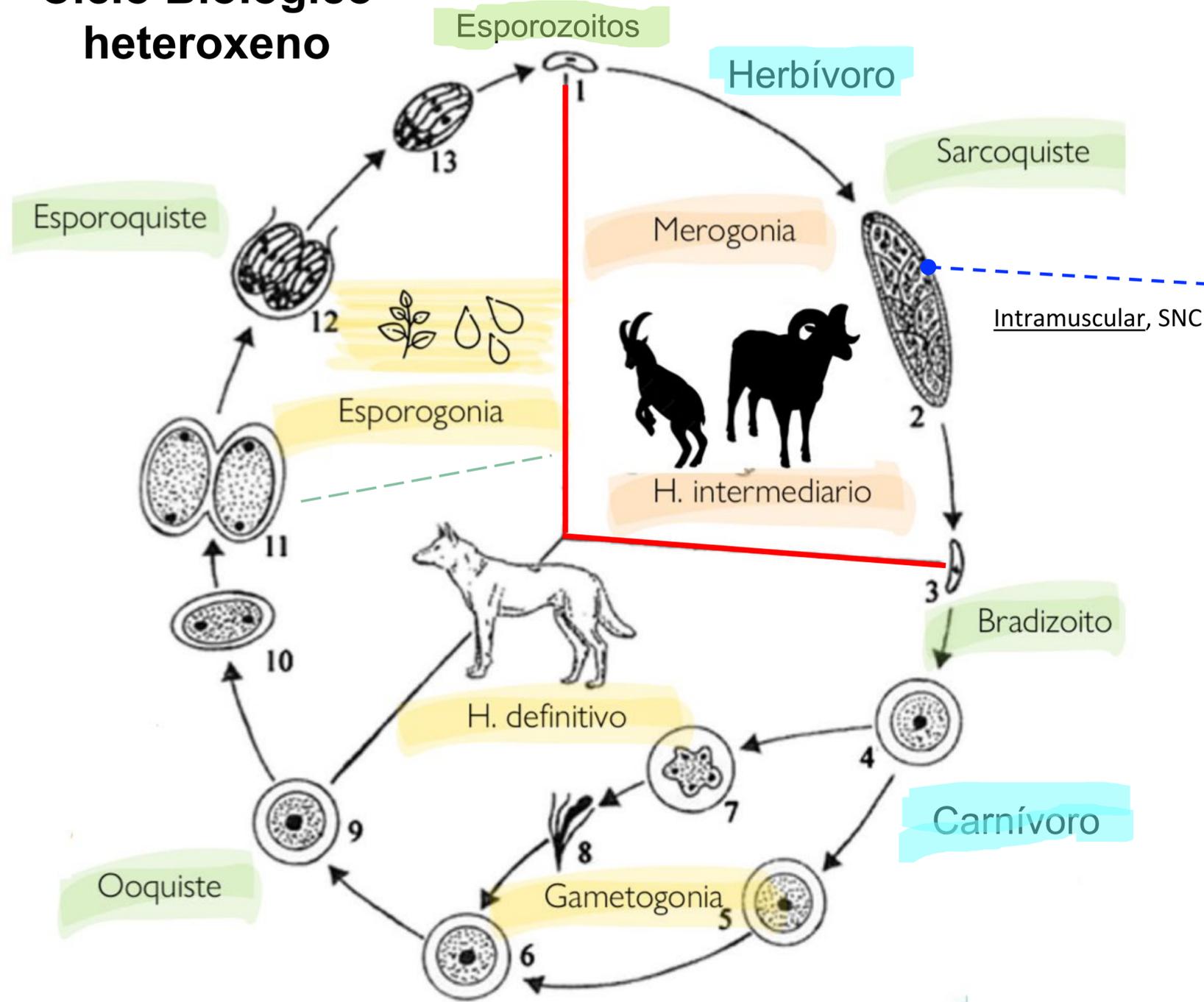


# Introducción



# Introducción

## Ciclo Biológico heteroxeno



**Sarcoquiste intramuscular**  
(Cabra montés)

# Introducción

## Los Hospedadores Intermediarios (HI) estudiados

**Rebeco** (*Rupicapra pyrenaica*)



**Cabra montés** (*Capra pyrenaica hispanica*)



**Boc balear** (*Capra aegagrus [hircus] ssp.*)

**Muflón** (*Ovis aries musimon*)



- Habitan **zonas montañosas**, con “techos” a distintas alturas, (Rebeco hasta 2800 m, Cabra Montés 2300 m, Muflón 1500 m, Boc balear 1000 m), suelen descender en invierno y por la falta de recursos alimentarios.
- Sus **hábitats se solapan** con el de otros ungulados silvestres o domésticos.
- Interés **Cinegético**.
- Los **cánidos predadores** comunes en las especies peninsulares.



# Introducción

Hernández Rodríguez et al., 1992  
 Delgado de las Cuevas et al., 2019  
 Rudaitytė-Lukošienė et al., 2020

Nombre S. en color = Spp. aislada en 

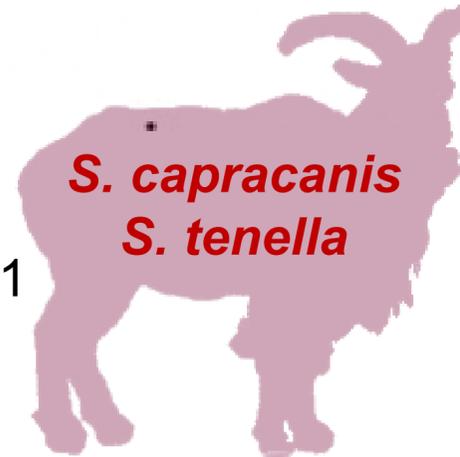


Gjerde, 2013  
 Gjerde et al., 2017  
 Rudaitytė-Lukošienė et al., 2021

**S. tarandi, S. elongata, S. truncata, S. hjorti, S. ovalis, S. hardangeri, S. ibérica, S. pilosa, S. morae, S. venatoria, S. linearis, S. cervicanis,**



Delgado de las Cuevas et al., 2021



Dhargren & Gjerde, 2009; Gjerde, 2011; Kolenda et al., 2014; Prakas et al., 2017; Rudaitytė-Lukošienė et al., 2020

# Justificación y Objetivos



# Justificación y Objetivos

## *Sarcocystis* y Ungulados de Montaña

- La mayoría de investigaciones **solo lo identifican a nivel de género.**

- Estudios moleculares** {
- Manera más **precisa** de **determinar** la **especie** involucrada.
  - El **gen *cox1*** (Subunidad 1 Citocromo C oxidasa) **distingue** entre especies de *Sarcocystis* muy **próximas** y **parecidas**.

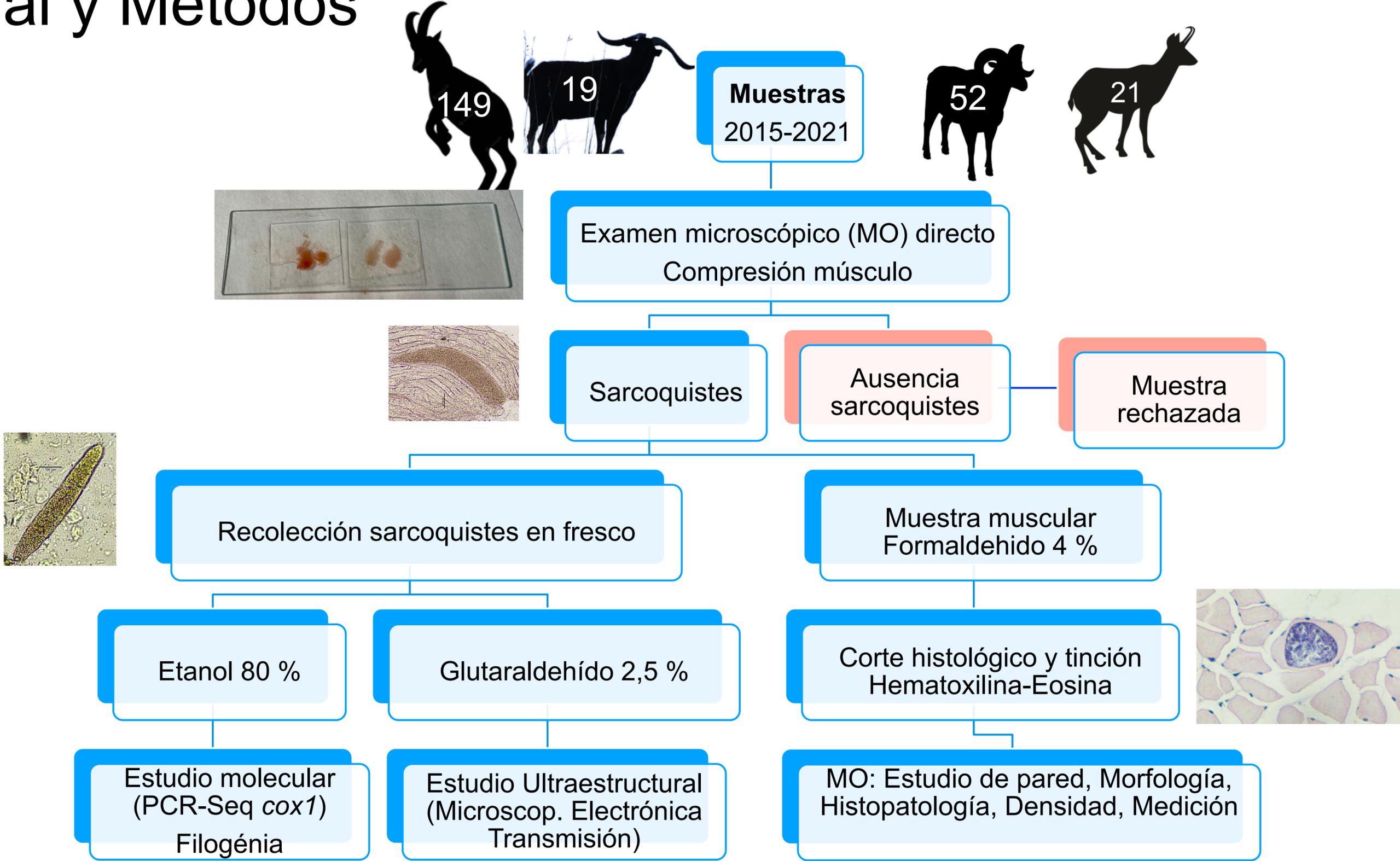
## Objetivos

1. Determinar la **prevalencia** de la infección por ***Sarcocystis* spp.** en los ungulados de montaña en la Península Ibérica.
2. **Identificar** las **especies** de ***Sarcocystis*** presentes mediante exámenes morfológicos y herramientas moleculares.
3. Establecer las **relaciones filogenéticas** entre las especies encontradas.

# Material y Métodos



# Material y Métodos



# Material y Métodos (Caracterización Molecular)

## Extracción de ADN genómico

(GeneJet Genomic DNA purification Kit)

**Amplificación n-PCR del gen *cox1***  
(DreamTaq PCR Master Mix).

**Primers:** Forward (Cebador directo) **SF1**, Reverse (Ceb. Inverso) **SR9, SR8D**, (Gjerde, B.: J. Parasitol. 2013, 43, 579–591 & Parasitol. 2014, 141, 441–452). **SR11**, (Prakas et al. 2017, Parasitol. Res. 116, 271-279) **SR12H** (Gazzonis et al., 2019, Parasitol. Res. 118, 1271-1287)

Amplicons purificados, clonados si fuera necesario, se **secuencian y alinean** (MEGA 11).

**Árbol filogenético:** construido con método de **Máxima Verosimilitud (ML)**, distancia evolutiva método **K2P**, comprobación: Bootstrap (1000 Bootstrap replications), (MEGA11). Outgroup: *Toxoplasma gondii* (KT363924).

**Comparación** con otras secuencias de *Sarcocystis* (BLASTn).

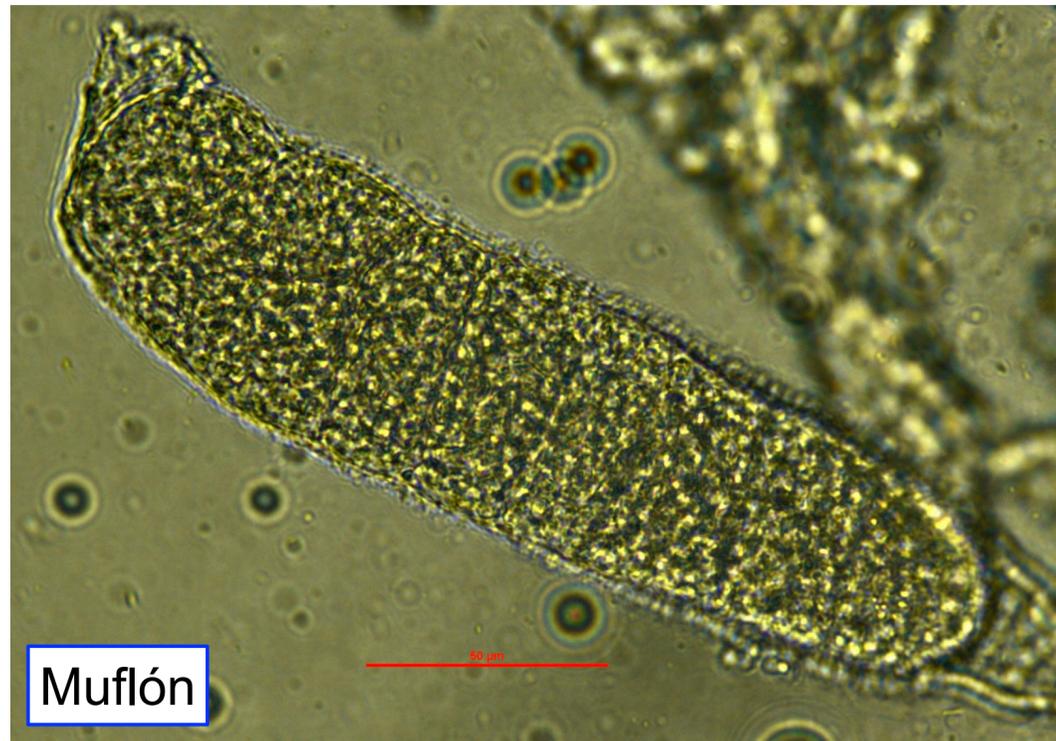
## Análisis molecular gen *cox1*

HI	Nº individuos	Nº secuencias
Rebeco	7	17
Muflón	16	23
Cabra montés	19	25
Boc balear	1	3 (clonadas)

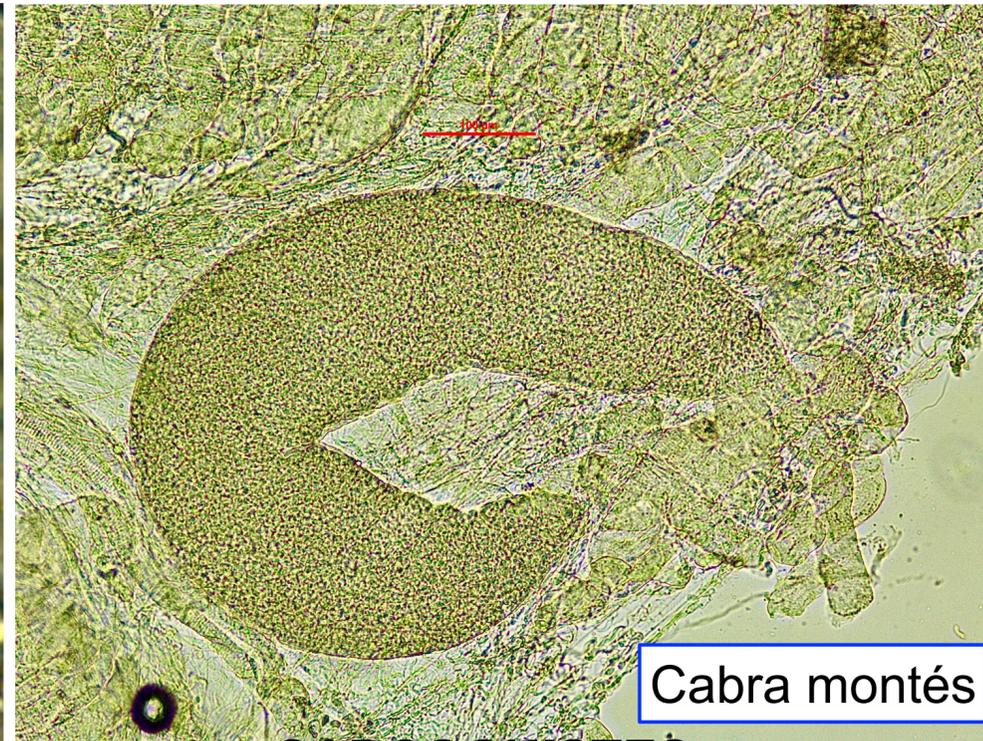
# Resultados y Discusión



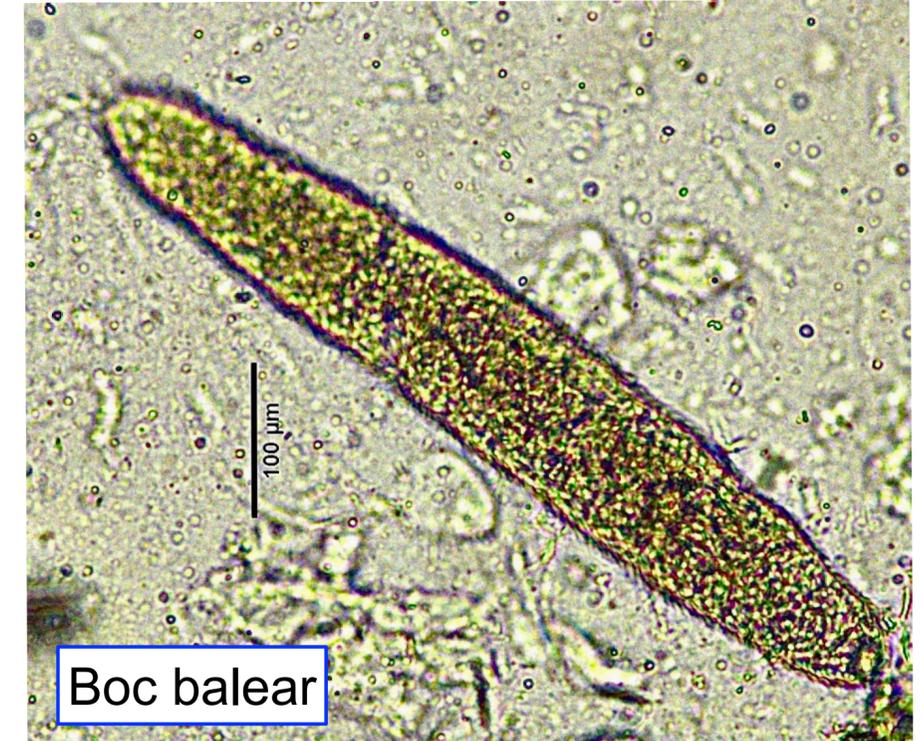
# Microscopía Óptica: Examen en fresco



Muflón

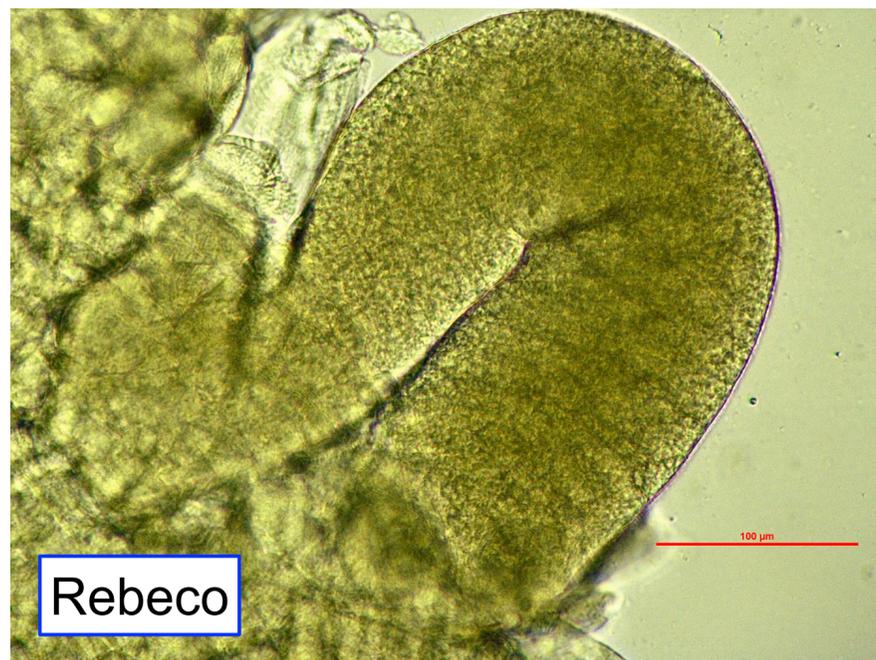


Cabra montés



Boc balear

## SARCOQUISTES



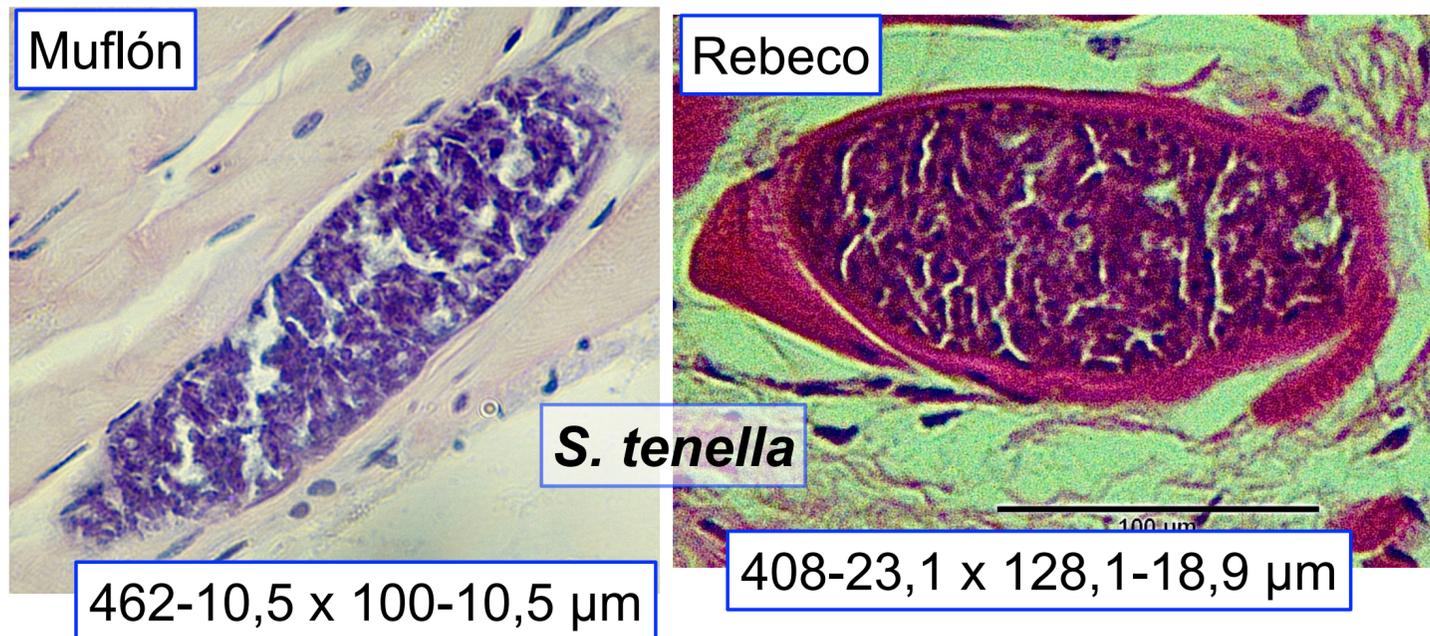
Rebeco

- **Paredes gruesas**, visibles claramente en **Muflón** y **Boc balear**, microvellosidades en **empalizada**.
- **No se aprecian** en **Rebeco** ni en **Cabra montés** (¿material de la célula hospedadora?).
- Formas **fusiformes**, **extremos romos** en **Muflón** y **Rebeco**, y más **acuminado** en **Boc Balear** y sobre todo en **Cabra montés**.
- **Septados**.
- **No se observaron macroquistes**.

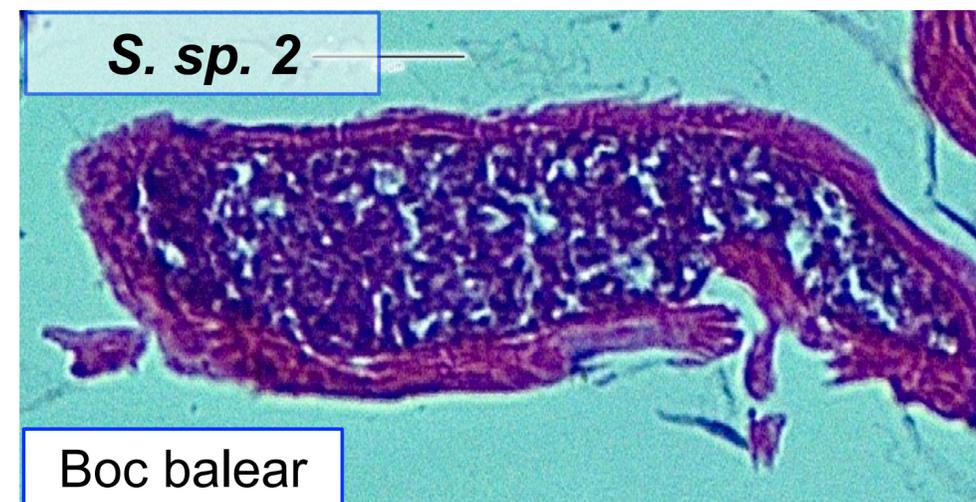
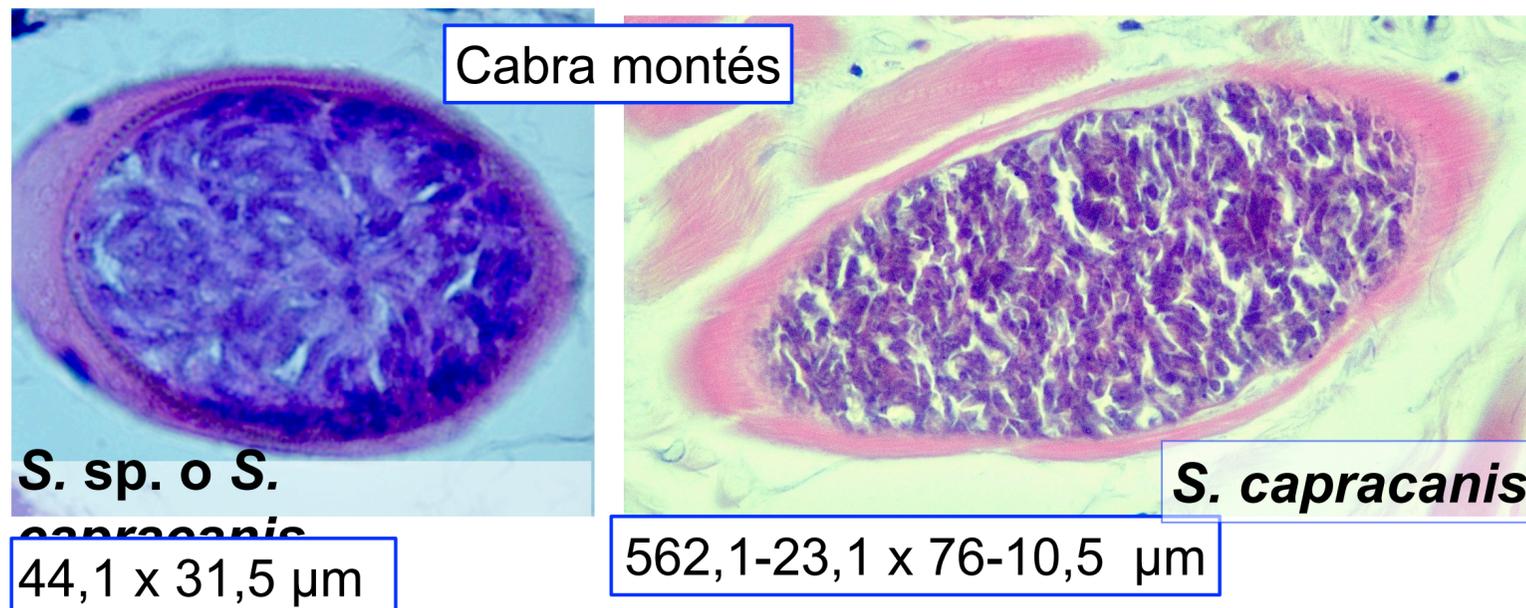
HI	Prevalencia*
Rebeco	100 % (21/21)
Muflón	86,54 % (45/52)
Cabra montés	52,35 % (78/149)
Boc Balear	5,26 % (1/19)*

# Microscopía Óptica. Histopatología

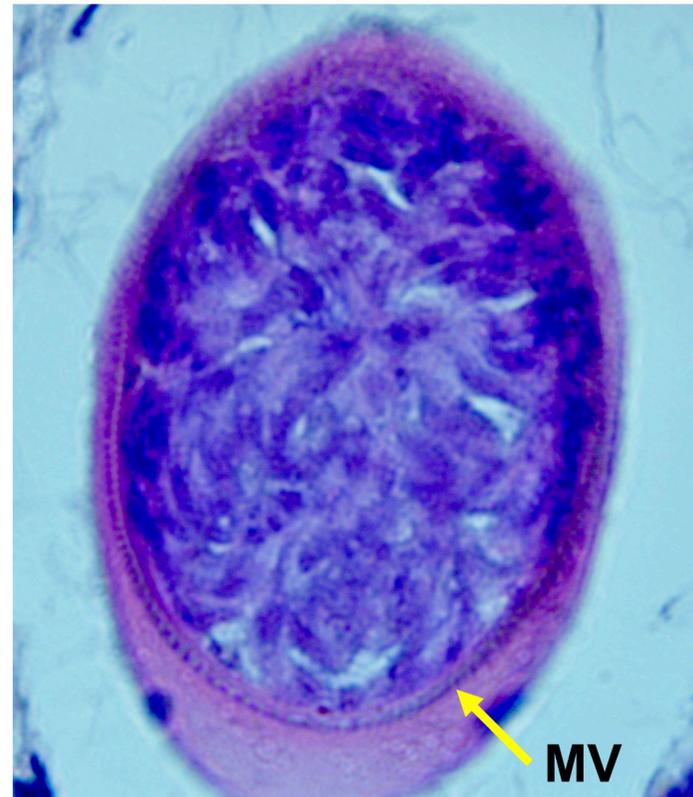
Tinción: Hematoxilina-Eosina



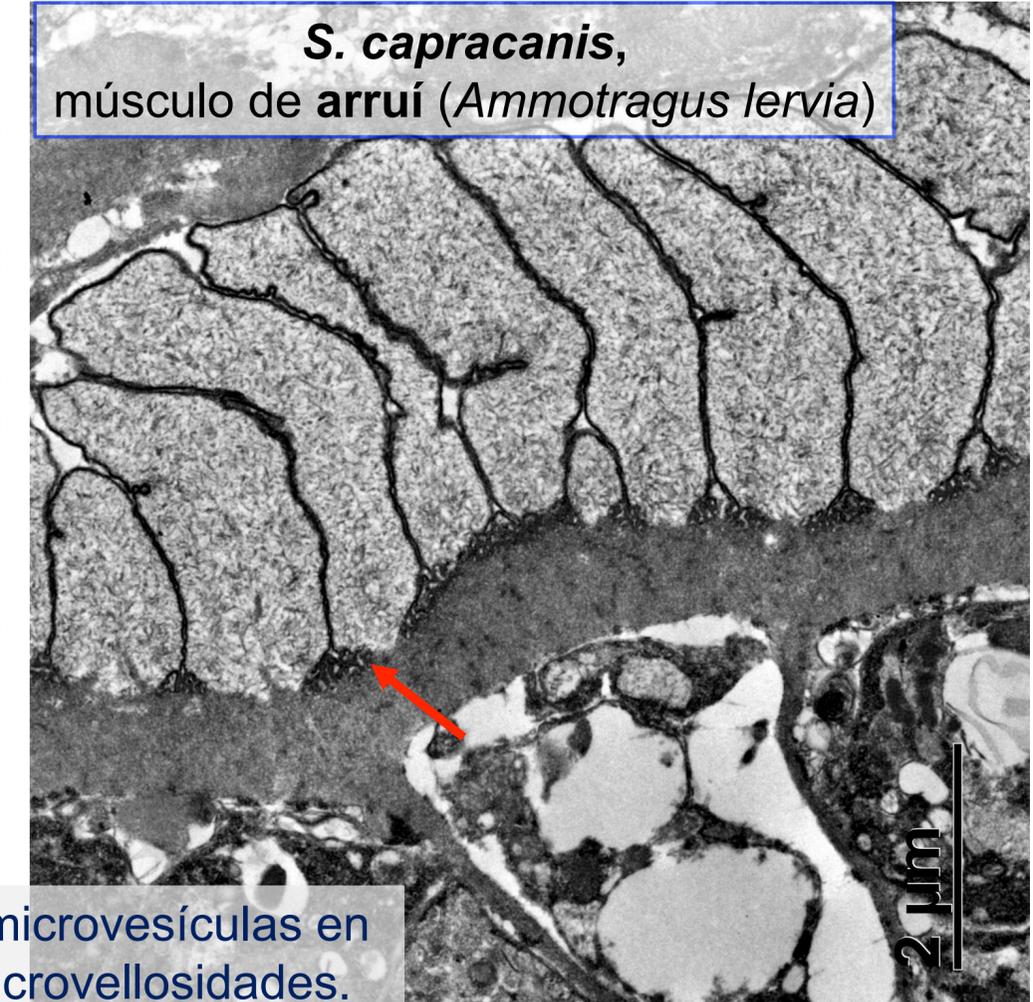
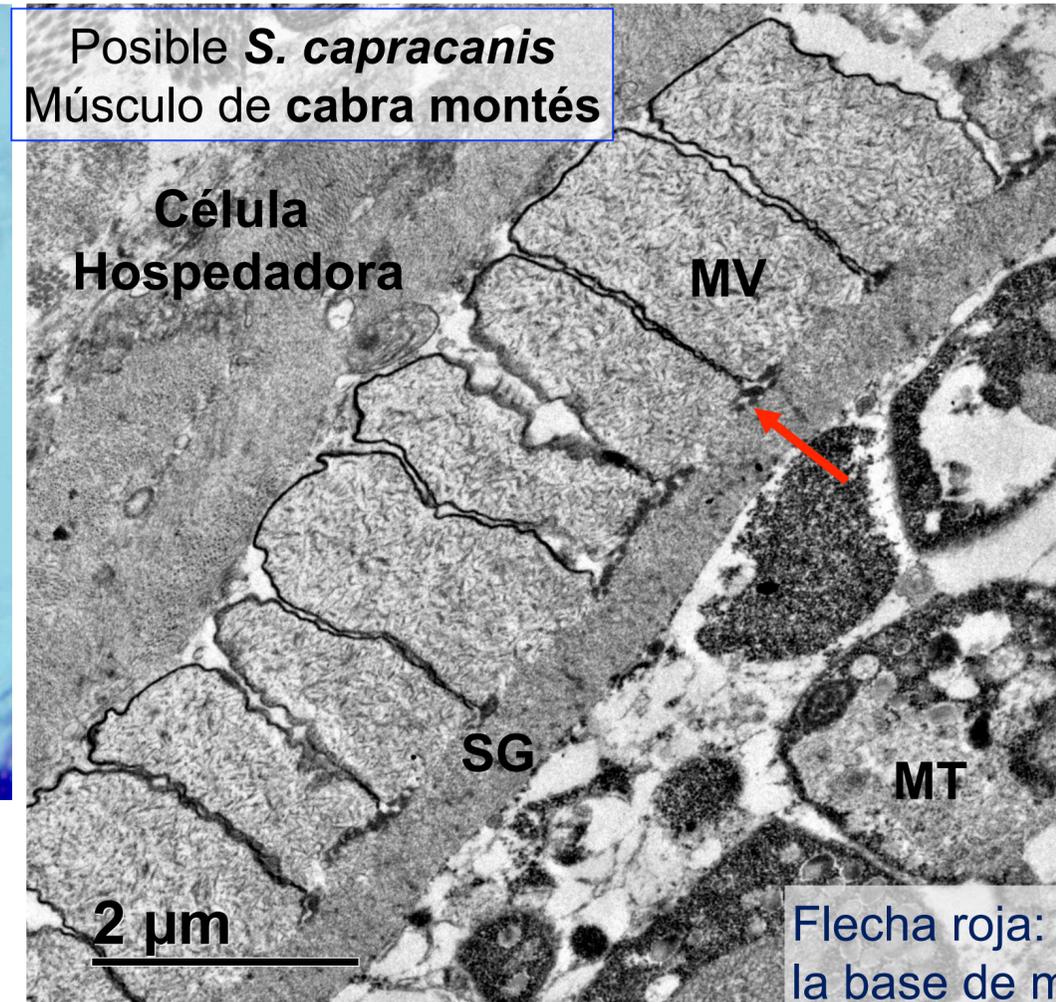
- **Sin** miositis ni degeneración tisular.
- **Paredes finas**, deberían ser **gruesas** en (muflón) (Posible efecto por la fijación o ángulo de miofibrillas).
- **Paredes gruesas** en el resto, pero en Boc Balear no se aprecia claramente (sarcoquiste dañado).
- **Densidades** bajas: **2,97-3,93** sarcoquistes/cm<sup>2</sup> (rebeco y muflón) y **0,4-1,2** sarcoq./cm<sup>2</sup> cabra montés y boc balear.
- **Medidas** de sarcoquistes dentro de rangos de aislados de *S. tenella* o *S. capracanis* en otros HI.



# Estudio ultraestructural



44,1 x 31,5  $\mu\text{m}$ ,  
pared gruesa, 1,06  $\mu\text{m}$



- **Microvellosidades: digitiformes, 2,76  $\mu\text{m}$  de largo** cabra montés y **3,92  $\mu\text{m}$  en arruí**, pared ondulada, con abundantes microgránulos y material microfibrilar en interior. **Pared tipo 14.**
- En esta cabra montés solo se detectan secuencias *cox1* de ***S. sp1***, relacionada con *S. hircicanis* (**pared tipo 7 a**), por lo que albergaría sarcoquistes de *S. capracanis* no detectados molecularmente, según su morfología.

# Análisis Molecular *cox1*

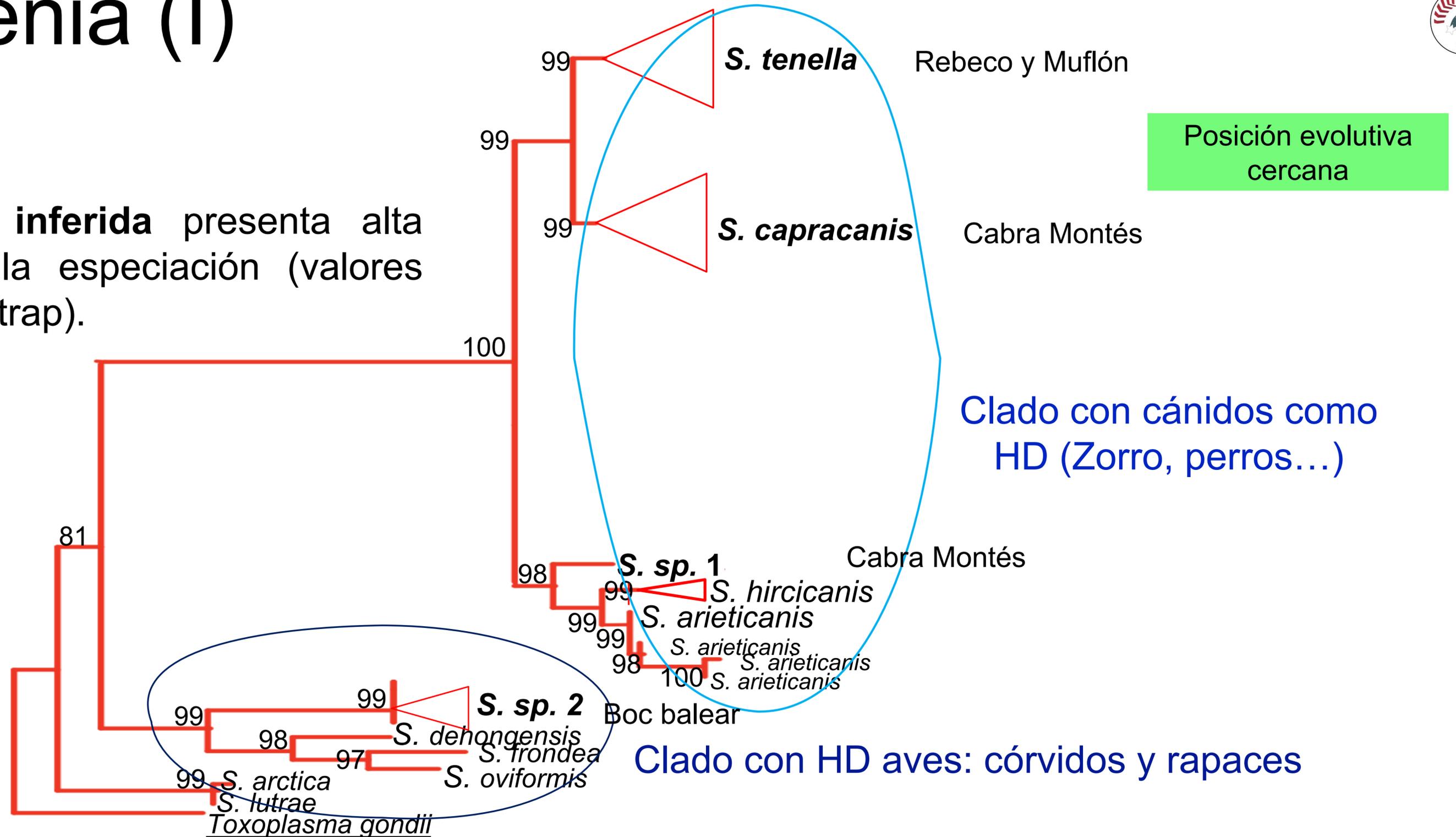
- Secuencias parciales de **907-1077 pb.**
- **Alta diversidad haplotípica** en *S. tenella* y *S. capracanis*, pero **alta similitud intraespecífica**.
- En *S. tenella* y *S. capracanis*, alta **similitud interespecífica** con otras especies evolutivamente cercanas.
- Detectadas dos variantes genéticas nuevas: **S. sp1** en cabra montés y **S. sp2** en boc balear, pontenciales nuevas especies.

Caracterización molecular gen <i>cox1</i>					
Especies/var. confirmadas	HI	Haplotipos	Identidad (%)		
<i>S. tenella</i>	Muflón	23	96,1-99,7 <i>S. tenella</i>	90,2-93,7 <i>S. capracanis</i>	90,0-90,6 <i>S. heydorni</i>
	Rebeco	17	95,8-99,3 <i>S. tenella</i>	90,3-93,9 <i>S. capracanis</i>	89,9-90,6 <i>S. heydorni</i>
<i>S. capracanis</i>	Cabra montés	24	97,7-99,9 <i>S. capracanis</i>	91,5-94,1 <i>S. tenella</i>	80,9-83,5 <i>S. hircicanis</i>
<b>S. sp.1</b>		1	86,5-86,7 <i>S. hircicanis</i>	81,6-86,7 <i>S. arieticanis</i>	84,0-86,1 <i>S. tenella</i>
<b>S. sp. 2</b>	Boc balear	3	75,3-75,4 <i>S. dehongensis</i>	74,8-74,9 <i>S. frondea</i>	72,6-73,8 <i>S. oviformis</i>

# Filogenia (I)

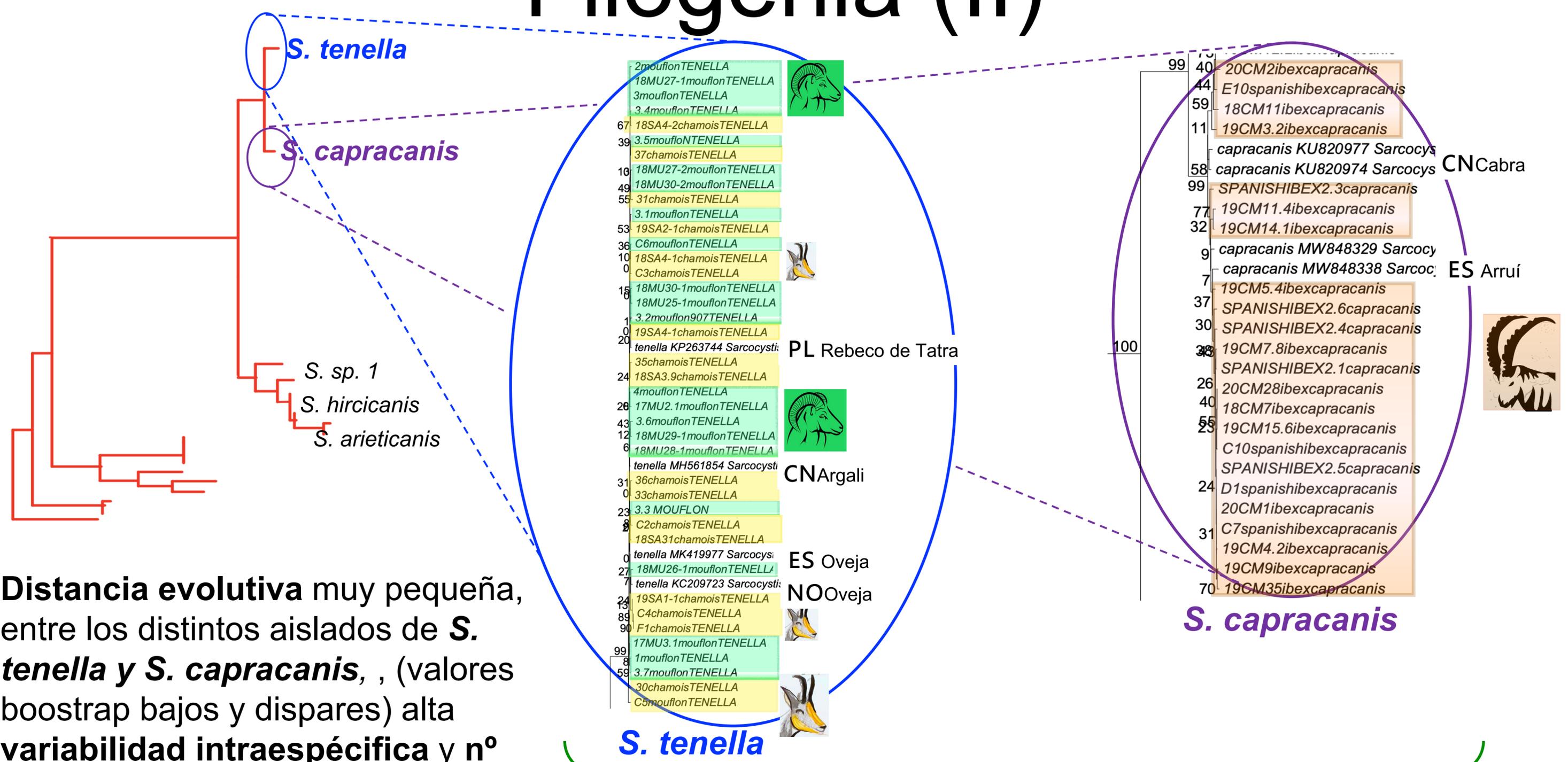


La **filogenia inferida** presenta alta fiabilidad en la especiación (valores altos de Bootstrap).

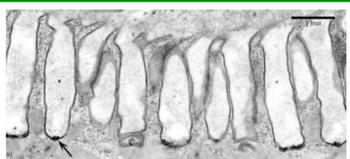


CONDICIONES: Mega 11, Maximum Likelihood, K2P, Outgroup: *T. gondii*

# Filogenia (II)

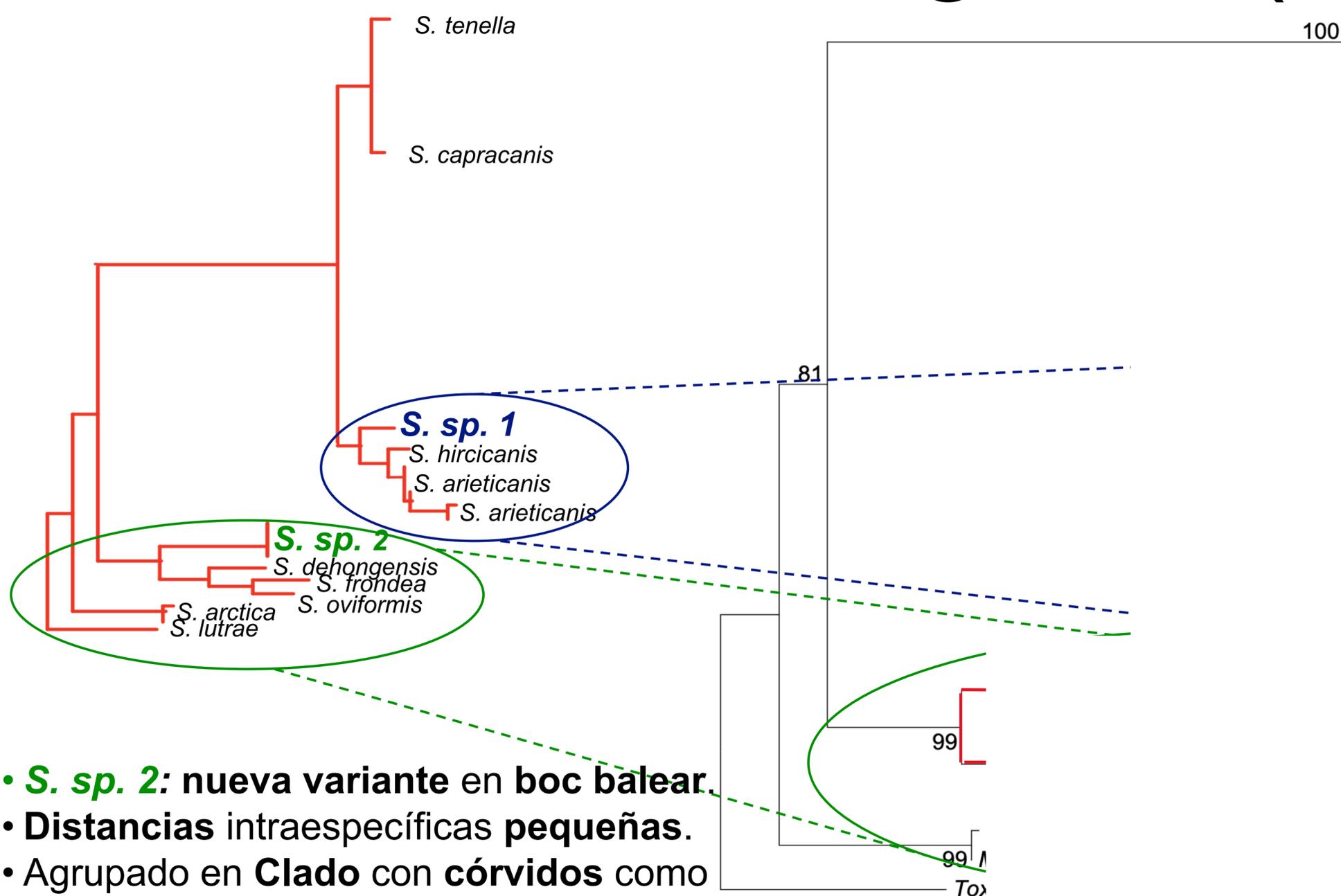


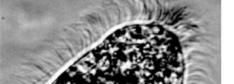
**Distancia evolutiva** muy pequeña, entre los distintos aislados de **S. tenella** y **S. capracanis**, (valores bootstrap bajos y dispares) alta **variabilidad intraespecífica** y n° de **haplotipos** elevado.



HD

# Filogenia (III)



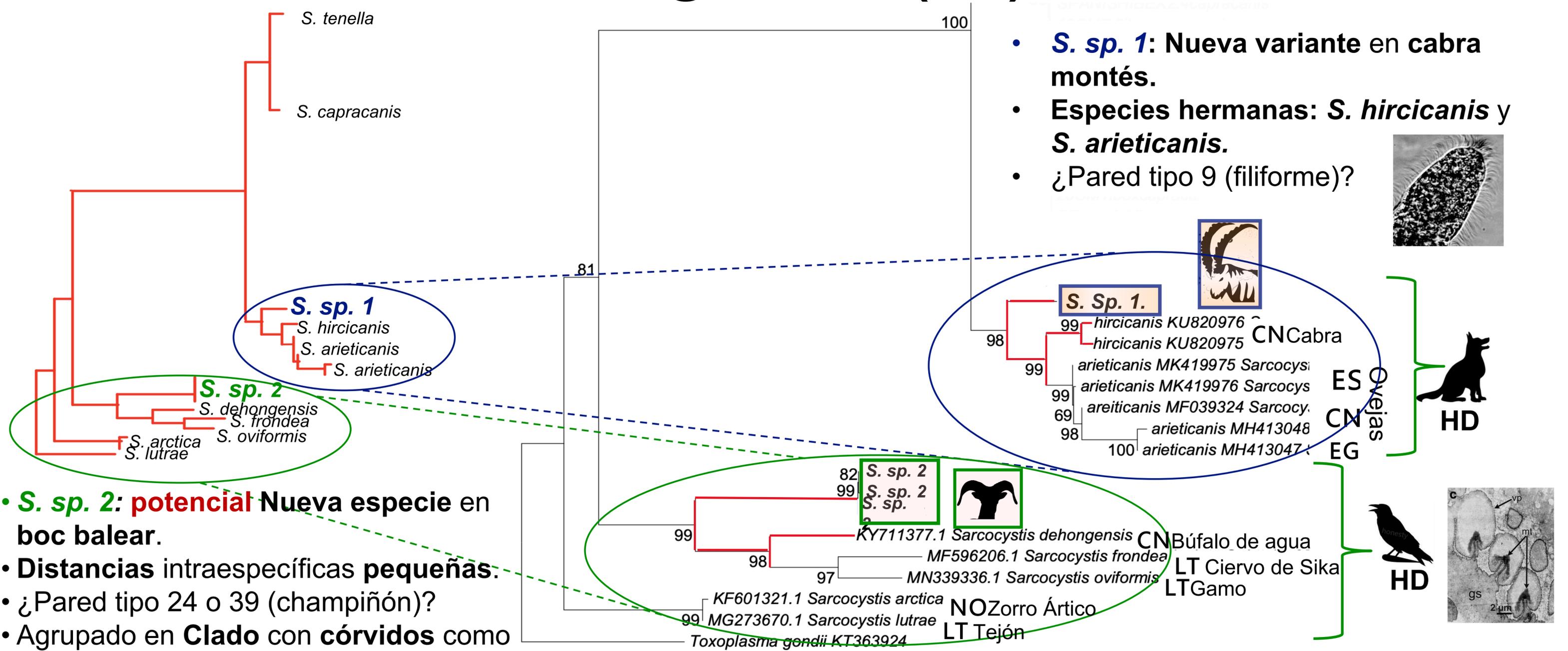
- ***S. sp. 1***: Nueva variante en cabra montés.
- Especies hermanas: ***S. hircicanis*** y ***S. arieticanis***.
- : Pared tipo 7a (filiforme)? 

- ***S. sp. 2***: nueva variante en boc balear.
- Distancias intraespecíficas pequeñas.
- Agrupado en **Clado con córvidos** como **HD**.

¿Pared tipo 24 o 39 (champiñón)?

- ***Sarcocystis*** con **córvidos** como **HD**: **poco frecuentes** en rumiantes domésticos, pero su prevalencia **aumenta** en **rumiantes silvestres** en libertad, por **fácil acceso** a los **cadáveres** del HI.

# Filogenia (III)



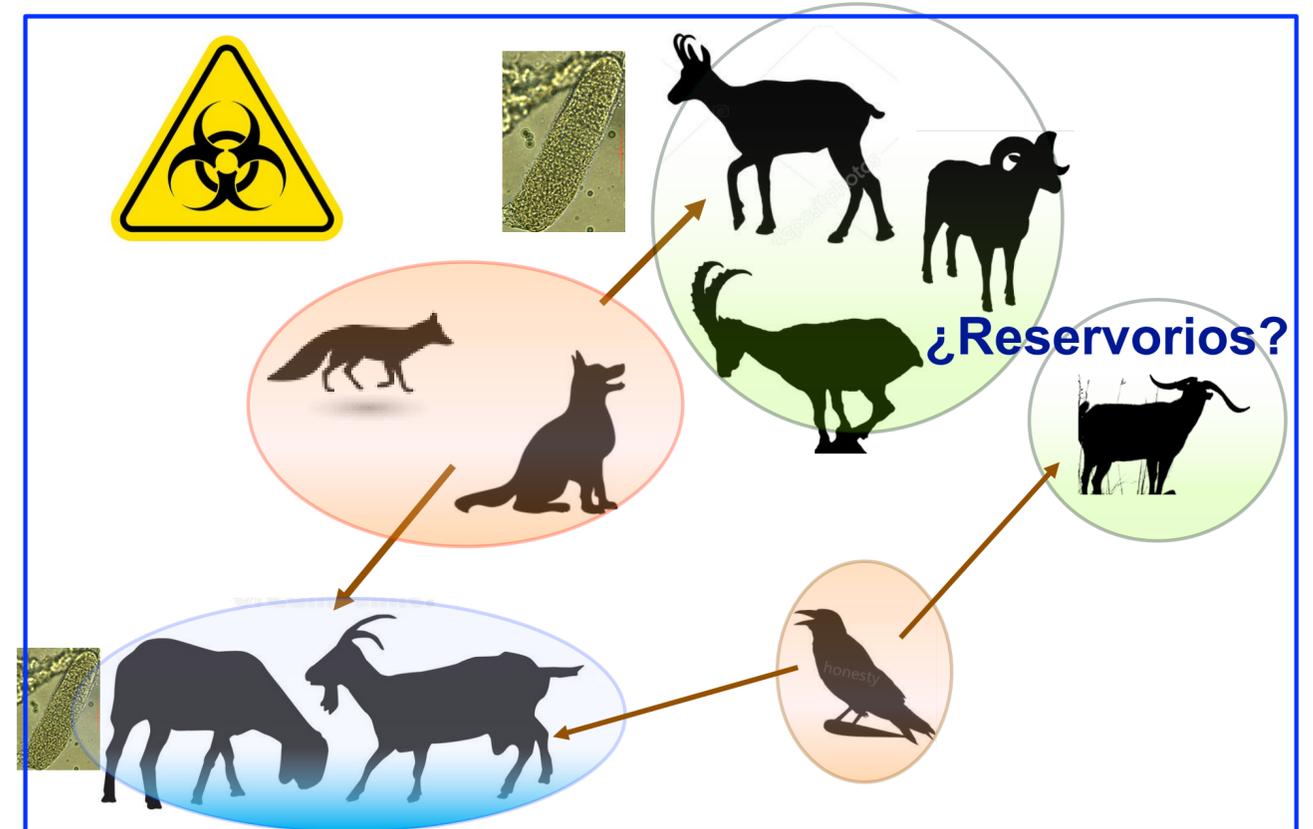
- ***S. sp. 1*: Nueva variante en cabra montés.**
- **Especies hermanas: *S. hircicanis* y *S. arieticanis*.**
- ¿Pared tipo 9 (filiforme)?

- ***S. sp. 2*: potencial Nueva especie en boc balear.**
- **Distancias intraespecíficas pequeñas.**
- ¿Pared tipo 24 o 39 (champiñón)?
- Agrupado en **Clado** con **córvidos** como **HD**.

• ***Sarcocystis* con córvidos como HD: poco frecuentes en rumiantes domésticos, pero su prevalencia aumenta en rumiantes silvestres en libertad, por fácil acceso a los cadáveres del HI.**

# Discusión

HI	Prevalencia	Prevalencias en otros estudios
Rebeco	100 %	Hasta 90 % en ovejas (global)
Muflón	86,54 %	85-90,2 % muflones (Austria y Alemania)
Cabra montés	52,35 %	23,5-84 % Cabra montés (España)
Boc balear	5,26 %	No hay estudios



- **No se detectaron *S. arieticanis* o *S. hircicanis***, poco frecuentes en muflón Prakas et al., Parasitol. Res. (2021) 120:2695-2702 y en cabra doméstica Hu et al., Parasitol. Res. (2016) 115:3973-3981.
- **No se detectan especies transmitidas por felinos (*S. gigantea*, *S. medusiformis*)**, menor número de ooquistes liberados en heces por estos HD, menor contacto por cuestiones de hábitat y escasez de felinos HD. Dubey & Streitl J. Parasitol. (1976) 62.5:828-830. McKenna & Charleston Vet. J. (1983) 31(4):49-52. Gil-Sánchez et al., Plos One (2020) 15(1) e0227708. Rodríguez Lince ibérico, <http://vertebradosibericos.org>
- **No se han referido síntomas clínicos** en los ungulados de montaña estudiados, a pesar de la patogenicidad para el ganado, pero ésta es **dosis-dependiente (densidades encontradas en nuestro estudio bajas)**. Dubey et al., Sarcocystosis of animals and humans. CRC Press, (2016).

# Conclusiones



# Conclusiones

1. **Primer estudio** sobre *Sarcocystis* en el Boc balear, y **primer estudio molecular** de este género de parásitos en nuestro país en rebeco, muflón, cabra montes y boc balear.
2. Las **especies predominantes** en ungulados de montaña, *S. tenella* en rebeco y muflón, y *S. capracanis* en cabra montés, han sido descritas en pequeños rumiantes domésticos, con cánidos como hospedadores definitivos.
3. Tanto en **cabra montés**, como en **boc balear** se detectaron dos variantes genéticas del gen *cox1* no descritas con anterioridad, *Sarcocystis* sp. 1 y *Sarcocystis* sp. 2 con importante % de homología con especies transmitidas por cánidos y córvidos respectivamente.
4. El presente hallazgo permite evidenciar la **limitada diversidad** de especies de *Sarcocystis* en estos hospedadores, a diferencia de lo observado en el ciervo, el corzo y el gamo, pero añaden datos interesantes sobre la posible **interrelación** de los ciclos domésticos y silvestres.

# Agradecimientos, Remerciements, Ringraziamenti, Acknowledgements, Dansakgungen

- Centro Nacional de Microscopía Electrónica.
- Universidad de Murcia.
- Cazadores, Taxidermias, Salas de tratamiento de caza.
- José Antonio Rodríguez Amado (Fotos Amado).
- Y a todos ustedes.



[gudelgado@alumnos.unex.es](mailto:gudelgado@alumnos.unex.es)



G CONSELLERIA  
O MEDI AMBIENT,  
I AGRICULTURA  
B I PESCA

