



Facultade de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

Prevalencia y desarrollo
larvario de *Cephenemyia* spp.
en corzos del norte de España

Néstor Martínez Calabuig

Grado en Veterinaria

Año 2020

Modalidad del Trabajo Experimental

Licencia

Esta obra pertenece a NÉSTOR MARTÍNEZ CALABUIG, y está sujeta a la licencia Reconocimiento-Compartir Igual 4.0 Internacional de Creative Commons. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>



Resumen

Cephenemyia spp. (Diptera: Oestridae) es la causante de una miasis nasofaríngea obligatoria y específica del corzo que se encuentra ampliamente extendida en el continente europeo donde ha sido descrita desde el pasado siglo y que en las dos últimas décadas está adquiriendo relevancia en España.

Se ha llevado a cabo un estudio con un total de 37 corzos fallecidos por distintas causas en el norte de España entre los años 2018 y 2020. Para visualizar las larvas del díptero se abrió longitudinalmente la cabeza de los corzos y se examinó la tráquea, faringe, laringe, sacos retrofaríngeos, cavidad oral y nasal. Una vez identificadas las larvas, se comprobó que todas eran *C. stimulator*. Para el análisis de los resultados se consideraron diferentes factores intrínsecos y extrínsecos.

La prevalencia de infestación por *C. stimulator* fue del 43,2%, con una intensidad media de $16,9 \pm 22,47$ larvas/animal. En total se obtuvieron 271 larvas que se localizaron sobre todo en los cornetes nasales (46,9%) y en los sacos retrofaríngeos (35,8%) y, en menor proporción, en la glotis (14,7%), la boca (1,5%) y la tráquea (1,1%).

La edad y el sexo de los animales influyeron de forma significativa en la prevalencia de esta miasis, así los animales adultos (55,5%) presentan 11,7 veces más riesgo de padecer una miasis por *C. stimulator* que los jóvenes (0%), probablemente debido a que, estos últimos al pasar más tiempo ocultos entre la vegetación están menos expuestos a las moscas de *Cephenemyia*. La prevalencia en los machos (60%) fue superior que en las hembras (23,5%); el comportamiento de defensa territorial al que se ven obligados los primeros los expone más a la actividad de las moscas, de modo que el riesgo de verse infestados por *Cephenemyia* es 4,65 veces superior al de las hembras. En las condiciones del estudio se observó que tanto el clima, como la causa de la muerte no influyeron de forma significativa en la prevalencia de esta miasis.

La clasificación de las larvas según su estadio de desarrollo reveló que la mayoría eran larvas 3 (59%), seguidas por larvas 2 (39%) y larvas 1 (2%). La prevalencia por larvas de *C. stimulator* fue más elevada durante la primavera (64,3%) que en invierno (30%) y otoño (0%), siendo la primavera la única estación en la que se hallaron los 3 estadios larvarios; la mayor prevalencia observada en esta estación se debe a que en esta época pueden coexistir en un mismo animal larvas procedentes de distintas temporadas.

En la actualidad, la infestación por *C. stimulator* es una miasis prevalente en el norte de España y que, por su difícil control y repercusiones negativas sobre la salud de los corzos, podría suponer un serio problema para las poblaciones de este ungulado silvestre.

Palabras clave: Corzo, *Cephenemyia stimulator*, desarrollo larvario, prevalencia, miasis, España.

Abstract

Cephenemyia spp. (Diptera: Oestridae) is the cause of a nasopharyngeal myiasis, which is obligatory and specific to roe deer and is widely spread in Europe where it has been described since the last century and that in the last two decades is gaining relevance in Spain.

A study has been carried out with a total of 37 roe deer that have died from different causes in the north of Spain between 2018 and 2020. To visualize the diptera larvae, the roe deer heads were opened lengthwise and the trachea, pharynx, larynx, retropharyngeal sacs, oral and nasal cavities were examined. Once the larvae were identified, they were found to be all *C. stimulator*. For the analysis of the results, different intrinsic and extrinsic factors were considered.

The prevalence of *C. stimulator* infestation was 43,2%, with a mean intensity of $16,9 \pm 22,47$ larvae/animal. A total of 271 larvae were obtained, mostly in the nasal turbinates (46,9%) and in the retropharyngeal sacs (35,8%) and, to a lesser extent, in the glottis (14,7%), the mouth (1,5%) and the trachea (1,1%).

The age and sex of the animals significantly influenced the prevalence of this myiasis, so that adult animals (55,5%) have 11,7 times more risk of suffering from a *C. stimulator* myiasis than young animals (0%), probably because the latter spend more time hidden among vegetation and have less exposure to *Cephenemyia* flies. Prevalence in males (60%) was higher than in females (23,5%); the territorial defence behaviour of males exposed them to fly activity, so that the risk of being infested by *Cephenemyia* is 4,65 times higher than that of females. Under the conditions of the study, it was observed that climate and cause of death did not significantly influence the appearance of this myiasis.

The classification of the larvae according to their stage of development indicated that most of them were larvae 3 (59%), followed by larvae 2 (39%) and larvae 1 (2%). The prevalence of *C. stimulator* larvae was higher during spring (64,3%) than during winter (30%) and autumn (0%) months, spring being the only season when larvae belonging to the 3 stages were found; this higher prevalence in spring is due to the fact that larvae from different seasons can coexist in the same animal at this time.

Nowadays, *C. stimulator* infestation is a well established myiasis in northern Spain and, due to its difficult control and negative repercussions on the health of the roe deer, could mean a serious problem for the populations of this wild ungulate.

Keywords: Roe deer, *Cephenemyia stimulator*, larval development, prevalence, myiasis, Spain.

Resumo

Cephenemyia spp. (Diptera: Oestridae) é a causante dunha miase nasofarínxea obrigatoria e específica do corzo que se atopa amplamente estendida no continente europeo onde está a ser descrita dende o pasado século e que nas dúas últimas décadas está adquirindo relevancia en España.

Levou a cabo un estudo cun total de 37 corzos falecidos por distintas causas no norte de España entre os anos 2018 e 2020. Para visualizar as larvas do díptero abriuse lonxitudinalmente a cabeza dos corzos e examinouse a traquea, farinxe, larinxe, sacos retrofarínxeos, cavidade oral e nasal. Unha vez identificadas as larvas, comprobouse que todas eran *C. stimulator*. Para a análise dos resultados consideráronse diferentes factores intrínsecos e extrínsecos.

A prevalencia de infestación por *C. stimulator* foi do 43,2%, cunha intensidade media de $16,9 \pm 22,47$ larvas/animal. En total obtivéronse 271 larvas que se localizaron sobre todo nos cornetes nasais (46,9%) e nos sacos retrofarínxeos (35,8%), e en menor proporción na glote (14,7%), boca (1,5%) e traquea (1,1%).

A idade e o sexo dos animais influíron de forma significativa na prevalencia desta miase, así os animais adultos (55,5%) presentan 11,7 veces máis risco de padecer unha miase por *C. stimulator* que os novos (0%), probablemente debido a que, estes últimos ao pasar máis tempo ocultos entre a vexetación están menos expostos ás moscas de *Cephenemyia*. A prevalencia nos machos (60%) foi superior que nas femias (23,5%); o comportamento de defensa territorial ao que ven obrigados os primeiros exponos á actividade das moscas, de xeito que o risco de verse infestados por *Cephenemyia* é 4,65 veces superior ao das femias. Nas condicións do estudo observouse que tanto o clima, como a causa da morte non influíron de forma significativa na aparición desta miase.

A clasificación das larvas segundo o seu estadio de desenvolvemento revelou que a meirande parte eran larvas 3 (59%), seguidas polas larvas 2 (39%) e larvas 1 (2%). A prevalencia por larvas de *Cephenemyia* foi máis elevada durante a primavera (64,3%) que en inverno (30%) e outono (0%), sendo a primavera a única estación na que se acharon os 3 estadios larvários; a maior prevalencia observada nesta estación débese a que nesta época poden coexistir, nun mesmo animal, larvas procedentes de distintas tempadas.

Na actualidade, a infestación por *Cephenemyia* é unha miase prevalente no norte de España e que, polo seu difícil control e repercusións negativas sobre a saúde dos corzos, podería supoñer un serio problema para as poboacións deste ungulado silvestre.

Palabras chave: Corzo, *Cephenemyia stimulator*, desenvolvemento larvario, prevalencia, miase, España.

Índice

1. Introducción	7
1.1. Miasis nasofaríngeas que afectan a los cérvidos	8
1.2. Morfología de <i>Cephenemyia</i> spp.....	10
1.3. Ciclo biológico de <i>Cephenemyia</i> spp.	12
1.4. Cronobiología de la infestación por <i>Cephenemyia</i> en corzos	14
1.5. Prevalencia e intensidad de infección por Oestrinae en corzos.....	15
1.6. Factores de riesgo en la infección por <i>Cephenemyia</i>	16
1.6.1. Factores intrínsecos o dependientes del hospedador	16
1.6.2. Factores extrínsecos o dependientes del medio.....	17
1.7. Acción patógena y signos clínicos	17
2. Objetivos	19
3. Material y métodos.....	20
3.1. Animales muestreados.....	20
3.2. Recolección de las larvas	21
3.3. Análisis estadísticos	25
4. Resultados y discusión	26
4.1. Identificación de los parásitos hallados.....	26
4.2. Prevalencia e intensidad de parasitación por larvas de <i>C. stimulator</i>	27
4.3. Prevalencia e intensidad al tener en cuenta los distintos factores de riesgo.....	30
4.3.1. Prevalencia e intensidad al tener en cuenta los factores dependientes del hospedador	30
4.3.2. Prevalencia e intensidad al tener en cuenta los factores dependientes del medio	35
4.4. Cronobiología y desarrollo de las distintas fases larvarias de <i>C. stimulator</i> en el área de estudio	41
4.4.1. Desarrollo larvario en función de las zonas climáticas	41
4.4.2. Desarrollo larvario en función de la época del año	43
5. Conclusiones	45
6. Bibliografía	46

Abreviaturas

- a.C.: antes de cristo
- ANOVA: análisis de varianza
- °C: grados Celsius
- CO₂: dióxido de carbono
- DE: desviación estándar
- kg: kilogramos
- km: kilómetros
- km/h: kilómetros por hora
- L1: larvas 1
- L2: larvas 2
- L3: larvas 3
- m: metros
- mm: milímetros
- N°: número
- OR: odds ratio
- PBS: Phosphate Buffered Saline
- s.: siglo

1. Introducción

El corzo (*Capreolus capreolus*) es un mamífero rumiante y ungulado que pertenece a la familia Cervidae y como tal, cumple dos características típicas de esta: por un lado, en el caso de los machos, disponen de unas cuernas que renuevan anualmente; y por otro lado, pisan sobre los dos dedos centrales de cada extremidad que se encuentran protegidos por pezuñas (Fidalgo *et al.*, 2009).

Alcanzan un peso medio de 25 kg y es el cérvido de menor tamaño que habita en España, aunque se trata de uno de los pocos mamíferos salvajes que se encuentra en expansión gracias a su buena adaptación a los bosques de la península ibérica (Fernández & Valls, 2008; Fidalgo *et al.*, 2009).

El celo tiene lugar en los meses de verano, en el que suceden combates entre los machos, pero no tan violentos como en otras especies de cérvidos. Tras la fecundación, con el objetivo de que las crías nazcan en la época de mayor disponibilidad de alimento, hay un periodo de diapausa embrionaria que consiste en que se detiene el desarrollo del óvulo fecundado hasta la reanudación del ciclo en los meses de noviembre – diciembre con la implantación y comienzo de la gestación. De esta forma los partos se concentran en la primavera durante los meses de abril – mayo, en los que nacen una o dos crías (Fernández & Valls, 2008; Fidalgo *et al.*, 2009).

Como consecuencia del pequeño tamaño de su rumen, deben seleccionar el alimento más nutritivo y digestible y debido a su corto tracto digestivo necesitan alimentarse frecuentemente e ingerir pequeñas cantidades. Además, se adaptan excelentemente a las condiciones alimentarias del hábitat en el que se encuentren (Fidalgo *et al.*, 2009).

Presentan un pelaje de color gris oscuro en los meses de invierno (Ilustración 1) y más rojizo según se van acercando los meses de verano. Tienen una mancha de color blanquecino en la parte trasera, cuya forma varía entre hembras y machos (Darmangeat, 2014).

Por lo general, son animales solitarios y leales a la zona que habitan. Se inclinan por los lugares que combinan áreas abiertas y zonas boscosas. El territorio que ocupan los machos es mayor que el de las hembras, y en ocasiones, un macho puede ocupar el territorio de varias hembras (Fidalgo *et al.*, 2009).



Ilustración 1. Hembra de corzo en busca de alimento durante el invierno de 2018 en La Pernía (Palencia).

1.1. Miasis nasofaríngeas que afectan a los cérvidos

Zumpt (1965) definió el término miasis como “la infestación de animales vertebrados vivos con larvas de dípteros, las cuáles durante al menos un cierto periodo se alimentan de los tejidos vivos o muertos del hospedador, líquidos corporales o comida ingerida”.

La familia Oestridae está formada por distintos géneros cuyas larvas son parásitos obligados de vertebrados, generalmente mamíferos. En función de su localización los oéstridos pueden causar miasis cutáneas (Hypodermatinae y Cuterebrinae), intestinales (Gasterophilinae) y nasofaríngeas (Oestrinae). En la Ilustración 2, se resume, la clasificación taxonómica de *Cephenemyia* spp. y *Pharyngomyia* spp., así como de sus principales hospedadores.

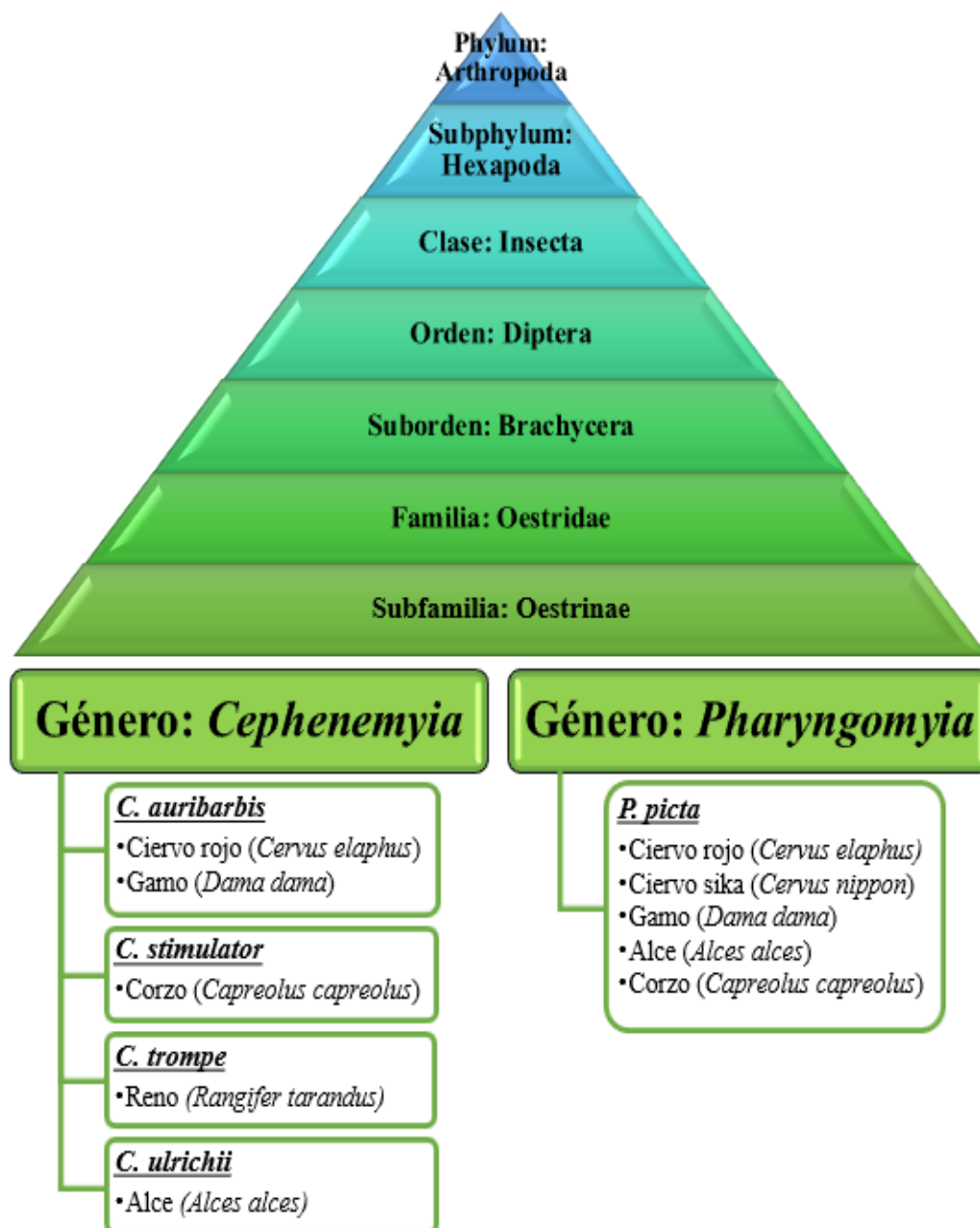


Ilustración 2. Clasificación taxonómica de *Cephenemyia* spp. y *Pharyngomyia* spp.

A diferencia de otros oéstridos en los cuales las moscas depositan huevos sobre los pelos de los animales de los que eclosionan pequeñas larvas que penetran activamente a través de la piel o son ingeridas por el hospedador, en la subfamilia Oestrinae las moscas depositan las larvas en los ollares o boca e invaden los senos y la cavidad faríngea (Colwell *et al.*, 2006).

Dentro de la subfamilia Oestrinae se encuentran distintos géneros que parasitan a herbívoros domésticos (*Oestrus* y *Rhinoestrus*) y silvestres (*Cephenemyia* y *Pharyngomyia*).

Las miasis nasofaríngeas en cérvidos están ocasionadas por larvas de mosca pertenecientes a los géneros *Cephenemyia* y *Pharyngomyia*. Estas son bastante específicas del hospedador y en raras ocasiones parasitan un hospedador inadecuado (Angulo-Valadez *et al.*, 2010; Leitner *et al.*, 2016). Así, dentro del género *Cephenemyia* nos encontramos con 4 especies que parasitan a cérvidos nombradas en la Ilustración 2 (Kornás *et al.*, 2016; Pajares, 2016). Por otro lado, perteneciente al género *Pharyngomyia* ubicamos a la especie *P. picta*, que aunque su hospedador principal es el ciervo rojo en Europa y el ciervo sika (*Cervus nippon*) en Asia, es menos específico de hospedador que el género *Cephenemyia*, observándose esporádicamente parasitaciones en gamos, alces y corzos. En el caso de los ciervos, no es raro que aparezcan infestaciones mixtas de *P. picta* y *C. auribarbis*, aunque las parasitaciones por *Cephenemyia* son menos frecuentes en estos (Zumt, 1965; Bueno-de La Fuente *et al.*, 1998; Leitner *et al.*, 2016).

Las hembras de las moscas depositan las larvas 1 (L1) directamente sobre la región de los ollares del hospedador (Angulo-Valadez *et al.*, 2010; Pajares, 2016) las cuales penetran a través de ellos y migran a lo largo de la cavidad nasal alcanzando los senos conectados con ella y la nasofaringe (Minár, 2000).

En todos los estadios larvarios destaca la presencia de unos ganchos bucales y unos peritremas con abundantes poros respiratorios en la región posterior. Poseen un cuerpo alargado, con la zona dorsal convexa y la región ventral más plana (Minár, 2000). Las L1 están provistas de ganchos y espinas que les proporcionan adherencia y facilitan su avance a lo largo de las fosas nasales, ya que deben ascender rápidamente por la cavidad para evitar ser expulsadas por estornudos del hospedador. Las larvas 2 (L2) ven reducido el tamaño de sus ganchos y espinas debido a que ya se encuentran alojadas en la región de los senos paranasales y en la nasofaringe donde es más difícil que sean expulsadas. Por último, las larvas 3 (L3), cuyo peso disminuye para facilitar su expulsión, disponen de unos ganchos y espinas útiles para facilitar su migración hacia fuera y ser eliminadas al ambiente donde formarán la pupa (Angulo-Valadez *et al.*, 2010).

Las moscas adultas de la familia Oestridae se caracterizan por carecer de unas piezas bucales funcionales por lo que tienen que minimizar la energía que gastan durante el vuelo. Debido a que no se alimentan, la vida de los adultos es corta y por ello las hembras salen de la pupa con huevos ya perfectamente desarrollados listos para su fertilización. Disponen de unos

ojos grandes que les facilita la detección del posible hospedador. Las hembras gozan de una mayor longitud de las antenas, siendo el tercer segmento de estas el más largo. Poseen un tórax grande, que en la mayoría suele ser más ancho que el abdomen; este último es oval y con protuberancias. Su anatomía difiere de otras moscas, ya que a diferencia de estas no se arrastran por el pelo del hospedador para depositar los huevos sino que directamente durante el vuelo las hembras eyectan las larvas del primer estadio ya incubadas en una gota de líquido en las fosas nasales. Por este motivo, las patas están menos desarrolladas y son más cortas que en otras moscas. Alcanzan una alta velocidad de vuelo y su color y pilosidad representan una protección frente a posibles depredadores (Minár, 2000; Angulo-Valadez *et al.*, 2010).

1.2. Morfología de *Cephenemyia* spp.

Las formas adultas de la especie que afecta a los corzos (*C. stimulator*) alcanzan unas dimensiones de 13-17 mm y tienen un cuerpo recubierto de pelos amarillos y naranjas adquiriendo en ocasiones una tonalidad ligeramente rojiza que se asimila a la de los abejorros (*Bombus* spp.). Esta coloración no es una casualidad, sino que es una adaptación de estos dípteros con el fin de protegerse de posibles depredadores al adoptar una forma y color semejantes al de especies que albergan veneno en su interior. Sin embargo, en la región bucal y del vértex los pelos son de color blanco-amarillento. Estos imagos están constituidos por una cabeza grande acompañada de unos ojos acordes al tamaño de la cabeza y unas antenas cortas (Zumpt, 1965; Calero-Bernal & Habela, 2013; Pajares, 2016). El falosoma de los machos está recubierto con delgadas espinas (Patton, 1937).

Existen grandes similitudes entre las formas adultas de las distintas especies de *Cephenemyia*, aunque existe alguna característica que las diferencia (Zumpt, 1965) como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Diferencias entre las principales especies de *Cephenemyia*.

<i>C. stimulator</i>	<i>C. auribarbis</i>	<i>C. trompe</i>	<i>C. ulrichii</i>
- Antenas de limpieza ausentes.	- Pelos de la región bucal y vértex de coloración naranja o rojiza. - Dos últimos segmentos abdominales de color blanco-amarillento.	- Pelos del abdomen de coloración amarilla y negra.	- Patas con pilosidad negra, excepto en los fémures medio y posterior que poseen algún pelo amarillo.

Los 3 estadios larvarios de *C. stimulator* constan de doce segmentos. El primer segmento, el cefálico, es móvil y se puede retraer dentro del primer segmento torácico (segmento II). Poseen un cuerpo recubierto de espinas que, junto con los grandes ganchos bucales, sirven para fijarse a la mucosa del hospedador y así evitar ser expulsadas por los mecanismos de defensa (tos, estornudos, etc.). Su forma es alargada con la región ventral más plana que la dorsal (Minár, 2000; Pajares, 2016).

Las larvas 1 tienen un tamaño de 1 mm cuando son eclosionadas y alcanzan un tamaño de hasta 3 mm. Su coloración es blanquecina. Tanto la parte ventral como dorsal de los segmentos II al XII están repletos de dentículos, más evidentes en la región lateral y ventral. Esto permite diferenciar las L1 de *C. stimulator* de: *C. trompe*, las cuales poseen pocos dentículos en la región dorsal y muy rudimentarios; *C. ulrichii*, cuyas larvas son más esbeltas alcanzando dimensiones de 3 a 5 mm y poseen más filas de dentículos, los cuales son mucho más largos y espinosos; y *Pharyngomyia picta*, en la que los segmentos III al V se agrandan globosamente (Zumpt, 1965; Pajares, 2016).

Las larvas 2 tienen un tamaño que va desde los 3 hasta los 13 mm. Su coloración es más amarillenta que las L1 y poseen el lado dorsal menos espinoso. En esta fase es característico de esta especie la presencia de un segmento X desnudo y un XI que en ocasiones lo replica o puede estar provisto con hasta 4 filas de espinas. La densidad de espinas es mayor en la región ventral y desde el segmento III al XI hay entre 5 y 8 filas de espinas menos irregulares (Zumpt, 1965; Pajares, 2016).

Las larvas del último estadio, las L3, pueden alcanzar hasta los 30 mm de longitud. Su coloración es marrón oscuro y en ocasiones, incluso negra. Esto se debe a que aumenta la cantidad de melanina, apareciendo manchas oscuras en el cuerpo de las larvas maduras, especialmente en el último segmento. Los peritremas posteriores de *C. stimulator* tienen forma reniforme (arriñonada) mientras que los de *C. trompe* tienen forma de media luna, con los bordes exteriores ligeramente ondulantes; los de *C. ulrichii* tienen una forma más o menos triangular; los de *P. picta* también tienen forma de media luna, aunque son más redondeados; y los de *C. auribarbis* son un punto intermedio entre *P. picta* y otras especies de *Cephenemyia*. Además, en *Pharyngomyia* el espacio entre las esquinas internas inferiores de los peritremas es al menos tres veces mayor que el espacio que hay entre las esquinas internas superiores, de forma que el espacio entre los peritremas es más ancho hacia abajo, mientras que en *Cephenemyia* el espacio entre la esquina interna superior e inferior es similar y como máximo dos veces mayor que el espacio inferior (Zumpt, 1965; Minár, 2000; Pajares, 2016).

Por último, las pupas tienen un tamaño de 16 a 20 mm, y son de color negruzco y poseen las características del último estadio larvario (Zumpt, 1965).

1.3. Ciclo biológico de *Cephenemyia* spp.

El ciclo comienza cuando las moscas adultas de *Cephenemyia* localizan a su hospedador. En el caso de *C. stimulator*, tendría lugar cuando las hembras ya fecundadas tras la cópula detectan un corzo. Son atraídas por estímulos químicos, tales como el olor del hospedador y el CO₂ espirado por este. Estas son muy buenas voladoras, prefiriendo zonas abiertas donde pueden alcanzar los 40 km/h, siendo esta una velocidad muy alta comparada con la de otros insectos como la mosca común (0,4 km/h), mosquitos (3,2 km/h) o tábanos (22,4 km/h). Las hembras pueden contener hasta 500 larvas en su interior y durante su ciclo de vida de 16 días van depositando de 30 a 50 L1 en las fosas nasales de distintos corzos con el fin de lograr una mayor tasa de supervivencia al infestar animales de distinta edad y estado inmunitario, al mismo tiempo que se reduce la competencia entre las propias larvas (Arias *et al.*, 2012; Calero-Bernal & Habela, 2013; Pajares, 2016).

Las larvas 1 están rodeadas de un fluido denso y gelatinoso que favorece su adherencia, al mismo tiempo que las protege de la desecación. Las L1 migran a la cavidad nasal gracias a sus ganchos y espinas que a su vez sirven de mecanismo de defensa ante los intentos del hospedador de deshacerse de estas mediante toses, estornudos, movimientos bruscos de la cabeza, etc. Estas larvas pueden entrar en una fase de hipobiosis (detención del desarrollo) según las condiciones climatológicas, como respuesta adaptativa, para que su completo desarrollo no tenga lugar cuando las condiciones del medio externo son desfavorables para su supervivencia. Este periodo de diapausa puede ocurrir en cualquier fase del desarrollo, pero suele aparecer principalmente en la fase de L1 o pupa (Angulo-Valadez *et al.*, 2010; Arias *et al.*, 2012; Pajares, 2016).

Tanto las L1 como las moscas adultas están inactivas cuando la temperatura es inferior a 5° C. Su máxima actividad tiene lugar entre 25-28° C, aunque se ha visto que su activación tiene lugar a temperaturas más bajas, sobre 12-16° C. Por este motivo, es importante que las hembras solo depositen L1 activas que puedan migrar rápidamente por las fosas nasales (Angulo-Valadez *et al.*, 2010).

En la Ilustración 3 se realiza un esquema del ciclo endógeno en el que se observa que una vez que las L1 han penetrado en el hospedador, se transforman en L2 que se dirigen hacia las coanas, la faringe y la laringe, donde se localizan preferentemente las larvas de este y del siguiente estadio (L3). En muchos corzos, estas larvas invaden los sacos retrofaríngeos provocando una dilatación de estos y completando ahí su desarrollo. Una vez completado su crecimiento, las L3 progresan hacia las vías aéreas superiores siguiendo un proceso inverso al de las L1 y L2 y llegan a las fosas nasales donde son eliminadas mediante estornudos del corzo (Arias *et al.*, 2012; Pajares, 2016; Pajares *et al.*, 2017).



Ilustración 3. Ciclo endógeno de *C. stimulator* en el corzo.

Entonces las larvas 3 se entierran en el suelo entre la hojarasca, ya que son lucífugas, y tras esto, pupan. La pupa tiene un recubrimiento quitinoso que protege a la larva y la nueva mosca emerge al cabo de unas 2-3 semanas, siempre y cuando las condiciones climáticas no sean adversas (Arias *et al.*, 2012; Calero-Bernal & Habela, 2013; Pajares, 2016).

Estas moscas al carecer de piezas bucales funcionales no pueden alimentarse y por ello su ciclo de vida es corto. Los machos únicamente viven 5 días, en los cuales van en busca de las hembras y copulan repetidamente. Las hembras ya fecundadas, buscan un cobijo para que se pueda completar la incubación y eclosión de las larvas, gastando la menor energía posible al no poder alimentarse. Una vez desarrolladas, buscan al hospedador donde depositarlas, comenzando así un nuevo ciclo (Calero-Bernal & Habela, 2013; Pajares, 2016).

El ciclo endógeno dura entre 6-8 meses (Pajares *et al.*, 2017). La época de vuelo de las moscas coincide con los meses de abril a septiembre en los que las temperaturas son más elevadas. La actividad es muy variable en función de la región o país y por ello, según las condiciones climáticas puede haber uno o más ciclos de la mosca durante el año. Las horas de mayor actividad de las moscas son entre las 11 y las 12 horas de la mañana (Arias *et al.*, 2012; Calero-Bernal & Habela, 2013).

Esporádicamente, las L3 pueden quedar retenidas en los cornetes nasales donde entran en un estado de putrefacción o se calcifican y en ocasiones, pueden dar lugar a la formación de abscesos. También se han descrito casos de migraciones erráticas de las L3 pudiendo localizarse en bronquiolos, cerebro, esófago o conducto auditivo, entre otros. Sin embargo, este hecho se atribuye más a una migración *postmortem* de las larvas como consecuencia del descenso de la temperatura corporal del corzo (Pajares, 2016).

1.4. Cronobiología de la infestación por *Cephenemyia* en corzos

En todos los dípteros de la familia Oestridae los días óptimos para las actividades de apareamiento y búsqueda de su hospedador comprenden temperaturas cálidas entre 20-30° C, sin viento y soleados (Angulo-Valadez *et al.*, 2010).

En Europa hay distintos autores que describen la cronobiología en su región. Así, en un estudio llevado a cabo en Polonia se observó un predominio de L2 en los meses de abril a julio y de las L3 desde abril hasta agosto (Dudzinski, 1970). En corzos de Hungría, se observó que solo las L1 estaban presentes entre los meses de octubre a abril y, desde abril a agosto ya podían detectarse las L2 y L3, aunque en agosto el número de L2 era muy inferior al de L3 (Király & Egri, 2007). Otro estudio más reciente en Polonia, indica que las moscas de *C. auribarbis* comienzan a infectar a los ciervos en mayo mientras que las de *C. stimulator* lo hacen desde el mes de junio hasta finales de septiembre (Kornaś *et al.*, 2016). Calero-Bernal & Habela (2013) señalan ese mismo periodo de infestación en el país germano, añadiendo que las horas de mayor actividad de las moscas es alrededor del mediodía. Una investigación realizada en corzos sacrificados en el norte de España refleja que entre abril y julio se obtuvo la mayor cantidad de L3, aunque se encontraron larvas de los 3 estadios. La presencia de L1 ya en el mes de abril puede ser debida a que en las regiones de clima más oceánico comiencen las moscas a volar en este periodo. En el mes de diciembre se obtuvieron larvas de estadio 1 y 2, mientras que ya en marzo solo se obtuvieron L2 (Pajares, 2016).

La región norte de nuestro país se caracteriza por tener un clima oceánico con temperaturas moderadas y lluvias abundantes. En las regiones montañosas, los inviernos son fríos y las nevadas se pueden extender desde mediados de otoño hasta la primavera; mientras que, los veranos son calurosos con una notable cantidad de horas de luz y algunas precipitaciones. Este clima es totalmente idóneo para el desarrollo de *C. stimulator*, si bien la época de vuelo de los adultos y el desarrollo de las larvas necesita de unas condiciones de sincronización concretas. Así, tanto las larvas como las moscas adultas no son capaces de mantenerse activas a temperaturas inferiores a 5° C o superiores a 38° C. La actividad óptima de las moscas tiene lugar con temperaturas de 25-30° C y ausencia de fuertes rachas de viento. Aunque también se ha visto en estudios *in vitro* que, con temperaturas aproximadamente de 12° C, las moscas son capaces de estar activas y depositar L1 vivas que pueden migrar hacia las fosas nasales donde logran sobrevivir. Además, se ha podido observar que cuando las temperaturas son bajas entran en un estado de diapausa en el que, durante los meses fríos de invierno, se detiene su desarrollo y se reanuda el ciclo en primavera cuando las condiciones externas son favorables para que la larva pupa y emerja el adulto alrededor de 3 semanas después. Es importante tener en cuenta que la muda y el desarrollo de las larvas en el interior del hospedador no se produce simultáneamente. Este hecho se debe a un mecanismo de adaptación para evitar una obstrucción de las vías aéreas

del corzo que llevarían a la muerte del animal y por tanto del parásito. Por ello siempre se encontrarán larvas en distintos estadios de desarrollo en los corzos parasitados (Angulo-Valadez *et al.*, 2010; Arias *et al.*, 2016; Pajares, 2016).

1.5. Prevalencia e intensidad de infección por Oestrinae en corzos

Las miasis en cérvidos son conocidas desde hace siglos cuando Aristóteles ya hablaba sobre su presencia en ciervos (s. IV a.C.). Sin embargo, el estudio de las miasis nasofaríngeas en corzos es mucho más reciente. Actualmente la cefenemiosis se encuentra ampliamente distribuida en Europa, pero no fue hasta el año 2001 cuando se describió el primer caso de *C. stimulator* en corzos en nuestro país. Se trataba de un corzo que presuntamente ya estaba infestado y que se trajo de Francia en 1997 a una finca de caza de Castilla-La Mancha. Posteriormente, a mediados de la década de los 2000 se hallaron corzos autóctonos parasitados en el área noroeste del país (Pajares, 2009; Arias *et al.*, 2012; Fidalgo, 2012; Pajares *et al.*, 2017).

Se han encontrado resultados discordantes entre prevalencias e intensidades obtenidas de estudios realizados en diferentes países de Europa.

En un estudio realizado durante 3 años en Hungría se obtuvo una prevalencia de infestación por *C. stimulator* del 34,6% y una intensidad de unas 5 a 9 larvas por animal. Esa intensidad se veía incrementada progresivamente desde abril a agosto (Király & Egri, 2007). Otro trabajo llevado a cabo durante 8 años en República Checa obtuvo unas prevalencias entre 16,1 a 42,9% por año con una intensidad media similar al obtenido en el estudio húngaro, con 6 a 11 larvas por animal. Sin embargo, en contraposición con el estudio anterior, llegaron a la conclusión de que la intensidad de infestación fue mayor en los meses de mayo disminuyendo gradualmente hasta septiembre (Salaba *et al.*, 2013). Otra investigación realizada hace varias décadas en Polonia describió una prevalencia de hasta el 85% con una intensidad media de 32 larvas por corzo (Dudzinski, 1970). Este estudio se contrapone con uno realizado en ese mismo país más recientemente por Kornaś *et al.* (2016) en el que se observó una prevalencia relativamente baja del 13% y una intensidad acorde al obtenido en los trabajos realizados en Hungría y República Checa, con 1 a 10 larvas por hospedador.

Entre los años 2012 y 2013 se realizó un informe a partir de los datos obtenidos de corzos de diversos puntos de la península ibérica, predominando los ejemplares obtenidos en el noroeste. La prevalencia obtenida fue de un 16,50% siendo el número de positivos más elevado en Galicia, Asturias y León. Si únicamente se tenían en cuenta los ejemplares analizados en el resto de las

provincias de Castilla-León y en Castilla-La Mancha la prevalencia disminuía significativamente hasta un 5,83% (Fidalgo *et al.*, 2013).

En otro estudio llevado a cabo en el año 2012 en la provincia Lugo se obtuvo una positividad del 57% con una intensidad media de 5 larvas por corzo. A parte de estos datos, si se tenían en cuenta únicamente corzos hallados muertos en la región montañosa de los Ancares la media de larvas encontrados en estos fue muy alta (67 larvas), posiblemente motivo de su deceso (Arias *et al.*, 2012).

Por último, otro trabajo reciente realizado en las comunidades de Galicia y Asturias reflejó una prevalencia en corzos del 31,6% con una intensidad media de $19,67 \pm 21$ larvas por hospedador (Pajares *et al.*, 2017).

Todos estos estudios llevan a la conclusión de que independientemente del origen de la infestación y de su distribución y entrada en España, actualmente es un problema que está presente y se ha establecido en la península ibérica. Esto podría conllevar un riesgo para la población de corzos en nuestro país debido al difícil control de la enfermedad y los problemas que puede ocasionar en su estado de salud (Calero-Bernal & Habela, 2013).

1.6. Factores de riesgo en la infección por *Cephenemyia*

1.6.1. Factores intrínsecos o dependientes del hospedador

Según un estudio realizado por Dudziński (1970) en Polonia los corzos machos estaban más infestados que las hembras y los jóvenes más que los de mayor edad. Sin embargo, en un trabajo más reciente llevado a cabo por Kornás *et al.* (2016) en ese mismo país, se observó que los machos y los animales de más edad eran los más infestados.

Király & Egri (2007) en un estudio realizado, entre los años 2002 y 2005, en Hungría observaron que tanto la prevalencia como la intensidad eran superiores en los jóvenes que en los adultos; hecho que fue atribuido a una menor respuesta inmune o a una menor eficiencia de comportamiento defensivo frente al vuelo de las moscas por parte de los animales jóvenes.

Otra investigación realizada en corzos abatidos en Galicia y Asturias reflejó una mayor prevalencia de infestación en adultos, aunque eran los ejemplares jóvenes los que albergaban una mayor carga parasitaria. Del mismo modo, también se observó que los machos fueron los más parasitados, pero la carga de *Cephenemyia* era superior en las hembras positivas. Esto se achacó a la mayor competencia de territorio entre los machos que hace que en ocasiones ocupen zonas donde el alimento escasea o es de menor calidad de forma que decae su sistema inmunitario (Pajares, 2016; Pajares *et al.*, 2017).

Un informe realizado por Fidalgo *et al.* (2013) a partir de corzos obtenidos en distintos puntos de la península trató de establecer un criterio en función del grado de condición corporal de los corzos. Sin embargo, este estudio no mostró diferencias significativas entre los corzos parasitados y los sanos observando valores normales para la especie en ambos.

1.6.2. Factores extrínsecos o dependientes del medio

Pajares (2016) y Pajares *et al.* (2017) en corzos de Galicia y Asturias encontraron diferencias de infestación por *C. stimulator* entre los corzos procedentes de zonas montañosas y de clima oceánico. El número de animales positivos en ambas zonas fue similar, aunque los corzos abatidos en el área montañosa tenían una mayor carga parasitaria. Al considerar los meses del año, no se observaron larvas entre agosto y noviembre, ni en enero, ni febrero, mientras que, en diciembre se hallaron larvas de primer y segundo estadio. Estos resultados llaman un poco la atención, aunque como su autor relata pudieron ser debidos a un menor número de animales muestreados en ese periodo o a la dificultad para visualizar las L1 en animales con una baja carga parasitaria debido a su ínfimo tamaño. En el mes de marzo únicamente se detectaron L2 mientras que en los meses siguientes hasta julio se encontraron larvas de los 3 estadios, aunque predominaban las L3. Además, se observó que tanto en las áreas de montaña como en las de clima oceánico la prevalencia de infestación era mayor cuando las temperaturas mínimas eran más elevadas y las precipitaciones escasas.

1.7. Acción patógena y signos clínicos

C. stimulator puede causar problemas de salud en su hospedador. En primer lugar, la presencia de las moscas adultas volando alrededor de su hospedador para la larviposición genera a estos estrés y nerviosismo. Consecuencia de ello, corren descontroladamente, sacuden la cabeza, golpean las patas contra el suelo y aumenta su estado de alerta con el fin de librarse del díptero, de forma que disminuye la ingestión y el aprovechamiento del alimento ingerido. Esta circunstancia ha hecho que, en las zonas endémicas, los corzos eviten salir a áreas abiertas durante el mediodía, momento y zona, en el que las moscas desarrollan su mayor actividad (Calero-Bernal & Habela, 2013; Kornaś *et al.*, 2016; Pajares, 2016).

A parte del estrés, la presencia de las larvas en las vías aéreas superiores origina un cuadro de sinusitis con toses, estornudos, descarga nasal y dificultad respiratoria o para tragar el alimento. Las espinas y ganchos de *Cephenemyia* dificultan su expulsión por parte del hospedador. Estas no son hematófagas, sino que se alimentan de proteínas plasmáticas y anticuerpos de los líquidos que se originan como consecuencia del proceso inflamatorio originado por las lesiones de la mucosa debido a sus ganchos y espinas. Además de este daño mecánico, las larvas segregan proteasas liberando óxido nítrico que contribuye a irritar y erosionar la mucosa nasal y favorece

infecciones bacterianas secundarias. También se alimentan de mucina y colágeno de la membrana basal (McMahon, 1989; Angulo-Valadez *et al.*, 2010; Calero-Bernal & Habela, 2013; Pajares, 2016). En el examen histopatológico de los sacos retrofaríngeos se observa dilatación de estos, con erosión y deterioro de las células epidérmicas (McMahon, 1989).

El número de larvas es el que determinará la gravedad de la situación. La presencia de entre 30 y 80 larvas, pueden ser suficiente para ocasionar una alta mortalidad consecuencia de la inmunosupresión, debilidad, reducción de la condición corporal, inapetencia, letargo, pérdida de la capacidad reproductiva, presa más fácil para sus depredadores, etc., así como tener repercusiones para los cazadores ya que obtienen canales con reducido peso o trofeos de menor valor cinegético (Arias *et al.*, 2016; Kornás *et al.*, 2016; Pajares, 2016).

En determinadas ocasiones las larvas también pueden morir en el interior del hospedador sin llegar a completar su ciclo. Estas larvas se necrosan y se descomponen formándose un foco de inflamación alrededor que da lugar a un absceso que puede fistulizar hacia el exterior. En otras situaciones las larvas pueden realizar una migración errática causando cuadros y lesiones en la zona en la que se implanten, incluso provocar problemas neurológicos cuando migran y se establecen en el cerebro (Kornás *et al.*, 2016; Pajares, 2016).

2. Objetivos

Teniendo en cuenta la creciente detección de la infestación por *Cephenemyia* spp. en corzos, hemos planteado un estudio encaminado a conseguir los siguientes objetivos:

1. Determinar la prevalencia e intensidad de infestación por *Cephenemyia* en corzos del norte de España.
2. Identificación específica de las larvas de *Cephenemyia*.
3. Determinar la influencia de distintos factores como la edad, sexo y procedencia de los animales sobre la prevalencia e intensidad de la infestación.
4. Establecer la cronobiología de las distintas fases larvarias del parásito en el área de estudio.

3. Material y métodos

3.1. Animales muestreados

El estudio se llevó a cabo entre septiembre de 2019 y marzo de 2020, estudiándose un total de 37 cabezas de corzo que se habían obtenido entre los años 2018 y 2020 y que procedían de distintas zonas de Galicia y Cantabria. La mayoría de las cabezas fueron remitidas por el Servicio de Patrimonio Natural de la Xunta de Galicia y procedían de animales muertos de forma accidental (Tabla 2).

Las muestras fueron enviadas en bolsas de plástico numeradas y herméticas en las que se incluían la cabeza y el cuello del animal, junto con una ficha en la que se indicaban distintos datos referentes al mismo y que se reflejan en la Tabla 2. En el caso de los corzos abatidos en las cacerías se aportaba un documento para verificar la legalidad de la actividad realizada (datos del titular del coto de caza, así como del cazador y modalidad de caza) a parte de los datos incluidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Distribución de los animales en función de las distintas variables.

Factor	Categoría	Nº animales
Sexo	Macho	20
	Hembra	17
Edad	Adulto viejo	20
	Adulto joven	6
	Joven	6
Causa de la muerte	Accidental	28
	Natural	5
	Cacería	4
Área climática	Montaña	3
	Interior	27
	Costa	7
Provincia	Lugo	34
	Cantabria	3
Año	2018	11
	2019	21
	2020	5
Estación del año	Primavera	14
	Verano	8
	Otoño	5
	Invierno	10

Una vez en el laboratorio de Parasitología y Enfermedades parasitarias de la Facultad de Veterinaria, se mantuvieron en congelación (-20° C) hasta su posterior procesado.

La edad de los animales se determinó a través del método de erupción, remplazamiento y desgaste dentario, considerándose 3 grupos de edad: joven (< 2 años), adulto joven (2-5 años) y adulto (> 5 años). Solo se pudo calcular la edad de 32 corzos, en los 5 restantes no fue posible estudiar su dentadura por lo que únicamente se conocía si eran jóvenes o adultos.

Para el estudio del área climática de procedencia de los corzos se han considerado 3 zonas, basándonos en la altitud de la zona y su distancia del mar: Montaña (altitud >900 m), Costa (<40 km del mar) e Interior (altitud <900 m y >40 km del mar). Finalmente, al considerar la época del año, debido al escaso número de corzos en alguno de los meses, se han agrupado teniendo en cuenta la estación en la que se produjo su muerte (primavera, verano, otoño e invierno).

3.2. Recolección de las larvas

El instrumental necesario para la apertura de las cabezas, así como el material para conservar las larvas en caso de que estas fueran positivas, fue el siguiente (Ilustración 4):

- Guantes
- Mono de trabajo
- Gafas de protección
- Pinzas de distintos tamaños
- Pinzas con diente de ratón
- Mango de bisturí del número 4
- Hoja de bisturí del número 22
- Tijeras
- Tenazas
- Sierra de sable
- Placas Petri
- Regla
- Bolígrafo
- Papel
- Pipeta Pasteur
- Etanol al 70%
- PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Tubos de plástico de distintos volúmenes

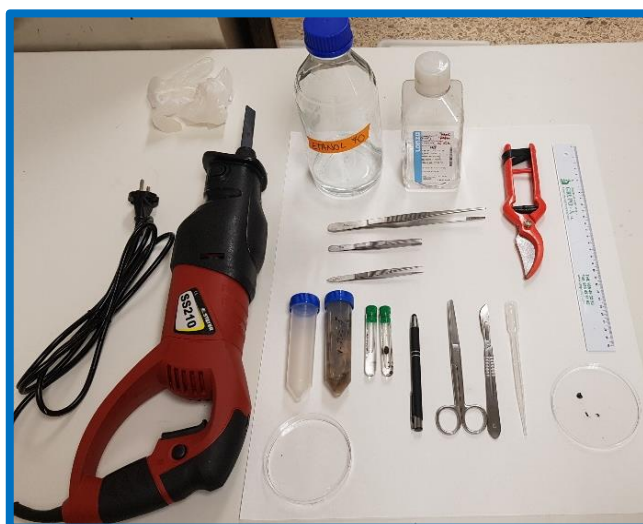


Ilustración 4. Instrumental necesario para la inspección, disección y conservación.

Las cabezas, se descongelaron a temperatura ambiente durante 12 horas, realizándose a continuación el siguiente protocolo:

1. **Inspección externa:** en primer lugar, se colocaba la cabeza del corzo/a sobre la mesa y se hacía una inspección externa a contrapelo en busca de lesiones y parásitos externos

que, en caso de existir, también eran recolectados y conservados en tubos de ensayo con etanol al 70%. En este examen externo, también se prestaba atención al desgaste de los dientes para poder establecer la edad estimada del animal (Ilustración 5). También se inspeccionaron los ollares con objeto de ver larvas que se encontraran entrando o saliendo del hospedador.



Ilustración 5. Clasificación de los corzos en base a su edad. (a) ejemplar joven en el que se aprecia la corona de los dientes con el esmalte blanquecino sin apenas desgaste; (b-c) ejemplares adultos en los que se observa una retracción de la encía mostrando el cuello y el inicio de la raíz del diente (b) y un gran desgaste de las piezas dentarias además de una coloración amarillenta (c).

- 2. Inspección interna:** una vez finalizada la inspección externa se colocaba la cabeza apoyada sobre las cuernas en el caso de los machos o sobre el hueso frontal en las hembras. Con el bisturí se efectuaba un corte de la piel a lo largo de la línea media de la cara ventral del cuello y la cabeza. Una vez localizada la tráquea, se abría con la tijera y se anotaba la presencia de larvas de *Cephenemyia* spp. u otros parásitos. A continuación, se procedía al corte de los cartílagos laríngeos con ayuda de las tenazas, y de esta forma

se accedía a la faringe y sacos retrofaríngeos. En caso de encontrar larvas en el individuo, estas se iban extrayendo una a una por medio de las pinzas hasta que los sacos se vaciaban y se depositaban sobre una placa Petri con PBS, para su limpieza.

Posteriormente, se retiraba la mandíbula inferior de la cabeza y se separaba la piel de la parte dorsal de la cabeza, quedando el hueso al descubierto. De esta forma, se sujetaba la cabeza en vertical, y se efectuaba un corte sagital con la sierra de sable a bajas revoluciones, para evitar la destrucción de las larvas en caso de su presencia. Así, se podía observar los cornetes nasales de ambos lados, una de las localizaciones más frecuentes de las larvas (Ilustración 6).

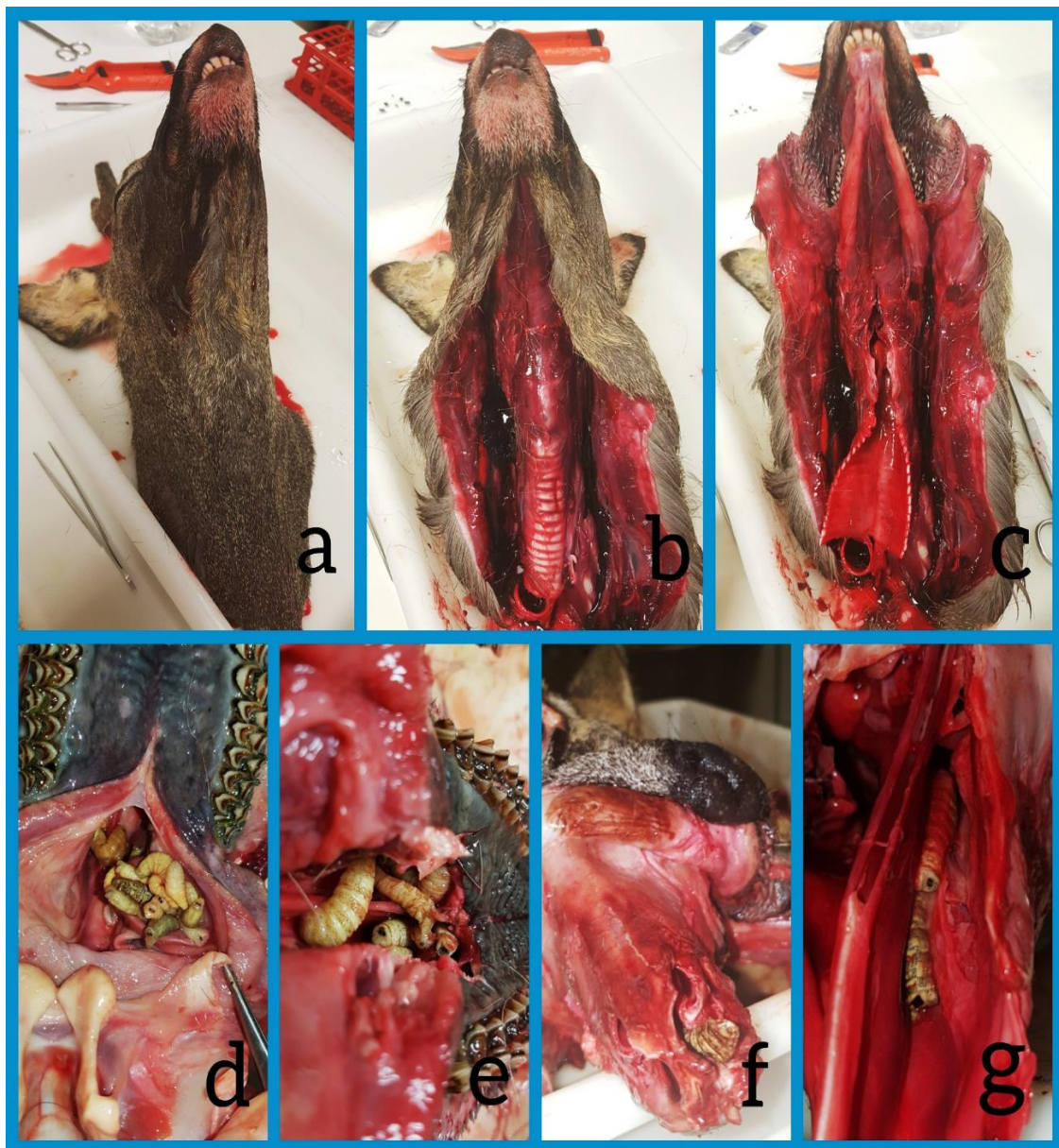


Ilustración 6. Proceso de disección de las cabezas. (a-c) colocación de la cabeza y apertura de piel y tráquea; (d-e) acceso a faringe, sacos retrofaríngeos e inicio de los cornetes nasales; (f) separación de la piel de la parte dorsal de la cabeza; (g) exploración de los cornetes nasales.

3. **Conservación de las larvas:** tras recolectar todas las larvas de un animal y anotar su procedencia anatómica, se lavaron en PBS, se midieron y se almacenaron en tubos con etanol al 70% hasta su posterior estudio. Todos los tubos eran numerados con el código del corzo al que pertenecían. Aquellas larvas que se encontraban muy degeneradas, fragmentadas o putrefactas se contabilizaron y midieron, pero se prescindió de ellas en el estudio morfológico (Ilustraciones 7 y 8).



Ilustración 7. Diferentes estadios larvarios (L1, L2 y L3) de *Cephenemyia* spp. en solución de PBS tras su extracción.



Ilustración 8. Medición de una larva de *Cephenemyia* spp. (L3: 27 mm).

4. **Identificación y clasificación de las larvas:** Una vez procesadas todas las cabezas, se procedió al estudio de las larvas recogidas. En primer lugar, se clasificaron en función de su estado de desarrollo en larvas 1, 2 ó 3, teniendo en cuenta los siguientes parámetros:
- Longitud total.
 - Color de la cutícula.
 - Grado de desarrollo de las placas respiratorias (forma y color).

Para ello, se volvió a realizar otra medición de las larvas para comprobar si estas se habían retraído por efecto del medio de conservación (solución de etanol al 70%).

Una vez clasificadas las larvas, se procedió a su identificación siguiendo las claves morfológicas de Zumpt (1965) que tiene en cuenta los siguientes parámetros:

- Forma de las placas respiratorias.
- Patrón de distribución de las espinas cuticulares.
- Forma y disposición de los segmentos antenales.
- Tamaño de los ganchos bucales.

3.3. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos en este estudio se procesaron con ayuda de la hoja de cálculo Microsoft Excel 2016 y su análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico R versión 3.6.3.

En el apartado de estadística descriptiva se empleó la media aritmética como indicador de tendencia y la desviación estándar (DE) como medida de dispersión.

Para estudiar las posibles diferencias existentes respecto a la prevalencia de infestación al considerar los distintos factores intrínsecos y extrínsecos estudiados se empleó la prueba exacta de Fisher que, además, extrae los odds ratio (OR) que nos permiten cuantificar la asociación entre factores de riesgo. Respecto a la intensidad de infestación se empleó un ANOVA. Se consideraron significativos valores de $p < 0,05$.

4. Resultados y discusión

4.1. Identificación de los parásitos hallados

En la inspección de las cabezas y de las tráqueas, además de *Cephenemyia* spp. también se detectaron otros parásitos (Ilustración 9), como garrapatas Ixodidae en 26 animales (70,3%) con una intensidad media de $13 \pm 9,92$ garrapatas/cabeza, *Dictyocaulus* spp. en la tráquea de 4 corzos (10,8%) y piojos malófagos en 4 animales (10,8%).



Ilustración 9. Otros parásitos encontrados en las cabezas de los corzos. a) *Dictyocaulus* spp.; b) Garrapata Ixodidae; c) Piojos malófagos.

Para determinar la especie de *Cephenemyia* se hizo una inspección ocular de las larvas determinando el grado de coloración de la cutícula. Posteriormente, se realizó un estudio más detallado en una lupa Leica EZ4 D a 40 aumentos (Ilustraciones 10 y 11), lo que nos permitió observar con detalle distintas estructuras como las placas respiratorias.

Todas las larvas extraídas eran de *Cephenemyia stimulator* y pertenecían a distintos estadios larvarios. Estos resultados coinciden con los de diferentes autores (Dudzinski, 1970; Minár, 2000; Fidalgo *et al.*, 2013; Salaba *et al.*, 2013; Kornaś *et al.*, 2016; Pajares, 2016; Pajares *et al.*, 2017) quienes ya habían señalado que *C. stimulator* es específica del corzo.

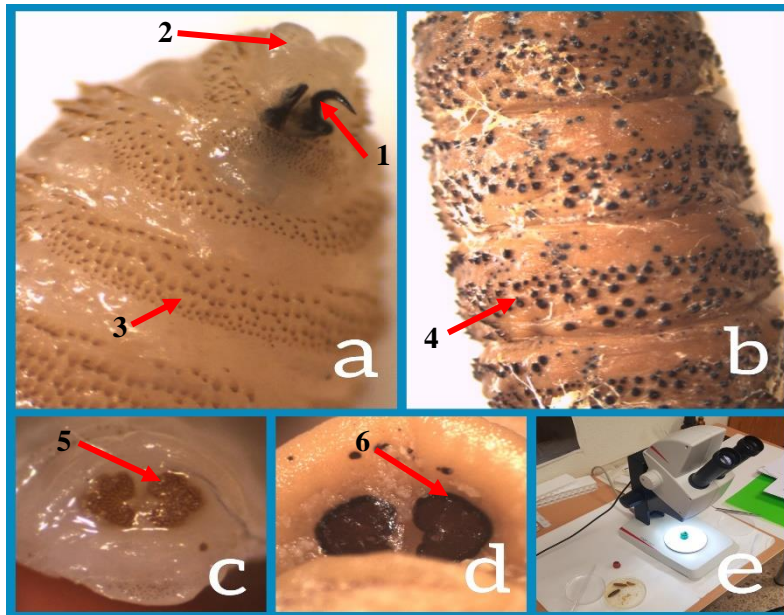


Ilustración 10. Observación de las larvas de *C. stimulator*. (a) ganchos bucales (1), lóbulos antenales (2) y espinas cuticulares en L2 (3); (b) espinas cuticulares negruzcas en L3 (4); (c) placas respiratorias L1 (5); (d) placas respiratorias L3 (6); (e) observación de las distintas estructuras en la lupa binocular.



Ilustración 11. L2 de *C. stimulator* a la lupa.

4.2. Prevalencia e intensidad de parasitación por larvas de *C. stimulator*

De los 37 corzos analizados en este estudio, 16 presentaban larvas en su cavidad nasofaríngea, es decir, la prevalencia de infestación fue del 43,2%. Se obtuvieron un total de 271 larvas, siendo la intensidad media de $16,9 \pm 22,47$ larvas/cabeza (rango 1-95).

Tradicionalmente los oéstridos se caracterizan por producir miasis con una gran especificidad por su hospedador. No obstante, de acuerdo con Price (1980) la especificidad de la Familia Oestridae está muy condicionada por la disponibilidad de hospedadores adecuados. Así, recientemente Panadero *et al.* (2017, 2020) comprobaron que los cambios en la distribución de

las poblaciones de ciervo en zonas del centro peninsular habían propiciado el salto y expansión de la miasis producida por *Hypoderma actaeon*, especie considerada específica del ciervo (*Cervus elaphus*), al corzo. Este fenómeno podría también suceder en los oestrinae, así Sugár (1974) en un estudio llevado a cabo en Hungría describió la presencia de *C. auribarbis* y *P. picta* en corzos. Por otro lado, en ese mismo país, Király & Egri (2004) determinaron la existencia de *C. stimulator* en un ciervo rojo. Más reciente, Nilssen *et al.* (2008) en Finlandia, detectaron un corzo parasitado con 50 larvas de *Cephenemyia* spp. que pertenecían a la especie *C. ulrichii* en vez de *C. stimulator*, siendo este el primer caso de infestación por *C. ulrichii* en corzos. Por otra parte, en el sur de España también se han visto infestaciones mixtas por *C. auribarbis* y *P. picta* en ciervos (Ruíz-Martínez & Palomares, 1993; Bueno-de La Fuente *et al.*, 1998).

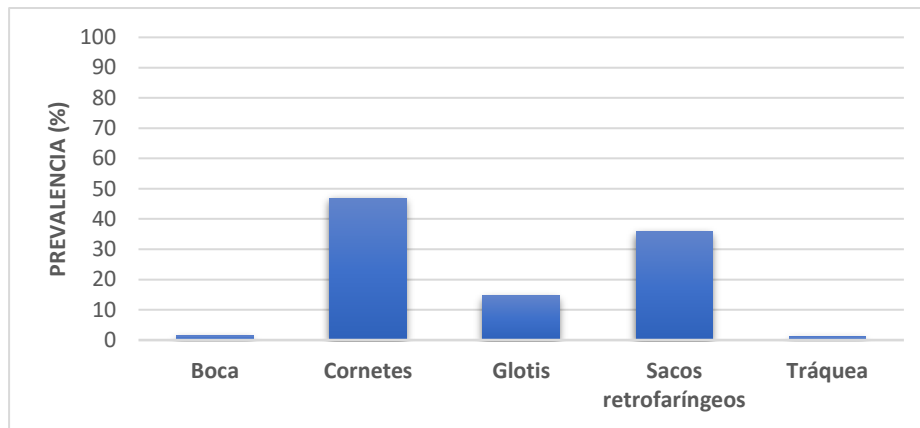
La presencia de *C. stimulator* como única especie que parasita al corzo en el norte de España, parece indicar que las poblaciones de cérvidos se mantienen bastante estables en estas zonas; no obstante, es necesario mantenerse alerta ya que, cualquier cambio que propiciase un mayor contacto entre las poblaciones de corzos y ciervos podría provocar la aparición de miasis nasofaríngeas provocadas por otras especies de la Subfamilia Oestrinae.

En nuestro estudio, la prevalencia total de corzos infestados (43,2%) fue ligeramente inferior a la detectada (57%) por Arias *et al.* (2012) en un estudio previo llevado a cabo en corzos de la provincia de Lugo, aunque es superior a la hallada por Arias *et al.* (2014) y Pajares (2016) en corzos del norte de España (25% y un 31,6%, respectivamente) y a la señalada (16,5%) por Fidalgo *et al.* (2013) en corzos de distintas zonas de España.

Con excepción del estudio llevado a cabo por Dudzinski (1970) en Polonia (85%), la prevalencia por *C. stimulator* detectada en otros países europeos fueron inferiores a la obtenida por nosotros, ya que estas prevalencias fueron del 13% en Polonia (Kornás *et al.*, 2016), del 28,8% en la República Checa (Salaba *et al.* 2013) y del 35,2 y 34,6% en Hungría (Király & Egri, 2004, 2007) y posteriormente, en este último país del 25,4 y 22,9%; (Pinnyey *et al.*, 2017).

En relación con la intensidad de parasitación, el rango de larvas/cabeza (1-95) hallado en nuestro estudio, en general, fue superior al señalado (1-11) por otros autores (Király & Egri, 2007; Arias *et al.*, 2012; Salaba *et al.*, 2013; Kornás *et al.*, 2016; Pinnyey *et al.*, 2017). Además, en corzos abatidos en el Norte de España, Arias *et al.* (2014) y Pajares (2016) obtuvieron también un menor rango de infestación (2-75 larvas/cabeza), aunque la intensidad media de infestación señalada por estos autores (19,67±21) fue similar a la obtenida en el presente estudio (16,9±22,47).

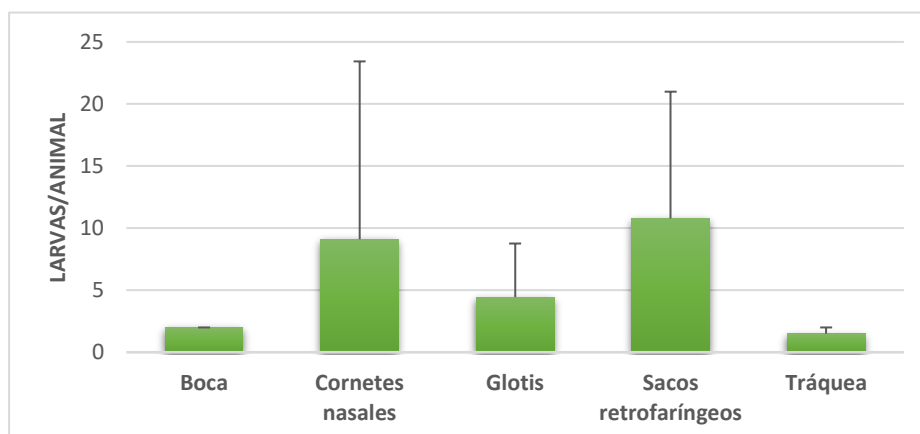
Al considerar la localización de las larvas de *C. stimulator* (Gráfica 1) se observó que la mayoría se encontraban en los cornetes nasales (46,9%) y en los sacos retrofaríngeos (35,8%) y, en menor proporción, en la glotis (14,7%), la boca (1,5%) y la tráquea (1,1%).



Gráfica 1. Prevalencia de *C. stimulator* al tener en cuenta la localización de las larvas en su hospedador.

La presencia mayoritaria en los cornetes era algo previsible ya que es la vía de entrada y salida de las larvas, por lo que en esta localización se pueden encontrar L1 y L2 que se dirigen hacia la glotis y los sacos retrofaríngeos y L3 ya maduras que salen hacia el exterior para pupar. Asimismo, diversos autores (Zumpt, 1965; Calero-Bernal & Habela, 2013; Pajares, 2016; Pajares *et al.*, 2017) señalaron que la localización preferente de las L1 y de algunas L2 son los cornetes y senos paranasales, mientras que, las L3 y el resto de L2 se localizan preferentemente en la faringe y los sacos retrofaríngeos. En nuestro estudio, la localización de un pequeño número de larvas tanto en la boca como en la tráquea podría deberse a una migración errática *postmortem*.

Asimismo, las cifras medias de larvas (Gráfica 2), fueron superiores en los sacos retrofaríngeos ($10,8 \pm 10,21$) y en los cornetes nasales ($9,1 \pm 14,78$) y se detectó menor número de larvas en la glotis ($4,4 \pm 4,32$), boca (2 ± 0) y tráquea ($1,5 \pm 0,5$).



Gráfica 2. Intensidad media de parasitación por *C. stimulator* al considerar la localización de las larvas.

El hecho de que se obtuviera menor intensidad de parasitación en los cornetes que en los sacos, puede deberse a que, en algunos corzos, únicamente hallamos una larva putrefacta en los

cornetes, posiblemente proveniente de un ciclo anterior, por lo que la intensidad larvaria real en ambas localizaciones sería similar.

4.3. Prevalencia e intensidad al tener en cuenta los distintos factores de riesgo

En la Tabla 3 se muestran los valores de prevalencia e intensidad de parasitación teniendo en cuenta los distintos factores considerados en el estudio y les hemos agrupado en intrínsecos o dependientes del hospedador (edad, sexo y causa de la muerte) y extrínsecos o dependientes del medio (área climática, provincia, año y estación de la muerte).

Tabla 3. Prevalencia e intensidad de parasitación por *C. stimulator* en función de los distintos factores incluidos en el estudio.

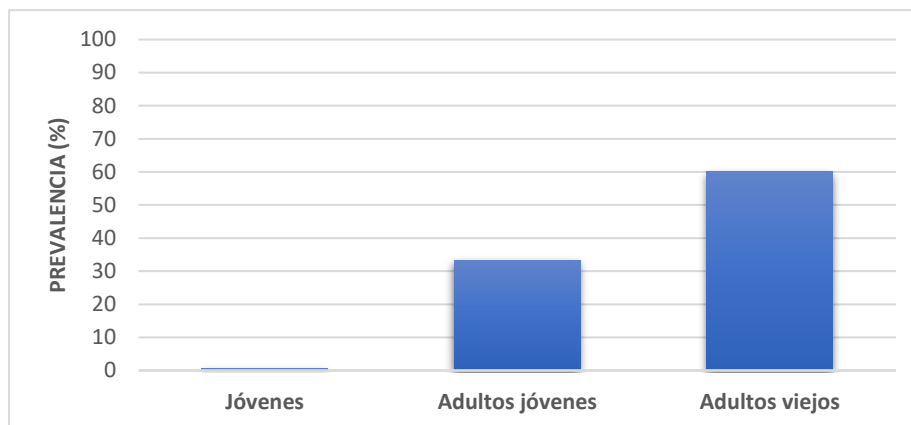
Factor	Categoría	Prevalencia (%)	Intensidad (media±DE)
Sexo	Macho	60	21,1±24,45
	Hembra	23,5	4,5±4,50
Edad	Adulto viejo	60	15,8±24,76
	Adulto joven	33,3	20,5±14,5
	Joven	0	0
Causa de la muerte	Accidental	50	12,5±10,20
	Natural	20	95±0
	Cacería	25	1±0
Área climática	Montaña	33,3	6±0
	Interior	48,2	20±23,88
	Costa	28,6	2,5±1,50
Provincia	Lugo	44,1	18±22,82
	Cantabria	33,3	1±0
Año	2018	27,3	18±9,42
	2019	52,4	19,6±25,63
	2020	40	1±0
Estación del año	Primavera	64,3	24,2±27,06
	Verano	50	12,5±6,54
	Otoño	0	0
	Invierno	30	1±0

4.3.1. Prevalencia e intensidad al tener en cuenta los factores dependientes del hospedador

4.3.1.1. EDAD

Para el cálculo de la prevalencia y la intensidad de infestación en función de la edad dispusimos de 32 ejemplares, ya que 5 de ellos no se pudieron clasificar según la condición de las piezas dentarias.

Como se refleja en la Gráfica 3, en los animales menores de 2 años no se hallaron larvas de *C. stimulator* (0%), mientras que, en los adultos jóvenes se detectó menor prevalencia (33,3%) que en los viejos (60%). No obstante, mediante la prueba de Fisher se comprobó que no existían diferencias significativas entre los 3 grupos de edad ($p = 0,064$).

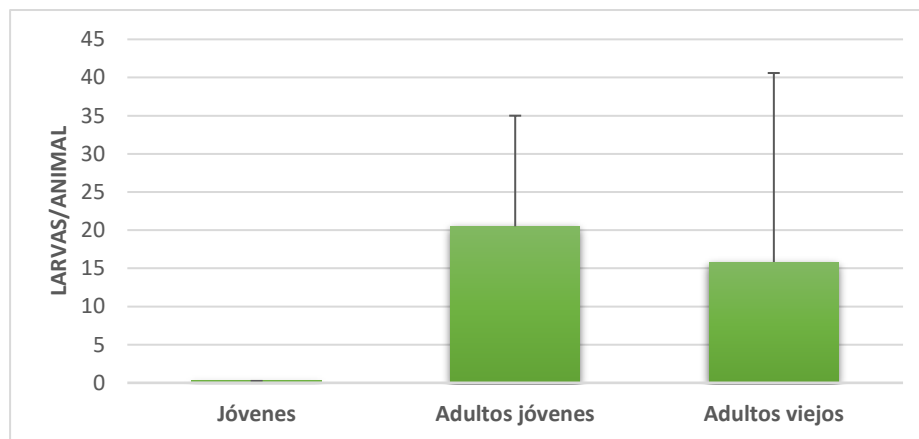


Gráfica 3. Prevalencia de *C. stimulator* al considerar la edad.

No obstante, al dividir a los animales en dos grupos de edad, la prevalencia (55,5%) fue superior en los adultos mayores de 2 años que en los jóvenes (0%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,002$). El valor del odds ratio fue de 11,771, lo que significa que los corzos adultos tienen casi 12 veces más riesgo de padecer una miasis por *C. stimulator* que los jóvenes. Estos resultados coinciden con los hallados por Kornaś *et al.* (2016) quienes solo observaron infestaciones por este parásito en corzos con edades comprendidas entre 3 y 8 años. Asimismo, nuestros resultados son similares a los hallados por Pajares (2016) quien observó una prevalencia netamente superior en los adultos (62%) que en los jóvenes (23%). Además, Pinnyey *et al.* (2017) en Hungría, también detectaron prevalencias ligeramente superiores en corzos mayores de 6 años que en los que tenían 4 ó 5 años, aunque estas diferencias no fueron significativas.

El incremento de la prevalencia de infestación por *C. stimulator* con la edad de los animales podría deberse a que los corcinos que nacen entre los meses de abril – mayo pasan gran parte del día ocultos entre la vegetación y así evitan estar expuestos a la larviposición de las moscas que se da entre los meses de abril a septiembre. Sin embargo, Dudzinski (1970) en Polonia y Király & Egri (2007) en Hungría señalaron mayor prevalencia en los animales jóvenes, atribuyendo este hecho a una menor respuesta inmune o a su menor capacidad defensiva frente al vuelo de las moscas.

Respecto a la intensidad media de parasitación (Gráfica 4) fue superior en los adultos jóvenes ($20,5 \pm 14,5$) que, en los viejos ($15,8 \pm 24,76$), aunque con ANOVA estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$).



Gráfica 4. Intensidad media de parasitación por *C. stimulator* al tener en cuenta la edad de los corzos.

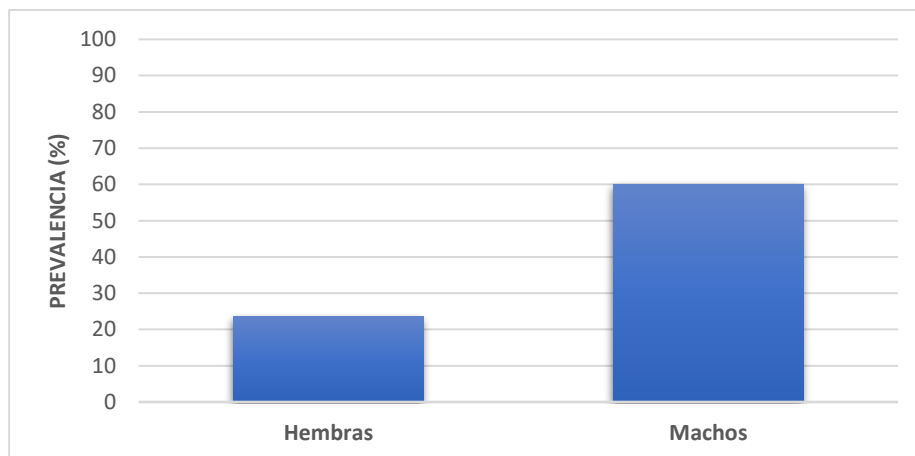
Estos resultados podrían deberse a que, en otros oéstridos, como *Hypoderma* spp., Panadero *et al.* (2009) comprobaron que hay una respuesta parcialmente protectora que ocasiona que en las reinfestaciones haya menor número de larvas, por lo que los animales jóvenes primoinfestados presentan intensidades de infestación superiores a los de más edad.

Sin embargo, Pajares (2016) obtuvo mayor intensidad de infestación por *C. stimulator* en corzos menores de 2 años ($23,33 \pm 23,71$) que en los adultos ($14,61 \pm 15,90$), aunque estas diferencias no fueron significativas. Asimismo, Király & Egri (2007) y Pinyey *et al.* (2017), en corzos de Hungría, obtuvieron valores significativamente superiores en los jóvenes que en los adultos.

En ciervos del sur de España, Ruíz-Martínez & Palomares (1993) encontraron una prevalencia e intensidad de parasitación por *Cephenemyia auribarbis* y *Pharyngomyia picta* significativamente más elevada en cervatillos y en adultos mayores de 5 años. Posteriormente, en la misma zona de estudio Bueno-de La Fuente *et al.* (1998) en la misma zona comprobaron que los ciervos adultos estaban parasitados más frecuentemente que los jóvenes.

4.3.1.2. SEXO

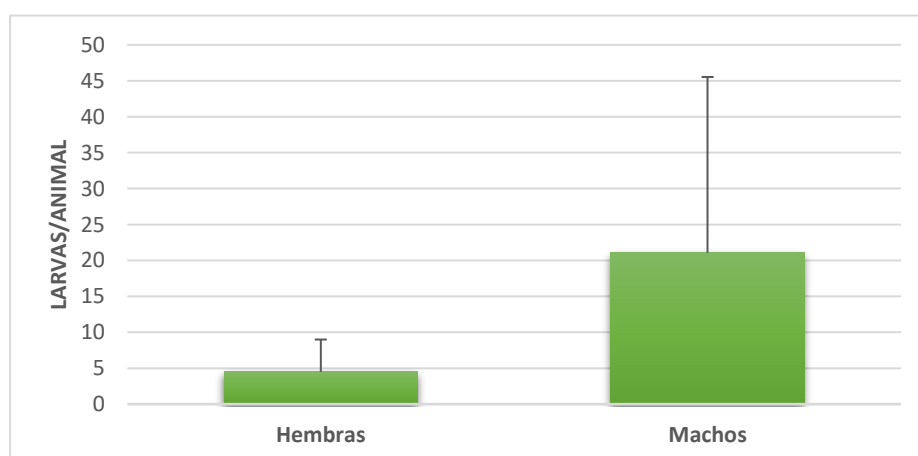
Al considerar el sexo de los animales se observó (Gráfica 5) que la prevalencia fue netamente superior en los machos (60%) que en las hembras (23,5%). Con el test de Fisher se constató que el sexo influye en la prevalencia de infestación por *C. stimulator* en corzos ($p = 0,045$); asimismo, se cotejó que el valor de OR era de 4,65, lo que nos indica que los machos tienen más riesgo de infestarse que las hembras.



Gráfica 5: Prevalencia de *C. stimulator* al tener en cuenta el sexo.

Estos resultados coinciden con los de otros autores (Dudzinski, 1970; Kornaś *et al.*, 2016; Pajares, 2016; Pajares *et al.*, 2017) quienes también señalaron una mayor prevalencia de infestación en los machos. Esto puede ser debido a que, aunque son animales fieles a la zona que habitan, el territorio ocupado por los machos es mayor que el que ocupan las hembras, lo que provoca competencias territoriales entre muchos ejemplares. Esto hace que muchos machos no tengan su territorio propio y deambulen abandonando los bosques en busca de otros lugares donde asentarse exponiéndose más a zonas abiertas y alimentándose en lugares donde el alimento escasea o es de peor calidad, decayendo así su sistema inmunitario (Fidalgo *et al.*, 2009; Pajares, 2016).

Con relación a la intensidad media de parasitación (Gráfica 6), al igual que la prevalencia, esta fue superior en los machos ($21,1 \pm 24,45$) que en las hembras ($4,5 \pm 4,5$). No obstante, debido al escaso número de hembras positivas (4), las diferencias no resultaron significativas ($p > 0,05$).



Gráfica 6. Intensidad media de parasitación por *C. stimulator* al tener en cuenta el sexo.

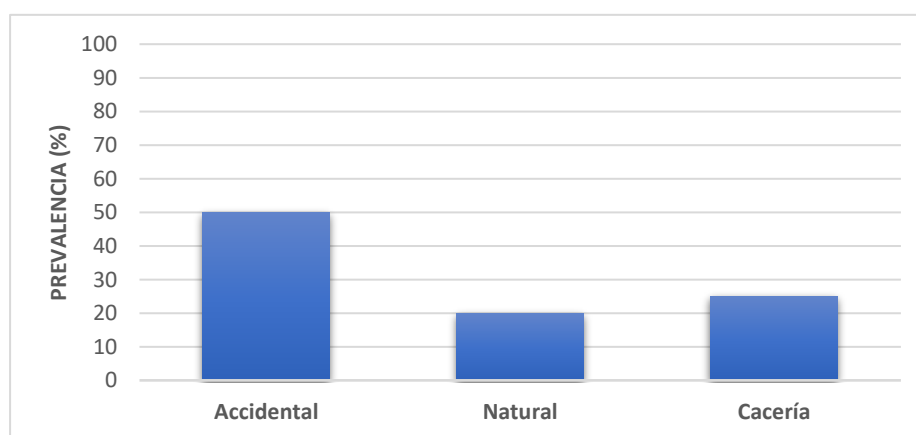
Estos resultados coinciden con los obtenidos por Király & Egri (2007) quienes también encontraron intensidades de infestación superiores en los machos. Por el contrario, Pajares (2016) observó mayor intensidad de infestación en hembras, aunque estas diferencias no fueron significativas.

Al igual que ocurría con la prevalencia, el hecho de que los machos presentasen mayores intensidades de parasitación podría estar motivado por una mayor exposición, ya que al tratar de vigilar sus territorios se exponen a ser infestados por un número mayor de moscas. Del mismo modo, el mayor gasto de energía de los machos durante la época de apareamiento (julio – agosto) hace que decaiga su respuesta inmunitaria disminuyendo la eficacia de sus mecanismos de defensa frente a las moscas suponiendo un aumento de su carga parasitaria. Además, el desarrollo de las astas también conlleva altos requerimientos energéticos que disminuyen la resistencia del animal (Pinnyey *et al.*, 2017).

Por su parte, Bueno-de La Fuente *et al.* (1998) en su estudio sobre *P. picta* y *C. auribarbis* en ciervos del sur de España también observaron prevalencias e intensidades de infestación superiores en los machos que en las hembras, mientras que Ruíz-Martínez & Palomares (1993) no encontraron diferencias significativas entre ambos sexos.

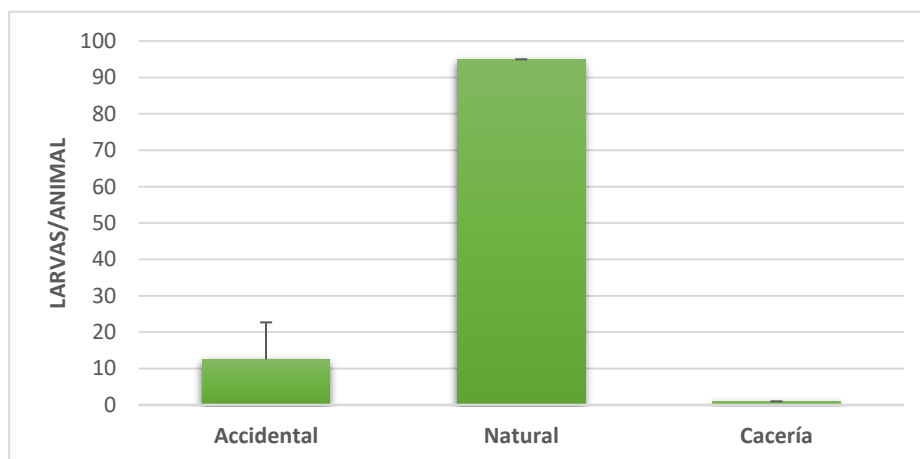
4.3.1.3. CAUSA DE LA MUERTE

Al tener en cuenta la causa de la muerte de los corzos, se observa que la gran mayoría de los casos fue debida a causas accidentales como atropellos, electrocución o despeñamientos; siendo la prevalencia (Gráfica 7) en estos superior (50%) a la hallada en los animales abatidos en cacerías (25%) o muertos por causas naturales (20%). No obstante, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$); pensamos que esta falta de significación podría deberse al escaso número de casos en alguna de las categorías (Tabla 2).



Gráfica 7. Intensidad media de parasitación por *C. stimulator* al tener en cuenta la causa de la muerte.

Por el contrario, la intensidad de parasitación (Gráfica 8) fue más elevada en los corzos muertos de forma natural (95 ± 0) que en los fallecidos de forma accidental ($12,50 \pm 10,20$) y que en los abatidos en cacerías (1 ± 0) y estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$), ya que como en el caso de la prevalencia hubo un escaso número de muestras positivas al considerar la causa de la muerte.



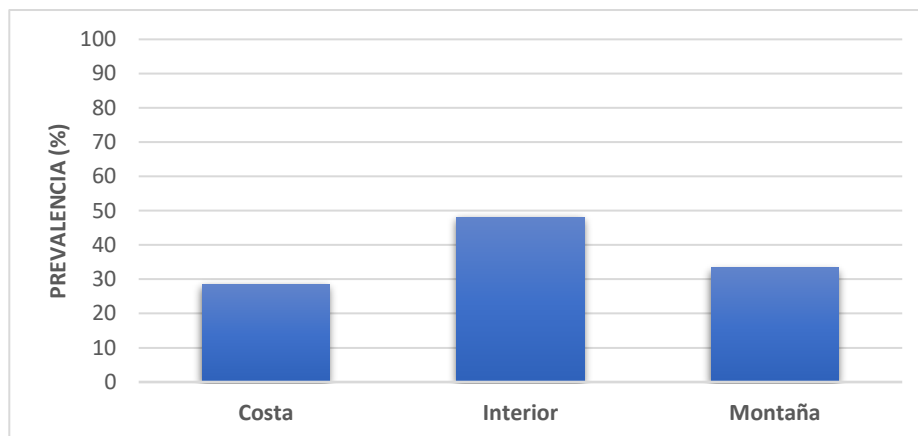
Gráfica 8. Intensidad media de parasitación por *C. stimulator* al considerar la causa de la muerte.

Cabe destacar que, de los 5 corzos fallecidos por causa natural, 4 de ellos eran corcinos de pocas semanas de edad y no albergaban larvas de este parásito. Sin embargo, llama la atención que el único corzo adulto muerto por enfermedad fue el más parasitado de todos los animales muestreados con un número de larvas muy por encima de la media (95 larvas); este hecho coincide con lo mencionado por Arias *et al.* (2016) quienes señalaron que cuando los corzos albergan entre 30-80 larvas puede causar una alta mortalidad. Asimismo, coincide, con lo indicado por otros autores (Arias *et al.*, 2012; Calero-Bernal & Habela, 2013; Kornás *et al.*, 2016; Pajares, 2016) quienes comprobaron que cuando la intensidad de infestación es elevada, las larvas causan graves problemas respiratorios e incluso una neumonía por aspiración, por lo que, posiblemente, este corzo de no haber muerto por causas naturales habría sido presa fácil para sus depredadores.

4.3.2. Prevalencia e intensidad al tener en cuenta los factores dependientes del medio

4.3.2.1. ZONA CLIMÁTICA DE PROCEDENCIA

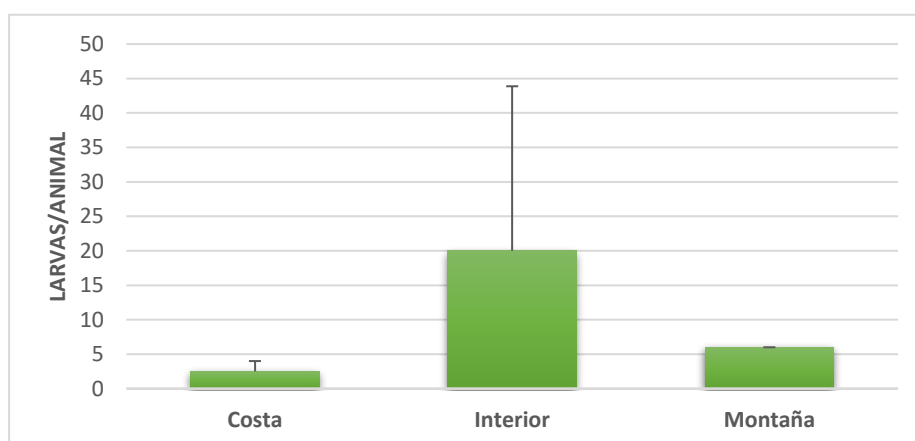
En la Gráfica 9 se observa que hubo una mayor prevalencia de la infestación en las zonas de interior (48,2%) y esta fue ligeramente inferior en las áreas montañosas (33,3%) y las costeras (28,6%). Con la prueba exacta de Fisher se constató que estas diferencias no eran significativas ($p > 0,05$) y, por tanto, en las condiciones de este estudio, el clima no influye en la aparición de esta miasis.



Gráfica 9. Prevalencia de *C. stimulator* en las distintas zonas climáticas.

Estos resultados coinciden con los de Pajares (2016) y Pajares *et al.* (2017) quienes hallaron prevalencias algo superiores en los corzos procedentes del área de montaña (39%) que en los de clima oceánico (30%), aunque también, en su caso, estas diferencias también carecían de significación estadística.

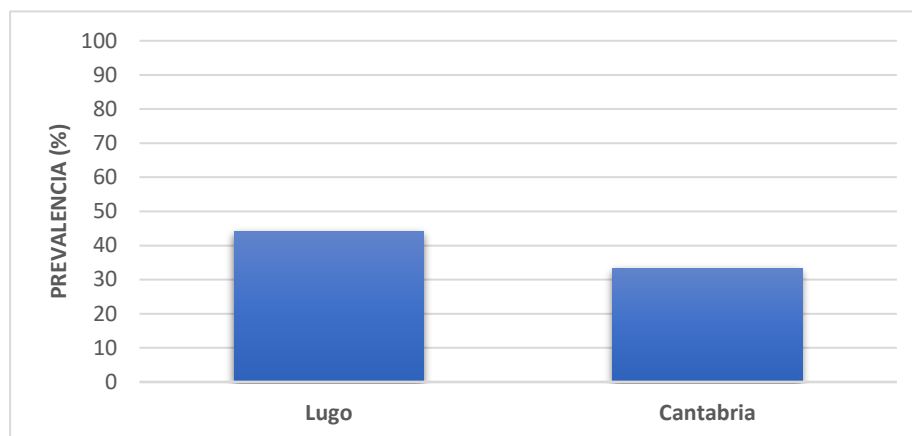
En cuanto a la intensidad media de parasitación (Gráfica 10), al igual que ocurría con la prevalencia, esta es más elevada en las zonas de interior ($20 \pm 23,88$) siendo mucho menor en las áreas de montaña y de costa (6 ± 0 y $2,5 \pm 1,5$, respectivamente). No obstante, hay que tener en cuenta que el número de ejemplares examinados fue bastante superior en las áreas de interior. Sin embargo, Arias *et al.* (2012) en corzos hallados en la Reserva Nacional de los Ancares, una zona de clima de montaña, describieron una intensidad media de 67 larvas por animal. Por otro lado, Pajares (2016) relató una intensidad media de infestación significativamente superior en las zonas de montaña en relación a las de clima oceánico.



Gráfica 10. Intensidad media de parasitación por *C. stimulator* en las distintas zonas climáticas.

4.3.2.2. PROVINCIA

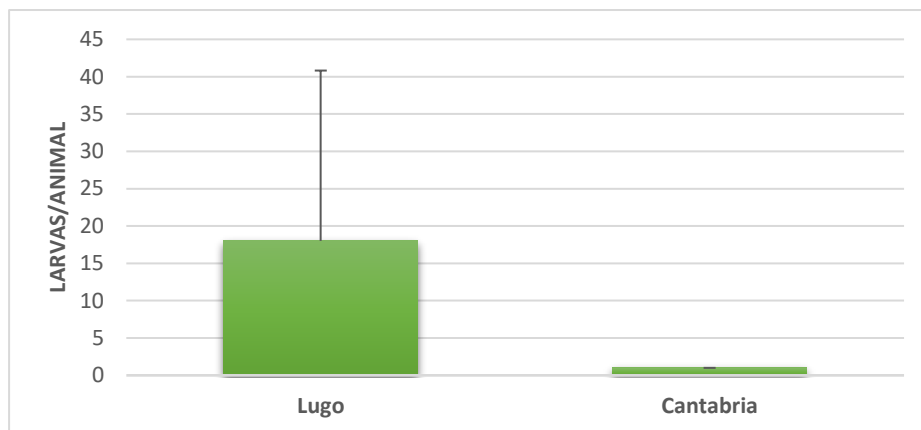
La prevalencia de infestación en los corzos procedentes de la provincia de Lugo (44,1%) fue ligeramente superior a la hallada en los de Cantabria (33,3%) (Gráfica 11) y debido al escaso número de animales procedentes de Cantabria (Tabla 2) no permitió el estudio estadístico de los datos.



Gráfica 11. Prevalencia de *C. stimulator* al considerar las provincias.

Estos resultados son algo superiores a los obtenidos por Fidalgo *et al.* (2013) quienes en un estudio llevado a cabo en casi todo el territorio español entre 2012 y 2013 hallaron una prevalencia del 16,5%. Sin embargo, si se tenían en cuenta únicamente los corzos de las provincias de Asturias, Lugo y León la prevalencia aumentaba hasta un 22%, dejando entrever que la positividad era mayor en el noroeste de la península ibérica. Asimismo, Pajares (2016) reseñó una prevalencia del 31,6% en corzos obtenidos en las provincias de Lugo y Asturias. Por otra parte, Arias *et al.* (2012) describieron prevalencias del 57% en corzos muestreados en Lugo en el año 2012. En cuanto a Cantabria no hay datos de otros estudios en esta provincia con los que poder comparar aunque los resultados sirven para concienciar de que este parásito se encuentra también presente en esta provincia y que el norte de España es la región peninsular donde mayor es la presencia de la infestación por *C. stimulator*.

Teniendo en cuenta la intensidad larvaria se puede observar una gran diferencia entre ambas provincias (Gráfica 12), aunque dicha desigualdad puede ser fruto de que el número de cabezas muestreadas en Lugo es muy superior al de Cantabria ($18 \pm 22,82$ y 1 ± 0 , respectivamente).

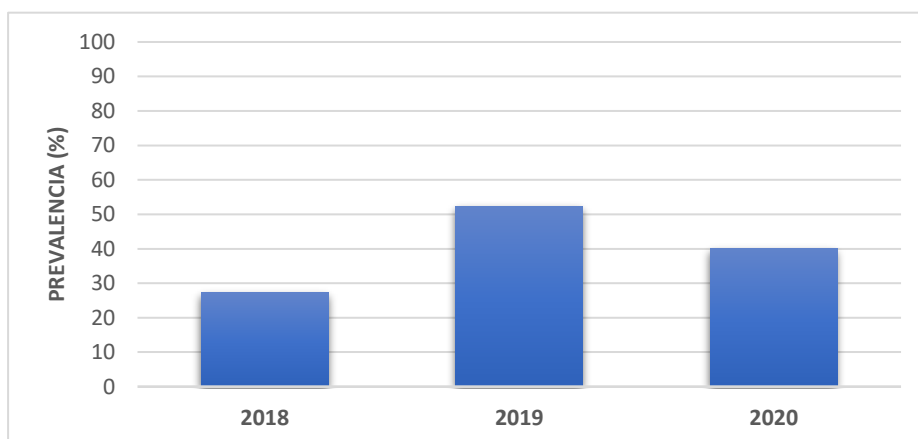


Gráfica 12. Intensidad media de parasitación por *C. stimulator* en cada provincia.

Los resultados obtenidos en la provincia de Lugo son muy similares a los obtenidos por Pajares (2016) en Lugo y Asturias ($19,67 \pm 21$) entre 2012 y 2014.

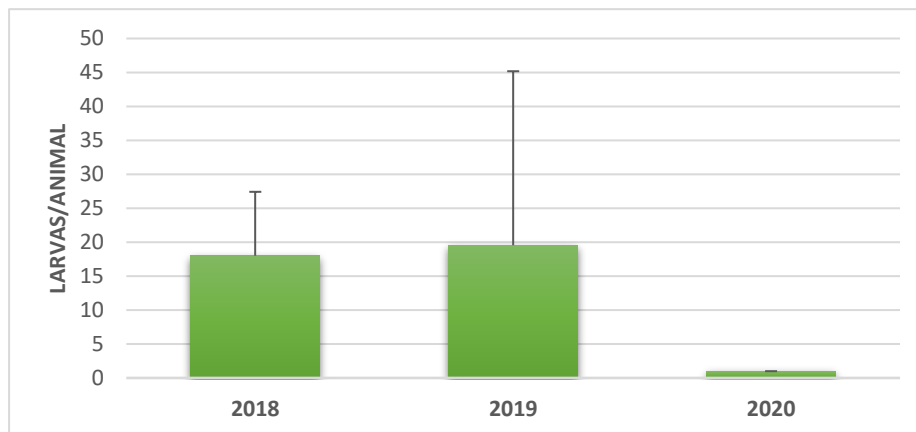
4.3.2.3. AÑO

Teniendo en cuenta los tres años en los que se llevó a cabo el muestreo, se observa que entre 2018 y 2019 existe una tendencia creciente de la infestación (Gráfica 13). Sin embargo, la prueba exacta de Fisher no mostró diferencias significativas entre los distintos años ($p > 0,05$). Sería conveniente continuar con el muestreo en 2020 para comprobar si esa tendencia ascendente es algo puntual del año 2019 o se prolonga durante el tiempo puesto que si la prevalencia sigue incrementándose, estaríamos ante un importante problema sanitario para las poblaciones de corzos del norte de España, por las repercusiones negativas de esta miasis en la salud de los corzos y por las dificultades para controlar el parásito (Calero-Bernal & Habela, 2013; Pajares, 2016).



Gráfica 13. Prevalencia de *C. stimulator* según el año de estudio.

En cuanto a la intensidad media de infestación (Gráfica 14) fue muy similar entre los años 2018 y 2019 ($18 \pm 9,42$ y $19,6 \pm 25,63$, respectivamente), pero muy superior a la obtenida en el año 2020 (1 ± 0). No obstante, hay que tener en cuenta que solo se dispuso de un animal positivo en el año 2020, por lo que no se ha podido aplicar un tratamiento estadístico a los datos.

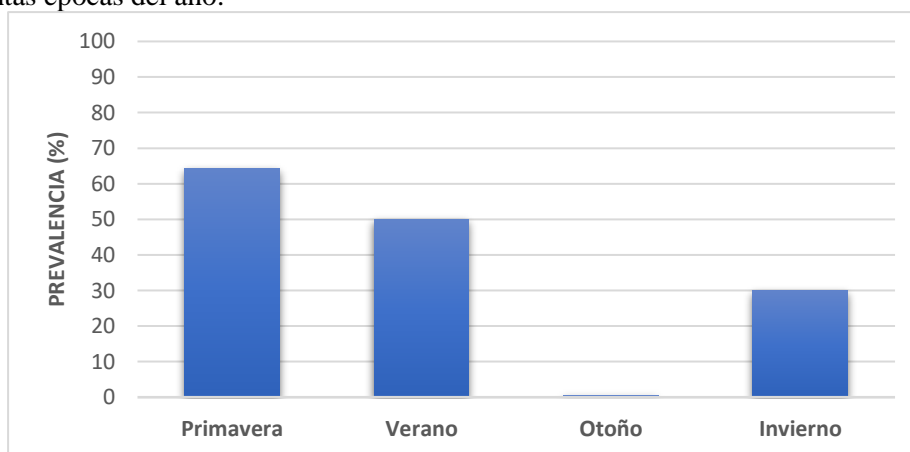


Gráfica 14. Intensidad media de parasitación por *C. stimulator* según el año.

Estos resultados son similares a los hallados por Király & Egri (2007) quienes también hallaron intensidades medias de infestación similares entre años consecutivos (9,8% en 2002 y 8,8% en 2003); asimismo, Pinney *et al.* (2017) obtuvieron prevalencias similares en los años 2014 y 2015 (9,1 y 8,5, respectivamente). Sin embargo, Pajares (2016) halló una intensidad media muy superior en el año 2012 ($26,75 \pm 27,93$) con respecto a 2013 ($13 \pm 10,68$) y 2014 ($18,75 \pm 18,15$).

4.3.2.4. ÉPOCA DEL AÑO

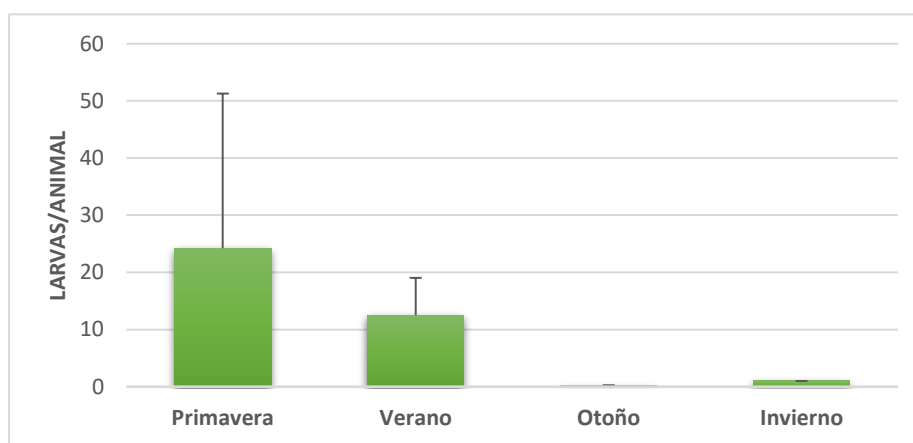
En la gráfica 15 se muestra la distribución de la prevalencia al tener en cuenta la época de captura o muerte del animal y se observa que esta fue mayor durante la primavera (64,3%) que, en verano (50%) e invierno (30%), siendo nula en los meses de otoño. La prueba exacta de Fisher señaló que no existían diferencias significativas ($p = 0,068$) en la prevalencia obtenida en las distintas épocas del año.



Gráfica 15. Evolución de la prevalencia por *C. stimulator* en función de la estación del año.

Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por Pajares (2016) estos son bastante similares, ya que en su estudio tampoco se observaron larvas durante los meses de otoño estando estas presentes en mayor medida durante los meses de marzo a julio. Este autor atribuyó la ausencia de larvas durante los meses de agosto a noviembre a un menor número de muestras analizado, al igual que en el presente estudio. No obstante, se debe señalar que, en otoño, en el caso de estar infestados, la mayoría de las larvas serían de primer estadio y estas pueden pasar desapercibidas si se considera que su tamaño es ínfimo (1-3 mm) y su coloración más clara, por lo que fácilmente pueden camuflarse entre la mucosidad nasal del corzo. En contraposición, Dudzinski (1970) en corzos de Polonia sí que describió la presencia de larvas durante todo el año.

En cuanto a la intensidad media de infestación (Gráfica 16), al igual que la prevalencia, fue mayor durante la primavera ($24,2 \pm 27,06$) que en verano e invierno ($12,5 \pm 6,54$ y 1 ± 0 , respectivamente). No obstante, debido al bajo número de muestras positivas en alguna de las categorías no fue posible aplicar el análisis de varianza a este factor.

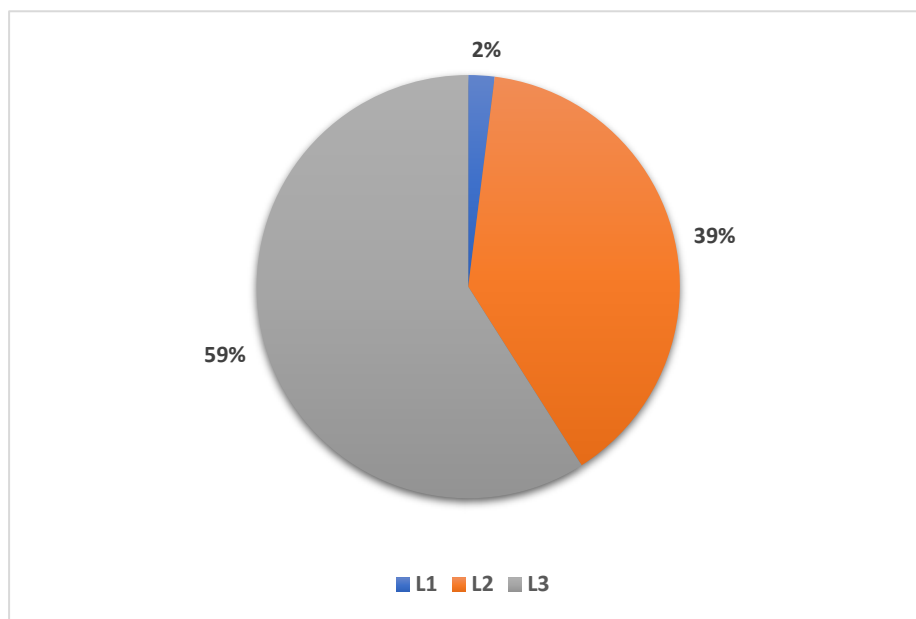


Gráfica 16. Evolución de la intensidad media de *C. stimulator* en función de la estación del año.

En general, nuestros resultados coinciden con los de Pajares (2016) quien observó las mayores intensidades de infestación en primavera y principios de verano. Salaba *et al.* (2013) en la República Checa también detectaron una mayor intensidad de infestación durante el mes de mayo y esta iba decreciendo progresivamente hasta el mes de septiembre. Sin embargo, Király & Egri (2007) en Hungría, hallaron que la intensidad larvaria aumentaba progresivamente desde abril a agosto. Los diferentes resultados obtenidos en los diversos países pueden deberse al clima de la región o al año de estudio, ya que la expulsión de las L3 por parte del hospedador puede adelantarse o retrasarse en función de las condiciones climáticas. Por ello, en nuestro país puede que las temperaturas comiencen a suavizarse antes que en otros países del norte de Europa de forma que las L3 abandonen antes a su hospedador, así como que, en la actualidad, como consecuencia del cambio climático, las temperaturas se están elevando en todo el planeta, pudiendo haber variaciones con resultados de estudios realizados en la década anterior.

4.4. Cronobiología y desarrollo de las distintas fases larvarias de *C. stimulator* en el área de estudio

Al tener en cuenta los distintos estadios larvarios de este parásito obtenidos en todo el estudio, se observó una mayor prevalencia de larvas del tercer estadio, seguidas de las L2 y una pequeña proporción de L1 (Gráfica 17). Esta distribución podría deberse a que, en nuestro estudio, la mayor parte de los animales positivos fallecieron durante la primavera, estación en la que las larvas de *C. stimulator* ya se encontrarían en las fases de segundo y tercer estadio. Además, como ya se comentó anteriormente en el punto 4.3.2.4. el pequeño tamaño de las L1 pudo hacer que algún ejemplar pasase desapercibido a la vista.

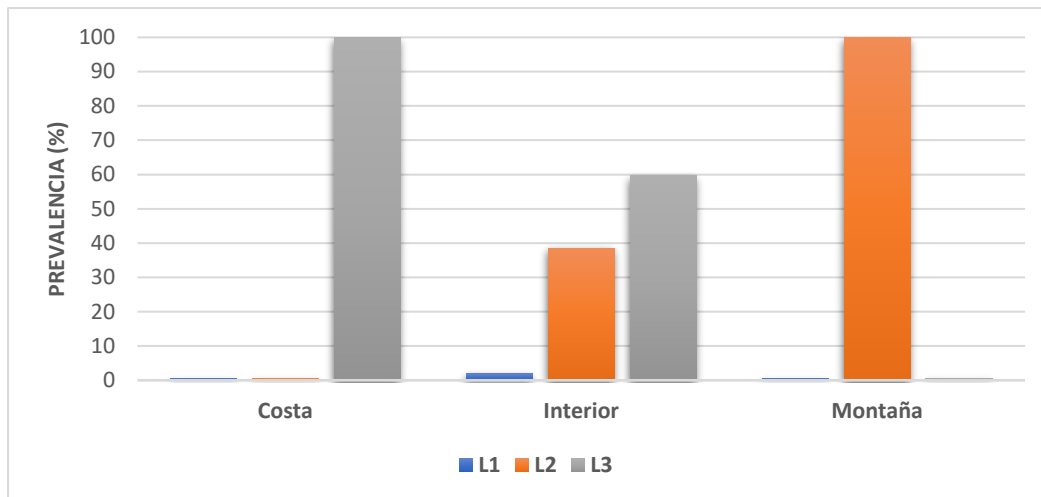


Gráfica 17. Prevalencia de los distintos estadios larvarios de *C. stimulator*.

Estos resultados coinciden, en parte, con los hallados por Pajares (2016), en corzos del norte de España, ya que este autor, obtuvo una mayor prevalencia de L2 (48%) y de L1 (10%) y menor de L3 (42%) que las obtenidas por nosotros.

4.4.1. Desarrollo larvario en función de las zonas climáticas

Como se observa en la Gráfica 18 la prevalencia de los diferentes estadios larvarios varió al considerar la zona de estudio. Debido a que el número de corzos positivos en cada zona climática no fue homogéneo a lo largo del año no se pudieron realizar los correspondientes análisis estadísticos.



Gráfica 18: Porcentaje de los distintos estadios larvarios observados en los corzos parasitados al considerar la zona climática.

En la costa únicamente observamos 2 corzos positivos: uno abatido enero y que albergaba una larva en estado de putrefacción, por lo que, probablemente, fuese una larva procedente de la infestación del año anterior y que murió durante el ciclo endógeno; y, por otro lado, el otro animal positivo había fallecido a finales del verano y en él se detectaron 4 L3, por lo que estarían finalizando su ciclo endógeno. Es muy posible que este último corzo hubiese tenido una carga parasitaria mucho mayor y hubiese estado expulsando las L3 durante los meses de primavera y verano siendo estas las últimas que estaban culminando su ciclo endógeno.

La mayoría de los corzos procedían de la zona interior y en ellos se detectaron larvas de los 3 estadios. Únicamente en 2 animales muertos en mayo y junio detectamos L1, L2 y L3, por lo que las L1 procederían de la reinfestación producida en el año de su muerte, ya que en esta época y en esta zona ya habría moscas realizando la larviposición y, las L2 y L3 de las larvas depositadas por las moscas el año anterior. En general, en la gran mayoría de los corzos infestados predominaban las L2 hasta mediados de abril y a partir de finales de abril el número de L3 era superior al resto. De estos resultados se podría deducir que, en esta zona, las L3 se liberarían al medio en abril y ya habría moscas volando desde el mes de mayo. Además, en el mes de agosto solo hallamos corzos infestados con L3 y, por lo tanto, podríamos encontrar moscas volando hasta finales de septiembre.

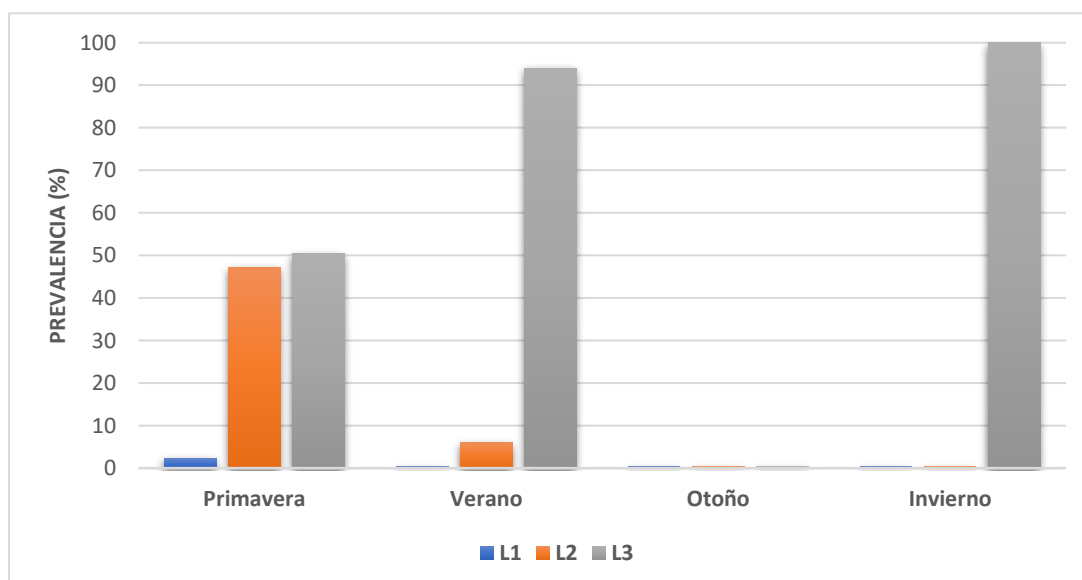
En la montaña, solo uno de los tres corzos hallados en la provincia de Lugo en abril de 2019 resultó positivo y presentaba únicamente L2. Cabe destacar que en esa zona la altitud es superior a 1100 m y las temperaturas fueron bajas e incluso hubo nevadas en esas fechas. Estos resultados coinciden con la cronobiología descrita por Pajares (2016), ya que en zonas de montaña el ciclo endógeno se ralentiza y la expulsión de las L3 y posterior pupación se retrasa hasta que las temperaturas sean más elevadas y, fundamentalmente, el vuelo de las moscas y la larviposición se ralentiza en los meses de verano. Por este motivo, en estas zonas la duración de la fase exógena

será menor que en otros climas con temperaturas más suaves, concentrándose en los meses más calurosos.

Estos resultados, en general, coinciden con los de diversos autores (Angulo-Valadez *et al.*, 2010; Arias *et al.*, 2012; Arias *et al.*, 2016; Pajares, 2016), quienes señalaron que el clima influye sobre el desarrollo del ciclo endógeno, ya que cuando las condiciones ambientales no son las idóneas, las L1 y algunas L2 pueden detener su desarrollo, es decir sufrir una hipobiosis o quiescencia larvaria; asimismo, el ciclo exógeno (expulsión de las L3, pupación y vuelo de las moscas) está condicionado por las condiciones ambientales.

4.4.2. Desarrollo larvario en función de la época del año

Como podemos observar en la gráfica 19, en primavera fue en la única estación en la que se hallaron larvas de los 3 estadios: L1 (2,3%), L2 (47,2%) y L3 (50,5%).



Gráfica 19. Porcentaje de los distintos estadios larvarios al considerar la estación del año.

En todas las estaciones se observó una baja prevalencia de L1, probablemente debido a que como se expuso anteriormente, su ínfimo tamaño hace más difícil su hallazgo. No obstante, nuestros resultados coinciden con los de Pajares (2016) quien observó las primeras L1 en abril, señalando que, en climas de tipo oceánico probablemente, en este mes las moscas de *C. stimulator* iniciarían su ciclo vital que se prolonga hasta finales de verano.

En primavera la prevalencia de infestación por L2 y L3 fue similar, lo que quiere decir que gran parte de las larvas comienzan a abandonar el hospedador durante la primavera para pupar y dar lugar a los adultos mientras que otras continúan su desarrollo en el hospedador. Estos resultados coinciden con los señalados por Pajares (2016) y Arias *et al.* (2016), quienes señalaron

que el desarrollo de las larvas en el hospedador no era sincrónico y en él se podían hallar simultáneamente larvas de los 3 estadios de *C. stimulator*. Asimismo, en corzos procedentes de Hungría, Király & Egri (2007) observaron que a partir de la segunda mitad de abril se podían observar que los animales estaban infestados mayoritariamente por L2 y L3.

En verano se observó la mayor prevalencia de infestación por L3, lo que concuerda con el hecho de que la mayoría de las L2 observadas en primavera ya habrían evolucionado a L3 y es en esta estación del año cuando se desarrolla fundamentalmente el ciclo exógeno (Pajares, 2016). Además, Dudzinski (1970) en corzos de Polonia, también observó que la mayoría de las L3 se encontraban entre los meses de abril a agosto.

Durante el otoño no se encontró ninguna evidencia de infestación, aunque como se mencionó en el punto 4.3.2.4. este periodo se correspondería con la presencia de L1, las cuales debido a su diminuto tamaño podrían haber pasado desapercibidas camufladas entre el moco y los recovecos nasales.

Sorprende la presencia únicamente de L3 durante los meses de invierno; no obstante, se debe señalar que únicamente hallamos 3 corzos infestados en esta época y que estos únicamente albergaban una larva de tercer estadio y, además, en 2 de ellos, estas L3 se encontraban putrefactas en un rincón de los cornetes nasales, lo que nos hace pensar que, probablemente estas larvas provendrían de la infestación del año anterior y que, por cualquier circunstancia, murieron en el hospedador y comenzaron a necrosarse en su interior sin poder ser expulsadas. La L3 del tercer corzo sí que era viable; este hecho podría deberse a que al estar parasitado por una única larva esta se hubiese desarrollado más rápidamente al no tener competencia.

Al analizar en conjunto estos resultados podríamos afirmar que la mayoría de las larvas finalizan el ciclo endógeno durante la primavera para completarlo todas en los primeros meses de verano, de modo que el vuelo de las moscas se realizaría, fundamentalmente entre los meses de abril y septiembre.

5. Conclusiones

De los resultados obtenidos en este estudio se extraen las siguientes conclusiones:

1ª. Todas las larvas extraídas se identificaron como *Cephenemyia stimulator*. La prevalencia de infestación fue elevada, mientras que, en general, la intensidad puede considerarse moderada.

2ª. Las larvas de *C. stimulator* se localizan mayoritariamente en los cornetes nasales y en los sacos retrofaríngeos y, en menor medida, en la glotis, la boca y la tráquea.

3ª. Los factores intrínsecos y extrínsecos que más influyeron en la prevalencia de infestación por *C. stimulator* fueron la edad, el sexo y la estación del año.

4ª. Los corzos adultos tienen más riesgo de padecer esta miasis que los más jóvenes, probablemente debido a que estos últimos pasan más tiempo ocultos entre la vegetación lo que disminuye su exposición a las moscas de *Cephenemyia*.

5ª. El sexo de estos ungulados silvestres influye de manera significativa en la prevalencia de infestación por *C. stimulator*, puesto que su comportamiento de defensa territorial hace que estén más expuestos a la larviposición por parte de las moscas.

6ª. En primavera se observó mayor prevalencia de infestación por *C. stimulator*, ya que en esta estación pueden coexistir larvas procedentes de distintas temporadas, produciéndose un solapamiento del final de un ciclo con el comienzo del siguiente.

7ª. El clima influye sobre el desarrollo del ciclo endógeno, ya que cuando las condiciones ambientales no son las idóneas, las L1 y algunas L2 pueden detener su desarrollo, es decir sufrir una hipobiosis o quiescencia larvaria; asimismo, el ciclo exógeno está condicionado por las condiciones ambientales.

8ª. En el norte de España la fase activa del ciclo endógeno de este parásito tiene lugar, fundamentalmente, en primavera y verano, por lo que el periodo de actividad de las moscas podría abarcar desde abril hasta septiembre.

9ª. La miasis por *C. stimulator* es frecuente en corzos del norte de España y debido a su difícil control y repercusiones negativas sobre la salud de los mismos, puede representar un problema para la supervivencia de las poblaciones de este ungulado silvestre.

6. Bibliografía

Angulo-Valadez, C. E.; Scholl, P. J.; Cepeda-Palacios, R.; Jacquiet, P.; Dorchies, P. (2010). Nasal bots... a fascinating world!. *Veterinary Parasitology*, 174: 19-25.

Arias, M. S.; (2012). Infestación por larvas de *Cephenemyia*: un problema de importancia creciente en corzos de Asturias y Galicia. *Boletín de la Asociación del Corzo Español*, 13: 37-38.

Arias, M. S.; Pajares, G.; Paz-Silva, A.; Díez-Baños, N.; Suárez, J. L.; Díez-Baños, P.; Sánchez-Andrade, R.; Morrondo, P. (2014). Antigen characterization from second instars of oestrid bot flies for the detection of anti-*Cephenemyia stimulator* antibodies by ELISA in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Medical and Veterinary Entomology*, 28(1): 83-89.

Arias, M. S.; Pajares, G.; Díez-Baños, N.; Pérez-Creo, A.; Prieto, A.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P. (2016). Cephenemyiosis, an emergent myiasis in roe deer (*Capreolus capreolus*) from northwestern Spain. *Parasitology Research*, 115(12): 4605-4610.

Bueno-de La Fuente, M. L.; Moreno, V; Pérez, J. M.; Ruíz-Martínez, I.; Soriguer, R. C. (1998). Oestrosis in Red Deer from Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 34(4): 820-824.

Calero-Bernal, R.; Habela, M. Á. (2013). First report of *Cephenemyia stimulator* (Diptera, Oestridae) parasitizing Roe deer (*Capreolus capreolus*) in Extremadura (Spain). *Galemys, Spanish Journal of Mammalogy*, 25(1): 29-34.

Colwell, D. D.; Hall, M. J. R.; Scholl, P. J. (2006). *The oestrid flies. Biology, Host-Parasite Relationships, Impact and management*. Wallingford: CAB International, 359.

Darmangeat, P. (2014). *1001 ANIMALES: Aves y mamíferos*. 1ª ed. Madrid: SERVILIBRO EDICIONES.

Dudzinski, W. (1970). Studies on *Cephenemyia stimulator* (Clark, 1815) (Diptera, Oestridae), the parasite of the European Roe Deer, *Capreolus capreolus* (L.). I. Biology. *Acta Parasitologica Polonica*, 18: 555-572.

Fernández, F.; Valls, M. C. (2008). *Cabárceno: parque de la naturaleza*. 1ª ed. Cantabria: Creática Ediciones.

Fidalgo, L. E.; López, J. M.; Gonzalo, J. M.; González, A. (2009). *El corzo: aspectos biológicos y aprovechamiento cinegenético*. 1ª ed. Madrid: FEDENCA - ESCUELA ESPAÑOLA DE CAZA.

Fidalgo, L. E. (2012). Cómo tomar muestras de los animales abatidos para su estudio: *Cephenemyia stimulator* en corzos. *Ciencia y Caza*: 1-16.

Fidalgo, L. E.; López, A. M.; Pérez, J. M.; Martínez, C. (2013). *Informe Final del proyecto: "Bases epidemiológicas para el control de Cephenemyia stimulator en corzos en España"*: Universidade de Santiago de Compostela y Fundación FEDENCA.

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

Király, I.; Egri, B. (2007). Epidemiological characteristics of *Cephenemyia stimulator* (Clark, 1815) larval infestation in european roe deer (*Capreolus capreolus*) in Hungary. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 53(3): 271-279.

Kornaś, S.; Kowal, J.; Wajdzik, M.; Nosal, P.; Wojtaszek, M.; Basiaga, M. (2016). *Cephenemyia stimulator* (Diptera) infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) from Kraków area, southern Poland. *Annals of parasitology*, 62(2): 115-118.

Leitner, N.; Schwarzmann, L.; Zित्रa, C.; Palmieri, N.; Eigner, B.; Otranto, D.; Glawischnig, W.; Fuehrer, H. P. (2016). Morphological and molecular identification of nasopharyngeal bot fly larvae infesting red deer (*Cervus elaphus*) in Austria. *Parasitology Research*, 115(11): 4417-4422.

McMahon, D. C. (1989). Bot Fly Larvae (*Cephenemyia* spp., Oestridae) in Mule Deer (*Odocoileus hemionus*) from Utah. *Journal of Wildlife Diseases*, 25(4): 636-638.

Minár, J. (2000). Family Oestridae in: *Contributions to a manual of palearctic diptera*. Ed. Papp & Darvas. Budapest: Science Herald, 467-478.

Nilssen, A. C.; Isomursu, M.; Oksanen, A. (2008). The moose throat bot fly *Cephenemyia ulrichii* larvae (Diptera: Oestridae) found developing in roe deer (*Capreolus capreolus*) for the first time. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50(1): 14.

Pajares, G. (2009). Apuntes de Biología. Primera cita en España de *Cephenemyia stimulator* en corzos. *Boletín de la Asociación del Corzo Español*, 11: 36.

Pajares Bernaldo de Quirós, G. (2016). Estudio sobre la infestación por larvas de *Cephenemyia stimulator* (Diptera: Oestridae) en corzos (*Capreolus capreolus*) del norte de España. *Tesis Doctoral. Faculdade de Veterinaria de Lugo, Departamento de Patología Animal: Universidad de Santiago de Compostela*.

Pajares, G.; Arias, M.S.; Pérez-Creo, A.; Prieto, A.; Callejo, A.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P. (2017). Epidemiología de la cefenemiosis en corzos del noroeste de España. *Boletín de la Asociación del Corzo Español, IV Simposio sobre el corzo en la Península Ibérica*, 15: 129-134.

Panadero, R.; Dacal, V.; López, C.; Vázquez, L.; Cienfuegos, S.; Díaz, P.; Morrondo, P.; Díez-Baños, P. (2009). Immunomodulatory effect of *Hypoderma lineatum* antigens: in vitro effect on bovine lymphocyte proliferation and cytokine production. *Parasite immunology*, 31(2): 72-77.

Panadero, R.; Varas, G.; Pajares, G.; Markina, F.; López, C.; Díaz, P.; Pérez-Creo, A.; Prieto, A.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P. (2017). *Hypoderma actaeon*: an emerging myiasis in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Medical and Veterinary Entomology*, 31(1): 94-96.

Panadero, R.; López, C.; Remesar, S.; Cabanelas, E.; Varas, G.; Markina, F.; Díaz, P.; García-Dios, D.; Prieto, A.; Fernández, G.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P. (2020). Temporal and spatial spread of *Hypoderma actaeon* infection in roe deer from peninsular Spain determined by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Medical and Veterinary Entomology*, 34(1): 44-48.

Patton, W. S. (1937). Studies on the higher diptera of medical and veterinary importance. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 31(1): 113-125.

Pinnyey, S.; Majzinger, I.; Barta, T.; Huber, J. (2017). Examination of the Nasal Botfly (*Cephenemyia stimulator*, Clark, 1815) in the Roe Deer (*Capreolus capreolus*, Linnaeus 1758), in Hungary. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 50(2): 143-146.

Price, P. W. (1980). *Evolucionary biology of parasites*. 1^a ed. New Jersey: Princeton University Press

Ruíz-Martínez, I.; Palomares, F. (1993). Occurrence and overlapping of pharyngeal bot flies *Pharyngomyia picta* and *Cephenemyia auribarbis* (Oestridae) in red deer of southern Spain. *Veterinary Parasitology*, 47: 119-127.

Salaba, O.; Vadlejch, J.; Petrtyl, M.; Valek, P.; Kudrnacova, M.; Jankovska, I.; Bartak, M.; Sulakova, H.; Langrova, I. (2013). *Cephenemyia stimulator* and *Hypoderma diana* infection of roe deer in the Czech Republic over an 8-year period. *Parasitology Research*, 112: 1661-1666.

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

Zumpt, F. (1965). *Myiasis in Man and Animals in the Old World*. 1^a ed. London: Butterworths.