



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

**Estudio molecular de la ocurrencia de *Trypanosoma pestanai* en
tejones eurasiáticos (*Meles meles*) del noreste peninsular**

Molecular study of the occurrence of *Trypanosoma pestanai* in Eurasian
badgers (*Meles meles*) from the northeast Iberian Peninsula

Autor:

Eva Astiz Ameztoy

Director/es:

Javier Millán Gasca
M^a Paz Peris Peris

Facultad de Veterinaria

2025

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1. EL PARASITISMO	5
2.1 TRYPANOSOMA SP. Y TRIPANOSOMIASIS	6
2.2 HOSPEDADORES	8
2.4 EL TEJÓN EUROASIÁTICO	9
2.5 TRYPANOSOMA PESTANAI.....	10
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	11
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
4.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
4.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	12
4.3 EXTRACCIÓN DEL DNA	13
4.4 DETECCIÓN MOLECULAR	14
4.4.1 Ensayo basado en SYBR Green.	14
4.4.2 Ensayo basado en sonda TaqMan	15
4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	15
5. RESULTADOS	16
6. DISCUSIÓN	19
7. CONCLUSIONES	21
8. VALORACIÓN PERSONAL	23
9. BIBLIOGRAFÍA	24

1. RESUMEN

El tejón europeo (*Meles meles*) es el hospedador natural de *Trypanosoma (Megatrypanum) pestanai*, un protozoo hemoparásito posiblemente transmitido por la pulga específica (*Paraceras melis*). Aunque este tripanosomátido ha sido detectado en tejones de diversas regiones europeas, su presencia no ha sido investigada previamente en España.

El objetivo de este trabajo fue determinar, mediante métodos moleculares (qPCR), la presencia y distribución de *T. pestanai* en tejones del noreste peninsular, así como identificar posibles factores de riesgo asociados. Para ello, se analizaron 145 muestras de tejones atropellados del País Vasco, Navarra, Aragón y Cataluña.

Los resultados revelaron una prevalencia del 35.7% de positivos por *T. pestanai*. El análisis estadístico de factores de riesgo (edad, sexo, biorregión) asociados a la presencia de ADN del parásito reveló que los tejones procedentes de la zona eurosiberiana presentaban una probabilidad tres veces mayor de estar infectados en comparación con los de la zona mediterránea.

Este estudio representa la primera evidencia de *T. pestanai* en tejones de España, y aporta información valiosa sobre su distribución geográfica y epidemiología en la Península Ibérica. Los hallazgos obtenidos podrían ser relevantes para futuras investigaciones sobre la ecología del parásito y las interacciones hospedador-vector.

ABSTRACT

The European badger (*Meles meles*) is the natural host of *Trypanosoma (Megatrypanum) pestanai*, a haemoparasite protozoan likely transmitted by its specific flea (*Paraceras melis*). Although this trypanosomatid has been detected in badgers from various European regions, its presence had not been previously investigated in Spain.

The aim of this study was to determine, using molecular methods (qPCR), the presence and distribution of *T. pestanai* in badgers from the northeastern Iberian Peninsula, as well as to identify potential associated risk factors. To this end, 145 samples from road-killed badgers from the Basque Country, Navarre, Aragon, and Catalonia were analyzed.

The results revealed a prevalence of 35.7% positive cases for *T. pestanai*. Statistical analysis of risk factors (age, sex, bioregion) associated with the presence of parasite DNA showed that badgers from the Eurosiberian region were three times more likely to be infected compared to those from the Mediterranean region.

This study represents the first evidence of *T. pestanai* in badgers in Spain and provides valuable information on its geographic distribution and epidemiology in the Iberian Peninsula. The findings may be relevant for future research on the parasite's ecology and host-vector interactions.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El parasitismo

El parasitismo es una relación biológica entre dos organismos en la que uno de ellos el parásito, se beneficia a expensas del otro, el huésped, al que puede causarle daño (Rózsa & Garay, 2023). Puede ser temporal o permanente, y los parásitos pueden encontrarse tanto dentro del cuerpo del huésped (endoparásitos) como sobre la superficie (ectoparásitos). Además, existen parásitos obligados, que dependen completamente del huésped para sobrevivir y reproducirse, y facultativos, que pueden vivir libremente, pero se aprovechan de un huésped cuando tienen la oportunidad (Combes, 2001). Los parásitos presentan una gran variedad de adaptaciones morfológicas, fisiológicas y comportamentales que les permiten sobrevivir en ambientes hostiles dentro del huésped y evadir su sistema inmunológico. También pueden tener ciclos de vida complejos, que involucran varios hospedadores (Combes, 2001).

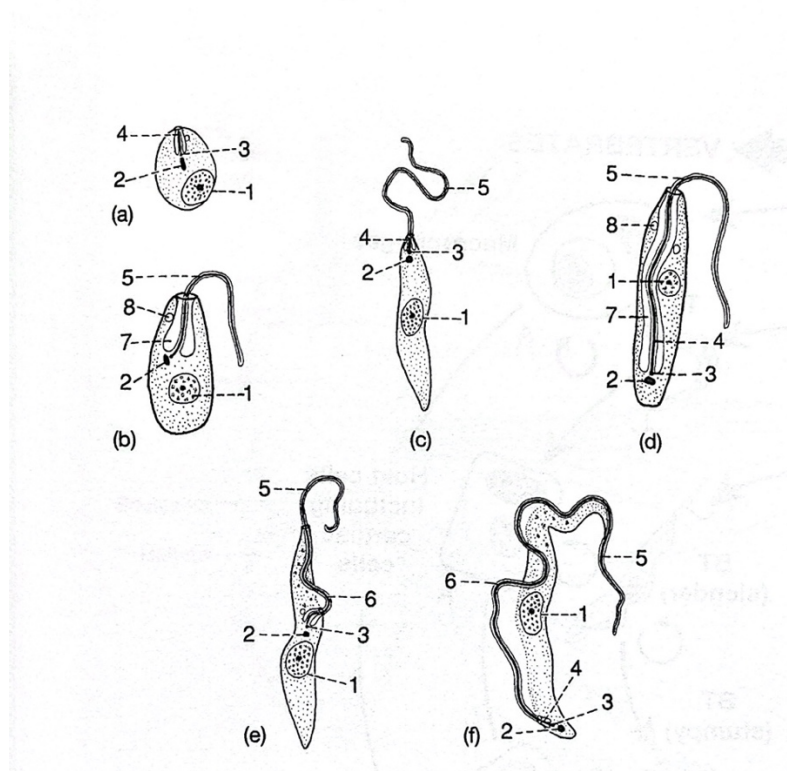
Los parásitos tienen gran impacto tanto en sanidad animal como en la conservación de la fauna silvestre. Además, aunque suelen asociarse únicamente con efectos negativos sobre la salud, su presencia tiene múltiples implicaciones ecológicas y evolutivas (Gómez & Nichols, 2013; Marcogliese, 2005). En medicina veterinaria, los parásitos representan una de las principales causas de pérdida de productividad y bienestar animal. Las infecciones parasitarias pueden provocar enfermedades crónicas, pérdida de peso, trastornos digestivos, disminución en la producción de leche o carne, y en casos graves, la muerte de los animales afectados (Kaplan & Vidyashankar, 2012). Por otro lado, varios parásitos animales tienen potencial zoonótico, es decir, pueden transmitirse a los seres humanos, lo que supone un riesgo significativo para la salud pública, especialmente en zonas rurales o en estrecho contacto con fauna (Fernandez Martinez et al., 2023). En el ámbito de la conservación, los parásitos pueden actuar como indicadores de la salud ecológica. Cambios en su diversidad o prevalencia pueden reflejar alteraciones ambientales, pérdida de hábitat, contaminación o estrés en las poblaciones silvestres. Por ejemplo, la presencia de ciertos helmintos en peces puede ser utilizada para monitorizar la calidad de cuerpos de agua dulce (Marcogliese, 2005). En poblaciones silvestres reducidas o amenazadas, los efectos de los parásitos pueden ser especialmente graves, ya que la baja diversidad genética y el estrés ambiental aumentan la vulnerabilidad a las enfermedades. Se han documentado brotes de sarna sarcóptica causada por *Sarcoptes scabiei* en lobos, zorros y otros carnívoros en Europa, con consecuencias graves sobre la viabilidad de las poblaciones (Krzysiak et al., 2024; Soulsbury et al., 2007). Asimismo, la translocación de fauna con fines de conservación, el comercio de animales exóticos o el contacto con animales domésticos puede introducir nuevos parásitos en

ecosistemas donde no existían previamente, afectando a especies nativas que carecen de defensas naturales frente a ellos (Gómez & Nichols, 2013).

2.1 *Trypanosoma* sp. y tripanosomiasis

La tripanosomiasis es una enfermedad parasitaria causada por protozoos del género *Trypanosoma*, que son transmitidos a los seres humanos y a los animales a través de vectores (Radwanska et al., 2018). *Trypanosoma* sp. es un protozoo flagelado perteneciente al orden Kinetoplastida dentro de la familia Trypanosomatidae. En cuanto a su morfología tiene un aspecto de hoja con un flagelo simple que parte junto al cinetoplasto (Beaver et al., 2003). Todas las especies de tripanosomátidos tienen un solo núcleo y son alargadas con un solo flagelo o redondeadas con un flagelo muy corto y no protuberante. Muchos miembros de la familia son heteroxenos: pasan por una fase intermedia en un huésped invertebrado (artrópodos hematófagos), que actúa de vector, y una fase final en un huésped vertebrado (mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces) (Schmidt & Roberts, 1977).

Figura 1. Género de Trypanosomatidae. (a) *Leishmania* (amastigote); (b) *Crithidia* (choanomastigote); (c) *Leptomonas* (promastigote); (d) *Herpetomonas* (opisthomastigote); (e) *Blastocrithidia* (epimastigote); (f) *Trypanosoma* (trypomastigote). 1, núcleo; 2, cinetoplasto; 3, cinetosoma; 4 y 5, axonema y flagelo; 6, membrana ondulante; 7, bolsa flagelar; 8, vacuola contráctil. De O. W. Olsen, *Animal parasites, their biology and life cycles* (3d ed.). Copyright © 1974 Dover Publications.



Durante su ciclo vital presenta cuatro fases; amastigote, promastigote, epimastigote y tripomastigote (Figura 1). Las diferentes formas se distinguen entre sí por la posición del cinetoplasto en relación con el núcleo y por la presencia o ausencia de una membrana ondulante (Zeibig, 2014):

a) En el tripomastigote, el cinetoplasto se encuentra localizado posterior al núcleo, usualmente en la porción más posterior del parásito. El flagelo sale del extremo posterior y se dobla hacia delante a lo largo del cuerpo del parásito, formando una membrana ondulante a lo largo de todo el parásito y emerge en forma libre en su extremo anterior.

b) En el epimastigote, el cinetoplasto se encuentra localizado en la parte media del organismo justo por delante del núcleo. El flagelo emerge de la parte media del parásito y forma una membrana ondulante más pequeña que la observada en los tripomastigotes.

c) El promastigote tiene el cinetoplasto en la parte anterior y un flagelo libre sin membrana ondulante.

d) El amastigote es más esférico y no tiene flagelo libre. El cinetoplasto se ve como un cuerpo oscuro cerca del núcleo.

Los tripanosomas se transmiten principalmente por insectos hematófagos, como la mosca tse-tsé, tábanos, moscas *Stomoxys* o triatominos (De Fuentes-Vicente et al., 2018; Kasozi et al., 2021). En algunos casos, la transmisión puede ocurrir por consumo de carne infectada (carnívoros) (Musinguzi et al., 2016) o contacto con sangre contaminada (Silva et al., 1995).

Por lo general, las infecciones en mamíferos salvajes son benignas (Thompson, 2013). Sin embargo, algunas especies de tripanosomas pueden causar enfermedades en otros mamíferos que no suelen estar involucrados en los ciclos naturales de transmisión. Algunas de estas especies, presentes en animales salvajes, pueden volverse patógenas al transmitirse a los seres humanos y al ganado doméstico (Davis & Anderson, 1973).

La tripanosomiasis sigue siendo un problema global significativo, con transmisión entre la fauna, el ganado y los seres humanos debido a la proximidad de hábitats y la interacción creciente en zonas rurales y parques naturales (Kasozi et al., 2021). Entre las diversas especies de tripanosomas identificadas, las zoonóticas representan un grave problema de salud pública debido a su morbilidad y mortalidad (Sgroi et al., 2021). Existen dos formas principales de la enfermedad en los seres humanos: la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño, causada por *Trypanosoma brucei*, y la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi* (Davis &

Anderson, 1973). Algunas especies de tripanosomas afectan también significativamente a los animales domésticos, como *T. brucei*, *Trypanosoma equiperdum* y *Trypanosoma evansi* (causante de la enfermedad denominada surra), provocando grandes pérdidas en la productividad y un considerable impacto socioeconómico a nivel global (Aregawi et al., 2019).

2.2 Hospedadores

En los últimos años, numerosos estudios han investigado el papel de los animales domésticos como reservorios de tripanosomas. Se ha identificado a los perros y gatos como hospedadores de *T. cruzi* (Elmayan et al., 2019; Eloy & Lucheis, 2009; Murphy et al., 2019), al ganado vacuno en la transmisión de *T. b. rhodesiense* (Waiswa et al., 2003) y a los cerdos como hospedadores de *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma congolense* y *Trypanosoma simiae* (Hamill et al., 2013). No obstante, el papel de la fauna silvestre como reservorio de tripanosomátidos requiere una mayor investigación (SgROI et al., 2021). Se sabe que los ecosistemas silvestres albergan diversas especies de tripanosomas para los cuales actúan como reservorio especies como zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*), armadillos (*Dasypus novemcinctus*) y diversos roedores en el caso de *T. cruzi* (Bezerra-Santos et al., 2021; Gürtler & Cardinal, 2015), mientras que *T. evansi* ha sido detectado en capibaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), murciélagos vampiros (*Desmodus rotundus*), venados de cola blanca (*Odocoileus virginianus chiriquensis*) y jabalíes (*Sus scrofa*) (Desquesnes, 2004; Radwanska et al., 2018). Además, nuevas especies se describen continuamente en fauna silvestre (Marcili et al., 2025).

La coevolución ha permitido que muchas especies silvestres sean tolerantes a la infección, aunque factores ambientales y enfermedades pueden aumentar su susceptibilidad (Kasozi et al., 2021). En Europa, se han identificado diversas especies de tripanosomas en animales domésticos y silvestres, como *Trypanosoma lewisi* en ratas (*Rattus norvegicus*) (Karbowski et al., 2009), *Trypanosoma theileri* tanto en rumiantes silvestres como domésticos (Neumüller et al., 2012; Villa et al., 2008), *Trypanosoma melophagium* en rumiantes domésticos (Büscher & Friedhoff, 1984) y *Trypanosoma vespertilionis* y *Trypanosoma dionisi* en pipistrellos (*Pipistrellus pipistrellus*) (Linhart et al., 2020). Por otro lado, *T. pestanai* parece ser una especie propia del tejón euroasiático (*Meles meles*) (Peirce & Neal, 1974). Sin embargo, la información sobre tripanosomas en animales salvajes en Europa, así como sobre su papel en la circulación de estos parásitos, incluidos aquellos de interés zoonótico, es insuficiente (Baker & Harris, 2007; Otranto et al., 2015). En España existen pocos estudios sobre la presencia de tripanosomas y los artrópodos que podrían actuar como vectores de los mismos (Portillo et al., 2018; Fernandez Martinez et al., 2023).

2.3 Epidemiología

La epidemiología de la tripanosomiasis en áreas silvestres está influenciada por diversos factores, como la distribución y el hábitat de los hospedadores. Especies ampliamente distribuidas albergan una mayor diversidad de tripanosomas debido a su capacidad reproductiva. En contraste, animales con hábitats más restringidos tienen una menor contribución a la propagación de estos parásitos debido a su limitada exposición a los vectores. El comportamiento alimenticio también juega un papel clave. Especies que habitan zonas arbustivas y matorrales, están más expuestas a la mosca tsé-tsé y otras moscas picadoras, lo que favorece la transmisión de tripanosomas. Además, la presencia de diferentes especies hospedadoras facilita el intercambio de cepas y variantes del parásito, aumentando las tasas de infección en la fauna silvestre. La introducción de nuevas especies en un ecosistema también puede influir en la diversidad de tripanosomas presentes. La invasión humana y los cambios en el uso del suelo afectan la transmisión de la enfermedad. A medida que crecen las poblaciones humanas y ganaderas, aumenta el riesgo de transmisión de tripanosomas de animales silvestres a domésticos y humanos. Asimismo, la densidad de los hospedadores influye en las poblaciones de los vectores, alterando la dinámica de propagación del parásito (Kasozi et al., 2021).

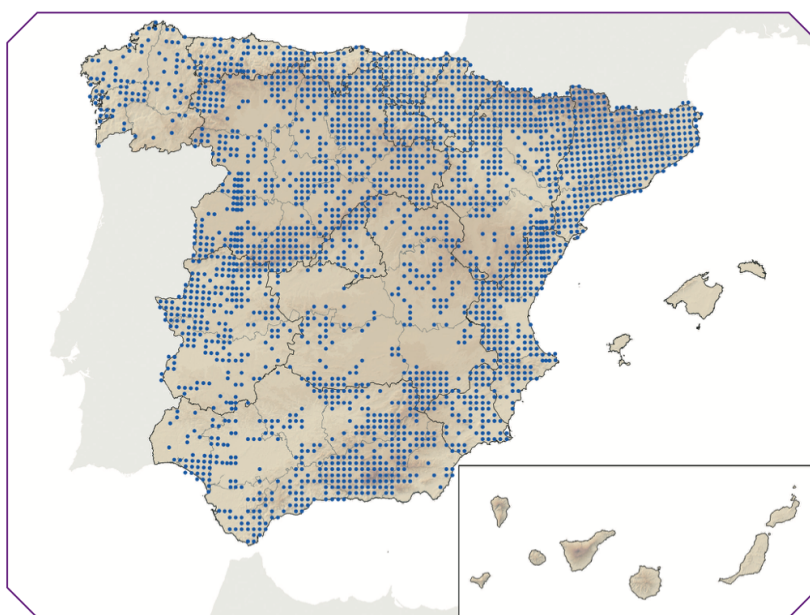
2.4 El tejón euroasiático

El tejón eurasiático es un mamífero de la familia Mustelidae, ampliamente distribuido en la región paleártica (Palomo et al., 2007). Su presencia abarca la mayor parte de Europa, excepto el norte de Escandinavia y Rusia, incluyendo islas como Rodas y Creta, y se extiende hasta partes de Asia occidental, como Jordania, Israel y Palestina (Herrera, 2008). En la Península Ibérica, el tejón está bien distribuido, aunque es menos común en las zonas más áridas del sur en comparación con el norte (Figura 2).

Los tejones pueden actuar como reservorios o huéspedes accidentales de varios patógenos. Se ha documentado, tanto en España como en otras áreas de distribución, su infección por múltiples agentes, incluyendo, entre muchos otros, virus como el de la rabia (Smith, 2002), el del moquillo canino (Oleaga et al., 2022) y diversos parvovirus (Barlow et al., 2012; Calatayud et al., 2020; Canuti et al., 2025). También son importantes reservorios de bacterias como *Mycobacterium bovis* y *M. tuberculosis* (Blanco Vázquez et al., 2021), que puede mantenerse en tejones y transmitirse al ganado (Balseiro et al., 2013; Corner et al., 2011); de *Leptospira* spp., capaz de infectar a humanos a través del contacto con agua contaminada (Ayrál et al., 2016; Kuhnert et al., 2024; Millán et al., 2009); o de *Salmonella* spp., presente en las heces y también con potencial zoonótico (Chiari et al., 2014; Millán et al., 2004; Wilson et al., 2003). Además, los tejones pueden albergar diversos helmintos intestinales (Millán et al., 2004) y albergar diversos ectoparásitos con capacidad vectorial (Millán et al., 2007).

También se han identificado protozoos como *Toxoplasma gondii* (Anwar et al., 2006), *Leishmania infantum* (Del Río et al., 2014; Peris et al., 2024) y *T. pestanai* (Sgroi et al., 2021).

Figura 2. Mapa de distribución del tejón eurasiático (*Meles meles*) en España (Palomo et al., 2007).



2.5 *Trypanosoma pestanai*

Trypanosoma pestanai es un parásito extracelular que habita en el torrente sanguíneo del hospedador cuyo hospedador natural se sospecha, como se dijo más arriba, que sea el tejón euroasiático (Peirce & Neal, 1974; Sgroi et al., 2021). Este parásito pertenece a un clado filogenético que agrupa a tripanosomas asociados a garrapatas, distinto de otros clados como el de *T. brucei*. Dicho clado incluye especies detectadas en diversas regiones del mundo y sugiere una especialización en vectores ixódidos (Koual et al., 2023). Se ha detectado principalmente en poblaciones de tejones de Reino Unido (Ideozu et al., 2015), Italia (Sgroi et al., 2021) y otros países europeos (Rioux et al., 1966). Además, se ha detectado en otros mamíferos como perros en Alemania (Dyachenko et al., 2017) y más recientemente, en liebres europeas (*Lepus europaeus*) (Veitova et al., 2025). Por otra parte, no se han documentado transmisiones a humanos, por lo que no se considera zoonótico.

Según el estudio de Lizundia et al. (2011) se sospecha que el ciclo de *T. pestanai* es indirecto, como es el caso de otros tripanosomas del subgénero *Megatrypanum*. El tejón se infectaría cuando el vector le transmite formas infectantes del parásito durante la alimentación sanguínea. El principal vector de *T. pestanai* podría ser la pulga del tejón, *Paraceras melis* (Lizundia et al., 2011). Estudios recientes han detectado ADN del parásito en garrapatas alimentadas de tejones infectados (Sgroi et al., 2021). Esto

no constituye, sin embargo, prueba de capacidad vectorial. Además, todos los frotis de hemolinfa, intestino y glándulas salivales de garrapatas vivas fueron negativos para tripanosomas (Sgroi et al., 2021). La pulga ingeriría sangre infectada con trypomastigotes y, en su intestino medio, los trypomastigotes se transformarían en epimastigotes. Estas formas se multiplicarían por fisión binaria y posteriormente migrarían al intestino posterior y eventualmente a la cavidad bucal o a las piezas bucales del insecto, donde se transformarían nuevamente en formas metacíclicas trypomastigotas, que son las formas infectantes para el animal (Lizundia et al., 2011; Sgroi et al., 2021). Se cree que en la sangre del tejón se encuentran formas trypomastigotes que pueden multiplicarse en sangre o tejidos. El parásito puede estar presente sin causar síntomas clínicos evidentes, aunque también se ha relacionado con cuadros de anemia y esplenomegalia en tejones (Lizundia et al., 2011). Asimismo, se ha sugerido que el parásito puede invadir otros tejidos, como el sistema nervioso, lo que explicaría los signos neurológicos en tejones infectados (Sgroi et al., 2021).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Puesto que la presencia de *T. pestanai* en tejones ibéricos no ha sido investigada nunca, el objetivo de este estudio es determinar si dicho parásito está presente en una muestra de tejones del noreste peninsular y determinar su prevalencia mediante técnicas moleculares. Como objetivo secundario, se evaluarán estadísticamente posibles factores de riesgo intrínsecos y extrínsecos asociados a su presencia, como son edad, sexo y biorregión de origen.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Revisión bibliográfica

Para la realización de la revisión bibliográfica se emplearon distintas bases de datos científicas para recopilar información actualizada y relevante sobre la presencia de *Trypanosoma spp.*, especialmente *T. pestanai*, en tejones, así como sobre su prevalencia en fauna silvestre en España. La búsqueda principal se llevó a cabo a través de “Web of Science”, facilitado por la Biblioteca de la Universidad de Zaragoza, que permitió el acceso a publicaciones indexadas en bases de datos como PubMed, SciELO y otras fuentes científicas.

Adicionalmente, se utilizaron otras plataformas como Google Scholar (Google Académico) y ScienceDirect para ampliar la recopilación de estudios y contrastar la información. También se

consultaron manuales y documentos técnicos relevantes de organismos oficiales y entidades especializadas en sanidad animal.

Las palabras clave utilizadas en la búsqueda incluyeron términos en español e inglés como: “*Trypanosoma pestanaï*”, “*Trypanosoma* en tejón”, “prevalencia de *Trypanosoma* en tejones en España”, “*Trypanosoma pestanaï* detection”, “badger *Trypanosoma pestanaï* Spain”, “molecular detection of *Trypanosoma*”, “PCR convencional *Trypanosoma*”, y “real-time PCR *Trypanosoma*”. Se priorizó la selección de artículos científicos publicados en los últimos diez años, con el fin de asegurar la actualidad y relevancia de los datos incorporados en el trabajo.

4.2 Obtención de las muestras

Este estudio utiliza una aproximación oportunista para la toma de muestras. Se utilizaron para el mismo, tejones atropellados (n=145) en cuatro comunidades autónomas: Aragón, Navarra, País Vasco y Cataluña (Figura 2). En cada una de estas comunidades, las autoridades competentes, habitualmente Agentes de Medio Ambiente, colectan cadáveres de animales silvestres atropellados en las carreteras y los remiten a los diversos Centros de Recuperación de Fauna Silvestre (CFRS) o a otro laboratorio designado, concretamente el CFRS de la Alfranca (Aragón), el CFRS de Ilundáin (Navarra), el CFRS de Torreferrussa (Cataluña) y el laboratorio regional NEIKER (País Vasco). El lugar del atropello fue registrado mediante GPS (Figura 4). Durante las necropsias practicadas en estos centros, se clasificó al animal en función de su sexo y edad y se obtuvo una porción de bazo, que se congeló a -20°C hasta su análisis. El procesamiento de la muestra, extracción del DNA y realización de la qPCR se llevó a cabo en los laboratorios de la Unidad de Enfermedades Infecciosas, del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

Tabla 1. *Número de muestras obtenidas según origen, sexo y edad.*

		Origen de la muestra				TOTAL
		País Vasco	Navarra	Cataluña	Aragón	
Sexo	Machos	39	25	11	4	79
	Hembras	31	19	10	2	62
	Desconocido	1	0	1	2	4
Edad	Adulto	61	22	21	4	108
	Joven	10	22	0	2	34
	Desconocida	0	0	1	2	3
TOTAL		71	44	22	8	145

4.3 Extracción del DNA

Para conseguir DNA puro de 20-30 g de tejido de bazo se usó el kit comercial Speedtools *DNA extraction*, Biotools® con alguna pequeña modificación en el protocolo. Para la lisis del tejido se añadieron 200 µl PBS (1x) y 200 µl Buffer BB3 a 20-30 g de bazo en un Eppendorf. Con una lanceta se trituró el tejido. Una vez triturado y disuelto el tejido se añadió 25 µl Proteasa K y se mezcló en el agitador 1 min a 11.000 g. Después, se incubó en el termociclador 30 min a 70°C. Para el establecimiento de las condiciones para la unión del DNA a la columna, la muestra se centrifugó 1 min a 1.000 g. En un nuevo Eppendorf se añadió 210 µl alcohol 99% y se preparó la columna con la membrana previamente numerada. Para la unión del DNA en la membrana, la muestra fue recogida con una pipeta y se traspasó al Eppendorf con alcohol 99%, se homogeneizó y seguidamente se hizo un segundo traspaso a la columna con la membrana. La columna se centrifugó 1 min a 11.000 g. Para los lavados de la membrana de sílice se trasladó la membrana a una nueva columna. Para el primer lavado se añadió 500 µl buffer BBW y se centrifugó 1 min a 11.000 g. Se retiró el sobrenadante y se reutilizó la columna para hacer un segundo lavado. Luego, se añadieron 600 µl buffer BB5 a la columna y se centrifugó 1 min a 11.000 g. Para el secado de la membrana de sílice la membrana se movió a un Eppendorf previamente numerado y se puso en el termociclador 2-3 min para un mejor secado. A la vez, se calentó un Eppendorf con buffer BBE en el termociclador 2 min. Para la elución de DNA puro se añadió 100 µl buffer BBE caliente a la membrana y se centrifugó 1 min a 11.000 g. Por último, se retiró la membrana y se guardó el Eppendorf con el DNA puro en el congelador.

4.4 Detección molecular

Se pusieron a punto dos protocolos de PCRs a tiempo real (qPCR), uno basada en SYBR Green y otra en sonda TaqMan. Para ello se diseñaron los cebadores y la sonda a partir de una secuencia previamente publicada por Maslov et al. (1994) con la que se detectó *T. pestanai*. Para ello se utilizó la herramienta PrimerQuest™ Tool (Integrated DNA Technologies, IDT), configurada para ensayos de qPCR, aplicando los parámetros que aparecen por defecto excepto la temperatura de anillamiento que se modificó a 55°C. No todas las muestras pudieron ser analizadas por ambas técnicas al haber insuficiente ADN en algunos casos. Se analizaron 123 muestras por el ensayo basado en SYBR Green y 145 con sonda TaqMan.

4.4.1 Ensayo basado en SYBR Green.

Los cebadores diseñados fueron Tryp set 1 F (5'- GCG ATA TTC GGT TGT ATC -3') y Tryp set 1 R (5'- ACA TAG AGG AGC ATC AC -3').

En base a las condiciones óptimas de amplificación descritas por otros autores, se decidió llevar a cabo cada reacción en un volumen final de 20 µL. compuesto por 10 µL de GoTaq® qPCR Máster Mix con SYBR Green (Promega), 10 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de cada cebador (con una concentración final de 0,6 µmol) por cada 50 µL de mezcla total de agua y Master Mix. La amplificación de todas las muestras se realizó por duplicado, distribuyendo en un primer pocillo la muestra a su concentración de origen (2,25 µL de ADN molde) y realizando en el segundo una dilución 1/10 de la primera. Todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando un termociclador CFX Connect™ (Bio-Rad Laboratories) y placas de 96 pocillos.

El programa térmico consistió en una activación inicial de ADN polimerasa (hot start): desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 44 ciclos de amplificación a 94 °C durante 5 segundos. La adquisición de fluorescencia para la fase cinética se realizó a la temperatura de 55°C durante 30 segundos, subiendo a 79°C durante 5 segundos. Para poder confirmar el resultado final en a técnica molecular se realizó la curva de fusión obtenida de cada pocillo de la placa. Al finalizar la amplificación, se realizó una curva de disociación. Este paso se realizó en un rango de temperaturas comprendido entre 60°C y 94°C con incrementos de 0,5°C, con el fin de comprobar la especificidad del producto amplificado. Los resultados obtenidos fueron analizados usando el programa Bio-Rad CFX Manager, versión 2.1.

4.4.2 Ensayo basado en sonda TaqMan

Los cebadores diseñados fueron Tryp F (5'- GAT CCG GAC AGG ATA AG -3') y Tryp R (5'- GGA ATC AAC CAA ACA AAT C -3') y la sonda TaqMan 5'-/56-FAM/TCA GGA AAT /ZEN/CGA GAA AGG ACA C/3IABkFQ/-3'.

Al igual que en el anterior ensayo la amplificación se llevó a cabo mediante qPCR utilizando un termociclador CFX Connect™ (Bio-Rad Laboratories) y placas de 96 pocillos. Cada reacción se preparó en un volumen final de 20 µL, compuesto por 10 µL de NZY® Supreme qPCR probe Master mix (2x) (Nzytech), 10 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de cada cebador (0,9 µmol) por cada 20 µL de mezcla total de agua y Master Mix. A continuación, se añadieron 2,25 µL de ADN molde a la mitad de los pocillos de la placa, y en el pocillo contiguo se hizo una dilución 1:10 de cada muestra.

El programa térmico consistió en una activación inicial de ADN polimerasa a 94 °C durante 7 minutos, seguida de 44 ciclos de amplificación a 94 °C durante 5 segundos, alineamiento a 55 °C durante 30 segundos y extensión a 79°C durante 5 segundos.

4.4 Análisis estadístico

Se generó una base de datos en una hoja de cálculo Microsoft Office Excel que incluía para cada individuo código de identificación, su edad (joven/adulto), sexo (macho/hembra), localización y resultados del estudio molecular. En función de su localización, se le asignó una de las siguientes dos regiones biogeográficas según el Instituto Geográfico Nacional (IGN 2019): eurosiberiana o mediterránea (Figura 3).

Para evaluar el grado de concordancia entre las dos técnicas moleculares se recurrió al cálculo del coeficiente de concordancia kappa mediante el programa WinEpi (www.winepi.net), utilizando únicamente las muestras analizadas por ambas técnicas.

Asimismo, se calculó la prevalencia y los intervalos de confianza al 95% para la población general y los distintos grupos usando con esta misma herramienta. Se consideraron positivas las muestras que mostraron reacción positiva al menos a una de las técnicas.

Para determinar potenciales factores de riesgo para la parasitación por *T. pestanai* en tejones, se realizó una regresión logística binaria en la que se incluyó como variable dependiente la presencia/ausencia de ADN y como variables explicativas el sexo, edad del animal y la biorregión dónde fue encontrado, utilizando el programa IBM SPSS Statistics v29. Se tomó un valor $p < 0.05$ para

considerar la diferencia estadísticamente significativa. La bondad de ajuste del modelo se estimó con la prueba de Hosmer-Lemeshow. Si el ajuste es bueno, se espera un valor alto de p .

Figura 3. Mapa Regiones Biogeográficas. Fuente: Rivas-Martínez, S. et al, 2017. Elaborado por: Instituto Geográfico Nacional. Atlas Nacional de España



5. RESULTADOS

Se observó una prevalencia del 23.6% mediante el protocolo Sybr y del 31% mediante el protocolo TaqMan (Tabla 2). Tomando como positivos los que lo fueran para al menos una de las técnicas, la prevalencia observada fue del 35.2% (Intervalo del Confianza al 95%= 27.4% - 42.9%).

Tabla 2. Prevalencia de las muestras analizadas según la técnica utilizada.

Técnica	RESULTADOS		
	Positivo	Negativo	Dudoso
Sybr	23.6% (29/123)	70.7% (87/123)	5.7% (7/123)
Sonda TaqMan	31.0% (45/145)	62.8% (91/145)	6.2% (9/145)

Respecto al grado de concordancia entre las dos técnicas de PCR a tiempo real utilizadas, se observó una concordancia excelente si se tomaban los dudosos como positivos y adecuada si se consideraban estos como negativos (Tabla 3).

Tabla 3. Grado de concordancia entre las dos técnicas utilizadas, teniendo en cuenta las muestras analizadas por ambas técnicas. *Interpretación del coeficiente según (Thrusfield, 2007)

Sybr - Sonda	Coeficiente Kappa	Grado de concordancia*
Asumiendo los dudosos como positivos	0.805	Excelente
Asumiendo los dudosos como negativos	0.712	Adecuado

En cuanto a las prevalencias en función del sexo, edad y biorregión se observó mayor prevalencia en machos, adultos y en la biorregión Eurosiberiana (Tabla 4).

Tabla 4. Prevalencias de las muestras en función de los factores de sexo, edad y biorregión.

* Indica diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

	Prevalencia (%)	Intervalo de Confianza 95%
SEXO		
Macho	40.5%	29.7% - 51.3%
Hembra	30.7%	19.2% - 42.1%
EDAD		
Adulto	38.5%	29.1% - 47.8%
Juvenil	27.3%	12.1% - 42.5%
BIORREGIÓN *		
Eurosiberiana	41.9%	32.5% - 51.3%
Mediterránea	18.9%	6.3% - 31.5%

El análisis estadístico reveló diferencias significativas solamente para la variable biorregión (Tabla 5), siendo mayor la prevalencia en la región Eurosiberiana que en la Mediterránea. Basándonos en la razón de probabilidades, la probabilidad de encontrar un tejón parasitado en la región Eurosiberiana es 3,04 veces mayor que en la Mediterránea.

Tabla 5. Resultado del modelo de regresión lineal. Variables especificadas: Biorregión, sexo, edad.

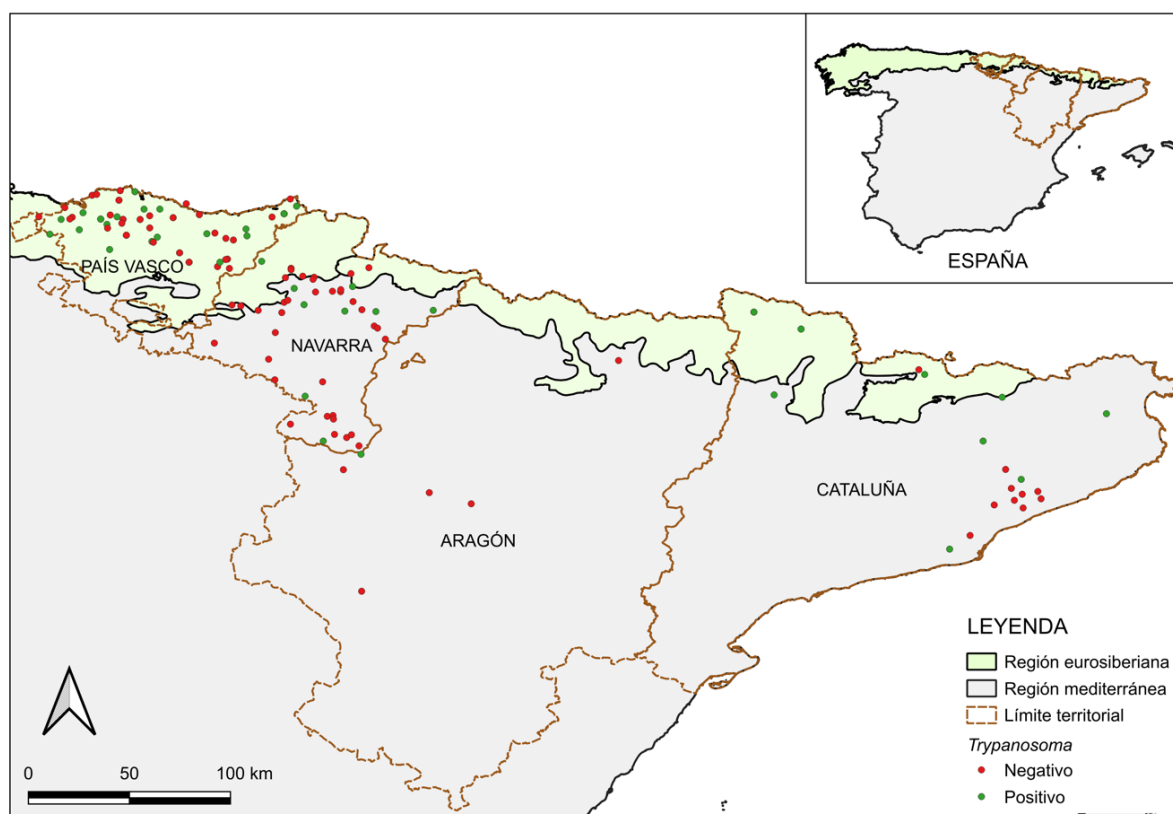
	B	Error estándar	Wald	gl	Sig.	Exp (B)	95% C.I. para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Biorregión	1.112	0.471	5.588	1	0.018	3.042	1.209	7.651
Sexo	-0.421	0.371	1.290	1	0.256	0.656	0.317	1.357
Edad	0.386	0.453	0.727	1	0.394	1.472	0.605	3.578
Constante	-1.551	0.557	7.753	1	0.005	0.212		

Los resultados arrojados por la prueba de Hosmer - Lemeshow nos indican un buen ajuste del modelo de regresión logística (Tabla 6).

Tabla 6. Prueba de Hosmer y Lemeshow.

Chi-cuadrado	gl	Sig.
1.854	4	0.763

Figura 4. Mapa del origen de las muestras analizadas del noreste de la Península ibérica. Elaborado con QGIS v3.38.3-Grenoble.



6. DISCUSIÓN

El presente estudio revela por primera vez la presencia de *T. pestanai* en tejones en la península ibérica. Anteriormente, se había documentado la presencia de este parásito en otros países de Europa como Francia (Rioux et al., 1966), Inglaterra (Ideozu et al., 2015; Lizundia et al., 2011; Peirce & Neal, 1974), Italia (Sgroi et al., 2021) y Rumanía (Lindhorst et al., 2024). El hecho de que nunca se hubiera detectado en la península ibérica se debe a que no existían investigaciones previas de su presencia en España de las que tengamos conocimiento más que a una introducción reciente del parásito. A pesar de que el tejón europeo es una especie territorial y principalmente sedentaria, con desplazamientos limitados en su hábitat (Kruuk, 1978), esto no excluye la posibilidad de cierta conexión entre las poblaciones del sur de Francia y las del norte de la península ibérica. Por tanto, aunque la transmisión local del parásito entre tejones probablemente se produce a través de vectores hematófagos presentes en la zona, no puede descartarse que la introducción original del parásito en la península se produjera históricamente mediante un movimiento de individuos entre poblaciones vecinas.

La prevalencia observada en el presente estudio es comparable a los estudios mencionados anteriormente, que reportaron tasas del 31% en Oxfordshire, Inglaterra (Lizundia et al., 2011) o 35.4% en Gloucestershire, Inglaterra (Ideozu et al., 2015), aunque algo inferiores a los detectados en algunos países del este de Europa, como Rumanía (58%), Hungría (57%) y Serbia (54%) (Lindhorst et al., 2024). Estas diferencias en las tasas de prevalencia pueden explicarse por múltiples factores ecológicos, ambientales y biológicos que influyen en la dinámica de transmisión del parásito. Por un lado, la interacción entre la ecología del vector y del hospedador, así como el clima y las condiciones del hábitat, desempeñan un papel crucial. Se ha sugerido que una mayor densidad de tejones, en determinados países, puede estar relacionada con la disponibilidad de hábitats más adecuados, como bosques, setos y madrigueras, lo que facilita la supervivencia del hospedador y, por tanto, la circulación sostenida del parásito (Kasozi et al., 2021).

Asimismo, diversos estudios han demostrado que la prevalencia de qué varía significativamente en función de la geografía, la abundancia de vectores hematófagos y la composición de las especies hospedadoras presentes en cada región (Fetene et al., 2021). De hecho, los climas templados y húmedos han sido identificados particularmente como favorables para el desarrollo y la actividad de los vectores responsables de la transmisión (Aregawi et al., 2019). Esta mayor prevalencia en países más fríos podría estar relacionada con la mayor probabilidad de encontrar el parásito en tejones de zonas eurosiberianas en nuestro estudio.

A su vez, también se deben considerar factores genéticos. Las variaciones genéticas entre distintas poblaciones de tejones podrían influir en su grado de susceptibilidad al parásito, lo que se ha constatado para *T. brucei* (Morrison et al., 2010), lo cual podría constituir otro determinante de las diferencias observadas en las tasas de prevalencias entre regiones.

Los resultados obtenidos en el estudio actual señalan que los tejones provenientes de la región eurosiberiana presentan una probabilidad tres veces mayor de ser positivos a *T. pestanai*. Esto podría explicarse por el clima más húmedo y templado típico de bosques y arbustos en esa zona, que favorece la supervivencia y reproducción de las pulgas (Balestrieri et al., 2009; Cox et al., 1999). En contraste, la región mediterránea presenta un ambiente más cálido y seco, que limita la proliferación de la pulga sospechosa de actuar como vector. Además, los tejones eurosiberianos suelen formar grupos sociales más grandes y estables, lo que facilita la transmisión de parásitos entre individuos. Por el contrario, en la zona mediterránea los grupos son generalmente más pequeños y su uso del hábitat es más disperso, lo que contribuye a reducir el contacto y la transmisión del parásito (Bonet-Arbolí et al., 2005; Lara-Romero et al., 2012; Virgós et al., 2005). También se observa que los tejones eurosiberianos emplean madrigueras estables y compartidas durante largos periodos de tiempo, favoreciendo la acumulación de vectores (Kruuk, 1978). En cambio, en el área mediterránea el uso de madrigueras es más esporádico o las condiciones internas resultan menos adecuadas para estos ectoparásitos (Revilla et al., 2001).

Desgraciadamente, el origen de las muestras (individuos atropellados) nos ha impedido estudiar la potencial asociación entre la presencia de pulgas y otros ectoparásitos en los tejones y la presencia de ADN de *T. pestanai*, debido a que dichos vectores suelen abandonar al hospedador una vez éste muere. Al desconocer cuánto tiempo llevaba el individuo muerto, cualquier asociación que se pudiera intentar resultaría espuria.

En contraste, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos de sexo y edad. Sin embargo, se aprecia una tendencia en la que los machos parecen ser más susceptibles a resultar positivos que las hembras y los adultos que los juveniles. La falta de significación estadística podría deberse al tamaño reducido de la muestra, lo cual limita la potencia estadística del análisis. Sin embargo, es posible que, en este caso, no exista una relación real entre el sexo y la susceptibilidad a ser positivo. Este patrón ha sido también reportado en otros estudios. Por ejemplo, Ideozu et al. (2015) no hallaron una asociación significativa entre la presencia del parásito y variables como el sexo, la edad o la condición corporal en tejones.

En cuanto a la variable edad, tampoco se encontraron valores significativos. En contraste, algunos estudios han encontrado resultados opuestos. Por ejemplo, Lizundia et al. (2011) reportaron una mayor prevalencia de infección en individuos jóvenes en comparación con los adultos. Los autores achacaron esta diferencia al comportamiento de los jóvenes, quienes suelen pasar más tiempo en madrigueras contaminadas con ectoparásitos, como señalan Butler & Roper (1966). Este mayor tiempo de permanencia en ambientes propicios para la transmisión podría explicar su mayor vulnerabilidad, algo que no ha podido ser confirmado en el presente estudio.

Finalmente, para aquellas muestras que han resultado positivas, sería conveniente realizar una amplificación mediante PCR convencional, como paso previo a su secuenciación, lo que permitiría confirmar la identidad del patógeno de forma más precisa. Asimismo, es importante señalar que, para una adecuada tipificación de *T. pestanai*, se recomienda la utilización de al menos dos marcadores genéticos: el gen 18S rARN y el gen cox1 (citocromo c oxidasa subunidad 1). El empleo conjunto de ambos genes permite aumentar la fiabilidad y la resolución de la identificación molecular, minimizando errores de clasificación y mejorando la precisión taxonómica (Lecocq et al., 2015).

7. CONCLUSIONES

1. El presente estudio confirma la presencia de *T. pestanai* por primera vez en tejones de la península ibérica.
2. La prevalencia observada entra en el rango de lo publicado en otras zonas de Europa.
3. Las técnicas de PCR a tiempo real utilizadas (SYBR Green como sonda TaqMan), han demostrado tener un excelente grado de concordancia. Esto las convertiría en un método adecuado para estudios de diagnóstico molecular y vigilancia epidemiológica.
4. Los resultados obtenidos indican que la prevalencia de *T. pestanai* es mayor en la región eurosiberiana en comparación con la mediterránea, lo que sugiere que las zonas de clima más húmedo favorecen la transmisión del parásito.
5. Sería conveniente realizar una amplificación mediante PCR convencional y seguidamente la secuenciación de las muestras para confirmar la identidad del parásito y estudiar posibles variaciones genéticas del mismo.
6. Se sugiere realizar nuevos estudios con tejones capturados vivos para conocer mejor la influencia de factores no estudiados aquí como la presencia de pulgas, estudiar la presencia concomitante de otros patógenos, así como buscar lesiones histopatológicas asociadas a la presencia del parásito en tejones muertos.

CONCLUSIONS

1. This study confirms the presence of *T. pestanai* in badgers from the Iberian Peninsula for the first time.
2. The observed prevalence falls within the range reported in other parts of Europe.
3. The real-time PCR techniques used (both SYBR Green and TaqMan probe) showed excellent agreement, suggesting they are suitable methods for molecular diagnosis and epidemiological surveillance.
4. The results indicate a higher prevalence of *T. pestanai* in the Eurosiberian region compared to the Mediterranean region, suggesting that more humid climates may favor parasite transmission.
5. It would be advisable to perform conventional PCR amplification followed by sequencing of the samples to confirm the parasite's identity and assess possible genetic variations.
6. Further studies involving live-captured badgers are recommended to better understand the influence of factors not addressed here, such as flea presence, co-infection with other pathogens, and to investigate histopathological lesions associated with the parasite in dead badgers.

8. VALORACIÓN PERSONAL

La realización de este trabajo ha supuesto un desafío personal y académico. En primer lugar, la propuesta de este trabajo del director Javier me ha brindado la oportunidad de profundizar en la parasitología de la fauna silvestre, del mismo modo me ha permitido aplicar y ampliar los conocimientos durante mis estudios. Además, he tenido la posibilidad de poder adquirir conocimientos laboratoriales y conocer nuevas fuentes de búsqueda y nuevos softwares para trabajos científicos. Por otro lado, he mejorado la lectura y comprensión de artículos científicos en inglés, así como la expresión escrita en el mismo idioma. Todo esto y el trabajo diario en el laboratorio me ha enseñado a trabajar en equipo y mostrarme cómo se trabaja en las investigaciones científicas.

Quiero agradecer a todo el mundo que ha colaborado conmigo en el trabajo. En especial a mis tutores Javier y Paz, la paciencia y la dedicación que me han otorgado durante toda la realización del trabajo. Gracias a Paz por su ayuda y cercanía sobre todo en los momentos más grises en el laboratorio. También agradecer a todo el departamento de parasitología y a las técnicas de laboratorio que sin ellas el trabajo no habría salido adelante.

Por último, no hubiese llegado hasta aquí sin toda la gente que me ha apoyado. Gracias a mis padres, mi hermano y a toda la gente de la carrera que se ha convertido en familia. Se acaba una gran etapa, pero empieza otra nueva y espero poder seguir compartiendo este viaje con vosotros. Gracias a todos.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Anwar, A., Knaggs, J., Service, K. M., McLaren, G. W., Riordan, P., Newman, C., Delahay, R. J., Cheesman, C., & Macdonald, D. W. (2006). Antibodies to *Toxoplasma gondii* in Eurasian Badgers. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(1), 179-181. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.1.179>
- Aregawi, W. G., Agga, G. E., Abdi, R. D., & Büscher, P. (2019). Systematic review and meta-analysis on the global distribution, host range, and prevalence of *Trypanosoma evansi*. *Parasites & Vectors*, 12(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3311-4>
- Ayral, F., Djelouadji, Z., Raton, V., Zilber, A.-L., Gasqui, P., Faure, E., Baurier, F., Vourc'h, G., Kodjo, A., & Combes, B. (2016). Hedgehogs and Mustelid Species: Major Carriers of Pathogenic *Leptospira*, a Survey in 28 Animal Species in France (20122015). *PLOS ONE*, 11(9), e0162549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162549>
- Baker, P. J., & Harris, S. (2007). Urban mammals: What does the future hold? An analysis of the factors affecting patterns of use of residential gardens in Great Britain. *Mammal Review*, 37(4), 297-315. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2007.00102.x>
- Balestrieri, A., Remonti, L., & Prigioni, C. (2009). Habitat selection in a low-density badger *Meles meles* population: A comparison of radio-tracking and latrine surveys. *Wildlife Biology*, 15(4), 442-448.
- Balseiro, A., González-Quirós, P., Rodríguez, Ó., Francisca Copano, M., Merediz, I., De Juan, L., Chambers, M. A., Delahay, R. J., Marreros, N., Royo, L. J., Bezos, J., Prieto, J. M., & Gortázar, C. (2013). Spatial relationships between Eurasian badgers (*Meles meles*) and cattle infected with *Mycobacterium bovis* in Northern Spain. *The Veterinary Journal*, 197(3), 739-745. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.03.017>
- Barlow, A. M., Schock, A., Bradshaw, J., Mullineaux, E., Dastjerdi, A., Everest, D. J., McGowan, S., Steinbach, F., & Cowen, S. (2012). Parvovirus enteritis in Eurasian badgers (*Meles meles*). *Veterinary Record*, 170(16), 416-416. <https://doi.org/10.1136/vr.100680>
- Beaver, CH., Jung, R. C., & Cupp, E. W. (2003). *Parasitología clínica de Craig Faust*. Masson Editores.
- Bezerra-Santos, M. A., Ramos, R. A. N., Campos, A. K., Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2021). *Didelphis* spp. opossums and their parasites in the Americas: A One Health perspective. *Parasitology Research*, 120(12), 4091-4111. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07072-4>
- Blanco Vázquez, C., Barral, T. D., Romero, B., Queipo, M., Merediz, I., Quirós, P., Armenteros, J. Á., Juste, R., Domínguez, L., Domínguez, M., Casais, R., & Balseiro, A. (2021). Spatial and Temporal Distribution of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Infection in Eurasian Badger (*Meles*

- meles) and Cattle in Asturias, Spain. *Animals*, 11(5), 1294. <https://doi.org/10.3390/ani11051294>
- Bonet-Arbolí, V., Rafart, E., RODRÍGUEZ-TEIJEIRO, F. L. Y. J., & Llimona, F. (2005). Ecología del tejón (Meles meles) en espacios naturales metropolitanos: El caso de Collserola (NE Península Ibérica). Pp: 119-147. *Ecología y conservación del tejón en ecosistemas mediterráneos. SECEM, Málaga*.
- Büscher, G., & Friedhoff, K. T. (1984). The morphology of ovine Trypanosoma melophagium (Zoomastigophorea: Kinetoplastida). *The Journal of Protozoology*, 31(1), 98-101. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1984.tb04297.x>
- Calatayud, O., Esperón, F., Velarde, R., Oleaga, Á., Llaneza, L., Ribas, A., Negre, N., De la Torre, A., Rodríguez, A., & Millán, J. (2020, octubre 3). Genetic characterization of Carnivore Parvoviruses in Spanish wildlife reveals domestic dog and cat-related sequences. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(2), 626-634.
- Canuti, M., Mira, F., Villanúa, D., Rodríguez-Pastor, R., Guercio, A., Urra, F., & Millán, J. (2025). Molecular ecology of novel amdoparvoviruses and old protoparvoviruses in Spanish wild carnivorans. *Infection, Genetics and Evolution*, 128, 105714. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2025.105714>
- Chiari, M., Ferrari, N., Giardiello, D., Lanfranchi, P., Zanoni, M., Lavazza, A., & Alborali, L. G. (2014). Isolation and identification of Salmonella spp. From red foxes (Vulpes vulpes) and badgers (Meles meles) in northern Italy. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0086-7>
- Combes, C. (2001). *Parasitism: The ecology and evolution of intimate interactions*. University of Chicago Press.
- Corner, L. A. L., Murphy, D., & Gormley, E. (2011). Mycobacterium bovis Infection in the Eurasian Badger (Meles meles): The Disease, Pathogenesis, Epidemiology and Control. *Journal of Comparative Pathology*, 144(1), 1-24. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.10.003>
- Cox, R., Stewart, P., & Macdonald, D. (1999). The ectoparasites of the European badger, Meles meles, and the behavior of the host-specific flea, Paraceras melis. *Journal of Insect Behavior*, 12, 245-265.
- Davis, J. W., & Anderson, R. C. (1973). *Enfermedades parasitarias de los mamíferos salvajes*. Acibria.
- De Fuentes-Vicente, J. A., Gutiérrez-Cabrera, A. E., Flores-Villegas, A. L., Lowenberger, C., Benelli, G., Salazar-Schettino, P. M., & Córdoba-Aguilar, A. (2018). What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying Trypanosoma cruzi-triatomine interactions. *Acta Tropica*, 183, 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.04.008>

- Del Río, L., Chitimia, L., Cubas, A., Victoriano, I., De La Rúa, P., Gerrikagoitia, X., Barral, M., Muñoz-García, C. I., Goyena, E., García-Martínez, D., Fisa, R., Riera, C., Murcia, L., Segovia, M., & Berriatua, E. (2014). Evidence for widespread *Leishmania infantum* infection among wild carnivores in *L. infantum* periendemic northern Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 113(4), 430-435. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.12.001>
- Desquesnes, M. (2004). *Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America*. OIE.
- Dyachenko, V., Steinmann, M., Bangoura, B., Selzer, M., Munderloh, U., Dauschies, A., & Barutzki, D. (2017). Co-infection of *Trypanosoma pestanai* and *Anaplasma phagocytophilum* in a dog from Germany. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 9, 110-114. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.06.001>
- Elmayan, A., Tu, W., Duhon, B., Marx, P., Wolfson, W., Balsamo, G., Herrera, C., & Dumonteil, E. (2019). High prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in shelter dogs from southern Louisiana, USA. *Parasites & Vectors*, 12(1), 322. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3572-y>
- Eloy, L., & Lucheis, S. (2009). Canine trypanosomiasis: Etiology of infection and implications for public health. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 15(4), 589-611. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992009000400002>
- Fernandez Martinez, B., Herrador, Z., García-García, D., Navarro-Erro, A., & Gomez-Barroso, D. (2023). Vectores y enfermedades transmitidas por vectores en España: Del siglo XX al siglo XXI. *Elsevier*, 6-56.
- Fetene, E., Leta, S., Regassa, F., & Büscher, P. (2021). Global distribution, host range and prevalence of *Trypanosoma vivax*: A systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, 14(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04584-x>
- Gómez, A., & Nichols, E. (2013). Neglected wild life: Parasitic biodiversity as a conservation target. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2, 222-227. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2013.07.002>
- Gürtler, R. E., & Cardinal, M. V. (2015). Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 151, 32-50. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.029>
- Hamill, L. C., Kaare, M. T., Welburn, S. C., & Picozzi, K. (2013). Domestic pigs as potential reservoirs of human and animal trypanosomiasis in Northern Tanzania. *Parasites & Vectors*, 6(1), 322. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-322>
- Herrera, A. A. (2008). *Vertebrados del Plioceno superior terminal en el suroeste de Europa: Fonelas P-1 y el Proyecto Fonelas* (Número 10). IGME.

- Ideozu, E. J., Whiteoak, A. M., Tomlinson, A. J., Robertson, A., Delahay, R. J., & Hide, G. (2015). High prevalence of trypanosomes in European badgers detected using ITS-PCR. *Parasites & Vectors*, 8(1), 480. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1088-7>
- INSTITUTO GEOGRÁFICO NACIONAL (2019): España en mapas. Una síntesis geográfica. Serie Compendios del Atlas Nacional de España (ANE). Madrid, Centro Nacional de Información Geográfica, 620 pp. Ver lista de participantes en www.ign.es/resources/ane/participantes.pdf. Disponible en: <https://doi.org/10.7419/162.06.2018>
- Kaplan, R. M., & Vidyashankar, A. N. (2012). An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary parasitology*, 186(1-2), 70-78.
- Karbowiak, G., Wita, I., & Czaplińska, U. (2009). The occurrence and ultrastructure of *Trypanosoma* (Herpetosoma) lewisi (Kent, 1880) Laveran and Mesnil, 1901, the parasite of rats (*Rattus norvegicus*) in Poland. *Wiadomości parazytologiczne*, 55, 249-258.
- Kasozi, K. I., Zirintunda, G., Ssempijja, F., Buyinza, B., Alzahrani, K. J., Matama, K., Nakimbugwe, H. N., Alkazmi, L., Onanyang, D., Bogere, P., Ochieng, J. J., Islam, S., Matovu, W., Nalumenya, D. P., Batiha, G. E.-S., Osuwat, L. O., Abdelhamid, M., Shen, T., Omadang, L., & Welburn, S. C. (2021). Epidemiology of Trypanosomiasis in Wildlife—Implications for Humans at the Wildlife Interface in Africa. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 621699. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.621699>
- Koual, R., Buysse, M., Grillet, J., Binetruy, F., Ouass, S., Sprong, H., Duhayon, M., Boulanger, N., Jourdain, F., Alafaci, A., Verdon, J., Verheyden, H., Rispe, C., Plantard, O., & Duron, O. (2023). Phylogenetic evidence for a clade of tick-associated trypanosomes. *Parasites & Vectors*, 16(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05622-y>
- Kruuk, H. (1978). Spatial organization and territorial behaviour of the European badger *Meles meles*. *Journal of Zoology*, 184(1), 1-19.
- Krzysiak, M. K., Świątalska, A., Plis-Kuprianowicz, E., Konieczny, A., Bakier, S., Tomczuk, K., & Laska, M. (2024). Fatal *Sarcoptes scabiei* and *Demodex* sp. Co-infestation in wolves (*Canis lupus*) at the Białowieża National Park, Poland – is it a consequence of climate change? *Journal of Veterinary Research*, 68(4), 551-562. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2024-0068>
- Kuhnert, P., Brodard, I., Ackermann, S., Schierack, P., & Jores, J. (2024). Serological and molecular detection as well as typing of *Leptospira* spp. In foxes, raccoons, and other wild carnivores in North-Eastern Germany, 2021–2022. *Heliyon*, 10(1), e23268. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23268>

- Lara-Romero, C., Virgós, E., Escribano-Ávila, G., Mangas, J., Barja, I., & Pardavila, X. (2012). Habitat selection by European badgers in Mediterranean semi-arid ecosystems. *Journal of arid environments*, 76, 43-48.
- Lecocq, T., Dellicour, S., Michez, D., Dehon, M., Dewulf, A., De Meulemeester, T., Brasero, N., Valterová, I., Rasplus, J., & Rasmont, P. (2015). Methods for species delimitation in bumblebees (Hymenoptera, Apidae, *Bombus*): Towards an integrative approach. *Zoologica Scripta*, 44(3), 281-297. <https://doi.org/10.1111/zsc.12107>
- Lindhorst, Z. T. L., Brandstetter, S., Unterköfler, M. S., Eigner, B., Spergser, J., Colyn, M., Steinbach, P., Ćirović, D., Šprem, N., Dumić, T., Veneziano, V., Müller, F., Harl, J., Deak, G., Ionică, A. M., Heddergott, M., & Fuehrer, H.-P. (2024). Molecular analysis of vector-borne pathogens in Eurasian badgers (*Meles meles*) from continental Europe. *Parasites & Vectors*, 17(1), 451. <https://doi.org/10.1186/s13071-024-06515-y>
- Linhart, P., Bandouchová, H., Zukal, J., Votypka, J., Kokurewicz, T., Dundarova, H., Apoznanski, G., Heger, T., Kubickova, A., Němcová, M., Piaček, V., Sedláčková, J., Seidlová, V., Berkova, H., Hanzal, V., & Pikula, J. (2020). Trypanosomes in Eastern and Central European bats. *Acta Veterinaria Brno*, 89(1), 69-78. <https://doi.org/10.2754/avb202089010069>
- Lizundia, R., Newman, C., Buesching, C. D., Ngugi, D., Blake, D., Sin, Y. W., Macdonald, D. W., Wilson, A., & McKeever, D. (2011). Evidence for a Role of the Host-Specific Flea (*Paraceras melis*) in the Transmission of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *pestanai* to the European Badger. *PLoS ONE*, 6(2), e16977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016977>
- Marcili, A., Costa, A. P. D., Nunes, P. H., Ferreira, J. I. G. D. S., Tonhosolo, R., Bosco, V. C., Pesenato, I. P., Roxo, F. F., Aparecida Nieri Bastos, F., Pacheco, R. C., Rossi, R. V., Semedo, T. B. F., Shio, M. T., & Bahia Labruna, M. (2025). Description of Four New *Trypanosoma* Species Infecting Small Wild Mammals from Two Brazilian Biomes: The Pantanal and Cerrado Hotspots. *Microorganisms*, 13(6), 1257. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13061257>
- Marcogliese, D. J. (2005). Parasites of the superorganism: Are they indicators of ecosystem health? *International journal for parasitology*, 35(7), 705-716.
- Millán, J., G. Candela, M., López Bao, J. V., Pereira, M., Jiménez, M. A., & León-Vizcaíno, L. (2009, octubre 16). Leptospirosis in Wild and Domestic Carnivores in Natural Areas in Andalusia, Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9(5), 549-554.
- Millán, J., Ruiz-Fons, F., Márquez, F. J., Viota, M., López-Bao, J. V., & Paz MARTÍN-MATEO, M. (2007). Ectoparasites of the endangered Iberian lynx *Lynx pardinus* and sympatric wild and domestic carnivores in Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, 21(3), 248-254. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2007.00696.x>

- Millán, J., Sevilla, I., Gerrikagoitia, X., García-Pérez, A. L., & Barral, M. (2004). Helminth parasites of the Eurasian badger (*Meles meles* L.) in the Basque Country (Spain). *European Journal of Wildlife Research*, 50(1), 37-40. <https://doi.org/10.1007/s10344-003-0032-x>
- Morrison, L. J., McLellan, S., Sweeney, L., Chan, C. N., MacLeod, A., Tait, A., & Turner, C. M. R. (2010). Role for Parasite Genetic Diversity in Differential Host Responses to *Trypanosoma brucei* Infection. *Infection and Immunity*, 78(3), 1096-1108. <https://doi.org/10.1128/IAI.00943-09>
- Murphy, N., Macchiaverna, N. P., Victoria Cardinal, M., Bhattacharyya, T., Mertens, P., Zeippen, N., Gustin, Y., Gillemann, Q., Gürtler, R. E., & Miles, M. A. (2019). Lineage-specific rapid diagnostic tests can resolve *Trypanosoma cruzi* TcII/V/VI ecological and epidemiological associations in the Argentine Chaco. *Parasites & Vectors*, 12(1), 424. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3681-7>
- Musinguzi, S. P., Suganuma, K., Asada, M., Laohasinnarong, D., Sivakumar, T., Yokoyama, N., Namangala, B., Sugimoto, C., Suzuki, Y., Xuan, X., & Inoue, N. (2016). A PCR-based survey of animal African trypanosomosis and selected piroplasm parasites of cattle and goats in Zambia. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(12), 1819-1824. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0240>
- Neumüller, M., Nilsson, K., & Pålsson, C. (2012). *Trypanosoma* spp. In Swedish game animals. *Parasitology Research*, 110, 135-139. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2462-9>
- Oleaga, Á., Vázquez, C. B., Royo, L. J., Barral, T. D., Bonnaire, D., Armenteros, J. Á., Rabanal, B., Gortázar, C., & Balseiro, A. (2022). Canine distemper virus in wildlife in south-western Europe. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(4). <https://doi.org/10.1111/tbed.14323>
- Otranto, D., Cantacessi, C., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Pfeffer, M., Genchi, C., Guberti, V., Capelli, G., & Deplazes, P. (2015). The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe. Part II: Helminths and arthropods. *Veterinary Parasitology*, 213(1-2), 24-37. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.020>
- Palomo, L. J., Gisbert, J., & Blanco, J. C. (2007). *Atlas y libro rojo de los mamíferos terrestres de España*. Organismo Autónomo de Parques Nacionales Madrid.
- Peirce, M. A., & Neal, C. (1974). *Trypanosoma* (Megatrypanum) *pestanai* in British badgers (*Meles meles*). *International Journal for Parasitology*, 4(4), 439-440. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(74\)90055-1](https://doi.org/10.1016/0020-7519(74)90055-1)
- Peris, M. P., Martínez-Durán, D., García, P., González, C., Morales, M., Castillo, J. A., Badiola, J. J., & Moreno, B. (2024). *Leishmania infantum* infection in European badgers (*Meles meles*) from northeastern Spain: A histopathological and immunohistochemical investigation. *Parasitology Research*, 123(10), 346. <https://doi.org/10.1007/s00436-024-08369-w>

- Portillo, A., Ruiz-Arrondo, I., & Oteo, J. A. (2018). Artrópodos vectores en España y sus enfermedades transmisibles. *Medicina Clínica*, 151(11), 450-459. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2018.06.021>
- Radwanska, M., Vereecke, N., Deleeuw, V., Pinto, J., & Magez, S. (2018). Salivarian Trypanosomosis: A Review of Parasites Involved, Their Global Distribution and Their Interaction With the Innate and Adaptive Mammalian Host Immune System. *Frontiers in Immunology*, 9, 2253. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02253>
- Revilla, E., Palomares, F., & Delibes, M. (2001). Edge-core effects and the effectiveness of traditional reserves in conservation: Eurasian badgers in Doñana National Park. *Conservation Biology*, 15(1), 148-158.
- Rioux, J.-A., Albaret, J.-L., Bres, A., & Dumas, A. (1966). Présence de *Trypanosoma pestanai* Bettencourt et França, 1905 chez les Blaireaux du sud de la France. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 41(4), 281-288.
- Rózsa, L., & Garay, J. (2023). Definitions of parasitism, considering its potentially opposing effects at different levels of hierarchical organization. *Parasitology*, 150(9), 761-768. <https://doi.org/10.1017/S0031182023000598>
- Schmidt, G. D., & Roberts, L. S. (1977). *Foundations of parasitology*.
- Sgroi, G., Iatta, R., Paolo Lia, R., Latrofa, M. S., Samarelli, R., Camarda, A., & Otranto, D. (2021). *Trypanosoma (Megatrypanum) pestanai* in Eurasian badgers (*Meles meles*) and Ixodidae ticks, Italy. *Parasitology*, 148(12), 1516-1521. <https://doi.org/10.1017/S0031182021001190>
- Silva, R. A. M. S., Barros, A. T. M., & Herrera, H. M. (1995). Trypanosomosis outbreaks due to *Trypanosoma evansi* in the Pantanal, Brazil. A preliminary approach on risk factors. *Revue d'élevage et de Médecine Vétérinaire Des Pays Tropicaux*, 48(4), 315-319.
- Smith, G. C. (2002). The role of the Badger (*Meles meles*) in rabies epizootiology and the implications for Great Britain. *Mammal Review*, 32(1), 12-25. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2907.2002.00094.x>
- Soulsbury, C. D., Iossa, G., Baker, P. J., Cole, N. C., Funk, S. M., & Harris, S. (2007). The impact of sarcoptic mange *Sarcoptes scabiei* on the British fox *Vulpes vulpes* population. *Mammal Review*, 37(4), 278-296. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2007.00100.x>
- Thompson, R. C. A. (2013). Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. *International Journal for Parasitology*, 43(12-13), 1079-1088. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.007>
- Veitova, L., Pikula, J., Votýpka, J., Linhart, P., Kokesova, V., Lesiczka, P. M., Piacek, V., Sedlackova, J., Sindelarova, A., Heger, T., & Bandouchova, H. (2025). European Brown hare (*Lepus europaeus*)

- as an accidental host of *Trypanosoma pestanai*. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 27, 101079. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2025.101079>
- Villa, A., Gutierrez, C., Gracia, E., Moreno, B., Chacón, G., Sanz, P. V., Büscher, P., & Touratier, L. (2008). Presence of *Trypanosoma theileri* in Spanish Cattle. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149(1), 352-354. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.016>
- Virgós, E., Revilla, E., & Mangas, J. (2005). Factores que determinan la distribución y abundancia del tejón (*Melesmeles*) a escala regional. *Ecología y conservación del tejón en ecosistemas mediterráneos*. Eds: Virgós, E, 149-172.
- Waiswa, C., Olaho-Mukani, W., & Katunguka-Rwakishaya, E. (2003). Domestic animals as reservoirs for sleeping sickness in three endemic foci in south-eastern Uganda. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 97(2), 149-155.
- Wilson, J. S., Hazel, S. M., Williams, N. J., Phiri, A., French, N. P., & Hart, C. A. (2003). Nontyphoidal *Salmonellae* in United Kingdom Badgers: Prevalence and Spatial Distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4312-4315. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4312-4315.2003>
- Zeibig, E. (2014). *Parasitologia Clínica: Uma abordagem clínico-laboratorial*. Elsevier Brasil.