



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Paràsits del fílum Apicomplexa presents a *Larus michahellis*

Laia Ruiz Ponsell

Grau de Biologia

Any acadèmic 2019-20

Treball tutelat per Claudia Paredes Esquivel
Departament de Biologia

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

Toxoplasma gondii, toxoplasmosi, *Larus michahellis*, hoste, ELISA, ou, anticòs, antígen, infecció, *Plasmodium*, *Haemoproteus*, malària aviar, transmissió.

Índex

Resum	1,2
Introducció	3-11
Generalitats de <i>Larus michahellis</i>	3
Generalitats del fílum Apicomplexa.....	4, 5
Cicle vital dels paràsits del fílum Apicomplexa.....	5, 6
Cicle vital de <i>Toxoplasma gondii</i>	6, 7
Epidemiologia i canvis comportamentals causats per <i>T. gondii</i>	7, 8
Toxoplasmosi i la seva transmissió en aus	8,9
Hemo-paràsits del fílum Apicomplexa.....	10
Cicle vital <i>Plasmodium relictum</i>	10, 11
Metodologia	11-14
Zona i data de recol·lecció de les mostres.....	11, 12
Processament de les mostres	12
Immunoanàlisi ELISA.....	12, 13
Anàlisi estadística.....	14
Recerca bibliogràfica.....	14
Resultats	14-17
Discussió	17-20
Conclusió	20
Agraïments	21
Bibliografia	21-26

Resum

El fílum Apicomplexa inclou paràsits intracel·lulars obligats que infecten una gran varietat d'animals. Sovint, es donen transmissions accidentals dels paràsits dels animals als humans, causant greus zoonosis. Aquest treball s'ha centrat en detectar la incidència de *Toxoplasma gondii* en ous de gavines (*Larus michahellis*) de diferents illots adjacents de l'illa de Mallorca. També s'ha realitzat una revisió bibliogràfica dels paràsits causants de la malària aviar (gèneres *Plasmodium* i *Haemoproteus*), que poden afectar la supervivència de les gavines i la salut humana en general. S'ha realitzat un ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) per poder detectar els anticossos contra *T. gondii* presents a les mostres d'ou recol·lectades. Discriminant les distribucions de valors positius i negatius a través del Criteri d'Informació d'Akaike (AIC), amb un nivell de confiança del 95% s'ha obtingut un 14% de mostres positives. Amb un nivell de confiança més estricta (99%), es manté la majoria d'aquests positius.

Un canvi d'hostes de *T. gondii*, infectant tant a mamífers com aus (marins i terrestres), representa un risc per als ecosistemes i la salut humana, sobretot en illes. En canvi, els paràsits causants de la malària aviar no poden experimentar un canvi d'hoste tan fàcilment; encara que els paràsits que afecten les aus podrien afectar també als rèptils degut a que ambdós presenten eritròcits nucleats. Per aquesta mateixa raó, les espècies de paràsits que causen la malària aviar, difícilment infectarien mamífers.

Els anticossos detectats podrien procedir, almenys en part, de transmissió vertical. La parasitèmia als illots és considerablement més baixa en relació a estudis realitzats a zones continentals. Aquesta diferència es deu, probablement, a la influència de diversos factors naturals i antròpics que disminueixen notablement tant la transmissibilitat com la prevalença. La conservació de la fauna marina i la salut pública es veuen condicionades per la transmissió de la toxoplasmosi.

Abstract

Apicomplexa is a large and diverse group of parasites infecting a wide variety of animal species. Sometimes, accidental infections of this kind of parasites can affect humans causing zoonosis. The aim of this work is to detect the incidence of *Toxoplasma gondii* in eggs of yellow-legged gulls (*Larus michahellis*) of different islets near Mallorca, as well as to perform a bibliographic review of apicomplexan parasites causing avian malaria (genera *Plasmodium* and *Haemoproteus*), that can affect human health and gull survival. An ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) was done to detect antibodies against *T. gondii* in the collected eggs samples. Discriminating the distributions of positive and negative results throw the Akaike Information Criterion (AIC), 14% of samples were positive with a 95% confidence interval. With a more conservative confidence interval (99%), most of these positives are retained.

A host switch of *T. gondii* infecting both birds and mammals (marine and terrestrial) constitutes a risk for ecosystems, as well as for human health, especially on islands. In contrast, parasites causing avian malaria cannot easily experience a major host switch. Nevertheless, malaria parasites affecting birds could also infect reptiles since they share nucleated erythrocytes. For this reason, it is unlikely that *Plasmodium* parasites causing avian malaria could produce malaria in humans or mammals.

The detected antibodies to *T. gondii* could derive, at least partially, from vertical transmission. Parasitemia in islands is considerably lower than reported by studies performed in continental areas. Such difference is likely due to natural and anthropic factors noticeably reducing both transmissibility and prevalence. Transmission of toxoplasmosis impinges upon conservation of marine fauna and public health.

Introducció

Generalitats de *Larus michahellis*

Les gavines del gènere *Larus* conformen un grup d'espècies molt homogeni, amb grans poblacions que tenen gran adaptabilitat comportamental, ja sigui a zones antropitzades o a zones naturals. La gavina de potes grogues (*Larus michahellis*) és una espècie de gavina gran que està distribuïda arreu del Mediterrani occidental, com també per tota la península Ibèrica (Real et al., 2017). Així mateix, recentment s'ha observat que la distribució d'aquesta espècie ha augmentat, ja que actualment s'ha estès per bona part d'Europa, i també a Àfrica. La seva zona de reproducció preferent és la conca del Mediterrani occidental, encara que també s'han observat algunes nidacions a la costa atlàntica ibèrica (López, Pérez, Rumeu, i Nogales, 2016).

Moltes vegades, les gavines estan íntimament lligades a l'activitat humana i a les grans ciutats. En algunes zones on s'acumulen productes de rebuig, com en són les plantes de reciclatge o els abocadors (Clave, 2012), han esdevingut un problema. Un estudi realitzat a l'illa d'El Hierro, afirma que les gavines han adoptat un comportament omnívor. Tot i que normalment tenen preferència per menjar invertebrats terrestres durant tot l'any, també mengen invertebrats i vertebrats marins quan es troben a les zones de costa. Durant la tardor tenen una dieta totalment mixta, ja que s'alimenten en proporcions molt semblants de vertebrats marins i de invertebrats terrestres; mentre que durant la primavera s'alimenten pràcticament d'invertebrats terrestres, encara que també s'alimenten d'alguns invertebrats marins (López et al., 2016). Això suposa que tresquen enmig del fems per intentar trobar menjar, per la qual cosa poden ser vectors molt importants d'algunes patologies que poden causar zoonosis en humans, com per exemple la salmonel·losi o la toxoplasmosi.

Pel que fa la seva reproducció, gairebé totes les espècies del gènere *Larus* són espècies poliàndriques, la qual cosa significa que una mateixa femella s'aparella amb dos o més mascles per assegurar la seva descendència. Un estudi afirma que l'evolució ha fet que les femelles tinguin una mida més petita degut a la poliàndria de l'espècie (Székely et al., 2000). Aquesta diferència de mida entre mascles i femelles determina també l'hàbitat on es solen establir, així com la zona cap on migren. D'aquests i d'altres factors dependrà la selecció sexual perquè el més adaptat a les regions on es duguin a terme les migracions pugui sobreviure (Székely i Reynolds, 1995).

S'han realitzat nombrosos estudis sobre l'ecologia de les gavines (Bosch, et al., 2011; Real et al., 2017; Székely et al., 2000), però molts pocs inclouen els seus paràsits. En relació al filum Apicomplexa, aquesta manca d'estudis és força important. Tota la informació publicada apunta la possibilitat que les gavines siguin reservoris importants de la toxoplasmosi. A les Balears, la poca bibliografia existent suggereix la necessitat de continuar la investigació en aquest àmbit.

Generalitats del fílum Apicomplexa

El fílum Apicomplexa és un dels grups més extensos i diversificats de paràsits intracel·lulars obligats; està format per més de 5000 espècies, amb una alta capacitat d'infectar a gran part dels animals i amb cicles vitals complexos. N'hi ha que tenen la capacitat d'infectar als humans, com són els que pertanyen als gèneres *Plasmodium*, *Cryptosporidium*, *Babesia* i *Toxoplasma* (Kim i Weiss, 2004), entre d'altres. Estudis prèviament realitzats sobre altres paràsits del fílum en qüestió confirmen que hi ha transmissió dels paràsits tant a les aus com als humans, com n'és el cas de *Cryptosporidium* (O'donoghue, 1995).

Els hostes habituals dels apicomplexes són vertebrats, sent també són patògens oportunistes per als humans, fet que pot causar greus zoonosis. Aquest grup de paràsits té una sèrie de característiques morfològiques comuns associades a la capacitat d'infectar cèl·lules animals: el complex apical format per les roptries, els micronemes i la conoide. Aquestes estructures serveixen com a característiques de diagnòstic per a la seva detecció (Morrissette i Sibley, 2002).

La malària humana és una malaltia ben coneguda i molt estudiada, causada per apicomplexes del gènere *Plasmodium*. D'altra banda, la malària aviar és una malaltia que afecta tant a les poblacions d'aus endèmiques com a les poblacions d'aus migratòries (Huijben et al., 2007). Està causada per paràsits de dos gèneres que pertanyen a la mateixa classe Haemosporidia: *Haemoproteus* i *Plasmodium* (espècies que només afecten a ocells). Aquests paràsits poden infectar diferents hostes intermedis per poder completar els seus cicles vitals; habitualment es tracta d'ocells, dins el quals el paràsit es multiplica asexualment, formant clons amb dotació diploide. Així arriben als hostes definitius: dípters hematòfags específics, on es produeix la reproducció sexual. Alguns estudis postulen que el canvi climàtic i les mutacions que adquireix el paràsit alteren l'equilibri entre el paràsit i l'hoste, per la qual cosa la malària pot esdevenir una epidèmia. Així doncs, es planteja si realment la malària aviar podria esdevenir una epidèmia a Europa, així com s'ha produït, per exemple, a Hawaii (Benning et al., 2002).

Un altre apicomplex important és *Toxoplasma gondii*, mundialment estès, que afecta a pràcticament tots els organismes homeotermes (Sibley, 2003). És un paràsit zoonòtic, és a dir, infecta als humans i a altres espècies animals, causant-los la toxoplasmosi. En humans, aquesta malaltia resulta una de les infeccions parasitàries més comuns, moltes vegades asimptomàtica en pacients immunocompetents (Nardoni et al., 2019), ja que el propi sistema immunitari pot reduir-ne la morbiditat (Da Silva et al., 2017). Tot i això, no s'ha vist que hi hagi individus que tinguin un sistema immune capaç d'eliminar per complet el paràsit. D'aquesta manera, el paràsit s'assegura de tenir una permanència dins l'hoste per tal que en sigui una font de contagi i, així, es pugui produir la transmissió d'un hoste a l'altre, permetent que *T. gondii* pugui arribar al seu hoste definitiu i completar el seu cicle vital. Així doncs, els animals homeotermes, on s'hi troben incloses les aus, són potencials hostes intermedis de *T. gondii*.

Com que els dos paràsits tenen una transmissió molt diferent, no es poden estudiar de manera conjunta, per la qual cosa s'ha realitzat una investigació experimental per a *T. gondii* i una revisió bibliogràfica per als hemo-paràsits causants de la malària aviar.

L'objectiu d'aquest treball ha estat estudiar la incidència de *T. gondii* en ous de gavines vulgars (*L. michahellis*) dels illots subjacents a l'illa de Mallorca. També s'ha intentat establir a quin punt es troba la recerca de la malària aviar a través d'una cerca bibliogràfica que ha permès contrastar la informació amb la de *T. gondii* i altres paràsits del fílum Apicomplexa que afecten a *L. michahellis*.

Cicle vital dels paràsits del fílum Apicomplexa

Per explorar els factors que poden causar les diferències de seroprevalença entre les Balears i el continent és també necessari considerar els diferents processos que tenen lloc durant el cicle vital complex dels apicomplexes.

Tots els cicles vitals dels apicomplexes (**Fig. 1**) tenen una sèrie de fases comuns. La fase invasiva de les diferents espècies de paràsits poden ser morfològicament diferents, però compleixen funcions equivalents. Per exemple, l'estadi infectant de *Toxoplasma* i *Plasmodium* són els esporozoïts. Dins els hostes intermedis s'originen, per reproducció asexual els taquizoïts o merozoïts, respectivament. Però dins l'hoste intermedi no es reproduïxen de manera sexual, per la qual cosa a l'interior dels hostes definitius és l'únic lloc on es produeix la fusió dels gametozoïts i es produeix el zigot, el qual donarà lloc a nous esporozoïts.

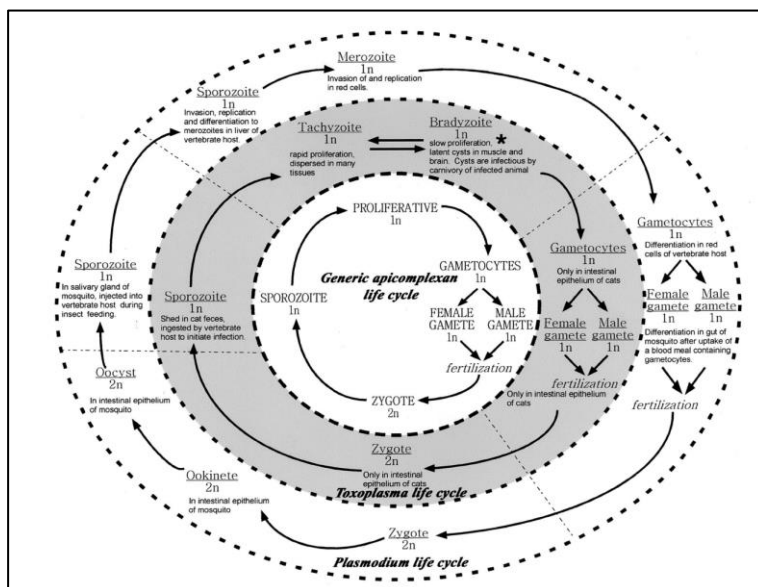


Figura 1. Cicle vital comparatiu de diferents paràsits del fílum Apicomplexa. A l'interior del cercle s'aprecia un cicle general aplicable a qualsevol paràsit d'aquest fílum. A continuació, al segon cercle

s'hi veu representat el cicle vital de *Toxoplasma* sp., i finalment, al cercle més exterior està representat el cicle vital de *Plasmodium* sp. Font: Morrissette i Sibley, 2002.

Cicle vital de *T. gondii*

El cicle vital de *T. gondii* pot tenir lloc en un medi antròpic o en un medi silvestre (**Fig. 2**), i inclou tres formes vitals principals del paràsit: taquizoïts, bradizoïts i esporozoïts. Les tres fases del paràsit són haploides. Així doncs, podem dividir el cicle en dues parts: la fase sexual (quan el paràsit es reproduïx de manera sexual) que inclou la diferenciació de taquizoïts i bradizoïts, i la fase asexual (quan el paràsit es reproduïx de manera asexual) que inclou els esporozoïts (Dubey, 1998).

La fase sexual es duu a terme als intestins dels felins, ja siguin salvatges o domèstics. En canvi, la fase asexual es desenvolupa a l'interior dels d'altres animals homeotèrmes (aus i mamífers) que són hostes intermediaris. Els felins s'infecten a través de la ingesta de mamífers o aus que tenen cists als teixits, provocats per *T. gondii*. Les aus i altres mamífers també es poden contagiar a través de la femta dels felins, ja que amb els productes de rebuig s'excreten oocists (forma de resistència d'alguns paràsits del filum Apicomplexa); els quals esporularan quan estiguin en contacte amb un medi favorable (Sibley et al., 2009). Així doncs, el cicle vital només es completa si hi ha hostes definitius (felins) que excretin aquests oocists. Quan esporulin aquests oocists, esdevindran esporozoïts, que poden ser ingerits o inhalats per qualsevol potencial hoste intermediari. Una vegada s'hagi infectat l'hoste intermediari, el paràsit es reproduirà de manera asexual a l'interior dels seus teixits. Així doncs, els esporozoïts provinents de la fase asexual del cicle vital de *T. gondii*, esdevindran taquizoïts i bradizoïts dins els hostes intermediaris, infectant així l'epiteli intestinal d'aquests. Els bradizoïts són els encarregats de formar els cists als teixits dels hostes intermediaris (fase crònica de la infecció), mentre que els taquizoïts envairan altres teixits i òrgans de manera molt ràpida, però sense arribar a formar cists (fase aguda de la infecció) (Black i Boothroyd, 2000). D'aquesta manera, els taquizoïts són els que poden arribar al sistema nerviós i són els que poden passar al fetus mitjançant la migració transplacentària (Aguirre et al., 2019). La infecció de la descendència, en el cas dels mamífers, es pot dur a terme de manera congènita (via intrauterina o al moment del part) o de manera adquirida després del part.

La infecció congènita es produeix quan la mare s'infecta durant l'embaràs. D'aquesta manera, el fetus s'infectarà pels taquizoïts que migrin a través del cordó umbilical de la mare al fetus. Així mateix, cal destacar que, si la mare s'infecta durant el primer trimestre de l'embaràs, els signes i símptomes adquirits pel fetus són més greus que si la mare s'infecta en el segon i el tercer trimestre (Hill i Dubey, 2002).

En aus, el contagi és diferent ja que la descendència pot adquirir el paràsit i els anticossos durant la formació de l'ou. Una vegada que la closca de l'ou s'ha acabat de formar, ja no hi ha contagi possible. El cicle vital de *T. gondii* es completa quan l'hoste definitiu depreda un hoste intermediari infectat.

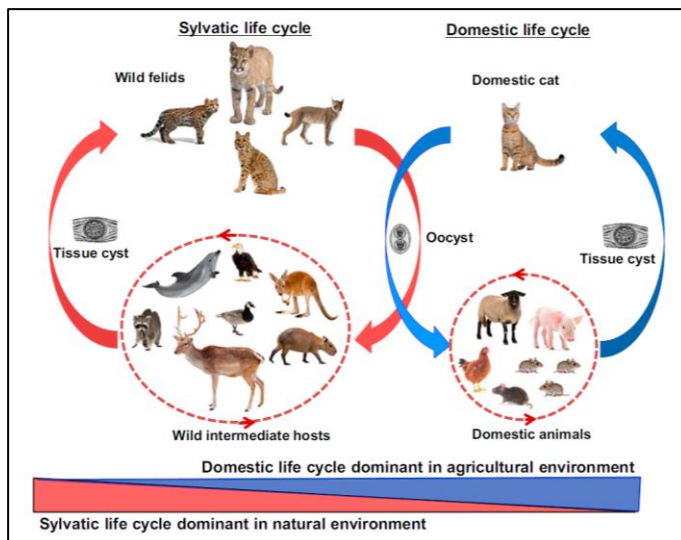


Figura 2. Cicle vital de *T. gondii* en medi silvestre i en medi antròpic (Keats Shwab et al., 2018).

Epidemiologia i canvis comportamentals causats per *T. gondii*

La prevalença de la toxoplasmosi en humans es situa entre el 50 i el 80% a Europa, i entre el 30 i el 90% a Amèrica Central i Sud Amèrica; a algunes zones del Brasil s'arriba a superar el 90% (Aguirre et al., 2019). Aquesta malaltia està qualificada com a “One Health disease” segons Crozier et al. (2014) i Jenkins et al. (2015), ja que afecta a la salut dels humans, els animals domèstics i els animals salvatges, com també als ecosistemes. Així doncs, aquesta infecció parasitària té grans conseqüències pel que fa a la mortalitat i la qualitat de vida dels humans i dels altres animals. Actualment, es calcula que una tercera part de la població mundial està infectada per *T. gondii*. La majoria de les persones infectades són asimptomàtiques, però als pacients immunodeprimits els pot arribar a causar complicacions importants com l'encefalitis (tant en adults com en nins), anomenada encefalitis toxoplàsmica, així com malformacions degudes a la transmissió vertical, és a dir, de la mare al nadó (Keats Shwab et al., 2018).

Per altra banda, cal destacar que algunes activitats humanes poden condicionar la transmissió de *T. gondii*, el qual normalment prové de la natura i arriba a les zones urbanes a través de vectors com puguin ser les gavines (*L. michahellis*) o els moixos (*Felis catus*). Així doncs, és crucial controlar els animals domèstics que en són hosts (com n'és el moix) i evitar també la contaminació ambiental, així com els hàbits alimentaris i la higiene dels espais comuns i privats per tal de minimitzar la transmissió del paràsit (Nardoni et al., 2019). Així mateix, l'existència de moixos assilvestrats, que actuen com a hosts definitius de *T. gondii*, suposen una peça clau en la demografia i l'evolució genètica del paràsit (Carme et al., 2009). Estudis recents demostren que la reproducció sexual de *T. gondii* genera una variabilitat genètica molt elevada en comparació amb altres paràsits (Shwab et al., 2014). Aquesta variabilitat pot estar relacionada amb els casos d'encefalitis que es produeixen quan *T. gondii* envaeix el cervell i causa inflamació de les membranes més externes del cervell. Així doncs, pel que fa a l'evolució de *T. gondii*, no es sap si hi pot haver alguna coadaptació genòmica entre els hosts definitius i el paràsit (Da Silva

et al., 2017); el que sí que es sap és que molts dels genotips del paràsit difereixen en quant a patogenicitat i transmissibilitat. Aquesta diversitat de genotips seria conseqüència de la pressió selectiva sobre el paràsit, el qual ha sofert canvis en el seu genoma per sobreviure dins els hostes.

Pot afectar tant als animals com als humans (Carme et al., 2009). En alguns animals, com en són els ratolins, s'ha vist que *T. gondii* els canvia de manera important el comportament, induint la pèrdua de resposta enfront a una situació perillosa. D'aquesta manera, perden també la por a ser depredats, i per tant s'exposen més als moixos. Així, el paràsit maximitza la seva transmissió i infecció des dels ratolins als moixos (Sibley et al., 2009). També s'ha provat que els ratolins infectats per *T. gondii* experimenten una atracció molt potent per la orina dels moixos, per la qual cosa, aquest factor també fa que s'exposin més allà on hi ha moixos i per tant, que tinguin més possibilitats de ser depredats (Aguirre et al., 2019). El mateix va ocórrer a un estudi on s'avaluava l'exposició dels ximpanzés als lleopards, segons si estaven o no infectats per *T. gondii*. Es va observar, que els ximpanzés infectats pel paràsit no evitaven les zones on hi havia presència d'orina de lleopards, mentre que els que no estaven infectats evitaven aquestes zones perquè les relacionaven com a zones de perill (Poirotte et al., 2016). Així mateix, en humans, *T. gondii* causa modificacions comportamentals com ara canvis de personalitat i incrementa el temps de reacció davant estímuls perillosos, com els accidents de trànsit (Flegr, Havlíček, Kodým, Malý, i Smahel, 2002). També s'ha postulat que *T. gondii* pot influir de manera més àmplia el comportament humà, causant trastorns bipolars i esquizofrènia (Shwab et al., 2014).

Les conseqüències d'aquesta selecció natural afecten tot el cicle de transmissió del paràsit. A més dels humans, si a una àrea geogràfica determinada també hi ha altres mamífers i ocells que actuïn com a hostes intermediaris, s'incrementa el grau de formació de nous polimorfismes del genoma del paràsit. Aquest increment de la variabilitat genètica de *T. gondii* (Da Silva et al., 2017), també incrementa la capacitat d'infecció, ja que no hi haurà, en principi, reservoris resistents a les noves adaptacions genètiques del paràsit. Aquest, ha de controlar en tot moment la progressió de la infecció dins l'hoste, ja que no li interessa matar-lo, sinó que es mantingui amb vida. També cal esmentar que dins els hostes definitius es poden donar pressions selectives diferents, segons els moixos siguin domèstics o assilvestrats, o si hi ha també altres espècies de fèlids (Afonso et al., 2008).

Toxoplasmosi i la seva transmissió en aus

Els ocells, sobretot els salvatges, tenen un paper fonamental en l'epidemiologia de *T. gondii*, ja que són els hostes intermedis del paràsit que actuen com a principal dieta dels hostes definitius, que són els felins. Alguns ocells són migradors, per la qual cosa aquest comportament de canviar d'hàbitat segons l'estació o època de l'any pot fer que s'incrementi l'expansió del paràsit a nivell mundial (Nardoni et al., 2019).

Les aus poden ser exposades al paràsit a través de la ingestió d'aliment o aigua contaminada que pot contenir dues formes: a través dels oocistos o a través de teixits infectats (provinents d'altres hostes també

infectats per *T. gondii*). Tot i això, el paper epidemiològic que juguen les aus en el cicle de vital de *T. gondii* no està massa clar, ja que també es sospita que les aus poden ser agents dispersors del paràsit a alguns territoris on no hi hagi presència de felins, on no es pot completar el seu cicle vital (Cabezón et al., 2016).

En el procés de transport i transmissió de *T. gondii* també hi intervenen diferents invertebrats aquàtics, ja que són aliment de molts ocells, com per exemple de *Larus michahellis*. Així doncs, els invertebrats que actuen com a vectors poden transmetre l'estadi infectant a altres possibles hostes, incloent humans i mamífers marins (Aguirre et al., 2019; Nardoni et al., 2019).

En aus, la simptomatologia de la toxoplasmosi sol ser: apatia, debilitat, trastorn de l'equilibri, espasmes, encefalitis, gastroenteritis, corioretinitis i en els pitjors del casos, la mort (Flores, 1991).

Per altra banda, també cal destacar la possibilitat que els moixos domèstics siguin una font constant de contagi cap als humans, ja que solen caçar ocells salvatges de mida petita, com ara *Passer domesticus*. D'aquesta manera, si l'ocell està infectat amb *T. gondii*, el moix passarà a estar infectat i serà una font activa de contagi del paràsit.

Cal destacar també, que en aus es pot donar la transmissió vertical de *T. gondii*, com també hi ha transmissió vertical d'anticossos contra el paràsit abans que l'ou s'hagi format per complet (Cabezón et al., 2016). Un cop l'ou ha estat post, no existeix cap tipus de transmissió vertical d'anticossos contra *T. gondii* en aus; en canvi, en mamífers sí que hi pot haver una transmissió post-natal d'anticossos a través de la lactància materna (**Fig. 3**) (Boulinier i Staszewski, 2008). El tipus d'immunoglobulines que es transfereixen a la descendència són només les IgG, tot i que varien morfològicament, a algunes regions, entre mamífers i aus; en aus s'anomenen IgY, i es troben en grans quantitats al vermell de l'ou (Boulinier i Staszewski, 2008).

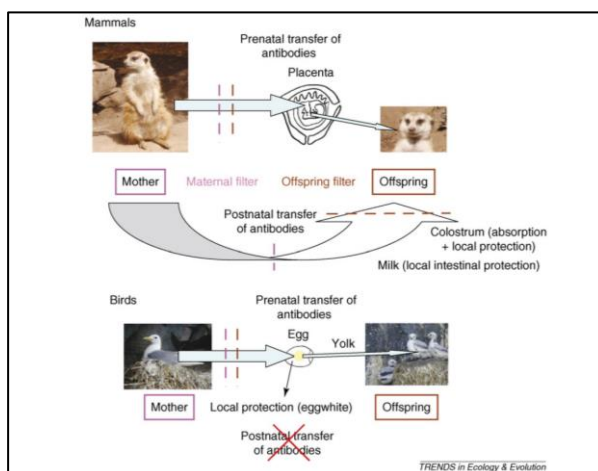


Figura 3. Transmissió d'anticossos en mamífers i en aus (Boulinier i Staszewski, 2008).

Hemo-paràsits del filum Apicomplexa

La principal espècie de paràsit que causa la malària aviar és *Plasmodium relictum*. Aquest, pot completar el seu cicle vital a 26 espècies diferents de moscards de la família Culicidae, incloent els gèneres *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* i *Culiseta* (Iezhova et al., 2005; LaPointe et al., 2006).

Culex pipiens pipiens és el principal vector de la malària aviar (Iezhova et al., 2005), que transmet el paràsit a través de les picades que realitza d'un ocell a un altre. Tot i això, a l'arxipèlag de Hawaii, el vector més prevalent que transmet *P. relictum* és *Culex quinquefasciatus*, tot i que també en poden ser vectors *Aedes albopictus* i *Wyeomyia mitchellii* (LaPointe et al., 2006).

A Europa, algunes investigacions s'han centrat en morts degudes a la malària aviar en zones endèmiques i indígenes, encara que recentment s'han detectat morts degudes a malària aviar a zones no-indígenes, sobretot a Europa. El zoològic de Rotterdam, així com el de Brussel·les en són un exemple (Huijben et al., 2007).

Cicle vital de *Plasmodium relictum*

El cicle vital de *P. relictum* té dues fases: una de reproducció sexual i l'altre de reproducció asexual. La fase de la reproducció sexual del paràsit té lloc a l'interior del tub digestiu (intestí) del mosquit, per la qual cosa *Culex pipiens pipiens* representa l'hoste definitiu del paràsit. És a l'intestí de *C. pipiens pipiens* on es fusionen els gàmetes masculins i femenins del paràsit i formen el zigot. Aquest, es segueix diferenciant i adquireix mobilitat, de tal manera que pot penetrar l'intestí per formar un oocist a la paret del tub digestiu.

Al mateix temps, els esporozoïts es produeixen a l'interior de l'oocist fins que aquest es romp i els esporozoïts s'alliberen al medi. Aquests, migren fins a les glàndules salivals del mosquit. D'aquesta manera, quan el mosquit piqui serà capaç de transmetre esporozoïts mentre xucli la sang de l'hoste (en aquest cas un ocell), ja que la saliva que injecta conté enzims específics que eviten la coagulació de la sang. Els esporozoïts arriben a la circulació sanguínia del l'hoste intermedi i envaeixen diferents òrgans. És allà on proliferen i es converteixen en criptozoïts. Dins aquesta forma del paràsit es desenvolupen els merozoïts, que són els que poden infectar els glòbuls vermells. Aquests merozoïts circulen a través d'un primer cicle exo-eritrocític, a través del qual infecten els macròfags. Part del merozoïts es quedaran en el cicle exo-eritrocític infectant macròfags, però una altra part entrarà dins un cicle eritrocític. Aquest cicle eritrocític consisteix en envair els glòbuls vermells de l'hoste aviar per tal de poder multiplicar-se en forma d'esquizonts. Quan envaeixen les cèl·lules sanguínies es transformen en gametòcits i entren a un segon cicle exo-eritrocític, a través del qual aconseguen envair les cèl·lules endotelials de molts òrgans com per exemple el fetge i el cervell, i és allà on es desenvolupen els fanerozoïts. Aquests són la forma del paràsit que resideix dins l'hoste aviar infectat i és la forma del paràsit que causa la "periodicitat" dels cicles de la malaltia, que solen durar menys d'una setmana, en el cas de *P. relictum*

és normalment 5 dies (Huijben et al., 2007). En canvi la malaria aviar que els hi causa *Haemoproteus* sol tenir cicles d'entre 14 i 32 dies (Székely et al., 2000). Arribats a aquest punt de la infecció, el paràsit és capaç d'induir l'hoste a un estat de coma o la mort.

Metodologia

Zona i data de recol·lecció de les mostres

Els ous analitzats procedeixen de nius de gavina de potes grogues (*Larus michahellis*), de poblacions salvatges a zones costaneres de Mallorca. Els ous es van recol·lectar entre el 5 i el 12 d'abril de 2019, per un equip de l'IMEDEA encapçalat pel Dr. Giacomo Tavecchia i la Dra. Ana Sanz, a diferents illots dels voltants de l'illa de Mallorca: na Moltona, sa Dragonera, sa Porrassa i el Toro. A sa Porrassa es van recol·lectar dia 5 d'abril, a el Toro es varen recol·lectar dia 9 d'abril, a sa Dragonera dia 8 d'abril i finalment el 12 d'abril es varen recol·lectar els ous de na Moltona.



Figura 3. Mapa de Mallorca. Els illots adjacents marcats en vermell corresponen a les zones de mostreig.

Les gavnes de potes grogues solen posar uns 3 ous per posta i niu, però només es va recol·lectar un ou de cada niu. Abans d'agafar-lo, es va comprovar que els ous fossin frescos i fes poc temps que els haguessin post. Per tal de fer aquesta comprovació, es varen introduir els ous en aigua: els ous frescos no floten (Gamble et al., 2019a), per la qual cosa es va agafar un dels ous que no flotaven. La resta d'ous van ser eixugats i retornats al niu. Així doncs, es recol·lectà un total de 65 ous.

A cada un dels ous se li posà un número a la part superior, segons l'ordre de recol·lecció. Es va crear un codi per identificar cada mostra perquè a l'hora del processament fos més senzill saber d'on provenia la mostra: M = na Moltona; D = sa Dragonera; P1 = sa Porrassa; T1 = el Toro. Per exemple: T5 correspon a l'ou número 5 recol·lectat a el Toro; que és el mateix que dir que T5 correspon a un ou del niu número

5, ja que només es va recol·lectar un ou de cada niu. En el cas que hi hagi un número i una lletra a part de la que indica la zona de recol·lecció, indica que s'han agafat dos ous del mateix niu, ja que hi havia més d'un recol·lector recollint ous al mateix temps. Un exemple en seria D21A i D21B.

Els ous es van conservar a 4°C durant una setmana fins els dia del seu processament al laboratori.

Processament de les mostres

Per al processament dels ous, es va separar el rovell del blanc de l'ou i es va introduir per separat dins tubs Falcon i bosses ziploc, prèviament retolats. Es varen utilitzar pipetes Pasteur per agafar el rovell i el blanc de l'ou i poder-los separar amb més facilitat.

Malauradament, a alguns ous es trobaren embrions amb un estadi de desenvolupament bastant avançat. En aquets casos, l'embrió s'ha guardat juntament amb el vermell de l'ou. D'aquesta manera, les mostres que surtin positives a través del mètode ELISA es comprovarà si tenen embrió.

Així mateix, també es varen preparar les mostres per dur a terme la detecció d'anticossos contra *T. gondii* a través del mètode immunològic ELISA. El primer que es va fer va ser preparar el Wash Buffer 1X per tal de diluir el rovell de l'ou. Aquesta solució està composta per PBS (Phosphate Buffer Saline) i Tween 20 al 0,05%. Una vegada es va tenir preparada, es va autoclavar per tal d'evitar possibles contaminacions que poguessin passar a les mostres del ous (Gamble et al., 2019a).

A continuació, es van introduir 1,3 mL de Wash Buffer dins tubs Eppendorf de 2 mL. Es van agafar 200 µL del vermell de l'ou i s'introduïren també dins els Eppendorfs amb Wash Buffer. Cada tub Eppendorf es va vortejar per tal que el vermell es diluís bé en el tampó. Tots els tubs varen ser emmagatzemats a -20°C pel posterior immunoanàlisi ELISA.

Immunoanàlisi ELISA

Es varen realitzar dues immunoanàlisis ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay): el primer dia 9 de juliol de 2019 i el segon dia 30 de setembre de 2019; ambdós duits a terme amb les mateixes condicions i les mateixes mostres.

Es va dur a terme el processament de les mostres per realitzar l'anàlisi immunològica i poder detectar els anticossos contra *Toxoplasma gondii* a través de la tècnica ELISA, més concretament a través d'un Indirect ELISA. Es va utilitzar el protocol del kit comercial ID.vet-ID Screen® Avian Toxoplasmosis Indirect (Indirect ELISA for the detection of antibodies against the *Toxoplasma gondii* in chicken sera), ja que s'ha provat que els anticossos poden usar-se per detectar els d'una altra espècie relacionada (Boulinier i Staszewski, 2008). En aquest cas, s'han emprat els anticossos de gallina contra *T. gondii* per detectar els anticossos contra *T. gondii* de *L. michahellis*.

Es va dur a terme una modificació del protocol, consistent en diluir en proporció 1:1 les mostres amb el Dilution Buffer 14. El control positiu (PC) i el control negatiu (NC) també es van diluir a la meitat amb

Dilution Buffer 14 (Gamble et al., 2019b). Així mateix, com que hi havia pouets de sobra es va preparar un PC així com un altre NC segons les instruccions del kit comercial.

Aquesta tècnica immunològica es basa en la detecció i quantificació d'anticossos, hormones i proteïnes o pèptids. La detecció i posterior quantificació es duu a terme quan l'enzim conjugat s'activa degut a la unió amb el substrat i es crea un producte colorimètric que pot ser quantificat (Lin, 2015). Aquesta quantificació correspondrà amb la quantitat d'anticòs primari que hi hagi a la mostra (Gan et al., 2013). S'utilitza una placa amb 96 pouets, on es durà a terme la unió entre els anticossos i els antígens, donant un producte acolorit que serà quantificat amb un espectrofotòmetre (BioTek PowerWave HT). Com que és una tècnica de detecció indirecta, la placa ja duu els anticossos primaris adherits a la superfície de cada un dels pouets, per la qual cosa només s'afegiran els antígens (control positiu del kit o mostra d'ou). La quantificació es duu a terme mitjançant la introducció de la placa a un espectrofotòmetre especialitzat en llegir les plaques de 96 pouets. La lectura de l'absorbància de cada un dels pouets s'ha dut a terme a 450 nm de longitud d'ona. El disseny de les dues immunoanàlisis realitzades es mostra a les taules 1 i 2.

Taula 1. Disseny de la placa de 96 pouets de la primera anàlisi ELISA (9/7/2019).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC 50	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P12	P13
B	NC 10	P14	P15	P16	T1	T2	T3	T4	T5	T7	T8	T9
C	PC 50	T10	T11	T12	T14	D2	D3	D4	D6	D7	D8	D9
D	PC 10	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20 A
E	D20 B	D21 B	D21 M	D22	D23	D24	D25 M	D26	D27	D28	D1	M1
F	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M13	M14			
G												
H												

	Protocol de (Gamble et al., 2019b) PC (Control Positiu)
	Protocol de (Gamble et al., 2019b) NC (Control Negatiu)
	Protocol del kit comercial (IDVET) NC
	Protocol del kit comercial (IDVET) PC

Taula 2. Disseny de la placa de 96 pouets de la segona anàlisi ELISA (30/09/2019).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC 50	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P12	P13
B	NC 10	P14	P15	P16	T1	T2	T3	T4	T5	T7	T8	T9
C	PC 50	T10	T11	T12	T14	D2	D3	D4	D6	D7	D8	D9
D	PC 10	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20 a
E	D20 b	D21 B	D21 M	D22	D23	D24	D25 M	D26	D27	D28	D1	M1
F	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M13	M14			
G	PC 50	PC 30	PC 20	PC 10	PC 5	PC 2,5	PC 1					
H												

	Protocol de (Gamble et al., 2019b) PC (Control Positiu)
	Protocol de (Gamble et al., 2019b) NC (Control Negatiu)
	Protocol del kit comercial (IDVET) NC
	Protocol del kit comercial (IDVET) PC
	Dilucions del PC

Anàlisi estadística

Una vegada es van obtenir els valors de les absorbàncies de les mostres analitzades, es va dur a terme una anàlisi estadística a través del codi creat per Amandine Gamble, emprant el programa RStudio. Aquesta anàlisi està basada en l'AIC (Criteri d'Informació d'Akaike; Akaike, 1974), a través de la qual es van poder identificar les mostres positives, així com establir un valor de seroprevalença basat en la distribució de les densitats òptiques de les mostres. El Criteri d'Informació d'Akaike avalua la distància de cada punt (densitat òptica) a la corba. Com menor sigui la dispersió dels punts al voltant de la corba, més ajustada serà la distribució d'aquests. D'aquesta manera, es pot establir si els punts s'ajusten a una sola corba si totes les densitats òptiques són paregudes o bé a dues corbes, és a dir, a dues distribucions normals (mostres positives i negatives per separat). Així mateix, en la mateixa anàlisi es va tenir en compte la interacció entre les dues proves ELISA realitzades, per tal de poder corregir els efectes (errors) deguts a la repetició de la mateixa tècnica amb les mateixes condicions. El valor de seroprevalença és la relació de mostres positives respecte del total.

Per determinar quines mostres són positives, en primer lloc es va calcular la distribució de les densitats òptiques de les mostres negatives. Les mostres analitzades es consideren positives si, usant un interval de confiança del 95%, estan fora d'aquesta distribució. Aquest valor llindar s'assoleix a partir d'un nivell de significació del 0,05, i s'ha calculat a partir de la mitjana + 2 SD de la distribució normal de les mostres negatives. Posteriorment, s'ha considerat un interval de confiança del 99% per tal de minimitzar els falsos positius de les mostres (Gamble et al., 2019a, 2019b).

Revisió bibliogràfica

Per dur a terme la revisió bibliogràfica de la malària aviar es va recopilar la informació a través de la recerca a diferents bases de dades: Web Of Science (FECYT), Scopus (FECYT) i Google Scholar. Les algunes de les paraules que es varen introduir (en català i en anglès) al cercador per poder obtenir tots els articles revisats varen ser: malària aviar, *Plasmodium*, *Haemoproteus*, aus i *Larus michahellis*.

Resultats

Els resultats de les densitats òptiques de la primera i la segona prova ELISA es mostren a les taules **3** i **4**:

Taula 3. Resultats de les densitats òptiques llegides a 450 nm de cada una de les mostres del primer immunoanàlisi ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,042	0,147	0,068	0,121	0,086	0,156	0,129	0,031	0,113	0,081	0,097	0,068
B	0,041	0,052	0,101	0,399	0,109	0,054	0,123	0,225	0,375	0,063	0,162	0,118
C	0,858	0,143	0,064	0,108	0,072	0,056	0,1	0,045	0,075	0,046	0,044	0,059
D	0,489	0,143	0,074	0,073	0,171	0,091	0,079	0,059	0,107	0,084	0,145	0,12
E	0,066	0,05	0,069	0,078	0,062	0,061	0,234	0,133	0,18	0,089	0,131	0,07
F	0,175	0,1	0,054	0,074	0,093	0,116	0,206	0,068	0,113			
G												
H												

	Protocol de (Gamble et al., 2019b) PC (Control Positiu)
	Protocol de (Gamble et al., 2019b) NC (Control Negatiu)
	Protocol del kit comercial (IDVET) NC
	Protocol del kit comercial (IDVET) PC

Taula 4. Resultats de les densitats òptiques llegides a 450 nm de cada una de les mostres del segon immunoanàlisi ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,131	0,193	0,169	0,204	0,143	0,208	0,206	0,294	0,155	0,171	0,149	0,21
B	0,121	0,143	0,17	0,402	0,173	0,154	0,191	0,255	0,263	0,165	0,221	0,22
C	1,121	0,173	0,131	0,172	0,136	0,16	0,165	0,104	0,15	0,133	0,114	0,138
D	0,595	0,19	0,145	0,134	0,205	0,151	0,132	0,13	0,156	0,159	0,161	0,156
E	0,133	0,113	0,131	0,123	0,117	0,137	0,239	0,205	0,183	0,155	0,18	0,138
F	0,246	0,147	0,121	0,128	0,123	0,166	0,248	0,126	0,178			
G	0,893	0,748	0,634	0,378	0,13	0,232	0,157					
H												

	Protocol de (Gamble et al., 2019b) PC (Control Positiu)
	Protocol de (Gamble et al., 2019b) NC (Control Negatiu)
	Protocol del kit comercial (IDVET) NC
	Protocol del kit comercial (IDVET) PC
	Dilucions del PC

Mitjançant l'anàlisi estadística basada en el AIC, s'ha establert que les densitats òptiques de les mostres analitzades s'ajusten a dues distribucions normals: una distribució per a les mostres positives i una distribució per a les mostres negatives. Així mateix, s'ha pogut establir un valor de llindar a partir del qual s'ha considerat que les mostres eren positives. Amb un nivell de confiança del 0,05, s'ha pogut establir que a partir de la densitat òptica de 0,138, les mostres s'han considerat positives (**Fig. 4**). S'han obtingut 9 mostres positives: 3 mostres positives recol·lectades al Toro, 3 mostres positives recol·lectades a sa Dragonera, 2 recol·lectades a na Moltona i tan sols una mostra positiva recol·lectada a sa Porrassa. Així doncs, un 14% de les mostres han estat positives.

Amb un nivell de confiança del 99%, el valor llindar és major, per la qual cosa el nombre de mostres positives és menor. Aplicant aquest criteri més estricte, s'han obtingut 5 mostres positives (**Fig. 5**). És

a dir, la majoria de les mostres positives considerades aplicant un nivell de significació de 0,05 també ho són quan es canvia aquest nivell de significació a 0,01. Així doncs, les dades indiquen que hi ha presència d'anticossos contra *T. gondii* als ous de *L. michahellis* als illots adjacents a l'illa de Mallorca.

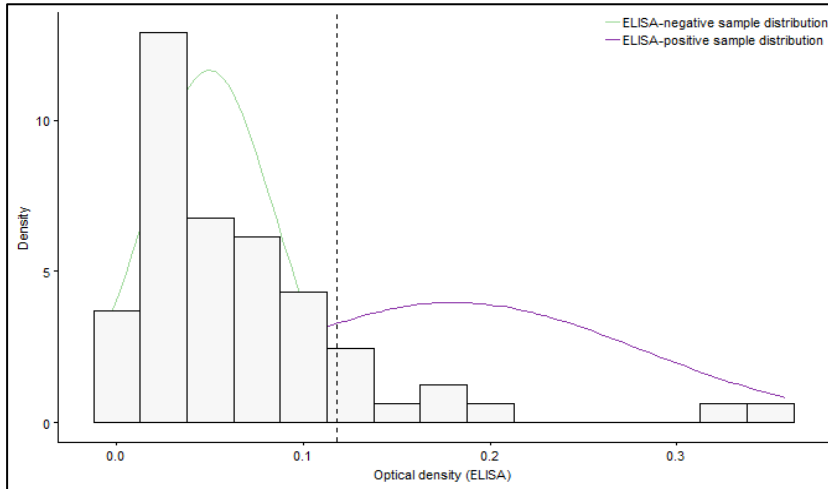


Figura 4. Distribució de les mostres segons la densitat òptica obtinguda a partir de la lectura de l'ELISA a 450nm. La línia de punts és el valor de llindar a partir del qual es considera que les mostres són positives. Aquest valor s'ha assolit a partir d'un nivell de significació del 0,05, i s'ha calculat a partir de la mitjana + 2 SD de la distribució normal de les mostres negatives.

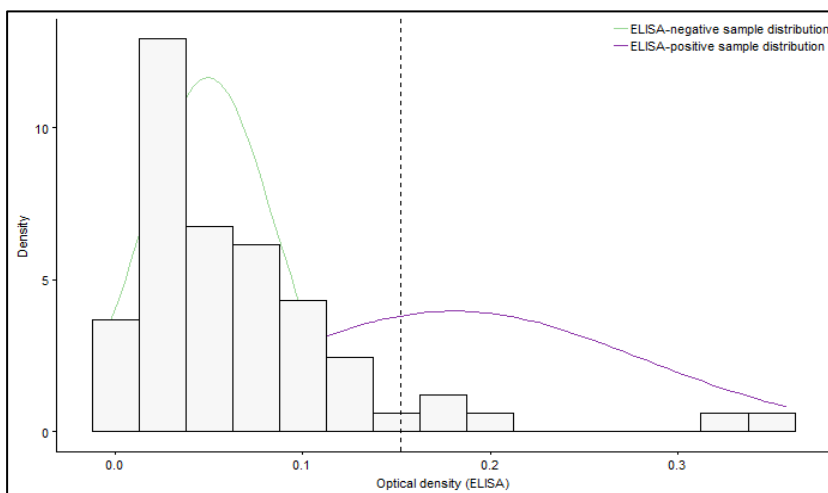


Figura 5. Distribució de les mostres segons la densitat òptica obtinguda a partir de la lectura de l'ELISA a 450nm. La línia de punts és el valor de llindar a partir del qual es considera que les mostres són positives. Aquest valor s'ha assolit a partir d'un nivell de significació del 0,01, i s'ha calculat a partir de la mitjana + 3 SD de la distribució normal de les mostres negatives.

S'han revisat les mostres originals que han donat positives a l'ELISA per tal d'intentar trobar alguna relació entre la presència d'embrions i la presència d'anticossos contra *T. gondii*. Tan sols dues de les nou mostres que han resultat positives, amb un nivell de confiança del 95%, contenien embrió. Ambdues

mostres corresponen a mostres que varen ser recol·lectades a sa Dragonera (D25M i D27). Amb un nivell de confiança del 99%, tan sols la mostra D25M ha resultat positiva i contenia embrió.

Pel que fa als resultats de la revisió bibliogràfica de malària aviar s'han escollit els articles amb més rellevància per a l'objecte d'estudi, considerant amb especial esment aquells que aportin una informació més adient, o bé que presenten una revisió.

Discussió

Utilitzant un assaig ELISA, realitzat a partir de les mostres recol·lectades, s'ha determinat que la seroprevalença de *T. gondii* en ous de gavina en illots de les Balears és del 14%. En comparació amb estudis prèviament realitzats (Cabezón et al., 2016; Gamble et al., 2019a), es podrien esperar més mostres positives per anticossos contra *T. gondii*. El fet que això no passi podria ser degut a la mostra inicial d'ous (n=65) o al nombre d'experiments (n=2); però els resultats són prou concloents com per considerar que la seroprevalença real és propera al valor obtingut.

El mètode ELISA permet detectar infeccions molt baixes que generen una resposta immunitària a l'hoste el qual infecten. Així, l'assaig que s'ha dut a terme dona la possibilitat de descobrir les infeccions que serien molt difícils de detectar de manera directa (en talls histològics, a partir de mostres de sang d'exemplars de *L. michahellis* adults o amb amplificació d'ADN del paràsit). Cal destacar també que és una tècnica que no modifica apreciablement l'estructura de les poblacions de *L. michahellis*, ja que les parelles reproductores de l'espècie no es veuen afectades. La descendència és la que es veu afectada, però amb una proporció baixa, ja que tan sols es va recol·lectar un ou de cada un dels nius. Sovint, si les gavines estan en període reproductor, reposen l'ou per compensar-ne la pèrdua (Houston et al., 1983).

La diversitat d'espècies que poden ser infectades per *T. gondii* és molt menor en un ecosistema insular, de manera que la transmissió del paràsit s'espera que sigui menys eficient. També cal tenir en compte que l'àrea total dels illots mostrejats no és igual, per la qual cosa, la detecció una mostra positiva per a anticossos contra *T. gondii* no tindrà la mateixa repercussió a un illot gran (com per exemple sa Dragonera) que a un illot petit (com per exemple na Moltona). Als illots petits, la transmissió entre individus és major que als illots grans, ja que al tenir una major superfície, la transmissió serà menor. Així doncs, si la prevalença obtinguda hagués estat molt elevada, s'haurien de considerar els riscos que això suposa per a la salut humana, ja que el cas de *T. gondii* és un clar exemple de la transmissibilitat de paràsits amb potencial zoonòtic. Una alta prevalença es traduiria amb una elevada capacitat d'infecció del paràsit i amb gran part de la població humana que podrien actuar com a hostes intermediaris. D'aquesta manera, el cicle vital del paràsit seria més ampli, i per tant tindria més probabilitats de sobreviure a un ecosistema en concret.

D'altra banda, la gestió dels fems i les aigües residuals és també diferent. En una zona turística com són les Balears, malgrat les mancances que hi pugui haver, aquests residus es tracten de manera considerablement més adequada que a molt altres llocs del sud d'Europa. D'aquesta manera, és més difícil que els oocists puguin infectar nous hostes (Arbulú et al., 2016).

L'efecte de la insularitat implica que les diferències que hi pugui haver entre illes són clau en quant a la transmissió dels paràsits. Un exemple en són els factors abiòtics com per exemple la temperatura o la llum. Respecte a les diferències entre els factors biòtics de les diferents illes cal destacar les interaccions entre paràsits i hostes. Això fa que s'origini una adaptació per part del paràsit o per part de l'hoste, encara que també es pot produir una coadaptació entre el paràsit i l'hoste, de manera que el patògen es torna menys virulent degut a l'associació paràsit-hoste. Per altra banda també cal destacar que hi ha efectes biogeogràfics que afecten a les illes, com en són: efectes àrea, distància i diana (Itescu, 2019; Lomolino, 2000). Són molt rellevants en l'àmbit de la supervivència i la dispersió del paràsit i de l'hoste.

A Melanèsia s'ha demostrat que els patrons biogeogràfics del paràsit i les associacions amb l'hoste indiquen que les distribucions i les prevalences de la malària aviar, causada pels gèneres *Plasmodium* i *Haemoproteus*, estan influenciades per diferents mecanismes. Els mecanismes principals en són la geografia i l'efecte distància, així com les interaccions entre els hostes (Olsson-Pons et al., 2015).

En el cas dels illots de Mallorca, els efectes àrea, distància i diana són molt marcats. L'àrea de Mallorca, i de tots els illots especialment, és reduïda, la qual cosa té un impacte notable sobre la diversitat específica; per aquesta raó, la fauna de les Balears és comparativament empobrida (Vogiatzakis et al., 2008). La distància al continent de les Balears és la més gran de totes les illes de la Mediterrània, cosa que es reflecteix en un elevat grau d'endemisme de la biota. Com a conseqüència d'aquests dos efectes, l'efecte diana als illots adjacents a Mallorca és molt acusat. Això podria explicar, en part, la baixa seroprevalença detectada.

De la recerca bibliogràfica realitzada es pot extreure que les infeccions per apicomplexes, com ara la malària aviar, responen a molts factors i poden donar prevalences molt variades segons l'espècie.

A algunes zones boscoses de Hawaii es suggereix que l'avifauna endèmica ha desenvolupat una certa resistència a determinats paràsits, la qual cosa suposa que els hostes s'han pogut adaptar més ràpidament que els paràsits i per tant poden sobreviure. Per altra banda, alguns patògens nous a alguna illa de l'arxipèlag de Hawaii poden causar més danys a l'avifauna endèmica que els patògens que ja hi eren presents amb anterioritat (Soares et al., 2017). Això es podria extrapolar al cas de les Balears, ja que els paràsits nous a les illes poden causar una major mortalitat a les espècies d'aus endèmiques.

Un altre estudi realitzat a les Illes Medes (Bosch et al., 2011), esmenta que les gavines (*L. michahellis*) estan parasitades per *Tetrabothrius erostris* (platihelminth) i *Cosmocephalus obvelatus* (nematode); conclou, a més, que *C. obvelatus* fa que el cos de l'animal sigui menor. Així mateix, *L. michahellis*

presenta una elevada parasitemia de *Eucoleus contortus* (nematode) i *Brachylaima* sp. (platihelmit), que també afecten la condició física de l'hoste aviar. Així mateix, les femelles solen tenir més càrrega parasitària i, conseqüentment, menor condició física. Més concretament, aquelles que tenen una mida de la posta més petita, tenen més prevalença del gènere *Haemoproteus* (Székely et al., 2000). La baixa condició física i la reduïda mida de la posta solen estar relacionades amb la intensa càrrega parasitària; ja que els paràsits solen competir amb la producció d'ous pels recursos de les femelles.

Per altra banda, la patogenicitat d'alguns paràsits, sobretot els helmints, varia depenent de l'edat (Poulin, 1996) a més a més del sexe, com s'ha explicat anteriorment. Tot i això, la patogenicitat del paràsit també varia segons la càrrega parasitària dels hostes, a més d'altres paràmetres com per exemple els hostes intermediaris i la competència interespecífica dels paràsits. Així mateix, s'han trobat altres espècies d'helmints presents a *L. michahellis* com són: *D. pseudospathaceum*, *C. longicollis*, *O. canaliculata*, *A. massiliensis*, *C. lingua*, i *P. adunca* (Bosch et al., 2011). Aquesta càrrega parasitària també es veu afectada si l'hoste aviar està immunodeprimit com a conseqüència d'altres infeccions prèvies, com podria ser el cas d'infecció per *T. gondii* o per *Plasmodium relictum*. D'aquesta manera, els hostes que estiguin infectats per un altre paràsit tindran major probabilitat d'esser hostes d'altres paràsits, com ara els helmints esmentats anteriorment.

D'altra banda, la dispersió de *T. gondii* és diferent, ja que el paràsit, a part de transmetre's a través dels hostes intermediaris fins als hostes definitius, també es pot transmetre a través dels oceans degut als oocists que es troben a l'aigua. Estudis recents han demostrat la infestació de diverses espècies de mamífers marins (incloent-hi cetacis, pinnípedes i sirenis), la qual cosa confirma l'evidència de la dispersió marina d'aquest paràsit terrestre (Honnold et al., 2005; Miller et al., 2002). Aleshores, aquesta contaminació de l'aigua per oocists és un greu perill per a la conservació de les espècies de mamífers marins que es veuen amenaçades o en perill d'extinció, ja que els condiciona notablement la supervivència. En aquest mateix estudi de Honnold et al., (2005), es va detectar que la diferència de parasitemia d'un animal infectat per *T. gondii*, és molt major que la d'un animal completament sà, sobretot en relació a la quantitat d'helmints. Això vol dir que *T. gondii* causa un estat d'immunodepressió dels hostes als quals infecta.

Aquesta contaminació dels oceans per *T. gondii* pot ser deguda, entre molts factors, per l'alteració de la costa. L'escorrentia d'aigua dolça provinent de nuclis urbans que arriba a la costa, en molts de casos està contaminada per oocists de *T. gondii*, degut a que en els nuclis urbans hi sol haver hostes definitius del paràsit que excreten els oocists (Miller et al., 2002). La contaminació de l'aigua dolça és un greu problema, sobretot en illes, com n'és el cas de les Balears. No s'han realitzat estudis que demostrin la contaminació de l'aigua d'escorrentia, però si n'és el cas, tota la fauna marina (sobretot mamífers marins) es veuria greument amenaçada.

La detecció de *T. gondii* en animals costaners, si es fa mitjançant la detecció d'anticossos contra el paràsit, ha de tenir en compte l'origen d'aquests. Les mostres positives obtingudes són perquè hi havia presència d'anticossos contra *T. gondii* en el moment del processament de les mostres. El que no es coneix és quant de temps tarden els anticossos en degradar-se en gavines adultes, així com tampoc es sap el temps que tarden en degradar-se en els seus ous. Per aquesta mateixa raó, el que no es sap és si en el moment en que la mare va posar l'ou estava infectada o si només tenia anticossos contra *T. gondii* en el seu organisme que poguessin passar a l'ou en formació (Peeling et al., 2010).

Estudis prèviament realitzats, han intentat avaluar el temps que tardarien els anticossos materns en degradar-se a partir de l'administració de vacunes contra virus de Newcastle, a pollets de l'ordre dels Procel-lariformes. Així, es va establir que les espècies amb períodes més llargs de creixement dels pollets, tenen una persistència més elevada dels anticossos materns que els que tenen un període més curt de creixement. Gràcies a aquest descobriment, es podrà usar la vacunació de les femelles d'espècies protegides o en perill d'extinció per poder protegir les futures cries enfront de patògens que puguin comprometre la seva supervivència (Garnier et al., 2017), com n'és el cas de *T. gondii*.

Els anticossos detectats als ous de *L. michahellis* procedeixen majoritàriament de les mares, perquè no s'havia iniciat el desenvolupament de l'embrió. No s'ha pogut determinar si els anticossos detectats a través del mètode ELISA hi són perquè els ous contenen anticossos degut a que la mare estava infectada en aquell moment per *T. gondii*, o si per contra, els anticossos detectats als ous de gavina són deguts a una infecció prèvia de la mare, la qual encara tenia anticossos contra el paràsit. La transmissió vertical podria existir, perquè una part de les mostres que contenien embrió han donat positiu. Aquesta possibilitat s'hauria d'estudiar amb major profunditat.

Conclusió

En aquest treball s'ha avaluat la seroprevalença de de *T. gondii* en *L. michahellis* a Mallorca, integrant evidències a diferents nivells d'organització, des del molecular fins a l'ecològic. Com passa amb altres malalties causades pels apicomplexes, com ara la malaria aviar, existeixen diversos factors, tant naturals com antròpics, que condicionen la parasitemia estudiada. Aquesta diversitat de factors causa una seroprevalença força diferent dels valors trobats en estudis fets en àrees continentals. *T. gondii* és extremadament important per a la conservació de la fauna marina, com també per la salut humana, per la qual cosa seria recomanable realitzar estudis més amplis en l'àmbit de les Balears.

Agraïments

Acabar el Grau i escriure la memòria del TFG em semblava una cosa molt llunyana i gairebé impossible el primer dia que vaig començar Biologia. Quatre anys (i mig) més tard us puc assegurar que l'elecció d'estudiar aquesta carrera ha estat una de les millors decisions que he pres mai. He après, molt, he rigut i plorat amb els companys. Hem compartit infinites hores de classe, cafès i dinars al bar, sopars, Biofestes i, fins i tot, un viatge a Vietnam; experiències inoblidables que difícilment podrem igualar en altres ocasions. Per tot això i més, m'agradaria agrair a totes les persones que m'han fet costat durant aquest llarg camí:

En primer lloc m'agradaria donar les gràcies als meus pares, per donar-me la llibertat l'elegir estudiar allò que realment volia, així com pel suport i la confiança que sempre m'han transmès. Al meu germà, per les infinites hores l'estudi compartides i per la paciència en dies esgotadors. Als meus oncles, cosins i padrins, per fer-me sentir la persona més afortunada del món de tenir-vos. Gràcies per entendre'm quan ni jo m'entenia i encoratjar-me a seguir sempre endavant.

Agrair també a la meva parella, Miquel Bauzà, per recordar-me en moments de dificultat que tot aniria bé i donar-me forces per seguir endavant.

També m'agradaria agrair especialment als meus amics, els que passi el que passi hi són: Aina Casanovas, Victòria Martín, Albert Pomar i Sebastià Amengual. Gràcies per fer aquest camí més fàcil i recolzar-me en tot moment.

D'aquests quatre anys també m'enduc amistats, d'arreu del món degut a l'ERASMUS+ que vaig fer a Ancona, Itàlia. Agrair especialment a na Francesca Ripanti, na Serena Ferretti i na Martina Pigliapoco per fer-me sentir com a casa.

Per altra banda, m'agradaria donar les gràcies a la meva tutora, Dra. Claudia Paredes, i a tot el seu equip (Júlia López, Sofia Delgado), per la confiança dipositada en mi i ajudar-me a realitzar aquest treball; així com també agrair al Dr. Giacomo Tavecchia i la Dra. Ana Sanz-Aguilar per les mostres d'ous recol·lectades dels diferents illots. També m'agradaria agrair a Amandine Gamble tot el suport donat, així com per les infinites converses via e-mail i Skype per tal d'aconseguir treure endavant el treball.

Per últim, m'agradaria agrair a la Universitat de les Illes Balears per cedir les instal·lacions usades en aquest treball, especialment al laboratori de la Dra. Marta Monjo.

“Tot esforç té la seva recompensa”, i per a mi, la recompensa sou vosaltres. Gràcies de tot cor.

BIBLIOGRAFIA:

Afonso, E., Lemonie, M., Poulle, M.-L., Ravat, M.-C., Romand, S., Thulliez, P., Villena, I., Aubert, D., Rabilloud, M., Riche, B., Gilot-Fromont, E. (2008). Spatial distribution of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behaviour in an urban area. *International Journal for Parasitology*, 38, 1017-1023. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.01.004>

- Aguirre, A. A., Longcore, T., Barbieri, M., Dabritz, H., Hill, D., Klein, P. N., Lepczyk, C., Lilly, E. L. (2019). The One Health Approach to Toxoplasmosis: Epidemiology, Control, and Prevention Strategies. *EcoHealth*. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01405-7>
- Akaike, H. (IEEE). (1974). BDD representation for incompletely specified multiple-output logic functions and its applications to the design of LUT cascades. *IEICE Transactions on Fundamentals of Electronics, Communications and Computer Sciences*, AC-19(6), 716-723. <https://doi.org/10.1093/ietfec/e90-a.12.2762>
- Arbulú, I., Lozano, J., i Rey-maqueira, J. (2016). The challenges of municipal solid waste management systems provided by public-private partnerships in mature tourist destinations : The case of Mallorca. *Waste Management*. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.03.007>
- Benning, T. L., Lapointe, D., Atkinson, C. T., i Vitousek, P. M. (2002). Interactions of climate change with biological invasions and land use in the Hawaiian Islands: Modeling the fate of endemic birds using a geographic information system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 14246-14249.
- Black, M. W., i Boothroyd, J. C. (2000). Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 607-623.
- Bosch, M., Torres, J., i Figuerola, J. (2011). A helminth community in breeding Yellow-legged Gulls (*Larus cachinnans*): pattern of association and its effect on host fitness. *Canadian Journal of Zoology*. <https://doi.org/10.1139/z99-252>
- Boulinier, T., i Staszewski, V. (2008). Maternal transfer of antibodies: raising immuno-ecology issues. *Cell Press*, (April). <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.12.006>
- Cabezón, O., Cerdà-Cuéllar, M., Morera, V., García-Bocanegra, I., González-Solís, J., Napp, S., Ribas, M.P., Blach-Lázaro, B., Fernández-Aguilar, X., Antilles, N., López-Soria, S., Lorca-Oró, C., Dubey, J.P., Almería, S. (2016). *Toxoplasma gondii* infection in seagull chicks is related to the consumption of freshwater food resources. *PLoS ONE*, 11(3), 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150249>
- Carme, B., Demar, M., Ajzenberg, D., i Dardé, M. L. (2009). Severe Acquired Toxoplasmosis Caused by Wild Cycle of *Toxoplasma gondii*, *French Guiana*. 15(4). <https://doi.org/10.3201/eid1504.081306>
- Clave, A. (2012). Parámetros reproductores de la gaviota patiamarilla *Larus michahellis lusitanicus* Naumann, 1840 en Gipuzkoa. *Munibe*, 60 (January 2014), 167-174.
- Da Silva, R. C., Langoni, H., i Megid, J. (2017). Adaptive and genetic evolution of *Toxoplasma gondii*: A host-parasite interaction. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(4), 580-

581. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0251-2017>

- Dubey, J. P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 28, 1019-1024.
- Escalante, A. A., i Ayala, F. J. (2006). Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(24), 11373-11377. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11373>
- Flegr, J., Havlíček, J., Kodým, P., Malý, M., i Smahel, Z. E. (2002). Increased risk of traffic accidents in subjects with latent toxoplasmosis: a retrospective case-control study. *BMC Infectious Diseases*, 6, 1-6.
- Gamble, A., Ramos, R., Parra-Torres, Y., Mercier, A., Galal, L., Pearce-Duvet, J., Villena, I., Montalvo, T., González-Solís, J., Hammouda, A., Oro, D., Selmi, S., Boulinier, T. (2019a). Exposure of yellow-legged gulls to *Toxoplasma gondii* along the Western Mediterranean coasts: Tales from a sentinel. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 8(October 2018), 221-228.
- Gamble, A., Ramos, R., Parra-Torres, Y., Mercier, A., Galal, L., Pearce-Duvet, J., Villena, I., Montalvo, T., González-Solís, J., Hammouda, A., Oro, D., Selmi, S., Boulinier, T. (2019b). Supplementary material. Exposure of yellow-legged gulls to *Toxoplasma gondii* along the Western Mediterranean coasts: Tales from a sentinel. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 8, 221-228.
- Gan, S. D., Patel, K. R., i Elisa, S. (2013). Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), 1-3. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>
- Garnier, R., Ramos, R., Maud, P., Sanz-Aguilar, A., Weimerskirch, H., Burthe, S., Tornos, J., Boulinier, T., Fox, C. (2017). Interpreting ELISA analyses from wild animal samples : Some recurrent issues and solutions. *Functional Ecology*, 31, 2255-2262. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12942>
- Hill, D., i Dubey, J. P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission , diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(10), 634-640. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x>
- Honnold, S. P., Braun, R., Scott, D. P., Sreekumar, C., Dubey, J. P., Hancock, K., Thiele, L.A., Zajac, A.M., Elvinger, F., Lindsay, D.S. (2005). Toxoplasmosis in a Hawaiian Monk Seal (*Monachus schauinslandi*). *BioOne*, 91(3), 695-697.
- Houston D. & Jones, P. & Sinly, R.. (1983). The effect of female body condition on egg laying in Lesser black-backed gulls *Larus fuscus*. *Journal of Zoology*. 200, 509 - 520. [10.1111/j.1469-7998.1983.tb02812.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1983.tb02812.x).

- Huijben, S., Wargo, A. R., Roode, J. C. De, Drew, D. R., i Read, A. F. (2007). Transmission stage investment of malaria parasites in response to in-host competition. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, (274), 2629-2638. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0873>
- Iezhova, T. A., Valkiūnas, G., Bairlein, F. (2005). Vertebrate Host Specificity of Two Avian Malaria Parasites of the Subgenus *Novyella*: *Plasmodium nucleophilum* and *Plasmodium vaughani*. *91*(2), 472-474.
- Itescu, Y. (2019). Are island-like systems biologically similar to islands? A review of the evidence. *Ecography*, (42), 1298-1314. <https://doi.org/10.1111/ecog.03951>
- Keats Shwab, E., Saraf, P., Zhu, X. Q., Zhou, D. H., McFerrin, B. M., Ajzenberg, D., Schares, G., Hammond-Aryee, K., Van Helden, P., Higgins, S. A., Gerhold, R.W., Rosenthal R.W., Zhao, X., Dubey, J.P., Su, C. (2018). Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(29), E6956-E6963. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722202115>
- Kim, K., i Weiss, L. M. (2004). *Toxoplasma gondii* : the model apicomplexan. *International Journal for Parasitology*, *34*, 423-432. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.009>
- LaPointe, D. A., Goff, M. L., i Atkinson, C. T. (2006). Comparative susceptibility of introduced forest-dwelling mosquitoes in Hawaii to avian malaria, *Plasmodium relictum*. *Journal of Parasitology*, *91*(4), 843-849. <https://doi.org/10.1645/ge-3431.1>
- Lin, A. V. (2015). Indirect ELISA. En Robert Hnasko (Ed.), *ELISA: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 1318, p. 51-59). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5>
- Lomolino, M. (2000). A call for a new paradigm of island biogeography. *Global Ecology & Biogeography*, 1-6.
- López, H., Pérez, A. J., Rumeu, B., i Nogales, M. (2016). Trophic strategies of Yellow-legged Gull *Larus michahellis* on oceanic islands surrounded by deep waters. *Bird Study*, *63*(3), 337-345. <https://doi.org/10.1080/00063657.2016.1194804>
- Miller, M. A., Gardner, I. A., Kreuder, C., Paradies, D. M., Worcester, K. R., Jessup, D. A., Dodd, E., Harris, M. D., Ames, J. A., Packham, A. E., Conrad, P. A. (2002). Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *International Journal for Parasitology*, *32*, 997-1006.
- Morrisette, N. S., i Sibley, L. D. (2002). Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *66*(1), 21-38. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.21>
- Nardoni, S., Rocchigiani, G., Varvaro, I., i Altomonte, I. (2019). Serological and Molecular

- Investigation on *Toxoplasma gondii* Infection in Wild Birds. *Pathogens*, 8(58), 2-7.
<https://doi.org/10.3390/pathogens8020058>
- O'donoghue, P. J. (1995). *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in Man and Animals. En *International Journal for Parasitology* (Vol. 25).
- Olsson-Pons, S., Clark, N. J., Ishtiaq, F., i Clegg, S. M. (2015). Differences in host species relationships and biogeographic influences produce contrasting patterns of prevalence, community composition and genetic structure in two genera of avian malaria parasites in southern Melanesia. *Journal of Animal Ecology*, 84, 985-998. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12354>
- Peeling, R. W., Artsob, H., Pelegrino, J. L., Buchy, P., Cardosa, M. J., Devi, S., Enria, D.A., Farrar, J., Gubler, D. J., Guzman, M. G., Halstead, S. B., Hunsperger, E., Kliks, S., Margolis, H. S. (2010). Evaluation of diagnostic tests : dengue. *Nature Publishing Group*, (12), S30-S37.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2459>
- Poirotte, C., Kappeler, P. M., i Ngoubangoye, B. (2016). Morbid attraction in *Toxoplasma* - infected chimpanzees. *Current Biology*, 26(3), R98-R99. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.020>
- Poulin, R. (1996). Helminth growth in vertebrate hosts: Does host sex matter? *International Journal for Parasitology*, 26(11), 1311-1315. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(96\)00108-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(96)00108-7)
- Real, E., Oro, D., Martínez-Abraín, A., Igual, J. M., Bertolero, A., Bosch, M., i Tavecchia, G. (2017). Predictable anthropogenic food subsidies, density-dependence and socio-economic factors influence breeding investment in a generalist seabird. *Journal of Avian Biology*, 48(11), 1462-1470. <https://doi.org/10.1111/jav.01454>
- Ricklefs, R. E., i Fallon, S. M. (2002). Diversification and host switching in avian malaria parasites. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269, 885-892.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1940>
- Shwab, E. K., Zhu, X., Majumdar, D., Hilda, F. J., Gennari, S. M., Dubey, J. P., i Su, C. (2014). Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*, 141, 453-461. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001844>
- Sibley, L. D. (2003). *Toxoplasma gondii* : Perfecting an Intracellular Life Style. *Traffic*, 4, 581-586.
- Sibley, L. D., Khan, A., Ajioka, J. W., i Rosenthal, B. M. (2009). Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 364, 2749-2761.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0087>
- Soares, L., Marra, P., Gray, L., i Ricklefs, R. E. (2017). The malaria parasite *Plasmodium relictum* in

the endemic avifauna of eastern Cuba. *Conservation Biology*, 31(6), 1477-1482.

<https://doi.org/10.1111/cobi.12995>

Szekely, T., i Reynolds, J. D. (1995). The evolution of parental care in shorebirds *Charadrii*.

Behavioral Ecology, 8(2), 84-.

Székely, T., Reynolds, J. D., i Figuerola, J. (2000). Sexual size dimorphism in shorebirds, gulls, and alcid: the influence of sexual and natural selection. En *Evolution* (Vol. 54).

Vogiatzakis, I.N., Pungetti, G., i Mannion, A.M. (Eds.).(2008). Mediterranean island landscapes: natural and cultural approaches (Vol. 9). *Springer Science & Business Media*.