



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

VI. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2025eko maiatzaren 28, 29 eta 30a
Bilbo, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 4.0

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Euskal Kostaldean lehorreratutako
izurde arruntaren (Delphinus
delphis) pneumonia
parasitarioaren azterketa
histologiko eta molekularra**

*Andrea Estarrón Calzón,
Xabier Lekube, Irune Valenciano,
Oihane Diaz de Cerio, Manu Soto,
Urtzi Izagirre Aramaiona
eta Denis Benito Fernández*

235-242 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.05.29>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



LAGUNTZAILEAK



Euskal Kostaldean lehorreratutako izurde arruntaren (*Delphinus delphis*) pneumonia parasitarioaren azterketa histologiko eta molekularra

Andrea Estarrona, Xabier Lekube, Irune Valenciano, Oihane Diaz de Cerio, Manu Soto, Urtzi Izagirre, Denis Benito

CBET Research Group, Department of Zoology & Animal Cell Biology, University of the Basque Country (UPV/EHU). Faculty of Science & Technology and Research Centre for Experimental Marine Biology and Biotechnology (PiE-UPV/EHU), University of the Basque Country (UPV/EHU). Research Centre for Experimental Marine Biology and Biotechnology (PiE-UPV/EHU), University of the Basque Country (UPV/EHU). Biscay Bay Environmental Biospecimen Bank (BBEBB), University of the Basque Country (UPV/EHU).

Kontakturako e-posta: aestarrona.cal@gmail.com

Laburpena

Lehorreratutako zetazeoen nekropsiak eta horien organoen analisiak populazioen osasun-egoerari buruzko informazio baliotsua ematen dute. Horregatik, azterketa histopatologikoa, heriotzaren kausarekin zerikusia izan dezaketen patologiak definitzeko tresna kritikoa da. Zetazeoek denbora luzez irauten dute bizirik, eta kate-maila trofikoaren goiko aldean daude. Hori dela eta, organismo askok parasitatzen dituzte, aztergai potentzial bihurtuz zetazeoen osasunaren markatzaile gisa. Lan honek Euskal Kostaldean lehorreratutako izurde arrunt baten pneumonia parasitario baten lehen deskribapen histopatologiko osoa ematen du.

Hitz gakoak: Zetazeo, trematodo, lehorreratze, patologia.

Abstract

Necropsy of stranded cetaceans and the analysis of their organs give information about the health status of their populations. For this reason, histopathological examination is a critical tool to define the pathologies that could be related to the cause of death. Cetaceans have long survival times and are at the top of the trophic link, consequently they are often parasitised by a wide range of organisms. Therefore, they become potential objects of study as markers of cetacean's health. The present work provides the first thorough histopathological description of a parasitic pneumonia in a stranded common dolphin in the Basque Coast.

Key words: Cetacean, trematode, stranding, pathology.

1. Sarrera eta motibazioa

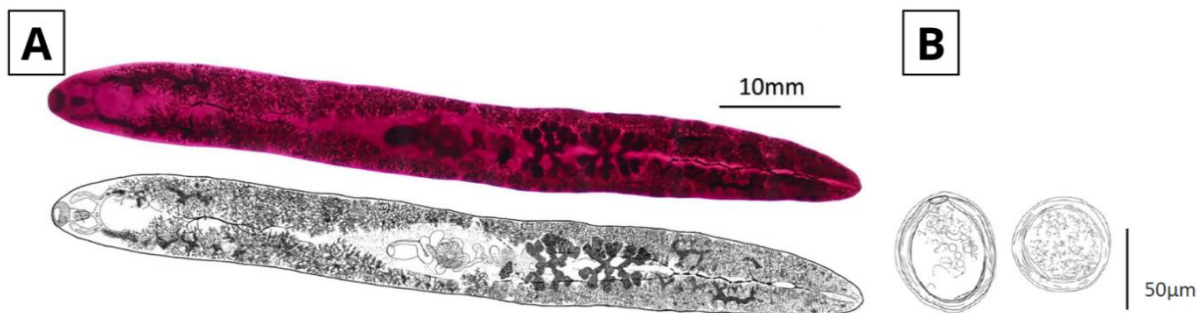
Lehorreratutako zetazeoen nekropsiek eta horien organo kaltetuen analisiak ahalbidetzen dute, indibiduen heriotzaren zergatia aurkitzea, zetazeoek izan ditzaketen mehatxuak hautematea eta kuantifikatzea, eta populazioen osasun-aldaketei buruzko informazioa lortzea. Horregatik, ehunen azterketa histopatologikoak eta molekularrak garrantzia hartzen dute animalia horien heriotza eragin ditzaketen patologiei edo gaixotasunei izena emateko. Ondo kudeatutako lehorreratze-sare batek, behar bezalako monitorizazio programarekin, zetazeoentzat mehatxu bat suposatzen duten iturrien presentzia detektatu eta kuantifikatu ditzake. Gainera, populazioen banaketaren eta abundantziaren aldaketak interpretatzeko beharrezkoa den informazioa eskaintzen du (Atxaga, 2018).

Euskal Herriko zetazeoen lehorreratze erregistroa 1993an hasi zen AMBAR Fundazioaren eskutik. Eusko Jaurlaritzak sustatutako lehen lehorreratze-sare ofiziala ere AMBAR-ek kudeatu zuen 2014 urtean hasita eta 7 urtetan zehar UPV/EHU eta AMBAR Fundazioaren arteko lankidetzari esker, bildu dira zetazeo, pinipedio, marrazo eta itsas dortoken laginak Plentziako Itsas Estazioako (PiE-UPV/EHU) Biobankuaren bildumarako. 2022ko uztailan Euskal Herriko lehorreratze-sare ofizialaren kudeaketa bere gain hartu zuen Plentziako Itsas Estazioak (PiE-UPV/EHU) SAREUS izeneko proiektuan (Diez-Virto et al., 2024). Bertan, lehorreratutako animalien kudeaketa egiteaz gain, bildutako lagin histologikoen bidez animalia itsastarren eta horien patologien ikerketa egiten da.

Zetazeoak luze bizitzeko gai dira eta kate-trofikoaren goialdean aurkitzen dira (Arbelo, 2007). Horiek endoparasito eta ektoparasito dibertsitate handiagatik parasituak izaten dira, organo, ehun eta barrunbe askotan (Dailey, 2001). Zetazeoek trofikoki transmititzen den parasito-fauna espezifikoak dute. Horren artean ugariena fauna helmintikoa da, hainbat filumeko 154 espeziek osatua: Nematodoen Filuma (62

espezie), eta Platelminotoen Filuma, digeneoak (54 espezie) eta zestodoak (38 espezie) barne hartzen dituen (Fraija, 2016; WoRMS, 2019). Platelminotoen barruan, Trematoda klasearen Digenea azpitaldea zetazeoetan duen eraginagatik bereziki aipagarria da. Digeneoen taldearen barruan, lau familia ezberdin aurkitzen dira; Brauninidae, Notocotylidae, Heterophyidae eta Brachycladiidae. Azkenengo hori itsas ugaztunen espezifikoa da (Fraija Fernández, 2016). Familia horrek hamar genero barne hartzen ditu. Horietatik zazpi zetazeoen espezifikokoak dira (*Brachycladium*, *Hunterotrema*, *Oschmarinella*, *Synthesium*, *Campula*, *Nasitrema* eta *Cetitrema*); eta beste hiruk, zetazeo zein pinipedioak infektatzen dituzten espezieak dituzte (*Zalophotrema*, *Odhneriella* eta *Orthosplanchnus*) (Gibson, 2005). Trematodo digeneoak, lauak, luzatuak eta tamaina ezberdinetakoak dira, 30 µm-tik 30 mm-ra (1. Irudia). Gorputza obalatua dute, eta, orokorrean, bi bentosa azaltzen dituzte: bat ahoaren inguruan eta beste bat alde bentrlean (Baird, 1988).

1. Irudia. *Brachycladium* sp. digeneoa. A) Gorputz osoaren ebaketa bentrala, eskala = 10 mm. B) Arrautza, eskala = 50 µm (Shiozaki et al., 2023).



Digeneo baten bizi-zikloa konplexua da, eta, gutxienez, bi ostalari ezberdin behar ditu hau osatzeko. Bizkarroi zein bizitza askeko fasea aurkeztzen ditu, baita ugalketa sexual eta asexuala ere. Zikloa lehen ostalari bitartekarian hasten da, molusku batean, normalean gasteropodo bat dena. Zenbaitetan bigarren ostalari bitartekaria ager daiteke, ornodun zein ornogabea izan daitekeena. Azkenik, behin betiko ostalaria ornodun bat da.

Trematodoak eta horien arrautzak izurdeen heriotzarekin eta lehorreratzearekin erlazionatu dira, pankrean, behazun-hodietan, giblean eta nerbio sisteman kalteak eragiten dituztelarik (Ridgway eta Dailey, 1972). Gainera, Japoniako 125 *Pseudorca crassidens*-en lehorreratze masiboa ere, trematodoek nerbio-sisteman eragindako patologiekin erlazionatu zen (Morimitsu et al., 1986). Izurde albozuriaren (*Lagenorhynchus acutus*), kostako izurdearen (*Sotalia guianensis*) eta izurde muturluzearen (*Steno bredanensis*) birrikak parasitatzeko ere aurkitu dira (Ebert & Valente, 2013). García Oliva (2021)-k egindako lanean aurkitutako nerbio-sistema zentralako lesio guztiak *Nasitrema* spp. arrautzekin erlazionatuta zeuden. Trematodo helduekin erlazionatutako patologia bat *Globicephala macrorhynchus*-en aurkitutako otitisa da, konplexu tinpaniko-periotikoaren infestazioagatik sortutakoa. Beste bat *Stenella longirostris*-en aurkitutako bronkoneumonia da, sudur-sakuetako infestazioagatik. Bestetik, zortzigarren pare kranialaren perineuritisa agertzen da, non trematodo helduak azaldu ziren zortzigarren nerbio-pare kranialaren sarreran *T. truncatus* batean. Woodard et al., (1969)-ek trematodo horien infestazio kasu bat deskribatu zuten Amazonas ibaiaren izurdeen (*Inia geoffrensis*) birriketan *Hunterotrema* generoko parasitoei lotua. Bronkio nagusiak buxatzen zituzten hantura txikia sortuz eta atelektasia eremu zabalak eratuz. Era berean, garuneko nekrosiaren eremuekin lotutako trematodoen arrautzak aurkitu ziren.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Euskal kostaldeko zetazeoetan parasitoek eragin ditzaketen arnas-aparatuko patologiei buruz ez dago informaziorik. Horregatik, ikerketa honen helburu nagusia da Euskal Kostaldean lehorreratutako izurde arruntaren biriketan aurkitutako lesio eta parasito anitzen deskribapen histopatologikoa egitea. Beste helburu bat da, trematodoek zetazeoetan duten eraginarekin erlazionatutako aurkikuntzak aurkeztea, espezie horien gaixotasunari, banakako osasunari eta populazioari dagokienez erabakigarriak edo garrantzitsuak izan daitezkeenak. Azken helburua, parasitoaren identifikazio morfologikoa eta molekularra ematea da.

3. Ikerketaren muina

3.1 Materialak eta metodoak

3.1.1 Izurde eta lehorreratzearen ezaugarriak

142 zentimetro luze eta 25,7 kilogramoko pisua zuen izurde arrunta (*Delphinus delphis*) azaldu zen Isuntzako hondartzan, Lekeition, Bizkaia (43,363254, -2,500573) 2023ko maiatzaren 18an. Gorpuaren deskonposizio egoera hil berria zen (2.maila) (Kuiken & García Hartmann, 1991). Animalia Plentziako Itsas Estaziora garraiatu zen nekropsia egiteko.

3.1.2 Nekropsia

Lehorreratzearen nekropsia TRAGSA enpresako albaitariak egin zuen Espainiako ministeritza ardurapean eta SAREUS lehorreratze sarearen betebeharretan. Albaitariak eta SAREUS pertsonalak nekropsia-txostena bete zuten non lehorreratzearen data, kokalekua, ordua, animalia-aren espeziea eta horren pisua eta luzera zehaztu zituen. Kanpo azterketari dagokionez, gantz-ehunaren lodiera neurtu eta kanpo parasitoen miaketa egin zen. Barne-azterketan barrunbe toraziko eta barrunbe abdominalean zeuden sistema ezberdinak ikertu ziren. Barrunbe torazikoaren barruan zirkulazio-sistema eta arnasketa-sistema aztertu ziren. Nekropsia-txostenarekin amaitzeko diagnostiko bat eman zen, lesio aipagarrienekin eta heriotzaren kausa probabileenekin. Diagnostikorako organo edo ehunen laginak biltzea beharrezkoa zenean, albaitariak horrela adierazi eta hartutako laginen erregistroa egin zuen.

3.1.3 Laginen bilketa eta tratamendua

Organo ezberdinen laginak hartu ziren, albaitari eta SAREUS taldekideen zaintzapean. Laginen prestaketa eta artxibatzea Plentziako Itsas Estazioko (PiE-UPV/EHU) biobankuan (Biscay Bay Environmental Biospecimen Bank-BBEBB) eman zen. Lan honetarako, jasotako lagin guztien artean, hiru lagin aztertu ziren: Eskuineko birikan aurkitutako lesioa, eskuineko birika eta ezkerreko birika.

Laginak formaldehidoa % 4an zuen itsas uretan finkatu ziren, etanol-bainu batzuetan deshidratatuta. Parafinan murgildu ziren ASP3005 ehun-prozesadorea erabiliz. 5 µm-ko mozketak egin ziren RM2125RTS Leica mikrotomoarekin. Azkenik, XL-Autostainerra erabiliz hematoxilina-eosinarekin (H&E) tindatu ziren azterketa histopatologikorako. Bestetik, mikroorganismoen azterketarako, Giemsa tindaketa egin zen prozesu berdina jarraituz. Muntaiak DPX-arekin egin zen eta laginak Nikon Eclipse E200 mikroskopioarekin behatu ziren.

Parasitoaren identifikazioa egiteko, eskuineko birikako lesioaren laginean zeunden arrautzak isolatu ziren mikrodisekzioaren bidez. Ondoren, arrautzen DNA erauzi zen PCRa eta elektroforesia egiteko. Horrekin batera, eskuineko birikan aurkitutako lesiotik zornea bildu eta izoztu zen – 40 °C-tara, ondoren bertan zeuden arrautzen DNA erauzi zen PCR eta elektroforesia egiteko.

3.1.4 Mikrodisekzioa

Mikrodisekzioa egiteko ezkerreko birikaren lesioaren parafina blokeetatik mozketak berriak egin ziren RM2125RTS Leica mikrotomoarekin, kasu honetan, 7 µm-ko 3 erreplika. Lagin horiek PEN-mintzazko portetan jaso ziren eta estufan lehortzen utzi ziren 24 orduz. Ondoren, XL-Autostainerra erabiliz parafina kendu zitzairen eta hidratatu ziren. Jarraitzeko, toluidina tindatzailearekin estali ziren 3 minutuz. Gero, ur destilatuarekin garbitu ziren eta % 70-era zegoen etanolarekin estali ziren. Azkenik, lehortzen utzi ziren 10 minutuz. ArcturusXT™ Laser Capture Microdissection (LCM) System erabili zen PEN-mintzazko portetan zeuden ehunen irudien sekzioak hartzeko. Laser bidez moztu beharreko eremuen aukeraketa egiteko, irudiak eratzen zituen mikroskopioa ArcturusXT™ Software v3.3 bidez kontrolatu zen.

3.1.5 Identifikazio molekularra

Mikrodisekzionatu ziren laginetik DNA erauzketa egiteko PicoPure™ DNA Extraction Kit-a erabili zen. Arrautzen DNA erauzteko ere, izoztutako zornea urtu, PBS soluzioan diluitu eta 20 µm-ko EASY STAINER bidez iragazi zen. Ondoren, iragazkian geratutako arrautzei 300 µl PBS gehitu zitzairen eta behin nahastuta, 200 µl hartu ziren mikropipeta batekin DNA erauzketa egiteko DNeasy Blood and Tissue kit-aren bidez. Anplifikaziorako erabilitako geneak hurrengoak izan ziren: C zitokromo oxidasaren lehenengo azpiunitatea (COI), eukarioto erribosomaren azpiunitate txikia (18s rDNA), eta handia (28s rDNA), eta mitokondriako NADH deshidrogenasaren 3. konplexua (mtND3). Oso kontserbatutako geneak (18S rDNA, 28S rDNA) astiro-astiro eboluzionatzen dute eta baliagarriak dira urruneko erlazio ebolutiboak aztertzeko. Gutxiago kontserbatutako geneak (COI) maizago mutatuak dute, espezie edo populazio hurbilak bereizteko baliagarri bihurtuz. MtND3 geneak kontserbazio-maila ertaina du, eta, horren ondorioz, baliagarria da espezieen filogenia- eta eboluzio-azterketarako. Anplifikazioa egiteko NZYTaQ II DNA polymerase Green Master Mix-a eta, geneen aurreranzko eta

alderantzizko hasleen 0.2 µM erabili ziren (1. Taula). PCRaren amaierako bolumena 25 µL izan zen. Horietatik 3 µL DNA-moldearenak zirelarik. Termozikladorea hurrengo pausoein programatu zen: 5 minutu 95°C-tan polimerasa aktibatze, 30 segundo 95°C-tan desnaturalizazioa gertatzeko, 45 segundo 50/57/58°C-tara (Tm) hibridatzeko, 30 segundo 72°C-tara elongazioa gertatzeko, eta, azkenik, 8 minutu 72°C-tara. Hiru pausu horiek, desnaturalizazioa, hibridazioa eta elongazioa, 40 aldiz errepikatu ziren. PCRko produktuak etidio bromuroarekin (1,5%) tindatutako agarosazko gelean aztertu ziren elektroforesiaren bidez. PCRaren emaitza positiboak sekuentziatuak izan ziren, Sanger prozeduren bidez, STAB VIDA konpainiagatik.

1. Taula. Trematodoen PCR-anplifikazioa egiteko erabilitako hasleak. Hasleen sekuentziak, urtze tenperatura (Tm, °C) eta erreferentziak.

Hasleak	Tm	Erreferentziak
Tremcois2Fw: TGTTYTTTGTCTGTGKAC	50	Magalhães et al. (2020)
Tremcois2Rv: AATGCATMGGRAAAAAACA		
Bb18SRv: ACTGGAGGGCAAGTCTGGTGC	58	Benito et al. (2023)
Bb18SFw: CAGCTTTGCAACCATACTCCC		
CLF28: AGT AAC GGC GAG TGA ACA GG	57	Kim et al. (2023)
CLF28B: GCA CTG GTC CGA AGA CTA TG		
ND3Fw: CGT TAA TTK KTA AAG CYT TGR ATT CTT ACT	58	Kim et al. (2023)
ND3Rv: CTA GTC CCA CTC AAC GTA ACC TT		

3.2 Emaitzak

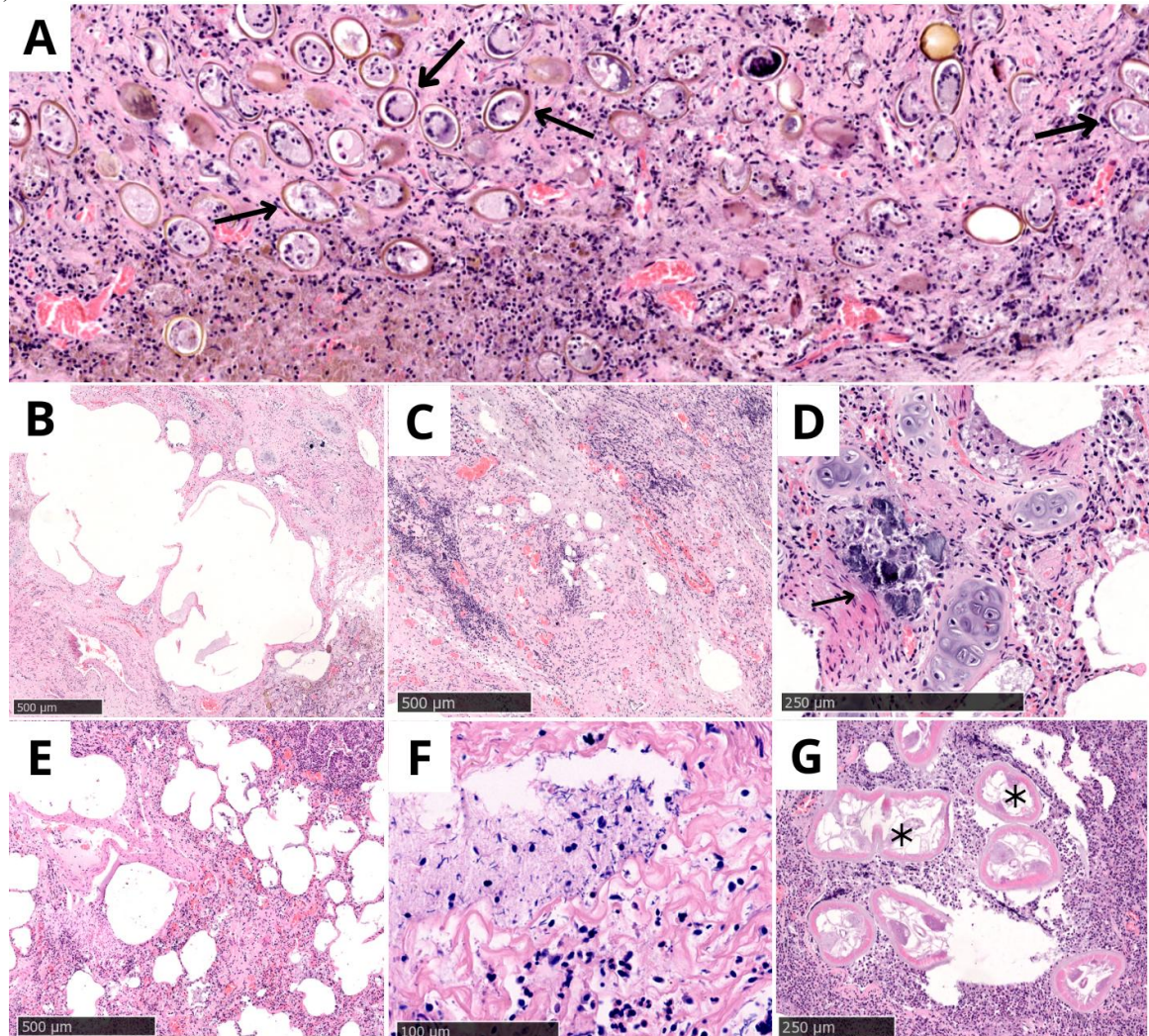
3.2.1 Nekropsia-txostena

Kanpo-azterketari dagokionez gantz-ehunaren lodiera hurrengo izan zen: 0,832 zentimetro alde dortsalean, 1,011 alde bentranean eta 0,790 albo-aldean. Bestetik, kanpo-parasitoen miaketa egin zen, baina ez zen bakar bat ere aurkitu. Larruazalpeko ehunen eta muskuluen azterketa egin zen, non hegaletan eta alde bentranean zauriak aurkitu ziren, barailen arteko hematoma batekin batera. Larruazalpeko gantzean, kisteak eta parasitoen antza zuten egiturak aurkitu ziren eta muskulu eskeletikoan *Crassicauda spp.* nematodoek sortutako infekzio orokorra behatu zen. Larruazalpeko parasitoei dagokionez *Clistobothrium delphini* zestodoa aurkitu zen. Barne-azterketan ez zen aurkitu ezer adierazgarri, birikietan ez. Eskuineko birikian lesio bat aurkitu zen, moztean likido marroia askatzen zuena eta ehun nekrotikoa aurkeztzen zuena. Ezkerrekoak berriz, ikutzean gogorrak ziren granulomak, nematodoak eta ehun nekrotikoa aurkeztzen zituen. Barrunbe abdominalari dagokionez ez zen aurkitu ezer adierazgarri, nefritis interstiziala ez. Nekropsia-txostenarekin amaitzeko heriotzaren kausa probabilena bezala eta analisi histopatologikoen zain, infekzioaren ondorioz sortutako disfuntzio multiorganikoa proposatu zen.

3.2.2 Behaketa histopatologikoa

Aurretik aipatu bezala, hiru lagin aztertu ziren: eskuineko birikan agertu zen lesioa, eskuineko birika eta ezkerreko birika. Eskuineko birikako lesioari dagokionez, trematodoen arrautzak azaltzen ziren (2A. Irudia), eta, inguruan, linfzito eta immunitate-sistemako zelulen infiltrazioa. Enfisema eta atelektasia aurkitu ziren (2B. Irudia). Atelektasia birikak puzteko gaitasuna galtzea bezala definitzen da. Birikaren atal baten kolapsoa da. Batzuetan birika osoaren kolapsoa gertatzen da ere, baina ez da ohikoa. Bestetik, enfisemak, bronkioloaren amaiera aldeko aire-espazioetan agertzen diren dilatazio ezohiko eta iraunkorrak dira, pareten apurketarekin eta fibrosirik gabe aurkeztzen direnak. Kaltzifikazioak ugariak ziren. Kaltzifikazioak kaltzio depositu basofilikoak dira, parenkiman, albeoloetan, odol-hodietan, pleuran eta linfa-noduluetan ager daitezkeelarik. Horrekin batera, edema albeolarra deskribatu zen. Edema likido pilaketari deritzo, organismoaren barrunbetan eta ehunetako zelulen arteko espazioetan agertzen denean. Lesio honetan, angiomasia ere aurkitu zen (2C. Irudia), kolageno eta muskulu leunez osatutako eta pareta irregular eta lodiak dituzten odol-hodi txikien ugaritzeagatik definitzen dena. Bakterioen antza zuten zelulak azaldu ziren, bazilo zein koko itxuradunak, eta okre koloreko pilaketak. Eskuineko birikan kaltzifikatutako materialaren pilaketak aurkitu ziren (2D. Irudia). Bestetik, enfisema eta hemorragia ugari ikusi ziren (2E. Irudia). Linfzito eta immunitate-sistemako bestelako zelulen infiltrazioak ugariak izan ziren. Eskuineko birikako lesioaren laginean bezala, bakterioen antza zuten zelulak azaldu ziren eta okre koloreko pilaketak. Ezkerreko birikari dagokionez, bakterioak izan zitezkeen zelulak (2F. Irudia), linfzito-agregatuak eta immunitate-sistemako beste zelulen infiltrazioa ikusi ziren. Lagin honetan, nematodoak aurkitu ziren (2G. Irudia), immunitate-zelulaz inguratutak. Nerbio-sistema zentralako laginak aztertu ziren, parasitoen presentziaren bila baina ez zen aurkitu trematodoren presentziarik, ez indibiduo helduena ezta arrautzena ere.

2.Irudia. Biriken irudi histologikoak. A-C) Eskuineko birikaren lesioa (H&E). A) Geziak: trematodoen arrautzak. B) Enfisema. C) Angiomatosis eta linfozitoen infiltrazioa. D-E) Eskuineko birika (Giemsa). D) Gezia: kaltzifikazioak. E) Hemorragia eta enfisema. F-G) Ezkerreko birika (Giemsa). F) Baziloen antza duten bakterioak. G) Izartxoak: *Pseudaliid* nematodoak.



3.2.3 DNA erauzketa eta PCR anplifikazioa

Mikrodisekzioaren bidez eskuineko birikako lesioaren laginetik, hiru gertakin histologikoetan agertzen ziren arrautzak isolatzea eta horien material genetikoa erauzteko lortu zen. Zornetik ere, arrautzak isolatzea eta horien material genetikoa erauzteko lortu zen. Mikrodisekzio bidezko eta iragazketa bidezko DNA erauzketa A260/280 ratioan lortutako balioak hurrengoak izan ziren hurrenez hurren: 1.01 eta 2,6.

Mikrodisekzioaren bidez erauzitako DNA-rekin egindako PCR eta elektroforesian emaitzak honakoak izan ziren: COI genearen anplifikazioan 200 bp-ko bandak agertu ziren, 18s rDNA genearen kasuan 500 bp-ko bandak, 28s rDNA genearen kasuan 900 bp-ko bandak, eta mtND3 genearen kasuan ez zen anplifikaziorik lortu. Zorneko arrautzetatik erauzitako DNA-tik lortutako emaitzak honakoak izan ziren: ez zen lortu COI genearen anplifikaziorik, 18s rDNA genearen kasuan 500 bp-ko bandak agertu ziren, 28s rDNA genearen kasuan 900 bp-ko bandak, eta mtND3 genearen kasuan 400 bp inguruko bandak.

Sekuentziazioan zorneko arrautzetatik erauzitako PCR emaitzetatik, 28s rDNA genetik Brachycladiidae familiako *Brachycladium nipponicum* (LC541908) espeziea lortu zen, %99,24-ko antzekotasunarekin. Gainerako sekuentziazioetatik ez zen emaitza garbirik lortu.

3.3 Eztabaida

Isuntzako izurdearen nekropsiaren ebaluazioa eta gero osasun egoera kaltetuaren adierazleak ikusi ziren. Nahiz eta, urdailean arrainen hondakinak aurkitu, eta hortzeria osoa egoera onean aurkeztu, larruazalpeko gantzaren eta gorpuak aurkeztu zituen barrunbe eta depresioak, nutrizio-egoera pobrea zuela adierazten zuten (De la Fuente, et al., 2020). Ikusita birikan topatutako lesioak, infekzio patro

batekin bat zetorrela, heriotzaren kausa, infekzio parasitiko baten eraginez sortutako disfunczio multiorganikoa zela proposatu zen. Horrela, indibiduo honen azterketa interesgarria bilakatu zen, analisi sakon bat egiteko bide eman zuen frogatutako histologiko eta molekular bitartez diagnostikoa berresteko.

Parasitoak itsas ugaztunetan ohi samarrak izateaz gain, horietako batzuek gaixotasunen garapen prozesuetan parte hartzen dute eta zetazeoen lehorratzeen eragile bezala definitu dira (Oliveira et al., 2011). Horien biologia ezagutzea garrantzitsua da, zetazeoen osasunerako suposa dezaketen arriskuagatik. Lan honen ekarpen garrantzitsuenak hiru dira: Euskal Kostaldean aurkitutako izurde arruntean trematodo batek sortutako pneumonia deskribatzea, trematodoek zetazeoetan duten eraginarekin erlazionatutako aurkituntzak aurkeztea eta parasitoaren identifikazioa ematea.

Azterketa molekularren zain egonda ere, Isuntzako izurde arruntean aurkitutako arrautzak Brachycladiidae familiakoak direla uste da, zetazeoen espezifikokoak direlako (Fraija Fernández, 2016). Hasiera batean *Nasitrema* generoa proposatu zen, lan honetan aurkitutako arrautzak obalatuak zirelako beste autore batzuek deskribatzen duten bezala (Kleinertz et al., 2014). Gainera, *Nasitrema* generoa arnas-aparatuko patologien eragile bezala identifikatua izan da aurretik. Baina PCR bidezko analisi molekularretan familia berdinekoa den *Brachycladium nipponicum* (LC541908) espeziea lortu zen, %99,24-ko antzekotasunarekin. Horrekin batera, arrautza horien morfologia Abril et al. (1991)-en lanean deskribatutako *Zalophotrema atlanticum* (1. Irudia) (orain *Brachycladium atlanticum*) arrautzen tamainarekin (54-61 x 40-47) bat zetorren, beraz, azkenean, genero hau proposatu zen. Dena dela, espeziea segurtasunez zehaztea posible izan ez bada ere, beste gene batzuen sekuentziazioek emaitza lausoak eman zituztelako, genero hau izatearen aukera, oraindik ere kasu interesgarriagoa bihurtzen du, normalean gibel eta behazun-hodian aurkitzen delako (Shiozaki et al., 2023).

Behaketa histopatologikoa

Trematodoek zetazeoetan eragindako patologiak hainbat aldiz aipatu dira parasitologian. Adibidez, Oliveira et al., (2011)-en ikerketan Brachycladiidae familiako lau digeneo aurkitu ziren: *N. globicephalae*, *Brachycladium palliatum*, *B. pacificum* eta *Oschmarinella albamarina*. *N. globicephalae* espeziea, *S. coeruleoalba* eta *S. attenuata* izurdeen sinu paranasaletan agertu zen, ostalariko 40 trematodo baino gehiagorekin. Horiek, erosio anitzekin eta sinusitis arinarekin erlazionatu ziren infestatutako izurdeetan. Gainera, *S. attenuata* espezimenaren kranioko zortzigarren nerbioak perineuritisa aurkeztu zuen. Indibiduo horrek *N. globicephalae* trematodo helduak zituen sinu paranasaletan eta arrautzak biriketako mukosan. Bestetik, Ozeano Bareko izurde albozuriatan bronkieko pneumonia, nekrosi lesioak eta eremu pterigoideoen hiperostosis ere deskribatu ziren (Tejedor, 2015).

Metazooen parasitismoaren arrakastak, besteak beste, mantenu gaien hornidura eta hondakin-produktuak ezabatzea eskatzen du. Horretarako, beharrezkoa da parasitoak definitutako sistema baskular bat egotea (Dennis et al., 2011). Birika, sare baskular aberatsa duen organoa izan arren, oso gutxitan aurkeztu ditu arazo baskularrak lurreko eta itsasoko espezieetan. Hala ere, ikusi da angiomatosis edo hemangioma gerta daitezkeela helmintoek eragindako lesioen ondorioz (Díaz-Delgado et al., 2012).

Biriketako kaltzifikazioak ez dira asko ikertu baina maiz agertzen dira organo honetan. Horiek, parenkiman, albeolotan, odol-hoditan, pleuran eta gongoil linfatikoetan agertzen dira (Savic et al., 2022). Gaixotasunaren larritasunaren markatzaile izan daitezke, eta, beraz, diagnostiko-balioa dute. Biriketako kaltzifikazioen eragile ohikoenak gaixotasun infekziosoak dira, baina hanturazko gaixotasunak ere mineralizatutako egitura horiek erlazionatu dira (Jarjou'i et al., 2021). Zafra et al. (2015)-en lanean, parasitoen aurkako erantzuna iradokitzen zuten kaltzifikazioak aurkitu ziren izurde batzuetan. Beraz, lan honetan aztertutako izurdean azaltzen diren kaltzifikazioak trematodoaren agerpenarekin erlazioa aurkeztu dutela ondorioztatu genezake, parasitoaren beraren infestazioagatik edota horren ondorioz sortutako hanturagatik.

Zetazeoak parasitoengatik infestatuak izaten direnean, aldeztu aurretiko joera aurkeztu dute bakterioengatik infektatuak izatera (Obusan et al., 2021). Díaz-Delgado et al., (2012)-en lanean azaltzen da biriketako infekzioek, eragin handia dutela bizitzaren askeko zetazeoetan, bereziki odontozeto txikietan, zeinetan indibiduoaren heriotza eragin dezaketen. Arnas-gaixotasunak izurdeentzat mehatxu handia direla jakina bada ere, ez da asko ezagutzen patogeno eragileei eta transmititzeko moduei buruz. Lan honetan aztertutako izurde arruntean, arrautzen presentziaren eraginez, erantzun immunologikoarekin erlazionatutako linfozitoen infiltrazioak eta hantura prozesuak deskribatzen dira, O'Shea et al., (1991)-ek Mexikoko Golkoan aurkitutako izurde marradun batean deskribatu zuen bezala.

Egiaztapen genetikoa

Egiaztapen genetikoa egitean genotipo mistoak sortzeko arriskua dago, hau da, indibiduo bat baino gehiagoren DNA egon daiteke, eta, ondorioz, zailtasunak sortu emaitzak interpretatzeko. Laser bidezko mikrodisekzioa, tresna baliotsua da zelula espezifikoak bereizteko, eta, DNA erauzketa egokia lortzeko (Vandewoestyne, & Deforce, 2010). Lan honetan laser bidezko mikrodisekzioaren teknika erabiliz, trematodoen arrautzak isolatzea eta DNA erauztea lortu zen, baina erauzitako laginen absorbantziak txikiak izan ziren ($< 1,0$), eta, horrek azal dezake PCR emaitzen sekuentziazioaren emaitza ez-erabatidaezinak.

4. Ondorioak

Ikerketa honen hasieran proposatu zen bezala, Euskal Kostaldean lehorreratutako izurde arruntaren biriketan aurkitutako patologia makroskopiko eta parasito anitzek garrantzia handia izan zuten izurdearen heriotzan eta lehorreratzean. Horien arrautzek hantura prozesuak, immunitate-sistemaren zelulen infiltrazioak, kaltzifikazioak eta baskularizazioaren alterazioa eragiten dituztelarik. Nekropsiek lehorreratutako animalien heriotza aztertzeko informazio baliagarria eskaintzen dute. Irudi histologikoen bidez, ehunen ezaugarri morfologikoak zehatz beha daitezke, eta, horrela, ehun ezberdinetako lesioak identifikatu. Identifikazio molekularra posible ez denean, histologia konparatuak hurbilketak egitea baimentzen du, morfologiaren azterketaren bitartez. Gainera, biobankuan biltegitratutako laginek aukera ematen dute etorkizuneko ikerketetan iraganeko lehorreratzei buruzko informazioa lortzeko, organo desberdinen ehunen analisiaren bidez. Lan honetan aurkeztu da Euskal kostaldean lehorreratutako izurde batean trematodo-arrautzak arnasteak eragindako pneumonia parasitario baten lehen deskribapen histologikoa

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunerako trematodoaren identifikazio molekularra lortzea da helburu nagusia, Euskal Kostaldean aurkitutako izurdean deskribatutako patologiaren eragilea zehazteko, eta, horren prebalentzia eta frekuentzia aztertu ahal izateko. Horretarako, mikrodisekzioaren teknika orraztu egingo da eta PCR-etan tenperatura altuagoak erabiliko dira hibridazio espezifikoagoak lortzeko. Horrekin batera, Euskal Kostaldean agertzen diren zetazeoen osasuna mehatxatzen duten parasitoek patologia eragile gisa duten garrantzia aurkeztu nahi da.

6. Erreferentziak

- Abril, E., Balbuena, J. A., & Raga, J. A. (1991). A new species of the genus *Zalophotrema* (Digenea: Campulidae), *Zalophotrema atlanticum* n. sp., from the liver of the striped dolphin *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833) (Cetacea: Delphinidae) in Atlantic waters. *Systematic Parasitology*, 18(2), 133-138. <https://doi.org/10.1007/bf00017666>
- Arbelo, M. (2007). *Patología y Causas de la Muerte de los Cetáceos Varados en las Islas Canarias (1999 -2005)*. [Doctoral Thesis on Veterinary, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria]. https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/20887/2/0511983_00000_0000.pdf
- Atxaga, O. (2018). *Estudio anatomopatológico de casos de mamíferos marinos de la red de varamientos del País Vasco*. [Master's Thesis, master's degree in animal health and food safety, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria]. <http://hdl.handle.net/10553/98270>
- Baird, J. K. (1988). Review of Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. *Parasitology Today*, 4, (2).
- Benito, D., Izagirre, U., Lekube, X., Zaldibar, B., Villalba, A., De Montaudouin, X., ... Diaz de Cerio, O. (2023). Molecular confirmation of pearl formation in arctic mussels (*Mytilus edulis*) caused by *Gymnophallus bursicola* (Odhner 1900) metacercariae. *Parasitology* 150, 1–7. <https://doi.org/10.1017/S0031182023000860>
- Dailey, M.D. (1990). Parasitic Disease. In L. Dierauf, & F.M.D. Gulland, (Eds.). *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease, and Rehabilitation*. (pp.767-778). Boca Raton: CRC Press.
- De la Fuente, J., Fernández, A., Suárez, C., Sierra, E., Consoli, F., Felipe, I., ... Arbelo, M., (2020). PROTOCOLO DE NECROPSIA Y TOMA DE MUESTRAS DE CETÁCEOS. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Dennis, R. D., Schubert, U., & Bauer, C. (2011). Angiogenesis and parasitic helminth-associated neovascularization. *Parasitology*, 138(4), 426-439. <https://doi.org/10.1017/s0031182010001642>
- Díaz-Delgado, J., Arbelo, M., Sacchini, S., Quesada-Canales, Ó., Andrada, M., Rivero, M., & Fernández, A. (2012). Pulmonary Angiomatosis and Hemangioma in Common Dolphins (*Delphinus delphis*) Stranded in Canary Islands. *Journal Of Veterinary Medical Science*, 74(8), 1063-1066. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0573>
- Diez-Virto, I., Benito, D., Valenciano, I., Ruiz, L., Lekube, X., Izagirre, U., Soto, M. (2024). First comprehensive overview on cetacean strandings in southeast Bay of Biscay (1993-2023). *Journal of Marine Systems*, in prep.

- Fraija Fernández, N. (2016). Digeneans of cetacean taxonomy, evolutionary history and host specificity. [Doctoral thesis on Marine Resources, Universitat de València]. <https://nataliafraija.wordpress.com/wp-content/uploads/2018/05/2017-fraija-fernandez.pdf>
- García Oliva, B. M. (2021). *Prevalencia de tremátodos del género Nasitrema (Ozaki, 1935) en cetáceos varados en las Islas Canarias (2000 / 2018) e introducción a su detección inmunohistoquímica* [Trabajo de Fin de Máster de Biología Marina, Universidad de La Laguna]. <http://riull.ull.es/xmlui/handle/915/23289>
- Gibson (Eds). *Keys to the Trematoda* (pp. 641-652). London: Cabi.
- Jarjou'i, A., Bogot, N., Kalak, G., Chen-Shuali, C., Rokach, A., Izbicki, G., & Arish, N. (2021). Diffuse pulmonary calcifications: A case series and review of literature. *Respirology Case Reports*, 9(10), 1-7. <https://doi.org/10.1002/rcr2.839>
- Kleinertz, S., Hermosilla, C., Ziltener, A., Kreicker, S., Hirzmann, J., Abdel-Ghaffar, F., & Taubert, A. (2014). Gastrointestinal parasites of free-living Indo-Pacific bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) in the Northern Red Sea, Egypt. *Parasitology Research*, 113(4), 1405-1415. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3781-4>
- Kuiken M., & García Hartmann, M. (1993). *Proceedings of the first ECS workshop on cetacean pathology: dissection techniques and tissue sampling*. Germany: European Cetacean Society.
- Kumar V., Vercruysse J., Kageruka P. & Mortelmans J. (1975). *Nasitrema attenuata* (Trematoda) infection of *Tursiops truncatus* and its potentialities as an aetiological agent of chronic pulmonary lesions. *Journal of helminthology*. 49(4): 289-292. DOI: 10.1017/s0022149x00026298
- Magalhães L, Daffe G, Freitas R & de Montaudouin X. (2020). *Monorchis parvus* and *Gymnophallus choledochus*: two trematode species infecting cockles as first and second intermediate host. *Parasitology* 147 (6), 643–658.
- Morimitsu T., Nagai T., Ide M., Ishii A. & Koono M. (1986). Parasitogenic octavus neuropathy as a cause of mass stranding of Odontoceti. *The Journal of parasitology*. 72(3): 469-472.
- Obusan, M. C. M., Caras, J. A. A., Lumang, L. S. L., Calderon, E. J. S., Villanueva, R. M. D., Salibay, C. C., Siringan, M. A. T., ... Aragonés, L. V. (2021). Bacteriological and histopathological findings in cetaceans that stranded in the Philippines from 2017 to 2018. *PloS One*, 19(2) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243691>
- Oliveira, J.B., Morales, J. A., González-Barrientos, R., Hernández-Gamboa, J., & Hernández-Mora, G. (2011). Parasites of cetaceans stranded on the Pacific coast of Costa Rica. *Veterinary Parasitology*, 182(2-4), 319-328. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.014>
- O'Shea T. J., Homer B. L., Greiner E. C. y Layton A. W. (1991). *Nasitrema sp.*-associated encephalitis in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) stranded in the Gulf of Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*. 27(4): 706-709.
- Ridgway S. H. y Dailey M. D. (1972). Cerebral and cerebellar involvement of trematode parasites in dolphins and their possible role in stranding. *Journal of Wildlife Diseases*. 8(1): 33- 43.
- Savic, I., Farver, C., & Milovanovic, P. (2022). Pathogenesis of Pulmonary Calcification and Homologies with Biomineralization in Other Tissues. *The American Journal Of Pathology*, 192(11), 1496-1505. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2022.07.015>
- Shiozaki, A., Nakagun, S., Tajima, Y., & Amano, M. (2023). A first record of digenean parasites of the dwarf sperm whale *Kogia sima* with morphological and molecular information. *Advances In Marine Biology*, 39-61. <https://doi.org/10.1016/bs.amb.2023.10.001>
- Tejedor M. L. (2015). Aportaciones a la osteología y sus anomalías asociadas en los cetáceos menores del Archipiélago Canario [Doctoral Thesis on Biology, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria]. <http://hdl.handle.net/10553/22450>
- Vandewoestyne, M., & Deforce, D. (2010). Laser capture microdissection in forensic research: a review. *Int J Legal Med* 124, 513–521. <https://doi.org/10.1007/s00414-010-0499-4>
- Woodard J.C., Zam S.G., Caldwell D.K. & Caldwell M.C. (1969). Some parasitic diseases of dolphins. *Pathol Vet* 6(3), 257-72. <https://doi.org/10.1177/030098586900600307>
- WoRMS Editorial Board. 2019. World Register of Marine Species (2024, January 14). Online access in: <http://www.marinespecies.org>
- Zafra, R., Jaber, J., Pérez, J., De la Fuente, J., Arbelo, M., Andrada, M., & Fernández, A. (2015). Immunohistochemical characterisation of parasitic pneumonias of dolphins stranded in the Canary Islands. *Research In Veterinary Science*, 100, 207-212. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.03.021>

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrik asko bereziki nire zuzendari izan diren Denis Benito eta Urtzi Izagirrerri, beti laguntzeko prest egoteagatik, eta irakatsitako guztiagatik, baita Oihane Diaz de Ceriori ere, biologia molekularrarekin laguntzeagatik. Eskerrak eman ere SAREUS proiektuaren kideei, jasotako informazioa erabiltzea baimentzeagatik, eta, azkenik, lehorratze proiektu hau finantziazten duten Biodibertsitate Fundazio (MITECO, PRTR, NextGenerationEU) eta Eusko Jaurlaritzari.