



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**SERODIAGNÓSTICO E INMUNOGENICIDAD
PRODUCIDA POR PROTEÍNAS DE LA
GLÁNDULA SALIVAL DE *Oestrus ovis* (DIPTERA:
OESTRIDAE) EN OVEJAS Y CABRAS**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

p r e s e n t a

Carlos Eliud Angulo Valadez

La Paz, B.C.S. enero de 2009

RESUMEN

En el contenido de la glándula salival larvaria de *Oestrus ovis* (Diptera:Oestridae) se encuentran antígenos reconocidos por las IgG de ovejas infectadas que pueden ser útiles para el diagnóstico de la estrosis ovina y caprina. Adicionalmente, las larvas parásitas de *Hypoderma lineatum* (Diptera:Oestridae) secretan proteasas antigénicas usadas para el diagnóstico de la hipodermosis bovina en programas de erradicación. Los objetivos generales de esta tesis fueron investigar las proteasas-antigénicas y los antígenos en el contenido de la glándula salival de *O. ovis* y determinar su valor antigénico para el diagnóstico de la estrosis en cabras y ovejas. Para ello se capturaron larvas de tercer estadio (L3) y moscas grávidas para obtener antígenos salivales y larvas de primer estadio (L1) infectivas de *O. ovis*. Se disecaron las larvas L3 para obtener la glándula salival del parásito y sus productos fueron analizados en pruebas enzimáticas (Apyzim, Azocoll, Zimogramas) e inmunoblots y en el desarrollo de pruebas de ELISA para el serodiagnóstico de la estrosis en ovejas y cabras. Se registró el número y desarrollo de larvas de *O. ovis* encontradas en cabras y ovejas infectadas. Además, se colectaron muestras de suero sanguíneo de caprinos y ovinos infectados experimental y naturalmente así como moco nasal de ovinos. Las ovejas del rebaño estudiado se organizaron en tres grupos de acuerdo al Progenitor que las engendró. Los resultados encontrados fueron: se detectaron las actividades enzimáticas de fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), leucina arilamidasa, α -glucosidasa y N-acetil- β -glucosaminidasa. El pH óptimo de actividad proteolítica fue de 8.0; mientras que la actividad proteolítica se incrementó con la temperatura (10 a 50 °C). Además, las enzimas proteolíticas reaccionaron solamente con inhibidores para serin-proteasas. En los zimogramas, se detectaron bandas de actividad proteolítica en el rango de 20 a 63 kDa; y en los inmunoblots se observaron tres bandas antigénicas, una de ellas relacionada a una banda proteolítica (63 kDa). En ovejas, se encontraron correlaciones negativas entre el establecimiento larvario y/o el desarrollo larvario por un lado y la intensidad de las respuestas sistémicas y locales de IgG por el otro en dos de los tres grupos Progenitor-progenie estudiados. En cabras, la prevalencia de *O. ovis* determinada en necropsias de caprinos en La Paz, Baja California Sur, fue de 73.9% y la seroprevalencia en los caprinos muestreados en Baja California Sur fue de 59.2%. La respuesta de anticuerpos no se asoció con los parámetros parasitológicos. En general, ambas pruebas de ELISA usando los antígenos de la glándula salival de *O. ovis* tuvieron alta sensibilidad (>90%) y baja especificidad (26-52%) para detectar la estrosis en ovinos y caprinos. Como conclusiones, se comprobó que existen actividades proteolítica y antigénica en el contenido de la glándula salival de larvas de *O. ovis* que parecen estar involucradas en la nutrición larvaria y la inmunomodulación del hospedero. Aunque se encontraron bandas proteolítica y antigénica del mismo peso molecular, no se pudo determinar si eran de proteasas antigénicas con los métodos aquí empleados. Los antígenos de la glándula salival mejoraron los parámetros serológicos de la prueba ELISA indirecta para detectar la estrosis ovina y fueron eficientes para diagnóstico de la estrosis caprina.

Palabras clave: Parásito *Oestrus ovis*, ovejas y cabras, respuestas inmunes.

ABSTRACT

The major antigens recognized by IgG from *Oestrus ovis* (Diptera:Oestridae) infected sheep have been found in salivary gland content that can be useful for diagnosis of ovine and caprine oestrosis disease. In addition, parasitic larvae of *Hypoderma lineatum* (Diptera:Oestridae) secrete antigenic proteases used for bovine hypodermosis diagnosis in eradication programs. The general objective of this thesis was to investigate antigenic proteases and proteolytic activity in salivary gland content of *O. ovis* third instars and to determine their antigenic value for sheep and goat oestrosis diagnosis. Third instars (L3) and gravid flies were collected to obtain salivary antigens and infective first instars of *O. ovis*. L3 larvae were dissected and their contents were analyzed in enzymatic tests (Apyzim, Azocoll, Zymogramas) and immunoblots as well as in ELISA test development to serodiagnosis of sheep and goats oestrosis. The number and development of *O. ovis* larvae found in sheep and goats were recorded. Additionally, blood serum samples from sheep and goats infected naturally or experimentally were used as well as nasal mucus of sheep. The sheep of the flock were divided into three groups Ram-families. The results found were: enzymatic activities in salivary gland contents of acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, α -glucosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase, were detected. Optimum pH for proteolytic activity was 8.0, while proteolytic activity increased with temperature (10 to 50 °C) then drastically decreased at 60 °C. Proteases in *O. ovis* salivary gland products belong to the serine subclass. In Zymograms, bands of proteolytic activity were detected in the 20 to 63 kDa range; the immunoblot showed three antigenic bands, one of them related to a protease band (63 kDa). In ovine specie, negative correlations among larval establishment and/or larval development on the one hand and intensity of local or systemic IgG responses on the other hand were found in two out of three studied ram-families. In caprine specie, the prevalence (necropsy examinations) of *O. ovis* in La Paz, Baja California Sur, was 73.9% and the overall seroprevalence in samples goats of Baja California Sur was 59.2%. The IgG antibody response was not associated ($P<0.05$) with parasitological parameters. In general, both iELISA test using antigens of *O. ovis* salivary gland had high sensibility (>90%) and low specificity (26-52%) to detect ovine and caprine oestrosis. As conclusions, there are antigenic and proteolytic activities in *O. ovis* salivary gland content that seems to be involved in larval nutrition and host immuno-modulation. Despite that antigenic and proteolytic bands of the same molecular weight were found, it could not possible to determine if they were antigenic proteases with the employed methods. The salivary gland antigens improved the serological parameters of iELISA test to detect ovine oestrosis and were efficient for diagnosis of caprine oestrosis.

Keywords: *Oestrus ovis* parasite, sheep and goats, immune responses.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORIAL

Dr. Felipe Ascencio Valle. Co-Director de tesis. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

Dr. Ramón Cepeda Palacios. Co-Director de tesis. Universidad Autónoma de Baja California Sur.

Dra. María Antonia Guzmán Murillo. Tutora. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

Dra. Maurilia Rojas Contreras. Tutora. Universidad Autónoma de Baja California Sur.

Dr. Philippe Jacquet. Tutor. École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Francia.

MIEMBROS DEL JURADO DEL EXAMEN DE GRADO

Dr. Felipe Ascencio Valle. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

Dr. Ramón Cepeda Palacios. Universidad Autónoma de Baja California Sur.

Dra. María Antonia Guzmán Murillo. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

Dra. Maurilia Rojas Contreras. Universidad Autónoma de Baja California Sur.

Dr. David Raúl López Aguilar. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

Suplente

Dr. Bernardo Murillo Amador. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

DEDICATORIA

A mis Padres y a mis Hermanas....

AGRADECIMIENTOS

Espero acordarme de tod@s los que me han ayudado durante este tiempo para alcanzar esta meta muy personal y que nunca la podría haber conseguido sin su apoyo. Por favor, discúlpame de antemano si omití mencionarte.

Primero quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado.

Muchas gracias al Centro de de Investigaciones Biológicas del Noroeste por la oportunidad y las facilidades brindadas durante mi formación doctoral.

También quiero reconocer mi gratitud a la Universidad Autónoma de Baja California Sur, a través del Departamento de Zootecnia, por su apoyo durante mis estudios de doctorado.

Mi sincero agradecimiento a la École Nationale Vétérinaire de Toulouse porque siempre me ha recibido y me ha dado las facilidades para realizar mis estancias doctorales de entrenamiento.

Al programa ECOS-CONACYT de los gobiernos francés y mexicano por los apoyos económicos concedidos para llevar a cabo las estancias en la ENVT, muchas gracias.

Aprovecho este espacio para agradecer al Dr. Felipe Ascencio y al Dr. Ramón Cepeda Palacios su confianza para desarrollar estos trabajos de investigación, pero sobre todo por su gran amistad.

Siempre les agradeceré enormemente a mis tutores: la Dra. Tony Guzmán, la Dra. Maurilia Rojas y el Dr. Philippe Jacquet y también al Dr. Philippe Dorchies por sus excelentes orientaciones académicas y por brindarme siempre su amistad. Aprovecho para agradecer también, al Dr. Raúl López y al Dr. Bernardo Murillo por aceptar amablemente ser suplentes en el examen de grado.

Quiero decirle muchas gracias a la Dra. Thelma Castellanos porque siempre me apoyó en lo que necesité como estudiante de este posgrado. También les agradezco la amistad, disponibilidad y ayuda a las Lic. Leticia Rubio y Lic. Osvelia Ibarra, a las secretarías Claudia y Betty, y a los Ing. Horacio Sandoval e Ing. Manuel Melero.

Gracias también a mis buenos Amigos de la UABCS: Dr. Juan Manuel Ramírez Orduña, Dr. Rafael Ramírez Orduña, M.C. Alberto Monroy, M.S., Juan Manuel Ávila Sandoval, por sus valiosos consejos durante mi formación doctoral.

A mes amis de l'ENVT: Cristelle Grisez, Françoise Prévot, Jean Paul Bergeaud, Getachew Terefe, Madame Françoise Carriere, Dr. Gilles Foucras et Directeur A. Milon. Merci beaucoup pour votre disponibilité et votre enseignement dans le Laboratoire de Parasitologie-INRA.

I will always appreciate the kind help of Drs. Phillippe Scholl, David Taylor and Douglas Colwell for English edition of the articles from this research thesis.

A mi querida Patobanda que para mi Ha sido, Es, y Seguirá siendo única e inolvidable. Sobra enlistar a todos los que saben que son mis amigos, que me han brindado un consejo, una explicación, una sonrisa.

A Mathita porque me ha apoyado en todo y por su gran cariño. También, porque ella me ha permitido conocer a sus grandiosas familias Reyes Becerril y Reyes Murillo con las que he compartido muchos momentos bonitos.

No puedo dejar pasar la oportunidad para agradecer a la familia Cepeda Loya porque su amistad ha sido muy importante para mi desarrollo personal durante estos años.

A mis Padres que han tenido la paciencia para educarme y apoyarme para realizar mis estudios. Gracias por este legado.

A mis hermanas porque me quieren incondicionalmente y porque la pasamos a todo dar en esta vida. Hermanas, las admiro y las quiero con todo mi corazón y nunca dejaré de hacerlo.

A mi Tocayo que esta en el cielo...

PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN GENERADOS

Artículos arbitrados publicados:

Effects of immunization of Pelibuey lambs with *Oestrus ovis* digestive tract protein extracts on larval establishment and development. 2007. C.E. Angulo-Valadez, R. Cepeda-Palacios, P. Jacquiet, P. Dorchies, F. Prévot, F. Ascencio-Valle, J.M. Ramirez-Orduña, F. Torres. *Veterinary Parasitology* 143, 140–146 (Trabajo preliminar de doctorado).

Proteolytic activity in salivary gland products of sheep bot fly (*Oestrus ovis*) larvae. 2007. C.E. Angulo-Valadez, R. Cepeda-Palacios, F. Ascencio, P. Jacquiet, P. Dorchies, M.J. Romero, R.M. Khelifa. *Veterinary Parasitology* 149, 117–125.

Specific IgG antibody responses in *Oestrus ovis* L. (Diptera: Oestridae) infected sheep: Associations with intensity of infection and larval development. 2008. C.E. Angulo-Valadez, A. Scala, C. Grisez, F. Prévot, J.P. Bergeaud, A. Carta, R. Cepeda-Palacios, F. Ascencio, G. Terefe, P. Dorchies, P. Jacquiet. *Veterinary Parasitology* 155, 257-263.

Artículo sometido:

Specific IgG antibody response against salivary gland antigens from *Oestrus ovis* L. larvae (Diptera: Oestridae) in infected goats. Angulo-Valadez, C.E., Cepeda-Palacios, R., Ascencio, F., Jacquiet, Ph., Dorchies, Ph., Ramírez-Orduña, J. M., López, M.A. *Veterinary Parasitology*, Número de registro: VETPAR-S-08-00520.fdf

Manuscrito en preparación:

Oestrus ovis L. larvae (Diptera: Oestridae) infected goats: relationships with systemic antibody response, sinus lesions, and host' phenotypic characteristics. Angulo-Valadez, C.E., Cepeda-Palacios, R., Ascencio, F., Jacquiet, Ph., Dorchies, Ph.

Participaciones en congresos Nacionales e Internacionales:

Infección natural de cabras con *Oestrus ovis* L. (Diptera: Oestridae): asociaciones con características fenotípicas del hospedero y la respuesta de anticuerpos IgG específicos contra antígenos de la glándula salival larvaria. VI Seminario Internacional de Parasitología Animal. Veracruz, México. 2008. C.E. Angulo-Valadez, R. Cepeda-Palacios., F. Ascencio., Ph. Jacquiet., Ph. Dorchies. J.M. Ramírez-Orduña.

Oestrosis diagnosis in sheep by ELISA test using salivary gland antigens of *Oestrus ovis* (Diptera:Oestridae). 21st Internacional congress of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Gent, Belgium. 2007. C.E. Angulo-Valadez, A. Scala, C. Grisez, F. Prevot, J.P. Bergeaud, A. Carta, R. Cepeda-Palacios, F. Ascencio, G. Terefe, P. Dorchies, P. Jacquiet.

- Cambios en la mucosa nasal asociados con la infección de *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) en caprinos. XLIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Sinaloa 2007. Sinaloa, México. 2007. C.E. Angulo-Valadez., R. Cepeda-Palacios., F. Ascencio., Ph. Jacquiet., Ph. Dorchie. J.M. Ramírez-Orduña.
- Actividad proteolítica en la glándula salival de larvas de *Oestrus ovis*: gusano del cuerno de cabras y ovejas. VII Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria. Guerrero, México. 2006. Angulo V. C. E., Cepeda P. R. Ascencio V. F, Jacquiet, Ph, Dorchie, Ph y Ramírez O.J.M.
- Inmunización de corderos pelibuey con extractos del tracto digestivo de *Oestrus ovis* y subsecuente reto experimental. VII Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria. Guerrero, México. 2006. Cepeda P.R., Angulo V. C. E., Jacquiet P., Dorchie P., Prévot F., Ascencio V.F., Ramírez O.J.M., Torres F.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORIAL.....	iii
MIEMBROS DEL JURADO DEL EXAMEN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN GENERADOS.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
HIPÓTESIS GENERAL.....	37
HIPÓTESIS PARTICULARES.....	37
OBJETIVO GENERAL.....	38
OBJETIVOS PARTICULARES.....	38
SINÓPSIS DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA.....	39
CAPITULO I. Actividad antigénica y proteolítica de las proteínas de la glándula salival de larvas L3 de <i>Oestrus ovis</i> L. (Diptera:Oestridae)	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
RESULTADOS.....	46
DISCUSIÓN.....	52
CAPÍTULO II. Valor serodiagnóstico de los antígenos de la glándula salival de <i>Oestrus ovis</i> L. usando la prueba de iELISA en ovejas	58
MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
RESULTADOS.....	63
DISCUSIÓN.....	70
CAPÍTULO III. Valor serodiagnóstico de los antígenos de la glándula salival de <i>Oestrus ovis</i> L. usando la prueba de iELISA en cabras	
Parte I. Desarrollo de una prueba de iELISA usando caprinos infectados experimentalmente y estudio seroepidemiológico de la estrosis caprina en Baja California Sur	73
MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
RESULTADOS.....	78
DISCUSIÓN.....	85
Parte II. Aplicación de la prueba de ELISA en caprinos infectados en campo y examinados en necropsias	88
MATERIALES Y MÉTODOS.....	88
RESULTADOS.....	91
DISCUSIÓN.....	98
DISCUSIÓN GENERAL.....	101
CONCLUSIONES.....	104
REFERENCIAS.....	105
ANEXOS: ARTICULOS CIENTÍFICOS.....	115

LISTA DE FIGURAS

No.	Título	Página
Figura 1.	Vista ventral de la larva L1 de <i>O. ovis</i> (60X).....	7
Figura 2.	Patrón de crecimiento (peso promedio, g) de larvas de <i>O. ovis</i>	8
Figura 3.	Descarga nasal como signo clínico de la infección de <i>O. ovis</i> en cabras.	18
Figura 4.	Cambios histopatológicos asociados a la estrosis en ovejas.....	22
Figura 5.	Actividades enzimáticas detectadas en el contenido de la glándula salival de <i>O. ovis</i> utilizando la técnica ApiZym (media±D.E.).....	46
Figura 6.	Efectos del pH (A) y la temperatura (B) sobre la actividad proteolítica en el contenido de la glándula salival de las larvas de <i>O. ovis</i> (media±E.E.).....	48
Figura 7.	Patrón de proteínas, Zimograma e Inmunobloting del contenido de la glándula salival de larvas L3 de <i>O. ovis</i> en condiciones nativa (A) y desnaturalizante no reductora (B).....	50
Figura 8.	Intensidades de las respuestas de anticuerpos IgG específicos, sistémicas (A) y locales (B), contra <i>O. ovis</i> en ovejas infectadas (media±D.E.).....	66
Figura 9.	Reconocimiento de antígenos por los anticuerpos de ovejas infectadas con <i>O. ovis</i> de los grupos Progenitor-progenie.....	67
Figura 10.	Cinética de los anticuerpos sistémicos IgG específicos por la prueba de ELISA indirecta usando L3SGC como antígenos de cobertura en cabritos infectados experimentalmente (media±D.E.).	82
Figura 11.	Relación del número de larvas de <i>O. ovis</i> (A) y el desarrollo larvario (B) con la severidad de las lesiones en los senos frontales y cavidades cornuales de cabras infectadas (media±D.E.).....	95

LISTA DE TABLAS

No.	Título	Página
Tabla I.	Clasificación taxonómica de <i>O. ovis</i> L. (Díptera: Oestridae).....	5
Tabla II.	Estudios epidemiológicos de la infección de <i>O. ovis</i> en ovinos.....	10
Tabla III.	Estudios epidemiológicos de la infección de <i>O. ovis</i> en caprinos.....	11
Tabla IV.	Estudios epidemiológicos de la infección de <i>O. ovis</i> en cabras y ovejas en México.....	14
Tabla V.	Efecto de los diferentes inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica del contenido de la glándula salival de larvas L3 de <i>O. ovis</i>	49
Tabla VI.	Poblaciones de <i>O. ovis</i> en las ovejas de los tres grupos Progenitor- progenie necropsiadas en el mes de Julio en Sardinia, Italia.....	64
Tabla VII.	Prueba de ELISA indirecta usada para el diagnóstico predictivo de la estrosis en ovejas, utilizando L2CE, L2SGC y L3SGC como antígenos de cobertura (2 µg/ml).....	65
Tabla VIII.	Relaciones entre las respuestas sistémicas y locales de inmunoglobulinas G y la carga larvaria o el desarrollo larvario de <i>O. ovis</i>	69
Tabla IX.	Datos de la necropsia, peso vivo y ganancia de peso de los cabritos infectados experimentalmente con larvas L1 de <i>O. ovis</i> durante un periodo de 67 días.....	80
Tabla X.	Actividad física (media diaria) registrada con un equipo indicador digital atado al cuello de los cabritos infectados experimentalmente con larvas L1 de <i>O. ovis</i> , divididos en periodos de 14 días.....	81
Tabla XI.	Respuesta sistémica de anticuerpos IgG específicos y estudio epidemiológico de la infección de <i>O. ovis</i> en cabras de B.C.S. por la prueba de ELISA indirecta usando L3SGC como antígenos de cobertura.....	84
Tabla XII.	Escala de evaluación de la severidad de las lesiones causadas por <i>O. ovis</i> en la cavidad nasal y los senos frontales de cabras examinadas en necropsias.....	90
Tabla XIII.	Características fenotípicas del hospedero y larvas de <i>O. ovis</i> recuperadas de los senos y cavidades cornuales en las necropsias de cabras expuestas a la infección natural.....	92
Tabla XIV.	Estadísticos descriptivos de los datos del hospedero, de <i>O. ovis</i> , y de la severidad de las lesiones de la estrosis en cabras.....	93
Tabla XV.	Predicciones de la prueba de iELISA usando L3SGC como antígenos de cobertura y los datos de las necropsias de cabras expuestas a la infección natural de <i>O. ovis</i>	96
Tabla XVI.	Diagnóstico predictivo de la estrosis en cabras expuestas a la infección natural de <i>O. ovis</i> por la prueba de ELISA indirecta usando L3SGC como antígenos de cobertura.....	97

INTRODUCCIÓN

Oestrus ovis L. (Díptera: Oestridae) es un parásito de distribución mundial de las cabras y las ovejas, que afecta el bienestar y rendimiento de sus hospederos. El primer reporte científico de observaciones de *O. ovis in situ* en ovejas fue hecho por Vallisieri en 1712 (Gildow y Hickman (1931) citado por Rogers, 1967). Desde ese tiempo y durante los dos siglos pasados, *O. ovis* ha sido considerado como uno de los parásitos cosmopolitas más importantes de las ovejas (Riley (1868) citado por Rogers, 1967; Babcock, 1953). De hecho, a la fecha la infección de *O. ovis* es considerada de importancia económica para las industrias de producción de cabras y ovejas en el mundo (Colwell, 2004). La infección de *O. ovis*, como todas las causadas por moscas dípteras, se conocen con el nombre de miasis. Por definición, miasis (del Griego, myia= mosca) es “la infestación de animales vertebrados vivos con larvas dípteras, las cuales, al menos por un cierto periodo, se alimentan del tejido vivo o muerto, sustancias líquidas del cuerpo, o comida ingerida del hospedero” (Zumpt, 1965).

En México, se han realizado algunos trabajos sobre epidemiología, ecología, biología de *O. ovis* y sobre la inmunología de esta relación parásito-hospedero (Quintero et al., 1987; Bautista-Garfias, 1982; 1988; Mireles et al., 1992; Murguía et al., 2000; Cepeda-Palacios y Scholl, 2000ab).

Es interesante el hecho de que Baja California Sur sea uno de los lugares más propicios en el mundo para la diseminación y desarrollo de *O. ovis* debido a sus condiciones climáticas: tierra árida, precipitaciones bajas, temperaturas relativamente altas y otros factores asociados (Cepeda, 2005). Cepeda et al. (1993) encontraron que el 88% de

las cabras y ovejas estaba infectadas con *O. ovis*. Además, la infección en B.C.S. es permanente y con alta prevalencia a través del año (Cepeda-Palacios et al., 1999, 2000; Cepeda-Palacios y Scholl, 2000ab, 2001).

La infección activa de *O. ovis* inicia después de que las moscas grávidas depositan larvas alrededor de la nariz del hospedero. Las larvas inmediatamente penetran en las cavidades nasales y sinusales donde habitan. Básicamente, las larvas se alimentan de la mucosa y del moco secretado para crecer y desarrollarse en menos de 30 días ó incluso durante varios meses. Cuando las larvas alcanzan la madurez fisiológica, dejan al hospedero para iniciar la formación del pupario y el proceso de metamorfosis en el suelo. Finalmente, el adulto emerge para aparearse, incubar, y larvipositar hospederos en pocos días.

Los estornudos frecuentes y las descargas nasales son los signos clínicos principales de los hospederos infectados. La patogénesis desarrollada se relaciona con el efecto traumático causado por las espinas cuticulares y ganchos orales durante los desplazamientos larvarios; y también, con las moléculas larvarias secretadas y excretadas que provocan una reacción inmune de hipersensibilidad nasal (Dorchies et al., 2006). Ambos estímulos mecánico y bioquímico son responsables de los daños patológicos y las respuestas inmunes en la mucosa nasal. Aunque este parásito es conocido hace varios siglos, existe poca información disponible sobre la relación inmune hospedero-parásito. Sobre todo, la interacción entre *O. ovis* y el hospedero caprino ha sido escasamente investigada. Recientemente, se demostró que la saliva contiene los antígenos de mayor reconocimiento por los anticuerpos sistémicos de las ovejas y probablemente juegan un papel importante en la relaciones parásito-hospedero (Tabouret et al., 2001a). Es por eso

que el conocimiento sobre las respuestas inmunes y el reconocimiento de antígenos por el hospedero es el primer paso para el desarrollo de tecnologías de diagnóstico y de vacunas efectivas. Por todo lo anterior, este estudio fue diseñado para investigar aspectos de la relación parásito-hospedero basado en las proteínas antigénicas de la saliva de *O. ovis*.

ANTECEDENTES

Ovejas (*Ovis aries*) y Cabras (*Capra hircus*)

Importancia económica de los ovinos y caprinos en el Mundo. Las especies ovina y caprina fueron domesticadas hace unos 10,000-9,500 años, probablemente en las montañas Asiáticas desde Turquía hasta el Tibet (Cepeda, 2008; Devendra y McLeroy, 1986). Desde aquellos tiempos, las cabras y las ovejas han sido indispensables para los seres humanos como fuentes de alimento y vestido. Ambas especies han proveído proteínas de alta calidad y energía de la leche y carne producidas, especialmente a las familias que viven en esquemas de subsistencia (FAO, 2006). Sin embargo, el rendimiento productivo de las ovejas y cabras depende directamente de sus genes y de las condiciones del ambiente; en donde son particularmente importantes los agentes de infección que provocan enfermedades en los hospederos y causan pérdidas en la producción de carne, leche, y lana.

Importancia de los ovinos y caprinos en México. Los ovinos y caprinos domésticos fueron traídos a México por los conquistadores españoles en el siglo XVI (de Lucas y Arbiza, 2000; Cepeda, 2008). En el año 2005, la población ovinos en México ascendió a 7, 207, 406

cabezas; mientras que la población de caprinos fue de 8, 870, 312 cabezas (SIAP, 2008). De estas poblaciones, Baja California Sur contaba con 22, 348 ovinos y 113, 056 caprinos, aproximadamente (SIAP, 2008). Sobre la importancia de los ovinos y caprinos en términos generales se puede decir que las producciones de carne de ovino y de caprino ocuparon el cuarto y quinto lugar en México durante el 2007. De acuerdo con el SIAP (2008), los pronósticos de producción carnes al cierre del 2008 son de 50, 724 toneladas para los ovinos y de 42, 641 toneladas para los caprinos. Además, se estima que la leche de cabra cerrará este año con una producción aproximada de 166, 584 miles de litros. Estos alimentos son la base de alimentación en muchas familias de escasos recursos económicos en nuestro país (Arbiza y de Lucas, 2001; Cepeda, 2008). No obstante, actualmente existen productos de origen ovino y caprino de alta calidad por los que se paga un elevado precio en el mercado nacional. Lo anterior indica la relevancia de estas especies animales en la producción de alimentos para los mexicanos por más de cuatro siglos. Sin embargo, los sistemas de producción ovina y caprina en México y en el mundo han sido perjudicados por muchos patógenos que han causado pérdidas económicas importantes y enfermedades a los humanos.

Enfermedades de las ovejas y las cabras. La explotación de ovejas y cabras es afectada negativamente por muchos patógenos de los cuales se han identificado bacterias, virus, priones, hongos, y parásitos por su impacto en pérdidas económicas en las industrias de producción ovina y caprina. De todos los patógenos, el gusano de la nariz y cuernos (*Oestrus ovis* L.) ha sido considerado uno de los parásitos mas importantes de las cabras y

las ovejas en el mundo (Babcock, 1953; Riley (1868) citado por Rogers, 1967; Touré, 1994; Colwell, 2004).

***Oestrus ovis* L. (Díptera: Oestridae)**

Taxonomía. *O. ovis* es un insecto que pertenece a la familia Oestridae (Tabla I). En el género *Oestrus spp*, Zumpt (1965) ha incluido las especies *O. variolosus* Loew, *O. bassoni* Zumpt, *O. caucasicus* Grunin, *O. aureogargentatus* Rodhain y Bequaert, y *O. ovis* L.

Todos las larvas de los éstridos son parásitos de vertebrados vivos en los que causan una enfermedad conocida genéricamente como miasis (Colwell et al., 2006). En general, las miasis son clasificadas de acuerdo con el nivel de dependencia del parásito con el hospedero (obligada o facultativa) y al lugar anatómico de infestación en el hospedero (Zumpt, 1965). Basado en esta clasificación, *O. ovis* es un parásito obligado de las cavidades nasales y sinusales de las cabras y ovejas.

Tabla I. Clasificación taxonómica de *O. ovis* L. (Díptera: Oestridae)

Reino:	Animal
Filo:	Artropoda
Subfilo:	Hexapoda
Clase:	Insecta
Subclase:	Pterigota
Infraclase:	Neoptera
Orden:	Diptera
Suborden:	Braquicera
Infraorden:	Muscomorfa
Familia:	Oestridae
Subfamilia:	Oestrinae
Genero:	Oestrus
Especie:	<i>Oestrus ovis</i>

(Integrated Taxonomic Information System (<http://www.itis.gov>), Diciembre, 2008)

Ciclo de vida. De acuerdo con [Cobbett y Mitchell \(1941\)](#), las moscas grávidas depositan larvas de primer estadio (L1, [Figura 1](#)) sobre la nariz de las cabras y ovejas. Estas larvas penetran activamente en la cavidad nasal donde viven. Luego, las larvas L1 migran del septo nasal y los turbinados al etmoides donde ocurre la primera muda al segundo estadio larvario (L2). Después las larvas L2 migran, a través del foramen nasofrontal, hacia los senos frontales donde mudan al tercer estadio larvario (L3). Cuando las larvas L3 adquieren la madurez fisiológica, regresan a la cavidad nasal y son expelidas con ayuda de los estornudos del hospedero. En el suelo, las larvas L3 se entierran e inician los procesos de formación del pupario y de metamorfosis. Después de la emergencia, los adultos están física y fisiológicamente preparados para aparearse pocos minutos después de la emergencia. A partir de ese momento las hembras incuban los huevecillos fecundados hasta su desarrollo a larvas L1; y finalmente, estas moscas grávidas son capaces de infectar nuevos hospederos en pocos días.

Durante la fase parásita, las larvas se alimentan principalmente del moco secretado por la membrana de la mucosa nasal. Las funciones básicas de las larvas son: alimentarse, crecer, mudar, y desarrollarse ([Scholl et al., 1990](#)); mientras que los adultos están dedicados exclusivamente a actividades de reproducción y diseminación de la especie ([Dorchies et al., 1998](#)). Lo anterior es importante debido a que los adultos no se alimentan y su viabilidad depende críticamente de las reservas energéticas y proteínicas que acumularon durante la fase parásita ([Cepeda-Palacios et al., 2000](#)).

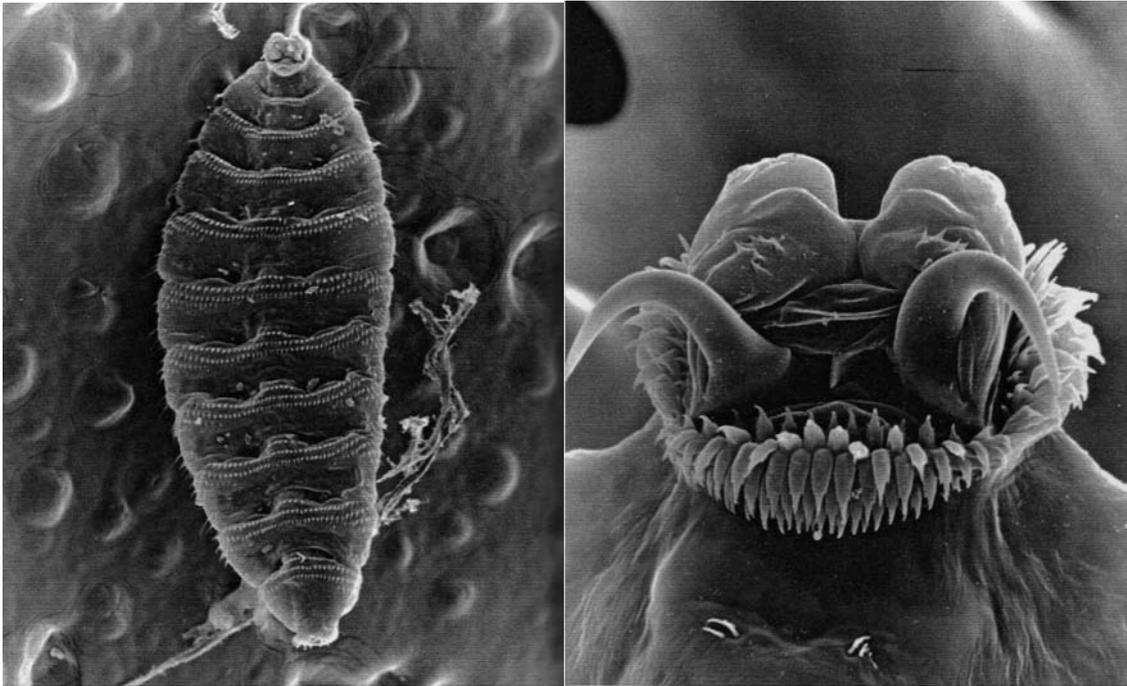


Figura 1. Vista ventral de la larva L1 de *O. ovis* (60X) (Duranton, 1997).

Crecimiento y desarrollo larvario. Cepeda-Palacios et al. (1999) describieron los patrones de crecimiento larvario de *O. ovis*. Estos autores desarrollaron una serie de criterios morfológicos para determinar la edad fisiológica de las larvas y su relación con los cambios en su peso, longitud, y anchura. En la curva de crecimiento (Figura 2) se observa que la ganancia de peso larvario obtuvo su máximo incremento después de la muda de L2 a L3.

Dentro del hospedero *O. ovis* se desarrolla en tres estadios larvario llamados L1, L2 y L3, de acuerdo con las claves entomológicas propuestas por Zumpt (1965). El desarrollo larvario completo puede tomar menos de 20 días (Dorchies et al., 1996), de 3-4 semanas (Cobbett y Mitchell, 1941) ó de 9-11 meses dependiendo de las condiciones ambientales para las larvas (Porchinskii, 1913; Cobbett y Mitchell, 1941; Breev y Sultanov, 1975). Si las condiciones ambientales son desfavorables, las larvas L1 emplean una estrategia fisiológica llamada diapausa (hipobiosis) facultativa que les permite sobrevivir durante meses (Fallis, 1940; Dorchies y Yilma, 1996; Cepeda-Palacios et al., 2003).

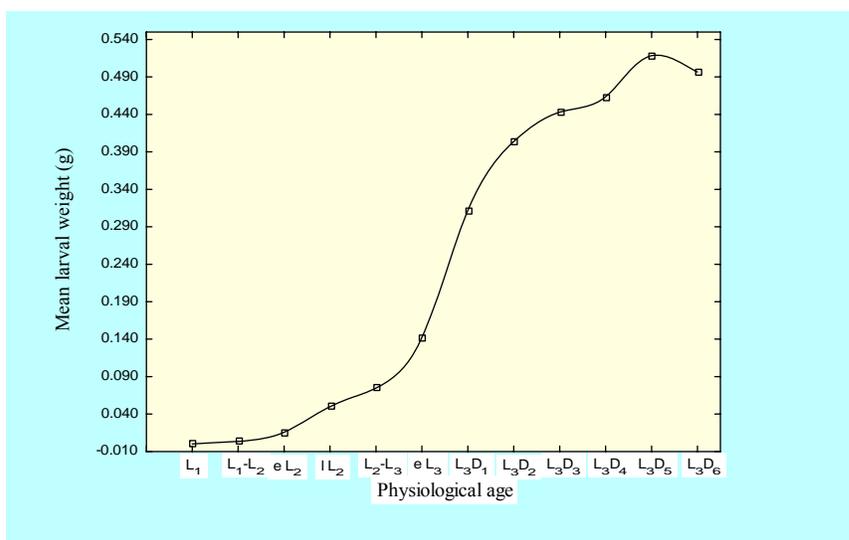


Figura 2. Patrón de crecimiento (peso promedio, g) de larvas de *O. ovis* (Cepeda-Palacios et al., 1999).

Nutrición y alimentación larvaria. En general, el canal alimentario de los insectos esta dividido en tres regiones principales (Mordue et al., 1980): intestino anterior (boca, faringe, esófago, buche), intestino medio (ciego, ventrículo, píloro) e intestino posterior (íleon, recto, ano). Algunos insectos secretan (p.ej. saliva) y excretan productos sobre su sustrato alimenticio antes de ingerirlo y, debido a que contiene enzimas, ocurre una digestión extra-corporal (Chapman, 1998). Se ha propuesto que *O. ovis* realiza digestión extra-corporal como ocurre en otros insectos (Tabouret et al., 2003a; Terra y Ferreira, 1994). En este caso, la membrana mucosa del hospedero, el moco, y algunas moléculas plasmáticas son el alimento y la fuente de nutrimentos para el crecimiento y desarrollo larvarios. Por ejemplo, se ha demostrado que las enzimas proteolíticas de los productos secretados – excretados (ESP) se degradan en pequeños fragmentos la mucina, albúmina de suero e inmunoglobulinas de oveja (Tabouret et al., 2003a). Luego, los fragmentos deben ser succionados para que se lleve a cabo una digestión intermedia-final y la absorción de nutrimentos en el intestino medio. Evidentemente, los monómeros (p.ej. amino ácidos, glucosa, etc) necesarios para los procesos fisiológicos larvarios provienen de esas y otras moléculas. Además, el colágeno también es degradado por las proteasas que son secretadas – excretadas sobre la mucosa nasosinusal (Frugère et al., 2000). Particularmente las proteasas larvarias son capaces de degradar colágeno Tipo I (matriz extracelular) y Tipo IV (lamina basal) (Dorchies et al., 2006). Además, la actividad colagenolítica larvaria podría representar un medio para facilitar la filtración de proteínas plasmáticas inducida por el proceso inflamatorio y una fuente de alimento para las larvas (Tabouret et al., 2003a). Por otra parte, cuando el desarrollo larvario se incrementa, no solo aumenta la producción de proteína en las secreciones – excreciones sino también se incrementa la actividad

proteolítica (Tabouret, 2001). Sin embargo, aún muchos aspectos de los hábitos alimenticios y de la nutrición larvaria de *O. ovis* permanecen desconocidos.

Epidemiología

O. ovis se ha reportado en los cinco continentes del mundo (Walter y Froggatt, 1911; Kettle, 1973; Horak, 1977; Ranatunga y Rajamahendran, 1972; Yilma y Dorchies, 1991; Cobbett y Mitchell, 1941). En las Tablas II y III se muestran ejemplos seleccionados de los años 2000 a 2007 que indican que *O. ovis* es altamente prevalente en cabras y ovejas, incluso en países desarrollados y a pesar del uso de una gran variedad de drogas antiparasitarias.

Tabla II. Estudios epidemiológicos de la infección de *O. ovis* en ovinos.

País	n=	Prevalencia (%)*	Incidencias (%)**	Intensidad de la infección (larvas/oveja)	Referencia
Francia	631	43.4	14.3-65.0	10.86	Dorchies et al., 2000.
Etiopía	248	77.4	50-99.3	12.74	Yilma y Genet, 2000.
Italia	566	91	69-100	19	Scala et al., 2001.
Francia	268	46	-	12.6	Jacquet y Dorchies, 2002.
España	477	71.1	22.2-100	18.5	Alcaide et al., 2003.
España	276	82.3	71.6-86.7	16.7	Alcaide et al., 2005a.
Italia	208	75	-	8.72	Suárez et al., 2005.
Turquía	624	59	34.6-76.9	23.9	Uslu y Dik, 2006

*Prevalencia anual promedio. **Mínimo y máximo encontrado, respectivamente.

Tabla III. Estudios epidemiológicos de la infección de *O. ovis* en caprinos.

País	n=	Prevalencia (%)*	Incidencias (%)**	Intensidad de la infección (larvas/cabra)	Referencia
Francia	672	28.4	6.25-47.1	5.35	Dorchies et al., 2000
Etiopía	258	72.9	50-100	10.52	Yilma y Genet, 2000.
España	80	34.9	20-40	3.9	Alcaide et al., 2005b.

*Prevalencia anual promedio. **Mínimo y máximo encontrado, respectivamente.

Algunas características sobre la epidemiología de *O. ovis* son aceptadas de manera general:

O. ovis tiene mayor prevalencia en ovejas que en cabras (Cozab, 1988; Jagannath et al., 1989; Pathak, 1992; Gabaj et al., 1993; Yilma y Genet, 2000; Dorchie et al., 2000).

Los hospederos adultos parecen más susceptibles a la infección de *O. ovis* que los corderos o los cabritos (Fallis, 1940; Chhabra y Ruprah, 1976; Jagannath et al., 1989; Gabaj et al., 1993; Biu y Nwosu, 1999; Yilma y Genet, 2000). Sin embargo, en los resultados obtenidos por Gabaj et al. (1993), el porcentaje de animales infectados disminuyó en ovejas de 1 a 4 años de edad; y Yilma y Genet (2000) no encontraron diferencias estadísticas significativas entre ovejas jóvenes y adultas. De la misma manera, Abo-Shehada et al. (2003) no encontraron diferencias en cabras jóvenes y adultas.

El número de larvas es mayor en ovejas que en cabras (Jagannath et al., 1989; Pathak, 1992; Gabaj et al., 1993; Duranton, 1997; Cepeda et al., 1998; Yilma y Genet, 2000). Probablemente esto tiene una explicación evolutiva en la que *O. ovis* parasitó primero a la especie caprina y después a la especie ovina (Philippe Dorchie, comunicación personal).

El número de larvas en adultos es mayor que en corderos o cabritos (Rogers y Knapp, 1973; Jagannath et al., 1989; Tesfaye, 1993; Abo-Shehada et al., 2003). En contraste, Tesfaye (1993) y Yilma y Genet (2000) encontraron que la carga larvaria en cabras más jóvenes fue significativamente mayor que en las adultas. De manera similar,

Kilani et al. (1986) y Yilma (1992) encontraron que las cargas larvarias fueron más altas en corderos que en ovejas adultas bajo condiciones de campo.

Por otra parte, las larvas de *O. ovis* crecen más rápido en corderos que en ovejas maduras (Babcock, 1953; Rogers y Knapp, 1973; Yilma, 1992).

El número de larvas por cabeza se incrementa durante el periodo de la actividad de larviposición de la mosca, cuando las larvas recientemente depositadas están presentes en los pasajes nasales (Cobbett y Mitchell, 1941).

En México se han realizado estudios epidemiológicos de la estrosis usando métodos de diagnóstico distintos (Tabla IV). La prevalencia de *O. ovis* es relativamente alta en todo el país. Probablemente debido a las condiciones climáticas es que se presentan mayores tasas de infección en la región Noroeste de México: Sonora, Sinaloa, Baja California Norte y Baja California Sur. Particularmente en Baja California Sur, *O. ovis* fue prevalente en 88% de los animales muestreados (Cepeda et al., 1993). La carga larvaria promedio encontrada por los autores fue más alta en ovejas (18.4) que en cabras (9.5). Es interesante el hecho que se encontraran correlaciones significativas de diciembre a junio con el número de larvas L1, L2, y L3, lo que indica que se intensificaron tanto la actividad infectiva de la mosca como los ritmos de desarrollo larvario. En otro estudio realizado en La Paz, B. C. S. se demostró que la prevalencia durante los años 1997 a 1998 fue del 85% (Cepeda et al., 1998). Los valores más altos (100%) de incidencia encontrados fueron durante los meses de enero a junio de 1998, mientras que los más bajos (63%) en julio de 1997. Los resultados recientes confirman la alta prevalencia de la enfermedad causada por *O. ovis* en rebaños caprinos de B.C.S. (Cepeda y Scholl, 2000a).

Tabla IV. Estudios epidemiológicos de la infección de *O. ovis* en cabras y ovejas en México.

Hospedero	n=	Origen	Prevalencia (%)	Intensidad de la infección (larvas/hospedero)	Referencia
Cabra	100	Coah., Gto., Nay., S.L.P., Zac.	53	-	Bautista-Garfias et al., 1982.
Oveja	100	Edo. de México	88	-	Angulo et al., 1983.
Cabra	52	Edo. de México	52	3	Quintero et al., 1987.
Cabra	380	Guerrero	31	2	Mireles et al., 1992.
Cabra,	58	B.C.S.	88	9.5 (cabras)	Cepeda et al., 1993.
Oveja				18.4 (ovejas)	
Cabra	452	B.C.S.	85.4	6.24	Cepeda et al., 1998.
Oveja	689	Yucatán	33	-	Murguía et al., 2000.

Adaptado de Cepeda (2005)

Importancia económica de la infección de *O. ovis*

Se han reportado pérdidas del 22% en el peso vivo corporal y del 16% en lana en ovejas infectadas con *O. ovis* (Scherban (1973) citado por [Scala 2001](#)). [Horak y Snijders \(1974\)](#) demostraron que la pérdida en la ganancia de peso de corderos Merino criados en Sudáfrica puede alcanzar hasta los 2 kg. En México, [Avila \(1973\)](#) encontró que los corderos infectados con *O. ovis* y tratados con el desparasitante Tricolorfón ganaron diariamente 153 g más que los corderos sin tratamiento. También, [Ilchmann et al. \(1986\)](#) determinaron que las ovejas infectadas con *O. ovis* producían 10% menos leche. Estos resultados fueron similares a los reportados recientemente por [Dorchies et al. \(2003\)](#) quienes cuantificaron las pérdidas económicas de la infección en ovejas lecheras de la raza Lacaune en el área de Roquefort (Aveyron, Francia). En los rebaños no infectados, las ovejas primíparas y múltiparas produjeron, respectivamente, 8.56% y 12.24% más que las ovejas provenientes de rebaños infectados. Adicionalmente, se han reportado mortalidades asociadas a la infección de *O. ovis* en ovejas introducidas recientemente en áreas endémicas ([Bouet y Roubaud \(1914\)](#) citados por [Pangui et al., 1988](#)).

Las infecciones asociadas en los animales parasitados por *O. ovis* pueden ser inadvertidas y sin embargo pueden tener consecuencias severas para la salud y la productividad de los hospederos. Se ha demostrado que *O. ovis* provoca problemas respiratorios secundarios en los pulmones e incrementa la susceptibilidad de aparición de otras enfermedades oportunistas ([Dorchies et al., 2006](#)). Consecuentemente, se involucran los costos económicos por concepto de aplicación de tratamientos químicos, manejo de los animales, y pérdidas en el rendimiento productivo animal.

Importancia de *O. ovis* en la salud pública

Los humanos pueden ser infectados con larvas de *O. ovis* por larviposición directa de las moscas ([Porchinskii, 1913](#)). En la actualidad, la literatura médica y biológica reporta miles de casos alrededor del mundo sobre miasis humana por *O. ovis* ([Anderson, 2006](#)).

Las larvas de *O. ovis* se han encontrado en los ojos, nariz, cavidad oral, y oídos de los seres humanos ([Hennessy et al., 1977](#); [Green y Dieppe, 1995](#); [Omar et al., 1988](#); [Pampiglione et al., 1997](#); [Fekry et al., 1997](#); [Gregory et al., 2004](#); [Hemmersbach-Miller et al., 2007](#)). Los signos y síntomas aparecen inmediatamente con la infección y desaparecen a las pocas horas ó días después de la eliminación de los parásitos ([Masoodi y Hosseini, 2004](#); [Hennessy et al., 1977](#)). Los signos clínicos y los exámenes físicos se utilizan para determinar si un humano esta infectado con *O. ovis*. Sin embargo, una prueba de ELISA promete ser un método útil para diagnosticar esta zoonosis ([Hemmersbach-Miller et al., 2007](#)). El tratamiento médico común consiste en remover las larvas usando instrumental de cirugía apropiado, aplicar medicamentos anti-alérgicos y antibióticos, y adicionalmente se pueden usar drogas antiparasitarias (p.ej. ivermectina) ([Omar et al., 1988](#); [Gregory et al., 2004](#); [Masoodi y Hosseini, 2004](#); [Hemmersbach-Miller et al., 2007](#)).

Relaciones parásito –hospedero

Comportamiento defensivo del hospedero a los ataques de las moscas. Las hembras grávidas de *O. ovis* larvipositan en los ollares de la nariz de las cabras y las ovejas. Las ovejas se comportan de una manera peculiar para evitar los ataques de las moscas: se ponen atentas y nerviosas, luego mueven su nariz hacia el suelo, y si los ataques son frecuentes, se agregan cerca una de la otra, manteniendo su nariz dentro de la lana de sus vecinas o la dirigen cerca de la superficie del suelo durante los desplazamientos (Dorchies et al., 2006). Cuando el ataque de la mosca es efectivo, las ovejas se alborotan y sacuden sus cabezas, luego limpian su nariz con el suelo, resoplan, y patean el suelo violentamente. Pero cuando las moscas se ausentan, las ovejas se distribuyen uniformemente sobre el campo (Dorchies y Alzieu, 1997). En las cabras ocurre algo similar (con excepción de dirigir la nariz junto a una compañera); aunque, éstas pueden mover la cabeza repetidamente al percatarse de la presencia de una mosca enfrente de su cara dispuesta a infectarla (observaciones personales).

Signos clínicos. Las descargas nasales abundantes y los estornudos frecuentes son comúnmente encontrados y constituyen los signos clínicos más evidentes en ovejas y cabras infectadas con *O. ovis*. Las descargas nasales pueden ser serosas, mucosas, mucopurulentas, y/o purulentas, acompañadas eventualmente de sangre (Butterfield, 1900; Dorchies et al, 1992) (Figura 3). Los signos clínicos no solo dependen del número de larvas, sino también de la reacción inmune individual del hospedero y de las infecciones oportunistas asociadas causadas por microorganismos.



Figura 3. Descarga nasal como signo clínico de la infección de *O. ovis* en cabras (Foto: Ramón Cepeda Palacios).

Unas características interesantes son la rinitis y sinusitis encontradas durante la temporada cálida en áreas endémicas. Éstas se deben a que las condiciones del ambiente son óptimas para la actividad de los adultos y el desarrollo de las larvas. Sin embargo, todos los signos clínicos son poco evidentes durante las temporadas muy fría ó muy caliente cuando las larvas L1 están hipobióticas (Dorchies et al., 2006). Un aspecto típico de los signos clínicos encontrados en la necropsia es que son más severos en la mucosa de los senos frontales (sinusitis), ya que en esta región anatómica colonizan los estadios larvarios avanzados L2 y L3 (Dorchies y Alzieu, 1997).

Algunos signos adicionales a la estrosis son: ollares obstruidos con moco y polvo, tos, ataxia (ausencia de coordinación de los movimientos musculares), debilidad, estupor (letargo y falta de respuesta), vértigo (pérdida del sentido del equilibrio), amaurosis (ceguera parcial), y epistaxis (episodios hemorrágicos de las fosas nasales) (Butterfield; 1900; Dorchies, 1997). Es interesante que los signos clínicos locales (en la mucosa) y externos puedan desaparecer completamente un mes después de un tratamiento antiparasitario efectivo (Alzieu y Chiarisoli, 1990) o cuando las condiciones climáticas no permiten más la actividad y supervivencia de las moscas (Pandey y Ouhelli, 1984; Dorchies, 1997).

Enfermedades y lesiones asociadas. Se ha asociado al parasitismo de *O. ovis* con la aparición de pleuroneumonía, neumonía intersticial, abscesos en los pulmones, pasteurolosis, listeriosis, adenocarcinomas en la mucosa nasal y sinusal, y con la presencia de *Corynebacterium spp.* (Roberts (1952) citado por Kettle, 1973; Ranatunga y Rajamahendran, 1972; Heikkila (1956) citado por Dorchies et al., 1993; Akapo et al., 1993;

Kato y Murakami, 1962; Ivanov y Petrov, 1966; Kilani et al., 1986; Bergeaud et al, 1994). Estas enfermedades y sus lesiones provocan debilidad en los hospederos y ocasionalmente su muerte. Se ha propuesto que las patologías asociadas pueden ser favorecidas por una estimulación antigénica permanente de los pulmones por larvas de *O. ovis* alojadas en las cavidades nasosinusales del hospedero (Dorchies et al., 2006).

Patogénesis. La patogenicidad de *O. ovis* es provocada principalmente por sus espinas cuticulares y ganchos orales y por las biomoléculas secretadas- excretadas sobre la mucosa. Los movimientos de locomoción larvarios se realizan con ayuda de sus espinas cuticulares ventrales y ganchos orales. Por ello, las larvas irritan mecánicamente la mucosa durante su desplazamiento. Por otra parte, las larvas secretan - excretan (ESP) grupos complejos de enzimas y antígenos sobre la mucosa (Frugère et al., 2000; Tabouret et al., 2001a). Las enzimas liberadas degradan proteínas y carbohidratos presentes en el moco y mucosa para la nutrición y alimentación larvaria (Tabouret et al., 2003a); mientras que los antígenos estimulan fuertemente el sistema inmune celular y humoral (Tabouret et al., 2001ab). Las respuestas inmunes celular y humoral también están asociadas a un fenómeno llamado hipersensibilidad tipo I (Dolbois-Charrier y Dorchies, 1993; Jacquet et al., 2005). Ambas actividades antigénica y enzimática de los ESP son los principales responsables de los daños en las mucosas (Dorchies et al., 2006). No obstante, los antígenos unidos a la cutícula larvaria también estimulan respuestas inmunes en el hospedero (Innocenti et al., 1995; 1997).

Se han caracterizado los cambios patológicos ultraestructurales causados por *O. ovis* usando técnicas de microhistología. La infección por *O. ovis* induce hiperplasia y

metaplasia del epitelio (Tabouret et al., 2003b). La hiperplasia se ha confirmado por el incremento del número de células epiteliales (marcadas con el epítoto nuclear Ki-67) en las mucosas de ovejas infectadas (Nguyen et al., 1998). Estos autores encontraron que el número de células epiteliales fué el doble en ovejas infectadas naturalmente que en ovejas no infectadas; pero también en corderos infectados experimentalmente las células epiteliales fueron 2, 8, y 40 veces más numerosas en el septo-turbinado, etmoides, y senos, respectivamente, que en corderos control (Tabouret et al., 2003b). Estos hallazgos sugieren la existencia de una tasa de regeneración celular muy alta en ovejas infectadas con *O. ovis*. Adicionalmente, la metaplasia observada se determinó usando microscopia electronica de trasmisión (Tabouret et al., 2003b) y consistió en que las células epiteliales redujeron el número y tamaño de las microvellosidades, se disociaron, redondearon y degeneraron (Figura 4).

La patología de la estrosis también causa irregularidades multifocales en la lámina propia (membrana basal) y el corion. En la Figura 4, se muestra que en el etmoides infectado las células epiteliales tienen numerosas vacuolas; así como también se puede apreciar la desorganización de la superficie mucociliar y la pérdida de microvellosidades. Estos hallazgos fueron similares a los encontrados en el epitelio nasal (septo y turbinados). En el seno frontal infectado se observa reducción de las microvellosidades, disociación celular, pérdida de la conformación y degeneración celular (Tabouret et al., 2003b; Nguyen et al., 1999ab).

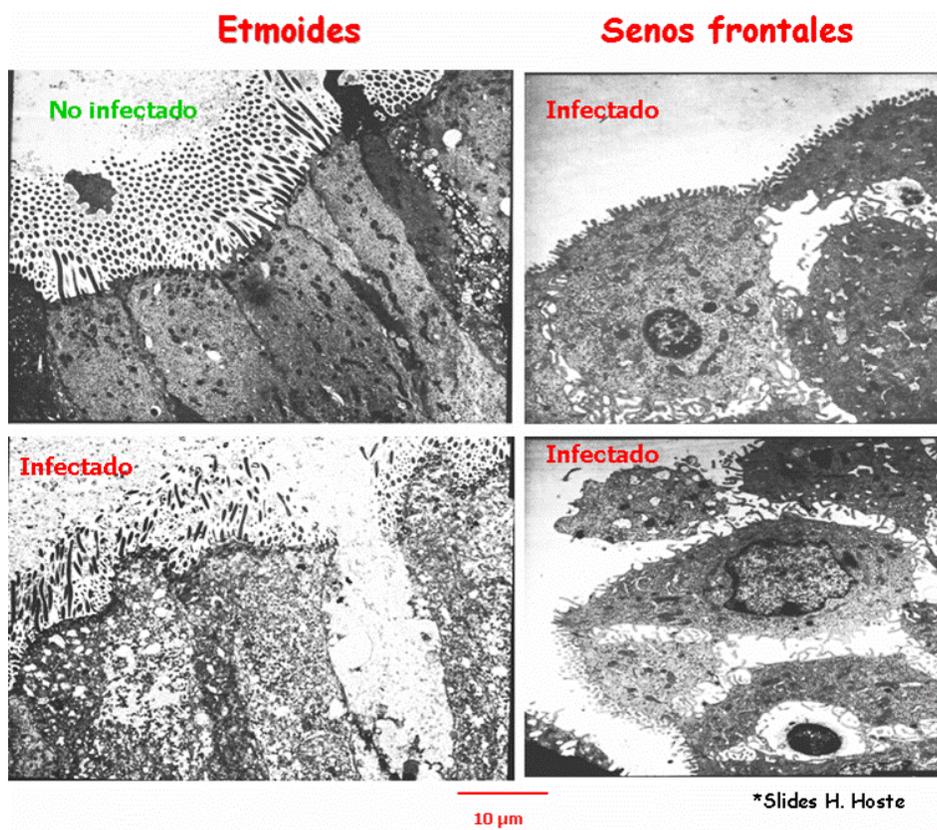


Figura 4. Cambios histopatológicos asociados a la estrosis en ovejas (Fotos Hervé Hoste, 2003).

Respuestas inmunes del hospedero. Las interacciones entre *O. ovis* y el sistema inmune del hospedero son poco comprendidas todavía. Las respuestas inmunes contra *O. ovis* parecen retrasar su crecimiento y desarrollo larvario (Jacquet et al., 2005). Sin embargo, aún no están muy claros los mecanismos inmunes que regulan las poblaciones de este parásito dentro del hospedero. En general, se acepta que las larvas de *O. ovis* estimulan el desarrollo de respuestas inmunes locales y sistémicas del tipo celular y humoral en el hospedero.

i. *Respuestas inmunes celulares.* La infección de *O. ovis* induce el reclutamiento de fagocitos macrófagos y eosinófilos, de linfocitos T ayudadores y B, y de mastocitos (Tabouret et al., 2003b). Estas células han sido reportadas de acuerdo a los sitios anatómicos y las localizaciones histológicas. Sin embargo, no se han observado correlaciones negativas entre el número de las células inmunes y las larvas de *O. ovis* (Nguyen et al., 1999b; Tabouret et al., 2003b).

a. *Mastocitos.* Los mastocitos son células del sistema inmune innato que poseen gránulos llenos de mediadores inflamatorios en su citoplasma. Se encuentran distribuidas en las mucosas y en el tejido conectivo cerca de los vasos sanguíneos. Estas células liberan un gran número de moléculas proinflamatorias, inmunoreguladoras y mediadoras en tejidos después de su activación inducida. Esta activación (fase temprana) se estimula a partir de la unión del antígeno a los anticuerpos (IgE) unidos al FcεRI del mastocito (Roitt et al., 2002). Después, los mastocitos se degranulan y su activación subsiguiente provoca la liberación de mediadores causando la aparición de la fase tardía del proceso inflamatorio (Piliponsky et al., 2002). Durante la

infección con *O. ovis*, los mastocitos son reclutados rápidamente ([Abella, 1990](#); [Dolbois-Charrier y Dorchies, 1993](#)). Estos autores encontraron que después de una infección experimental única en corderos, los mastocitos (los serosos y globulares) en la cavidad nasal fueron dos veces más numerosos que los Controles. Sin embargo, después de infecciones múltiples, los mastocitos serosos y globulares se incrementaron 11 y 7 veces, respectivamente. Los mastocitos se localizaron principalmente en el corion subepitelial, aunque también se incrementaron en el corion interglandular y la submucosa. Estos resultados han sido confirmados por [Yacob et al. \(2002; 2004a; 2004b\)](#), [Tabouret et al. \(2003b\)](#) y [Jacquiet et al. \(2005\)](#). Bajo condiciones de infección experimental, los resultados coinciden en que el número de estas células reactivas se incrementa gradualmente del septo nasal-etmoides-senos frontales. En condiciones de campo los resultados son similares. [Nguyen et al. \(1996\)](#) encontraron el doble de mastocitos reclutados en el septo, cornete, y senos frontales de ovejas infectadas naturalmente con *O. ovis* comparado con ovejas sanas. Además, se confirmó que el principal sitio anatómico y la posición histológica de los mastocitos son los senos frontales y el corion subepitelial, respectivamente ([Nguyen et al., 1996; 1999b](#)). También, se ha confirmado la participación activa de los mastocitos locales durante la infección mediante la identificación de la proteasa de mastocitos de oveja en la mucosa de corderos infectados ([J. Huntley, datos no publicados, citado por Dorchies et al., 2006](#)).

b. *Eosinófilos*. Los eosinófilos son granulocitos poliformonucleares producidos en la médula ósea. Emigran por medio de la sangre a la superficie de la mucosa donde ocurre la infección y están involucrados en los procesos inmunes contra gusanos parásitos y en reacciones de hipersensibilidad (Roitt et al., 2002). Fallis (1940) reportó que la descarga nasal de corderos infectados contiene un gran número de eosinófilos. Estos resultados fueron confirmados por Jagannath et al. (1989) y Yilma (1992). En general, los patrones de reclutamiento de eosinófilos son similares a los observados con los mastocitos (Yacob et al. 2002, 2004a, 2004b; Tabouret et al., 2003b; Jacquiet et al., 2005). Dolbois-Charrier y Dorchies (1993) reportaron que las cuentas de eosinófilos fueron 34 veces mayores en corderos infectados experimentalmente que en los no infectados. En ovejas infectadas naturalmente, el número de eosinófilos se multiplicó por 17 en el septo, 27 en el turbinado, y 58 en los senos frontales (Nguyen et al., 1996) y éstos se concentraron principalmente en el corion subepitelial (Nguyen et al., 1999a). Por otra parte, en ovejas con una infección experimental única el reclutamiento de eosinófilos en el exudado nasal se incrementó gradualmente de 0 a 2 semanas post-infección y luego disminuyeron al nivel basal; posteriormente, apareció un nuevo pico a las 8 semanas (Yilma, 1992). Esto sugiere un tipo de estimulación pulsátil de eosinófilos en las mucosas nasales infectadas. A nivel sanguíneo es similar. La cinética de eosinofilia en corderos infectados experimentalmente con *O. ovis* obedece a un patrón estímulo-respuesta (Dorchies et al., 1997; Durantón et al., 1999;

[Yacob et al., 2002, 2004b, 2006](#); [Terefe et al., 2005](#); [Jacquet et al., 2005](#)).

De acuerdo con [Bastem et al. \(1970\)](#) (citado por [Yacob et al., 2004b](#)), las fluctuaciones de eosinófilos dependen de factores como los ritmos diurnos, el estrés, entre otros. Sin embargo es evidente que después de la primera ó de cada infección experimental con *O. ovis*, el número de eosinófilos sanguíneos alcanzan un pico a las 48 h post infección y si ya no hay nuevas reinfecciones la eosinofilia regresa cercana a los valores de preinfección de 3 días a 5 semanas después. Es claro que la producción de eosinófilos es estimulada pero no es mantenida por larvas L1 ([Dorchies et al., 2006](#)).

- ii. *Respuestas inmunes humorales.* Las respuestas humorales de las ovejas contra *O. ovis* se han estudiado con base en la producción de inmunoglobulinas parásito-específicas. Las IgG, IgA e IgM sistémicas y las IgG e IgA locales se han asociado a la infección de *O. ovis* ([Ichlmann y Hiepe, 1985](#); [Bautista-Garfias, et al., 1988](#); [Tabouret et al., 2003b](#); [Suárez et al., 2005](#); [Jacquet et al., 2005](#)). Los roles precisos de las inmunoglobulinas sobre *O. ovis* son desconocidos. Sin embargo, las interacciones positivas de la producción de inmunoglobulinas contra *O. ovis* en ovejas infectadas ha sido útil para determinar cinéticas de anticuerpos, reconocimiento de antígenos, y el serodiagnóstico de la estrosis. Sin embargo, las discrepancias encontradas de las respuestas de anticuerpos entre estudios reportados quizá dependen de factores inherentes al hospedero, al parásito y al ambiente.
 - a. *IgG sistémicas.* Después de una infección experimental en corderos, las IgG específicas en suero alcanzan el valor de corte positivo en aproximadamente

3 a 4 semanas (Yima, 1992). En corderos infectados repetitivamente de forma experimental, la seroconversión se alcanza normalmente de 2 a 4 semanas (Tabouret et al., 2001a; Yacob et al., 2002). Sin embargo, cuando solo las larvas L1 ó cargas larvarias bajas están presentes el valor positivo de corte de IgG detectables en suero se alcanza después de 5 semanas post-infección (Terefe et al., 2005). Esto probablemente se debe a que las larvas L1 son más pequeñas, se alimentan menos que las larvas L2 y L3 y por consecuencia son menos capaces de estimular el sistema inmune del hospedero (Dorchies et al., 1999). Además, los niveles de anticuerpos IgG específicos se elevan rápidamente e interactúan positivamente cuando las larvas L2 y L3 están creciendo (Dorchies y Yilma, 1996; Suárez et al., 2005; Jacquiet et al., 2005). Por ello, las respuestas de IgG en ovejas infectadas naturalmente dependen de la cronobiología del desarrollo y la actividad de *O. ovis* en una región específica (Yima y Dorchies, 1991; Scala et al., 2002; Suárez et al., 2005; Papadopoulos et al., 2006). Por otra parte, las IgG sistémicas contra *O. ovis* pueden desaparecer alrededor de 160 días después de un tratamiento antiparasitario (p. ej. Closantel®) efectivo (Dorchies et al., 1992).

- b. *IgM sistémicas*. La participación de la inmunoglobulina M durante la infección por *O. ovis* fué reportada por Suárez et al. (2005). Para ello, analizaron las respuestas de anticuerpos IgM en corderos originarios de Sardinia (Italia) donde la estrosis tiene alta prevalencia (Scala et al., 2001). La respuesta sistémica de IgM se asoció a la presencia de *O. ovis* en las

cavidades nasales. Particularmente, se encontró una correlación positiva y significativa entre el número de larvas L1 alojadas en el hospedero y el nivel de producción de IgM en suero sanguíneo.

- c. *IgA sistémicas*. No se ha demostrado que la respuesta sistémica de IgA tenga relación con la infección por *O. ovis* en ovejas (Suárez et al., 2005; Jacquiet et al., 2005).
- d. *Respuestas de anticuerpos locales*. Los corderos infectados poseen anticuerpos IgG e IgA específicos contra *O. ovis* en su moco nasal (Tabouret et al., 2003b). La producción de IgG local se ha asociado claramente con la infección; pero, la producción de anticuerpos IgA locales es inconsistente entre estudios experimentales. Tabouret et al. (2003b) encontraron diferencias significativas en la producción de IgA entre corderos infectados y no infectados. Sin embargo, Jacquiet et al. (2005) encontraron niveles de respuestas de IgA variables y que no se asociaron a la infección. Quizá, el número de larvas recuperadas y su nivel de madurez dentro del hospedero (los cuales fueron diferentes en ambos experimentos) pudieron influenciar la respuesta local de IgA. No obstante, no se han reportado correlaciones negativas entre las respuestas locales de IgA y el número ó desarrollo de larvas hospedadas.

Antígenos

Los extractos crudos ó somáticos de larvas L2 se han usado frecuentemente como fuente de antígenos para el diagnóstico de la estrosis en ovejas y cabras en condiciones experimentales (Ilchmann y Hiepe, 1985; Bautista-Garfias et al., 1988; Jagannath et al., 1989; Yilma, 1992; Jacquiet et al., 2005). También, los productos de secreción-excreción larvarios se han usado en pruebas inmunológicas porque ahí se encuentran proteínas que reaccionan fuertemente con anticuerpos IgG sistémicos del hospedero (Tabouret et al., 2001a; Alcaide et al., 2005a; Suárez et al., 2005). Innocenti et al. (1995) reportaron que los antígenos secretados por la glándula salival de *O. ovis* son los más importantes que reconocieron los anticuerpos IgG de conejos inmunizados. Estos antígenos se concentran principalmente en un complejo proteico de 28 kDa (20-29 kDa) de peso molecular reconocidos por las IgG sistémicas de ovejas infectadas (Tabouret et al., 2001a). Además, los anticuerpos también reconocieron proteínas (principalmente, 56 kDa) unidas a la cutícula (Innocenti et al., 1997).

Fenómeno de hipersensibilidad

Se ha propuesto que un fenómeno de hipersensibilidad inmediata (Tipo I) está involucrado durante el curso de la infección de *O. ovis*. Los tres factores principales asociados a este fenómeno son la presencia de: mastocitos, eosinófilos e inmunoglobulinas subtipo E. Se ha demostrado que existen diferencias significativas en el reclutamiento de mastocitos y eosinófilos entre animales infectados y no infectados que soportan esta

hipótesis (Jagannath et al., 1989; Abella, 1990; Dolbois y Dorchies, 1993; Nguyen et al., 1999b; Yacob et al., 2004b). Además, Jacquet et al. (2005) demostraron la reacción de hipersensibilidad inmediata en ovejas infectadas con *O. ovis*. Estos autores encontraron que treinta minutos después de una inyección (vía intradérmica) con productos excretorios-secretorios, las ovejas infectadas desarrollaron una respuesta inflamatoria en la piel. En contraste, las ovejas control no presentaron reacciones a los 30 minutos. A las 3 horas post-inyección tanto las ovejas control (inyectados con solución salina fisiológica) como las infectadas mostraron respuestas epiteliales a los antígenos aplicados; y a las 72 horas no se observaron reacciones. A pesar de estas evidencias sobre el fenómeno de hipersensibilidad inmediata asociado, aún es necesario determinar la presencia y la participación activa de las IgE contra *O. ovis* en animales infectados para confirmar definitivamente ésta hipótesis.

Por otra parte, una de las características de este fenómeno es que la principal localización histológica de las células inmunoreactivas es la capa del corion, justo por debajo del epitelio. Esto significa que los eosinófilos y los mastocitos emigran al sitio de la infección para estar en contacto cercano con el parásito y los antígenos. Sobre una base inmunológica, se ha propuesto que los eosinófilos son responsables de limitar las poblaciones de parásitos mientras que los mastocitos se encargan de mantener el fenómeno de hipersensibilidad en el sitio del tejido infectado (Dorchies et al., 1998). Otra característica asociada es que estas células inmunes son más numerosas en las mucosas del etmoides y de los senos frontales. Esto sugiere una fuente de estimulación proinflamatoria en el hospedero por las larvas L2 y L3. Más aún, se han reportado correlaciones positivas (Nguyen et al., 1999b) entre las células inmunes y la carga larvaria que apoyan esta idea.

Linfocitos T y B

Por medio de técnicas inmunohistoquímicas se ha demostrado el reclutamiento de células mononucleares en la mucosa de ovejas infectadas con *O. ovis* (Nguyen et al., 1999a; Tabouret et al., 2003b). La detección de anticuerpos anti-CD para linfocitos B (Anticuerpos monoclonales para CD20 de humanos, clona BLA36) y linfocitos T (Anticuerpos de conejo anti-CD3 de humanos) mostraron diferencias significativas entre infectados y no infectados. Los CD20⁺ y CD3⁺ se incrementaron gradualmente de los turbinados a los senos frontales. El conteo de CD3⁺ se observó en el corion subepitelial, especialmente en las mucosas del etmoides y senos frontales. También, se identificaron células plasmáticas (por histoquímica) cerca de las glándulas secretorias en la región subepitelial.

Macrófagos

Tabouret et al. (2003b) han comprobado la participación de los macrófagos en corderos infectados experimentalmente con *O. ovis*. Estos autores llevaron a cabo ensayos inmunohistoquímicos en secciones de tejido mucoso nasal usando anticuerpos monoclonales anti-CD68 (clona ki-M6 monocito/macrófago humano). Los macrófagos (CD68⁺) fueron significativamente más numerosos en todas las regiones anatómicas de los corderos infectados (excepto por la región de los turbinados) que los no infectados. Además, los macrófagos fueron más numerosos en el etmoides y los senos frontales que en el septo nasal.

Inmunomodulación por *O. ovis*

Las relaciones *O. ovis*-hospederos incluyen estrategias de resistencia y defensa dinámicas y complejas (Dorchies et al., 1999). *O. ovis* está bien adaptado a las condiciones inmunes del hospedero. Cuando las condiciones dentro del hospedero son desfavorables (p.ej. inmunización), las larvas detienen ó disminuyen su tasa de desarrollo (Frugère et al., 2000). Por ejemplo, las larvas L1 no cambian su morfología externa pero modifican su estructura antigénica para ser más discretas, menos activas, y se alimentan menos para escapar de las reacciones inmunes focales (Dorchies et al., 1999). Es posible que a cierto nivel, el mecanismo de hipobiosis de las larvas L1 sea activado por el ambiente agresivo dentro del hospedero. Por otra parte, se ha relacionado a las larvas de *O. ovis* con actividades la estimulación y la supresión inmune como se describe a continuación (Tabouret et al., 2001b, 2003a; Dolbois, 1992; Duranton et al., 1999; Jacquet et al., 2005).

Inmunoestimulación. En ensayos *in vitro* se ha demostrado que los extractos larvarios inducen la producción de óxido nítrico (NO) por los macrófagos. Los extractos somáticos de larvas L2 fueron capaces de estimular la producción de NO de macrófagos ovinos, mientras que los extractos somáticos de larvas L1 la inhibieron (Duranton et al., 1999). Debido a que las larvas L1 inhibieron la producción de NO de los macrófagos, estas larvas probablemente regulan la reacción inflamatoria a cierto nivel. Como comparación, los productos excretados-secretados de cada estadio larvario (L1, L2, L3) fueron capaces de inducir la producción de NO por macrófagos tumorales RAW 264.7 (Tabouret et al., 2001b). En esta línea tumoral, la estimulación fué mayor con los productos excretorios-

secretorios de larvas L1 comparado con los productos de larvas L2 y L3. La inducción se relacionó principalmente a una proteína de 29 kDa secretada por la glándula salival. Sin embargo, si esto ocurre *in vivo*, los niveles de NO inducidos no son fisiológicamente posibles para que el hospedero pueda matar a las larvas L1 de *O. ovis*.

El NO posee múltiples funciones dentro del hospedero durante el proceso de inflamación (Laskin et al., 1994) que podrían ser beneficiosas para el parásito (Tabouret et al., 2001b). Por ejemplo, provoca daño en el tejido, vasodilatación y la liberación de proteínas del plasma a la mucosa. Es decir, las moléculas secretadas por *O. ovis* refuerzan el proceso inflamatorio con la producción inducida de NO. Por ello, mientras el NO es dañino para el hospedero, la liberación de las proteínas del plasma y la hipersecreción provocada constituyen una fuente de alimento y nutrientes para las larvas (Tabouret et al., 2001b; Tabouret et al., 2003a). Sin embargo, esto debe ser verificado *in vitro* (usando macrófagos de ovinos) e *in vivo*.

Inmunosupresión. La proliferación *in vitro* de linfocitos de corderos infectados experimentalmente sugiere un estímulo inmunosupresor provocado por *O. ovis*. Después de varias reinfecciones con *O. ovis*, la proliferación de linfocitos de ovinos contra extractos crudos de larvas L1 disminuyó más pronto que el control fitohemaglutinina (Dolbois, 1992). En sus experimentos, Jacquet et al. (2005) observaron que los linfocitos de ovejas previamente infectadas no respondieron a la estimulación específica de antígenos secretados – excretados de larvas L2 y L3 después de la tercera reinfección. Más aún, las respuestas de linfocitos disminuyeron con el número de exposiciones. Estos resultados indican el desarrollo de una inmunosupresión provocada por el parásito.

Por otra parte, las proteasas encontradas en los productos de secreción- excreción pueden degradar las inmunoglobulinas G en la región bisagra de la cadena pesada (Tabouret et al., 2003a). Este hallazgo sugirió un tipo de evasión inmune. La degradación de IgG produce fragmentos F(ab)' 2 y pFc' que quizá trae como consecuencia la incapacidad de reacción de eosinófilos asociados al mecanismo de Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos. Sin embargo, esto no se ha estudiado en *O. ovis* todavía. Adicionalmente, las inmunoglobulinas degradadas podrían constituir una fuente de aminoácidos para la nutrición y el metabolismo larvarios.

Diagnóstico

Clínico. La actividad de larviposición de la mosca, es un indicador de la evolución posterior de la estrosis. Los estornudos y la hipersecreción nasal son los signos clínicos mayores de ovejas y cabras infectadas (Dorchies et al., 2006). La rinitis y la sinusitis son signos evidentes de hospederos infectados con *O. ovis*.

Diferencial. Dorchies y Alzieu, (1997) revisaron algunas enfermedades que podrían interferir con el diagnóstico clínico: la cestodosis llamada Coenurosis del cerebro (*Coenurus cerebralis*, el estado larvario de *Taenia multiceps*) es fácilmente distinguible por los problemas nerviosos intensos y la perturbación de la visión; la Listeriosis y sus manifestaciones encefálicas son específicas, sin embargo, ellas se han asociado a la estrosis por la presencia de *Listeria monocytogenes* en larvas de *O. ovis* (Kato y Murakami, 1962; Ivanov y Petrov, 1966); la Dictiocaulosis (*Dictyocaulus filaria*) y los protostróngilos, que

clínicamente provocan bronquitis y bronconeumonía, son responsables de todos los signos presentes en la estrosis pero sin estornudos; el adenocarcinoma de la pituitaria es caracterizado por hiperflujo de secreción serosa nasal que en aspecto, naturaleza y cantidad es específicamente distinguible.

Serológico. Las respuestas inmunes de anticuerpos de las cabras y las ovejas contra la infección de *O. ovis* se han detectado usando extractos somáticos de todos los estadios larvarios como fuentes de antígenos en la prueba intradérmica (Bautista-Garfias et al., 1982, 1988; Ilchmann y Hiepe, 1985; Jagannah et al., 1989), la prueba de doble difusión (Bautista-Garfias et al., 1982, 1988; Ilchmann y Hiepe, 1985), la prueba de inhibición de la hemaglutinación (Bautista-Garfias et al., 1982, 1988; Jagannah et al., 1989), la prueba de ELISA (Ejemplos seleccionados: Haralampidis (1987) citados por Dorchies y Yilma, 1996; Marchenko y Marchenko, 1991; Yilma, 1992; Goddard et al., 1999), y la prueba de Dot-ELISA (Duranton et al., 1995). También se han usado productos secretorios – excretorios larvarios solamente en la prueba de ELISA (Tabouret et al., 2001a; Alcaide et al., 2005ab; Sánchez-Andrade et al., 2005; Suárez et al., 2005).

Los extractos somáticos de larvas L2 fueron la mejor fuente de antígenos para el serodiagnóstico de la estrosis (Bautista-Garfias et al., 1982, 1988; Ilchmann y Hiepe, 1985; Jagannah et al., 1989; Yilma, 1992). Recientemente, Goddard et al. (1999) desarrollaron una prueba de ELISA usando antígenos somáticos de larvas L1 para detectar la estrosis en ovejas. Sus resultados mostraron alta sensibilidad (97.4 %) y especificidad (97.6 %). El inconveniente de estos resultados fue que se establecieron los parámetros serológicos

basados en las exámenes postmortem de solo 11 ovejas y de las observaciones clínicas presuntivas.

En contraste, las proteínas de los productos secretorios –excretorios (ESP) parecen ser la mejor fuente de antígenos en la prueba de ELISA (Tabouret et al., 2001a; Alcaide et al., 2005a; Suárez et al., 2005). No obstante, mientras la sensibilidad de la prueba es alta, la especificidad es relativamente baja. Alcaide et al. (2005a) evaluaron los extractos somáticos y los productos secretorios – excretorios de los tres estadios larvarios como antígenos en una prueba de ELISA. Los resultados demostraron que los ESP de larvas L1 y L2 fueron la mejor fuente de antígenos para el serodiagnóstico de la estrosis en ovejas. Los autores estimaron que la prueba de ELISA usando antígenos de ESP de larvas L2 durante el verano (sensibilidad=90.9%; especificidad=51.7%) y los antígenos de ESP de larvas L1 durante el invierno (sensibilidad=91.4%; especificidad=72%) fueron útiles para la inmunodiagnóstico de la estrosis ovina en España. De manera similar, Suárez et al., (2005) determinaron 96.1% de sensibilidad y 55.8% de especificidad para detectar la estrosis en ovejas usando ESP de larvas L2 como antígenos.

Innocenti et al., (1995) reportaron que las proteínas de la glándula salival larvaria son los inmunógenos mas fuertes para las ovejas infectadas. Adicionalmente, Tabouret et al. (2001a) demostraron que los anticuerpos IgG sistémicos reaccionaban principalmente con un complejo de proteínas de 28 kDa. Por ello, es interesante determinar el valor serodiagnóstico de los antígenos de la saliva larvaria en cabras y ovejas expuestas naturalmente a la infección por *O. ovis*.

HIPÓTESIS GENERAL

Si el contenido de la glándula salival de *O. ovis* posee las proteínas más antigénicas reconocidas por la respuesta humoral de anticuerpos IgG de ovejas infectadas, su uso mejorará los parámetros de la prueba de ELISA para el diagnóstico de la estrosis en las especies ovina y caprina.

HIPÓTESIS PARTICULARES

Capítulo I. En el contenido de la glándula salival de larvas de *O. ovis* existen proteasas-antigénicas relacionadas con la respuesta humoral de anticuerpos producidos por el hospedero contra el parásito.

Capítulo II. Los antígenos de la glándula salival de *O. ovis* mejorarán los parámetros serológicos de la prueba ELISA indirecta validada con antígenos somáticos de larvas L2 para detectar la estrosis ovina.

Capítulo III. La prueba de ELISA indirecta usando los antígenos de la glándula salival de *O. ovis* tendrá alta sensibilidad y especificidad para diagnosticar la estrosis caprina.

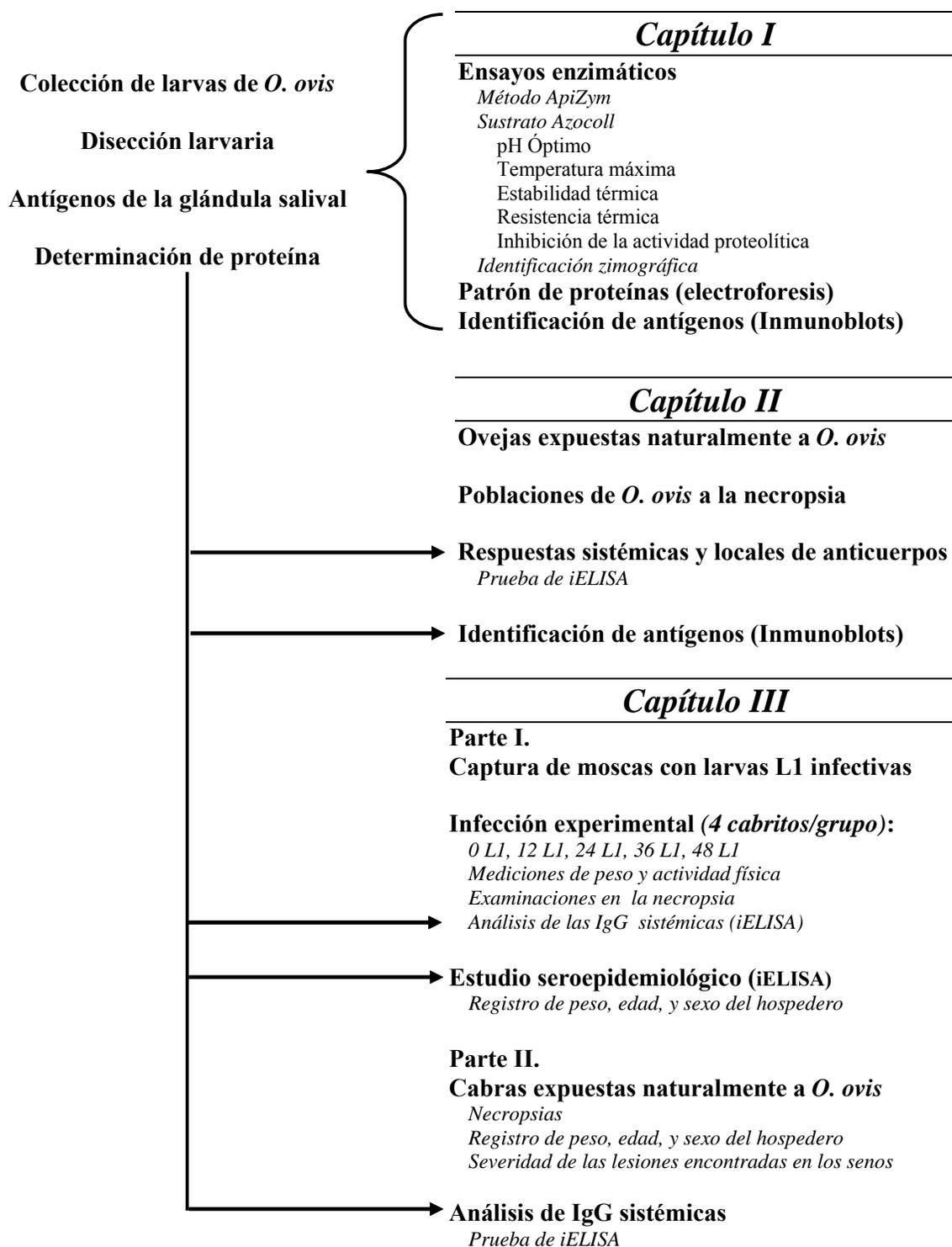
OBJETIVO GENERAL

Investigar las proteasas-antigénicas y los antígenos en el contenido de la glándula salival de *O. ovis* y determinar su valor antigénico para el diagnóstico de la estrosis en cabras y ovejas.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si existen proteasas-antigénicas y actividad proteolítica en el contenido de la glándula salival de *O. ovis*.
2. Determinar el valor serodiagnóstico de los antígenos de la glándula salival de *O. ovis* en ovejas usando la prueba de ELISA indirecta.
3. Determinar el valor serodiagnóstico de los antígenos de la glándula salival de *O. ovis* en cabras usando la prueba de ELISA indirecta.

SINÓPSIS DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA



CAPÍTULO I. Actividad antigénica y proteolítica de las proteínas de la glándula salival de larvas L3 de *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección de larvas

Se colectaron larvas de tercer estadio (L3) de *O. ovis* de las cabezas de cabras ($n=145$) sacrificadas en La Paz, B.C.S., México. Las larvas ($n=486$) fueron agrupadas en cajas de Petri de acuerdo con la fecha de colección y con las características de edad fisiológica de los inter-estadios de L3 (Cepeda-Palacios et al., 1999). Las larvas fueron lavadas individualmente con PBS (pH 7.4) conteniendo penicilina (100 U ml^{-1}) y estreptomicina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) antes de la disección.

Contenido de la glándula salival

Se evaluó la viabilidad de las larvas (ausencia de ataques del integumento por hongos, daños en la cutícula, vigor disminuido). Cada larva viva se fijó en una caja de Petri parafinada con agujas entomológicas y se disectaron bajo estereoscopio usando equipo de cirugía oftálmica. La disección se llevó a cabo sobre una cama de hielo ($4-10 \text{ }^\circ\text{C}$) usando PBS-antibióticos como medio líquido. Después de remover la pared celómica ventral, así como el tejido graso próximo, los tejidos traqueales y los nervios, la glándula salival completa ($n=128$) se recuperó y se colocó en un tubo con PBS-antibióticos. El contenido de la glándula salival de los inter-estadios L3 (eL3, D1, D2, D3, D4, y D5) se obtuvo por centrifugación (20 minutos, $10,000 \text{ g}$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$) y se almacenaron ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$) hasta su uso.

Infecciones experimentales y suero sanguíneo

Para identificar las proteínas antigénicas en el contenido de la glándula salival por medio de inmunoblots, se utilizó el suero sanguíneo de cabritos infectados experimentalmente. Brevemente, se capturaron manualmente moscas de *O. ovis* en los alrededores de rebaños de cabras en Baja California Sur, México. Larvas de primer estadio ($n=480$) se colectaron de las moscas hembras grávidas mediante presión abdominal suave y las larvas infectivas viables se seleccionaron bajo el estereoscopio ($40\times$). Se infectaron experimentalmente 4 cabritos de 3.5 meses de edad (jamás expuestos a infecciones de *O. ovis* y mantenidos bajo aislamiento de insectos voladores para evitar infecciones naturales). Para la infección se aplicaron 48 larvas de primer estadio en el orificio nasal derecho usando una pipeta flexible. El examen de necropsia y la colección de suero se realizaron a los 70 días post-infección. Los cabritos sacrificados fueron examinados cuidadosamente para identificar larvas de *O. ovis* sobre el septo nasal, turbinados, hueso etmoidal y senos frontales.

Determinación de proteínas

La concentración de proteína del contenido de la glándula salival de cada grupo de inter-estadio se midió por medio de la técnica de Bradford (1976). Se utilizó la albúmina de suero bovino (BioRad, 500-0007) como estándar en una curva de referencia.

Ensayos enzimáticos

Método ApiZym. Se utilizó el método ApiZym (Biomerieux, Francia) para identificar las actividades enzimáticas específicas en el contenido de la glándula salival. El método

consiste en una galería de pozos con sustratos para cuatro grupos de enzimas: esterasas, fosfatasas, glicosidasas y proteasas. Las muestras isoproteínicas de los diferentes inter-estadios de larvas L3 se mezclaron antes de su uso. Para este objetivo, se colocaron 50 µg (65 µl) de proteína en cada pozo de la placa (sustrato específico). Después de 4.5 horas a 37 °C, los reactivos Zym A y Zym B se adicionaron. El desarrollo de color se determinó visualmente y se registró de acuerdo a la escala estándar del fabricante. Los resultados se expresaron como la cantidad de sustrato hidrolizado después de 1 hora (media±D.E. de cuatro muestreos independientes).

pH óptimo y temperatura de máxima actividad proteolítica sobre el sustrato Azocoll. El contenido de la glándula salival de los inter-estadios de L3 se mezcló y se probó a varios pH y temperaturas para actividades proteolíticas sobre Azocoll (Calbiochem 194932, y Sigma A-4341) de acuerdo con el método descrito por [Tamashiro et al. \(1987\)](#). El sustrato colágeno se diluyó a una concentración de 1.6 mg ml⁻¹ con buffer acetato de sodio 100 mM (pH 5-6) y con buffer Tris-HCl 100 mM (pH 7-11). El contenido de la glándula salival (50 µg de proteína) se adicionó a 250 µl de solución de sustrato y se incubó a 37 °C por una hora en agitación lenta. La reacción se detuvo por centrifugación a 5000 g por 10 min y se colocaron 200 µl de sobrenadante en placas de microtitulación (ImmunoNunc) para medir absorbancia a 490 nm. La actividad enzimática se evaluó en el rango de temperatura de 10 a 70 °C en buffer Tris-HCl 100 mM a pH 7.8. Se usó tripsina purificada (Sigma, T-8642) como control positivo (50 µg ml⁻¹) y PBS (pH 7.4) como control negativo.

La actividad proteolítica (AP) se calculó (media±E.E.) como [Tabouret et al. \(2003\)](#):

$$AP = \frac{(\text{ABS}_{490 \text{ sample}} - \text{ABS}_{490 \text{ negative control}})}{(\text{ABS}_{490 \text{ positive control}} - \text{ABS}_{490 \text{ negative control}})}$$

La estabilidad térmica de la actividad proteolítica se determinó por la pre-incubación del contenido de la glándula salival a varias temperaturas (10 a 70 °C) durante 1 hora. La resistencia térmica se determinó al preincubar el contenido de la glándula salival a 40, 50, y 60 °C por 1, 2 y 4 horas. Después de la pre-incubación, el contenido de la glándula salival se enfrió por 1 minuto en hielo y la pérdida de la actividad proteolítica se midió en Azocoll. Los valores se expresaron como un control sin tratamiento térmico. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Inhibición de la actividad proteolítica. Se utilizaron 7 grupos de larvas colectadas ($n=67$) para caracterizar las subclases de proteasas del contenido de la glándula salival de todos los inter-estadios. Para ello, el contenido de la glándula salival (60 μg) se incubó por 330 minutos a 25 °C con inhibidores específicos y no específicos. Posteriormente, se adicionó el sustrato (solución de Azocoll para un volumen final de 250 μl a una concentración de 1.6 mg ml^{-1}) y se incubó 1 hora a 37 °C en agitación lenta. La reacción se detuvo como se describió anteriormente y se registraron los valores ópticos de absorbancia a 490 nm. Los inhibidores utilizados fueron: 4 mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF); 4 mM (etilenodinitrilo) ácido tetra acético (EDTA); 150 μM *N*- α -p-tosil-L-lisina clorometil cetona hidrocloreuro (TLCK); 150 μM *N*-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK); 2.5 μM *N*-[*N*-(1-3-*trans*-carboxirano-2-carbonil)-l-leucil]-agmatina (E64); 150 μM bestatin; and 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ inhibidor de la tripsina de soya (SBTI). Los resultados se expresaron como la media \pm D.E.

Identificación zimográfica. Se hicieron zimogramas con el contenido de la glándula salival de cada inter-estadio de larvas L3 en geles co-polimerizados con gelatina (0.1% del gel de separación, gelatina-PAGE) como lo describieron Laemmli (1970) y Heussen y Dowdle (1980). Después de la electroforesis, los geles fueron tratados como sigue: (1) dos lavados (30 minutos cada uno a 4 °C) en buffer Tris-HCl conteniendo 2.5 % Triton X-100 para remover el SDS; (2) incubados en buffer Tris-HCl (pH 7.8) toda la noche; (3) los zimogramas se lavaron en una solución de fijado-teñido conteniendo azul brillante de Coomassie R-250 (BioRad).

Patrón de proteínas de la glándula salival

Las proteínas de la glándula salival de cada inter-estadio L3 larvario se separaron en geles de electroforesis en condiciones no destaturalizantes (nativas, NAT-PAGE, 4-8%) y bajo condiciones no reductoras (SDS-PAGE, 4-15%) como lo describió [Laemmli \(1970\)](#). La electroforesis se corrió a 80/100 V durante 30 minutos/2 horas a 4-10 °C. Los extractos enzimáticos (15 µg proteína) se diluyeron (1:4) en buffer de carga para condiciones nativas (sin SDS, sin agentes reductores y sin calentar) ó para condiciones no reductoras (conteniendo SDS, sin agentes reductores y sin calentar). Se usó un estándar de peso molecular (BioRad) en el rango de 97.4 a 14.4 kDa (fosforilasa b = 97.4, albúmina de suero bovino = 66.2, ovoalbúmina = 45, anhidrasa carbónica= 31, inhibidor de tripsina = 21.5, lisozima = 14.4) para la electroforesis en condiciones no reductoras. Los geles se fijaron en una solución de teñido conteniendo 0.1-0.5% azul brillante de Coomassie R-250 (BioRad), 40% metanol, y 10% ácido acético.

Identificación de antígenos

Para encontrar bandas antigénicas probablemente relacionadas con bandas de proteasas, el contenido de la glándula salival de cada inter-estadio de L3 se resolvió en geles PAGE como se describió anteriormente. Los polipéptidos se revelaron usando la solución de azul brillante de Coomassie R-250 ó se transfirieron electroforéticamente a membranas de PVDF (Towbin et al., 1979) para probar su reactividad contra sueros de cabritos infectados experimentalmente. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 4% en buffer salino de Tris-Tween 20 (TBS-T) por 1 hora a temperatura ambiente. Una isocantidad de los sueros de los cuatro cabritos infectados experimentalmente se diluyó a 1:100 en TBS-T y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente (~25 °C). Posteriormente, el anticuerpo unido a peroxidasa (anti-IgG de cabra molécula completa, Sigma, A5420) se diluyó 1:1000 en TBS-T y se incubó por 1.5 h a temperatura ambiente. La ortofenildiamina se adicionó para revelar las bandas antigénicas. Finalmente, la reacción se detuvo con 3 lavados (30 minutos) de la membrana con agua destilada.

RESULTADOS

Ensayos enzimáticos

Detección enzimática usando la técnica ApiZym. Se detectaron 7 actividades enzimáticas positivas en el contenido de la glándula salival que pertenecieron a los cuatro grupos generales (Figura 5): 1) Grupo fosfatasa: fosfatasa ácida y naftol-AS-BI-fosfohidrolasa; 2) Grupo esterasa: esterasa (C4) y esterasa lipasa (C8); 3) Grupo proteasas: leucina arilamidasa; y 4) Grupo glucosidasas: α -glucosidasa y N-Acetil- β -glucosaminidasa.

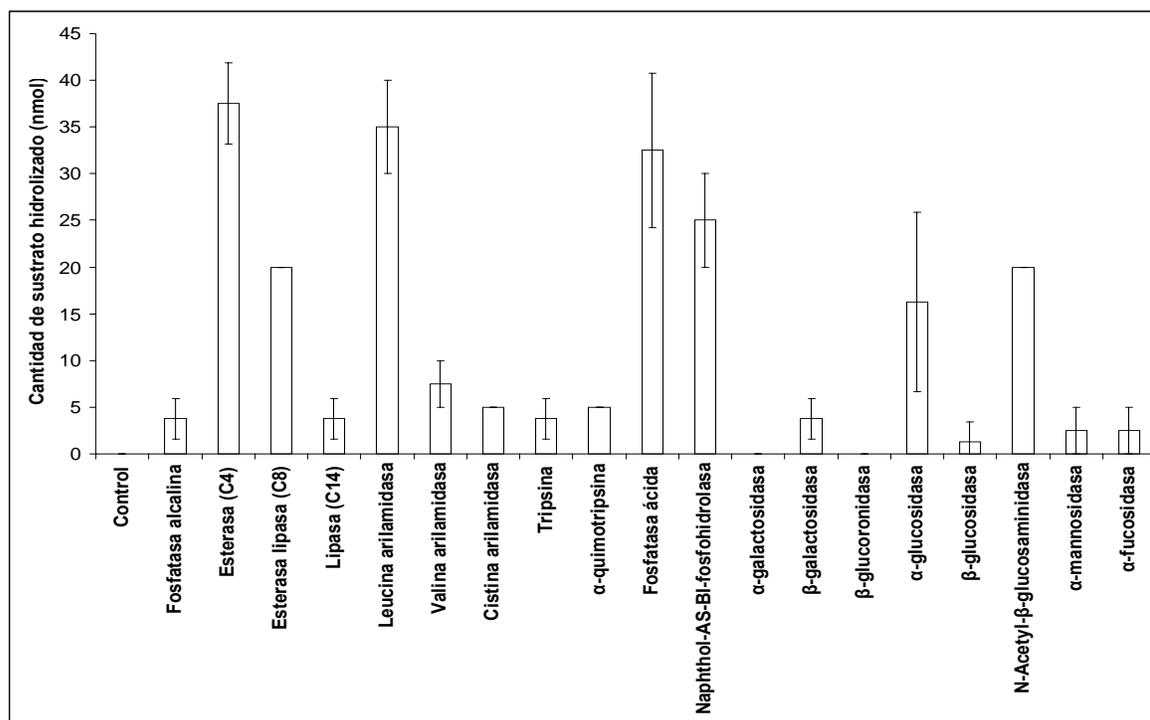


Figura 5. Actividades enzimáticas detectadas en el contenido de la glándula salival de

***O. ovis* utilizando la técnica ApiZym (media \pm D.E.).**

Se probaron 50 μ g de proteína en cada pozo. Las actividades enzimáticas se expresaron como la cantidad de sustrato hidrolizado (nmol).

pH óptimo, temperatura máxima, estabilidad térmica y resistencia térmica. Usando el sustrato colágeno (Azocoll) se determinó que la actividad proteolítica fue en el rango de pH de 5.0-9.0 (Figura 6A). La actividad máxima se observó a pH 8.0, disminuyendo a pH 7.0 (-63.8%) y 9.0 (-82.6%). Por otra parte, la actividad proteolítica se incrementó exponencialmente de 10 a 50 °C y disminuyó a los 60 °C (-13.5%) y 70 °C (-47.4%), indicando la desnaturalización de las enzimas (Figura 6B).

La estabilidad térmica de la actividad proteolítica disminuyó 13% de 10 a 20 °C y se estabilizó hasta los 50 °C (85, 82, y 86% a 30, 40, y 50 °C, respectivamente, Figura 6C), y posteriormente disminuyó a 60 °C (59%) y a 70 °C (10%). La resistencia térmica de las enzimas en diferentes tiempos de incubación sobre Azocoll (1, 2, o 4 horas) tuvo una tendencia similar a 40, 50, y 60 °C (Figura 6D). En temperaturas superiores a 50 °C, la resistencia térmica se redujo en los tres tiempos de incubación probados.

Inhibición de la actividad proteolítica. El ensayo de inhibición indicó que las proteasas del contenido de la glándula salival de larvas L3 de *O. ovis* pertenecen a la subclase serin proteasas, ya que solamente éste tipo de inhibidores reaccionaron con las enzimas (Tabla V). Los inhibidores de metaloproteasas (EDTA), cistein proteasas (E64) o aminopeptidasas (Bestatin) no inhibieron la degradación del Azocoll y la inhibición de serin proteasas fue menor a la esperada. Para determinar la relación óptima entre las concentraciones inhibidor y enzimas proteolíticas, se probaron concentraciones de SBTI más altas. Se encontró que el porcentaje de inhibición se incrementó de 100 µg SBTI ml⁻¹ (concentración recomendada) a 300 µg SBTI ml⁻¹.

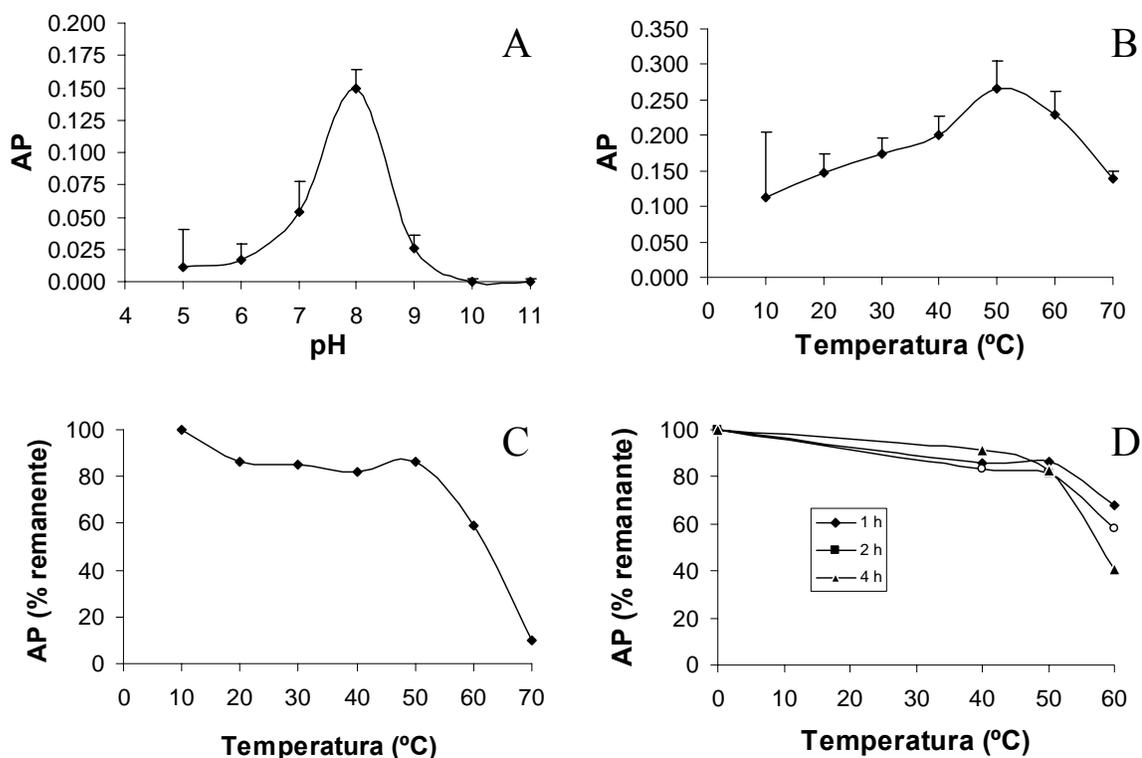


Figura 6. Efectos del pH (A) y la temperatura (B) sobre la actividad proteolítica en el contenido de la glándula salival de las larvas de *O. ovis* (media±E.E).

El colágeno se utilizó como sustrato. Se usó una tripsina purificada como control positivo ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) y PBS (pH 7.4) como control negativo. Los resultados son las medias y errores estándar de 4 muestras. (C) La estabilidad térmica de las proteasas en el contenido de la glándula salival se midió a temperaturas de pre-incubación diferentes. (D) La resistencia térmica de las proteasas se determinó a 40, 50, y 60 °C en tres periodos de pre-incubación. Los valores medios se expresaron como porcentaje de un control sin tratamiento térmico.

Tabla V. Efecto de los diferentes inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica del contenido de la glándula salival de larvas L3 de *O. ovis*.

Inhibidor de proteasas	Concentración	Inhibición (%)	D.E.
N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona [TPCK]	150 μ M	15.3	8.1
N α -p-tosil-L-lisina clorometil cetona [TLCK]	150 μ M	11.2	7.4
Fenil metil sulfonil fluoruro [PMSF]	4 mM	51.5	10.3
Inhibidor de la tripsina de soya [SBTI]	100 μ g/ml	36.4	7.1
	200 μ g/ml	49.8	4.3
	300 μ g/ml	72.5	1.5

No se encontró inhibición proteolítica con Bestatin (150 μ M); *N*-[*N*-(1-3-trans-carboxirano-2-carbonil)-l-leucil]-agmatina [E-64] (2.5 μ M); y (etilenodinitrilo) ácido tetra-acético [EDTA] (4 mM).

^aSBTI se evaluaron tres concentraciones.

Infección experimental

Se recuperaron de 9 a 18 larvas de *O. ovis* (incluyendo larvas L3) de las cavidades nasales y sinusales de los 4 cabritos infectados con larvas L1; y con los sueros sanguíneos colectados se identificaron los antígenos de la glándula salival de *O. ovis* usando la técnica de Western blot (Figura 7 A-B).

Patrón de proteínas, identificación zimográfica y bandas antigénicas

El patrón de proteínas, Zimogramas e Inmunobloting del contenido de la glándula salival de *O. ovis* se muestra en la **Figura 7 A-B**.

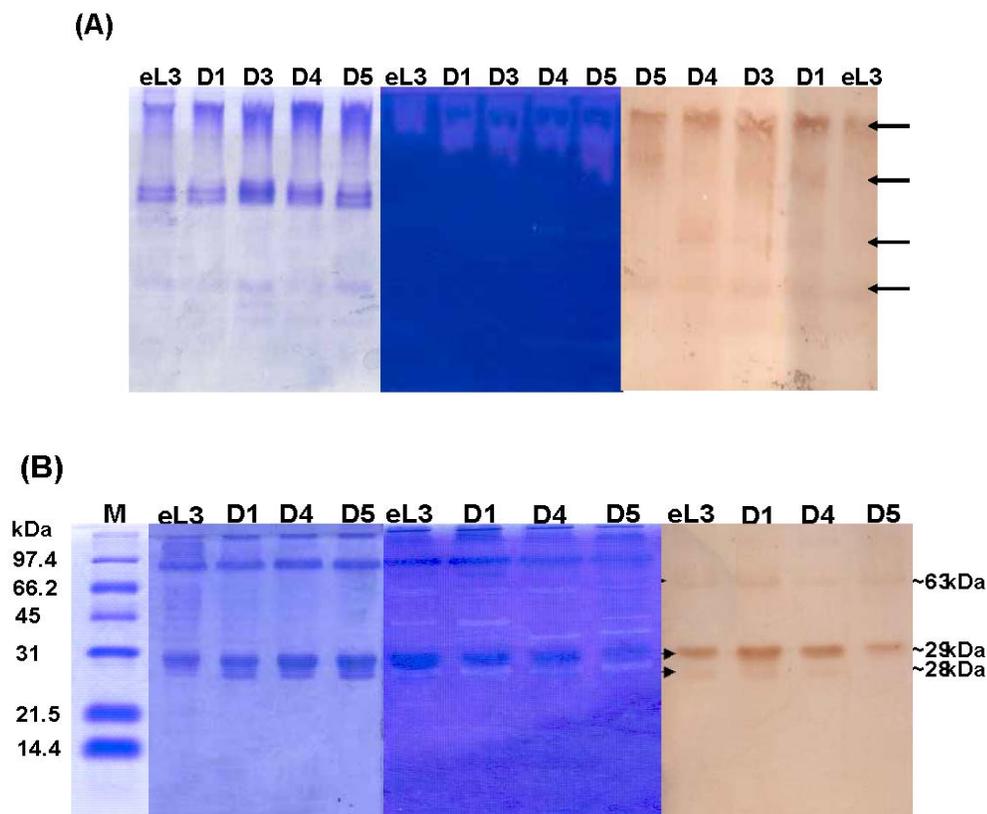


Figura 7. Patrón de proteínas, Zimograma e Inmunobloting del contenido de la glándula salival de larvas L3 de *O. ovis* en condiciones nativa (A) y desnaturalizante no reductora (B)¹.

¹Para el patrón de proteína (izquierda), Zimograma (centro) e inmunoblot (derecha). M = Marcador de peso molecular (kDa). Las líneas eL3 a D5 corresponden al tercer estadio de larvas L3 en sus intra-estados de desarrollo de eL3 a D5 (Cepeda-Palacios et al., 1999).

En condiciones nativas, la mayoría de las proteínas se encontraron en la parte superior del gel; similarmente, los Zimogramas revelaron alta actividad proteolítica sobre el sustrato gelatina y los inmunoblots bandas antigénicas. En condiciones desnaturizantes no reductoras, el patrón de proteína (teñido con azul de Coomassie) mostró varias bandas entre 26 a 84 kDa, de las cuales las más intensas se encontraron a 28, 29, y 84 kDa de peso molecular. Las bandas proteolíticas que se observaron en gel PAGE-gelatina copolimerizada fueron de 20, 26, 41, 46, 59, y 63 kDa. Se observó variación de bandas proteolíticas en el patrón Zimográfico entre larvas L3 capturadas en diferentes fechas. En el inmunoblot, los anticuerpos IgG sistémicos de cabritos infectados experimentalmente reconocieron 3 bandas antigénicas. La banda más intensamente reconocida fue de 29 kDa. La comparación entre el patrón de bandas antigénicas y proteolíticas reveló una banda en común (63 kDa), sin embargo, los geles PAGE teñidos revelaron 3 bandas delgadas cercanas entre ellas que fue imposible separar y definir cual de ellas era proteasa, antígeno, o ambas proteínas.

DISCUSIÓN

Este es el primer reporte que demuestra la actividad proteolítica del contenido de la glándula salival de *O. ovis*. La actividad proteolítica del contenido de la glándula salival en la prueba de Azocoll fue menor comparada con la observada en los productos excretorios-secretorios o extractos de tubo digestivo larvario (Angulo-Valadez et al., 2007b). Estos hallazgos, pueden indicar que las proteínas excretadas-secretadas son depositadas sobre la mucosa nasal y sinusal para una degradación parcial, y subsecuentemente, el alimento pre-digerido y las enzimas larvarias son ingeridas por las larvas para una digestión intermedia y final en el tracto digestivo como ocurre en otras larvas éstridas (Colwell et al., 2006).

Por otra parte, el perfil enzimático del contenido de la glándula salival de *O. ovis* obtenido en este estudio fue similar al reportado para el contenido del tubo digestivo y los productos excretados-secretados larvarios usando la técnica ApiZym (Tabouret et al., 2003a). Se sabe que el pH óptimo para las enzimas digestivas de los insectos comprende un amplio rango en el espectro ácido-alcalino; sin embargo, muchas de las proteasas (especialmente serin proteasas) y aminopeptidasas secretadas poseen el pH óptimo de actividad dentro del rango neutro a alcalino (Terra y Ferreira, 1994). Por ejemplo, el pH óptimo de actividad proteolítica en los productos excretorios-secretorios larvarios de *O. ovis*, *Lucilia sericata*, y *L. cuprina* se reportó entre 7.0 y 9.5 (Tabouret et al., 2003a; Chambers et al. 2003; Bowles et al., 1988). Las hipoderminas A y B producidas por las larvas de *Hypoderma lineatum* tuvieron su optima actividad a pH de 8.5, pero su actividad proteolítica se observó incluso a pH tan altos como 10.2 (Lecroisey et al., 1983). En este caso el rango de pH óptimo de la actividad colagenasa de *H. lineatum* fue entre 8.0 a 8.5, y

disminuyó 22% a pH 9.0 (Lecroisey et al., 1985). En comparación la actividad proteolítica del contenido de la glándula salival de *O. ovis* fue óptima a pH 8.0 y también disminuyó a pH 9.0 (<80%). En general, estos resultados indican que el pH óptimo de actividad proteolítica es similar en varias especies de moscas que causan miasis. Más aún, el pH de los senos y cavidades cornuales de las cabras analizadas en la necropsia (medidas a través del estudio) fue cercano al óptimo encontrado en el ensayo de Azocoll usando el contenido de la glándula salival. Estos resultados concuerdan con los encontrados en el cultivo *in vitro* de larvas L1 por Durantón y Dorchies (1997) quienes obtuvieron la mayor supervivencia larvaria a pH 7.7. En *L. cuprina* Guerrini et al. (1988) reportaron que la supervivencia y el crecimiento larvario más altos se obtuvieron entre pH 8.0 a 9.0 en ovejas infectadas artificialmente. En contraste, las proteasas tripsina y quimotripsina de los productos excretados-secretados por larvas de *Chrysomya bezziana* tuvieron alta actividad en un amplio rango de pH desde 5.0 hasta 10.0 (Muharsini et al., 2000).

De acuerdo con los resultados, ambas especies éstridas *H. lineatum* y *O. ovis* poseen perfiles de actividad enzimática similares. Las actividades máximas de las hipoderminas A, B y C fueron a 50 °C, disminuyendo arriba de los 55 °C (Cencek, 2003). De la misma manera, la actividad enzimática de las hipoderminas A y B no disminuyeron cuando fueron incubadas a 55 °C por 20 minutos; sin embargo, incubandolas a 60 °C se redujo la actividad enzimática hasta 50% y a 65 °C la inhibió completamente (Lecroisey et al., 1983). Por otra parte, las proteasas del contenido de la glándula salival de *O. ovis* mostraron estabilidad térmica similar a las hipoderminas A y B, pero diferente de la hipodermina C ya que retuvo su actividad a 60 °C después de una pre-incubación de 20 minutos (Lecroisey et al., 1985). Cencek (2003) reportó la resistencia térmica de las hipoderminas a 60, 65, y 70 °C con

diferentes tiempos de incubación. En promedio las actividades de las hipoderminas fueron muy similares a las encontradas en el contenido de la glándula salival de *O. ovis* preincubadas a 60 °C, en la cual disminuyeron 32, 42, y 59% a 1, 2, 4 h, respectivamente. En general, parece que las proteasas de *O. ovis* tienen menos estabilidad y resistencia térmica que la hipodermina C. [Lecroisey et al. \(1985\)](#) indicaron que esto puede deberse al hecho de que la enzima es almacenada en el intestino medio larvario por más de 8 meses a 37 °C antes de activarse durante su último estadio de desarrollo larvaria dentro del hospedero. En el caso de *O. ovis*, los senos frontales de las ovejas mantienen una temperatura constante de 37 a 40 °C ([Rogers et al., 1968](#)). Esto podría indicar que las especies de oestridos poseen proteasas que permanecen activas por arriba de la temperatura normal del hospedero y que posiblemente se relacionan con sus propiedades físico-bioquímicas. Por otra parte, la actividad proteolítica disminuyó a temperaturas más bajas (30, 20, and 10°C); y si esto ocurre *in vivo*, la inactivación enzimática parcial quizá afecta la degradación del alimento por las enzimas larvarias y ayudaría a entender las características de las bajas tasas de desarrollo larvario de *O. ovis* durante los periodos hipobióticos temporales observados en climas templados.

Las enzimas proteolíticas encontradas en el contenido de la glándula salival de *O. ovis* pertenecen a la subclase serin proteasas como las encontradas en los productos excretados-secretados de otros agentes causantes de miasis tales como *C. bezziana*, *L. sericata*, *L. cuprina* ([Muharsini et al., 2000](#); [Chambers et al., 2003](#); [Sanderman et al., 1990](#)). Las hipoderminas, también clasificadas como serin proteasas, están involucradas directamente en la penetración y la migración de las larvas de *H. lineatum* a través de los tejidos de bovinos y en la nutrición larvaria ([Boulard y Garrone, 1978](#)). [Tabouret et al.](#)

(2003a) detectaron serin proteasas digestivas en bandas de actividad proteolítica de 20, 24, 29, 36, 45, y 69 kDa sobre geles PAGE-gelatina usando los productos excretados-secretados de *O. ovis*. Estas bandas fueron similares (20, 26, 41, 46, 59, y 63 kDa) a las encontradas en el presente estudio. Ello sugiere que la actividad colagenolítica *in vivo* facilita el escape de proteínas plasmáticas inducidas por el proceso inflamatorio. Como solamente se utilizó un inhibidor de las cistein proteasas (E-64) y uno de las metalo proteasas (EDTA), sería interesante probar otros inhibidores de las cistein o metalo proteasas para confirmar estos resultados.

Como se esperaba, la actividad proteolítica del contenido de la glándula salival de *O. ovis* claramente varió entre las fechas de colección de larvas L3. Esta variación puede ser relacionada con los ritmos de alimentación y producción de enzimas necesarias para digerir el alimento. Los perfiles enzimáticos pueden ser modificados de acuerdo con las condiciones ambientales y la disponibilidad de alimento en el hospedero (Terra y Ferreira, 1994). En especies dípteras, como *Phlebotomus papatasi*, *Stomoxys calcitrans*, y *Anopheles gambiae*, se han reportado mecanismos similares (Ramalho-Ortigao et al., 2003; Lehane et al., 1998; Shen et al., 2001). Mas aún, se ha observado una gran variación en el peso y talla en los inter-estadios de larvas de tercer estadio de *O. ovis* (Cepeda-Palacios et al., 1999; Cepeda-Palacios et al., 2000); y también, se ha reportado variación genética en la capacidad enzimática larvaria intrapoblaciones de *Cochliomyia hominivorax* y *C. macellaria* (Taylor et al., 1996). Además de las condiciones del ambiente y la disponibilidad de alimento en el hospedero, también se deben considerar las propiedades físico-químicas de las enzimas. Las enzimas poseen propiedades físico-químicas inherentes que las hacen inestables y

susceptibles a la autólisis. Por ejemplo, la autólisis en quimiotripsinas LCTa y LCTb de *L. cuprina* se ha demostrado incluso a 4 °C (Casu et al., 1994).

Por otra parte, se han identificado enzimas responsables de la degradación de anticuerpos IgG en la saliva de varios insectos hematófagos. Esas enzimas hidrolizan preferentemente en la región bisagra de la cadena pesada para la alimentación larvaria y la inmunomodulación del hospedero (Nisbet y Huntley, 2006). De forma similar, las proteasas excretadas y secretadas por *L. cuprina*, *H. lineatum* y *O. ovis* pueden degradar las IgGs (Eisemann et al., 1995; Pruett, 1993; Tabouret et al., 2003a). Así que, podemos suponer que los aminoácidos de las inmunoglobulinas pueden ser utilizadas para la regeneración celular y el crecimiento larvario. Aunque, se requiere hacer ensayos para determinar si la glándula salival de *O. ovis* secreta enzimas capaces de digerir los anticuerpos para evitar o modular el sistema inmune del hospedero. En este estudio, se detectó una banda de actividad antigénica-proteolítica en donde se localizaron tres bandas proteicas delgadas. Por ello, se necesita aislar esas proteínas para determinar si existen proteasas antigénicas en el contenido de la glándula salival de *O. ovis*. Las proteasas más importantes en *H. lineatum* poseen propiedades antigénica e inmunogénica (Pruett et al., 1988), mientras que las larvas de *L. cuprina* sintetizan una variedad de proteínas antigénicas en sus glándulas salivales (Skelly y Howells, 1987) y serin-proteasas (Elvin et al., 1994). El perfil proteico resuelto en geles de poliacrilamida y las bandas antigénicas observadas en los inmunoblots muestran consistencia en las bandas que aparecen entre los inter-estadios de larvas L3 (de eL3 a L3D5). En el presente estudio, un complejo de 28 kDa en el contenido de la glándula salival se detectó usando suero de cabras infectadas artificialmente con larvas de *O. ovis*. Se determinó una banda de 29 kDa con la mayor actividad antigénica, pero las bandas de 28 y

63 kDa también fueron reconocidas por las IgG sistémicas. En las ovejas, este complejo proteico (20-29 kDa) se ha reportado como la fracción más antigénica en la saliva de *O. ovis* (Tabouret et al., 2001a), por ello, la banda de 29 kDa parece ser altamente antigénica en ambas especies.

Muchos aspectos de la acción de la saliva de *O. ovis* en el contexto de la relación parásito –hospedero permanecen desconocidas. Por ejemplo, la capacidad de las moléculas del contenido de la glándula salival para estimular o suprimir las células del sistema inmune del hospedero es poco comprendido. Ambas, las proteasas (que degradan proteínas, p.ej. IgG, receptores de linfocitos) y los antígenos más importantes están presentes en la saliva. Es necesario llevar a cabo investigación para determinar si las moléculas del contenido de la saliva confiere inmunoprotección a las cabras y ovejas, afectando el establecimiento y desarrollo larvario. En conclusión, el contenido de la glándula salival de *O. ovis* contiene proteasas termoestables de la subclase serin proteasa, las cuales parecen ser importantes en la nutrición larvaria y la interacción parásito-hospedero.

CAPÍTULO II. Valor serodiagnóstico de los antígenos de la glándula salival de *Oestrus ovis* L. usando la prueba de iELISA en ovejas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Poblaciones de ovejas

En 1998, 14 sementales élite de la raza Lacaune (L) de Francia fueron apareados con 184 ovejas de la raza Sarda (S) para producir carneros F1 (50L: 50S) en Italia. Se seleccionaron 10 machos hijos de 10 cruzas diferentes para aparearlos con 2719 ovejas Sarda y seleccionar la progenie de 975 hembras cruzadas (25L: 75S). Todas las hembras nacieron durante el invierno de 1998-1999 (en promedio 98 ovejas por grupo progenitor progenie, rango de 76-121). De agosto de 1999 a 2004, las ovejas fueron criadas en una granja experimental localizada en el sur de Sardinia bajo un clima Mediterraneo seco (promedio de lluvia 44 mm/año, temperatura máxima arriba de 40 °C). Todas las ovejas pastoreaban diariamente por 4 a 5 horas sobre una pradera irrigada de ryegrass y suplementadas durante el invierno y la primavera tardía con heno de alfalfa, ensilado de maíz y concentrado. La primera época de empadre se programó en septiembre de 1999 mientras que las siguientes tres épocas de empadre se llevaron a cabo en junio del 2000, julio de 2001, 2002, 2003. Por ello, los partos ocurrieron en el invierno del 2000 (primera lactancia) y el otoño de 2000, 2001, 2002, 2003. Después del periodo de amamantamiento de 3 (1^{ra} y 2^{da} lactancia) o 4 semanas 3^{ra} y 4^{ra} lactancia), la ovejas se ordeñaron dos veces diariamente. En julio, las ovejas fueron secadas progresivamente mediante el ordeño matutino solamente. Debido al sacrificio parcial de la población de ovejas en enero de

2004, solo se conservaron tres grupos Progenitor-progenie en Monastir hasta Julio de 2004, p. ej. Progenitor-progenie 1 (62 ovejas), Progenitor-progenie 2 (70 ovejas), Progenitor-progenie 3 (54 ovejas). Esas ovejas fueron expuestas a altas tasas de infección natural por *O. ovis* durante seis temporadas cálidas sucesivas (de 1999 a 2004).

Poblaciones de *O. ovis*

Las necropsias se llevaron a cabo en julio del 2004 en un rastro en Cagliari (Sardinia, Italia). Después de dividir las cabezas, las larvas se colectaron del septo nasal, los turbinados, el etmoides, las cavidades sinusales, y se identificaron sus estadios (L1, L2 y L3) de acuerdo con [Zumpt \(1965\)](#). La longitud total de larvas (L1, L2 y L3) y los pesos (L2 y L3) se registraron individualmente usando una microrregla bajo microscopio de disección y una balanza de precisión de 0.01 mg, respectivamente ([Frugère et al., 2000](#)).

Análisis de las respuestas locales y sistémicas de anticuerpos

Las muestras de sangre se tomaron de cada oveja el día antes del sacrificio y el suero se almacenó a -20 °C hasta su uso. Las muestras de moco se colectaron en la necropsia por medio de absorción en tiras de 4 cm² de papel filtro (Whatman). Las tiras impregnadas de PBS se depositaron sobre la mucosa septal durante 5 minutos en cada lado. Luego, las tiras se agitaron lentamente en PBS por 2 horas a temperatura ambiente ([Tabouret et al., 2003b](#)). Las soluciones se centrifugaron y los sobrenadantes se almacenaron congelados a -20 °C.

Proteínas de los parásitos

Se homogenizaron larvas L2 en PBS (pH 7.2) a 0.25g /mL y se centrifugaron a 5000 x g. Los sobrenadantes se filtraron a través de 0.08/0.2 μm (Acrodisc sieves, Gelman) para ser usados como extractos crudos de L2 (L2CE). Las larvas L2 y L3 se disectaron en hielo-medio PBS helado bajo estereoscopio, tal como se describió antes. Las glándulas salivares se removieron y centrifugaron a 10,000 x g para liberar el contenido. Las concentraciones de proteína se determinaron en los L2CE y los contenidos de las glándulas salivales de L2 y L3 (L2SGC and L3SGC) usando el kit del ensayo del ácido bicinonínico (BCA, Pierce, Rockford, Illinois). La albúmina de suero bovino se utilizó como estándar.

IgG específicas en suero sanguíneo

Los L2CE, L2SGC y L3SGC se diluyeron a 2 $\mu\text{g/ml}$ en buffer de carbonato (pH 9.6), distribuidos en placas de 96 pozos (Nunclon surface, Nunc, Denmark), incubados por 1 hora a 37 °C y luego toda la noche a 4 °C. Los pozos se lavaron tres veces con PBST (0.01 M fosfato, 0.15 M cloruro de sodio, pH 7.2 y 0.1% Tween 20). Los pozos cubiertos con antígeno se incubaron 30 minutos a 37 °C con una solución de leche descremada al 10% y luego se descartó la solución. Se adicionaron muestras de suero diluido 1:200 en PBST y se lavaron tres veces con PBST antes de adicionar el anticuerpo conjugado con peroxidasa (anti-IgG de oveja, Sigma A3415) diluido 1:2000 en buffer de carbonato (60 minutos de incubación a 37 °C). Se hicieron tres lavados finales con PBST antes de adicionar e incubar (37 °C) 100 μl por pozo del cromógeno (2,2'-azino-bis(2-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) diamonio). Después de 1 hora, las densidades ópticas (DO) se determinaron con un espectrofotómetro al medir la absorbancia a 405 nm. Las

muestras se analizaron por triplicado. Los resultados fueron expresados como el promedio de las DO para IgG en suero menos el promedio de las DO de los pozos PBST (blanco).

IgG específicas en moco

Se sensibilizaron placas de microtitulación (Nunclon surface, Nunc, Dinamarca) con L2CE, L2SGC o L3SGC (5 µg/ml) de *O. ovis*. Se utilizó el procedimiento descrito previamente, excepto que el suero se reemplazó por preparaciones de moco diluido 1:25 en PBS. Las DO se leyeron en un lector de placas Dynatech a 405 nm. Las muestras se analizaron por triplicado. Los resultados fueron expresados como el promedio de las DO para IgG de moco menos el promedio de las DO de los pozos PBST.

Parámetros de la prueba de iELISA

El valor de corte se determinó usando los sueros de 38 corderos no infectados, de 3 meses de edad, nacidos en el verano y alojados bajo techo (p.ej. en condiciones libres de *O. ovis*). La sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo se calcularon así como la prevalencia aparente ([Tabouret et al. 2001a](#)).

Identificación de antígenos

Los L3SGC se resolvieron en geles SDS-PAGE 4-10% de acuerdo con Laemmli (1970). Las bandas de proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie o transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (Towbin et al., 1979). Las membranas se probaron para su reactividad contra sueros de 5 ovejas de cada grupo Progenitor-progenie con los valores de densidades ópticas más altos en la prueba de iELISA ([Tabouret](#)

et al. 2001a). La detección de antígenos se llevó a cabo con el ensayo de quimioluminiscencia (Phototope®-HRP western blot detection system #7003, Cell Signaling Technology) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las bandas de antígenos se escanearon sobre un filtro de rayos X y se fotografiaron (Molecular Imager ChemiDoc XRS System, BioRad).

Relaciones con las intensidades de la infección y el desarrollo larvario

Los valores de densidades ópticas de las respuestas de IgG sistémicas y locales, el número y el peso de las larvas se transformaron a $\log + 1$ para normalizar las distribuciones. Los coeficientes de correlación se obtuvieron usando el software Statistica (StatSoft, 1998).

RESULTADOS

Parámetros parasitológicos

La prevalencia y la intensidad de la infección, las longitudes de las larvas L1, L2 y L3, los pesos de las larvas L2 y L3, y la estructura demográfica larvaria de las poblaciones de *O. ovis* (proporciones relativas de L1, L2, y L3) se presentan en la **Tabla VI** para el rebaño completo ($n=186$ ovejas). Todos esos parámetros fueron similares entre los tres grupos Progenitor-progenie (**Tabla VI**) excepto por las estructuras demográficas larvarias las cuales difirieron significativamente entre los tres grupos Progenitor-progenie ($P=0.01$). Se observó una mayor proporción de la carga de larvas L1 en el grupo Progenitor-progenie 3, y de larvas L2 en el Progenitor-progenie 1, mientras que la cuenta de larvas L3 en el Progenitor-progenie 2 fue el 50% del total de larvas recuperadas.

Tabla VI. Poblaciones de *O. ovis* en las ovejas de los tres grupos Progenitor-progenie necropsiadas en el mes de Julio en Sardinia, Italia.

Infección de <i>O. ovis</i>	Progenitor-Progenie 1 (n=62)	Progenitor-Progenie 2 (n=70)	Progenitor-Progenie 3 (n=54)
Prevalencia de la infección de <i>O. ovis</i>	63%	64%	59.6%
Intensidad media de la infección (D.E.)	2.56 (3.19)	2.23 (3.09)	2.14 (3.08)
Proporción de L1 (%)	17.6 (a)	10.9 (b)	25.8 (c)
Proporción de L2 (%)	47.8 (a)	39.1 (b)	35.6 (b)
Proporción de L3 (%)	34.6 (a)	50 (b)	38.6 (a)
Longitud media (mm) de L1 (D.E.)	1.09 (0.25)	1.03 (0.15)	1.19 (0.21)
Longitud media (mm) de L2 (D.E.)	9.6 (4.25)	7.83 (3.5)	8.35 (3.05)
Longitud media (mm) de L3 (D.E.)	18.55 (2.64)	18.36 (2.63)	18 (2.15)
Peso medio (mg) de L2 (D.E.)	45.3 (38.6)	33.6 (41.9)	45 (39)
Peso medio (mg) de L3 (D.E.)	388.6 (149.7)	386.6 (144.8)	362.5 (134.2)

Análisis de iELISA (respuesta IgG sistémica)

Los resultados de las pruebas de ELISA indirecta (utilizando L2CE, L2SGC, y L3SGC como antígenos de cobertura) se resumen en la **Tabla VII**. Se observaron altas sensibilidades con todas las fuentes de antígenos. Todas las pruebas resultaron en prevalencias aparentes más altas que la prevalencia real determinada en la necropsia (p.ej. en algunas ovejas no infectadas en el momento de la necropsia tenían títulos altos de anticuerpos IgG específicos contra *O. ovis*). Esta observación fue consistente en los tres grupos Progenitor-progenie (datos no mostrados en tablas).

Tabla VII. Prueba de iELISA usada para el diagnóstico predictivo de la estrosis en ovejas, utilizando L2CE, L2SGC y L3SGC como antígenos de cobertura (2 µg/ml).

Parámetros de la prueba	Fuente de antígenos de cobertura en la prueba de iELISA ¹		
	L2CE	L2SGC	L3SGC
Sensibilidad	95.0	99.0	97.1
Especificidad	48.2	22.4	52.6
Valor de predicción +	74.0	66.6	78.5
Valor de predicción -	85.9	95.2	90.7
Prevalencia aparente ²	78.4	90.6	79.6

¹L2CE = Extractos crudos de larvas L2; L2SGC = Contenido de la glándula salival de larvas L2; L3SGC = Contenido de la glándula salival de larvas L3.

²La prevalencia real determinada en necropsias de las ovejas fue de 62.2%.

Las intensidades de las respuestas de anticuerpos IgG sistémicas y locales mostraron alta variación intra- Progenitor-progenie (Figura 8 A-B). Los valores de densidad óptica (DO) máximos se encontraron usando proteínas de la glándula salival como antígenos de cobertura en ambas respuestas sistémica y local. No se observaron diferencias significativas en la intensidad de las respuestas IgG entre los tres grupos Progenitor-progenie.

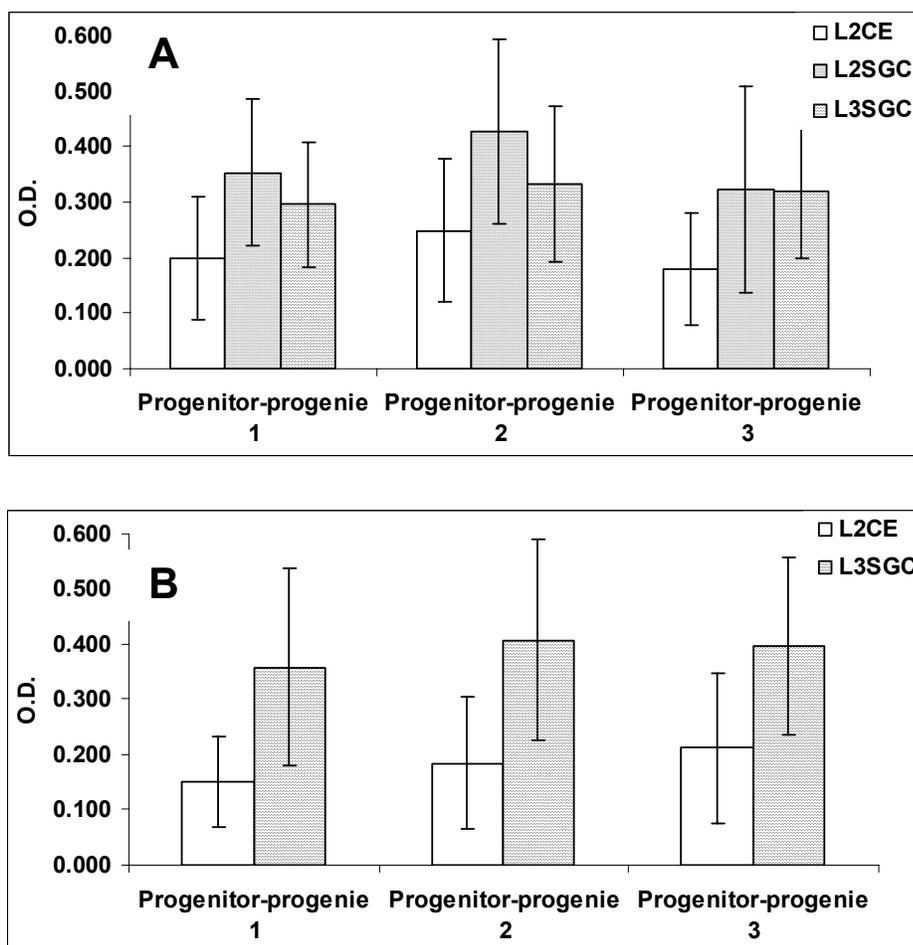


Figura 8. Intensidades de las respuestas de anticuerpos IgG específicos, sistémicas (A) y locales (B), contra *O. ovis* en ovejas infectadas (media±D.E.).

¹L2CE = Extractos crudos de larvas L2; L2SGC = Contenido de la glándula salival de larvas L2; L3SGC = Contenido de la glándula salival de larvas L3.

Identificación de antígenos

Los anticuerpos IgG sistémicos de las ovejas seleccionadas de los tres grupos Progenitor-progenie detectaron el complejo de 28 kDa (Figura 9). Sin embargo, las IgG sistémicas de las ovejas del grupo Progenitor-progenie 1 no reconocieron una banda proteica de 43 kDa que fue detectada por las IgG sistémicas de las ovejas de los grupos Progenitor-progenie 2 y 3.

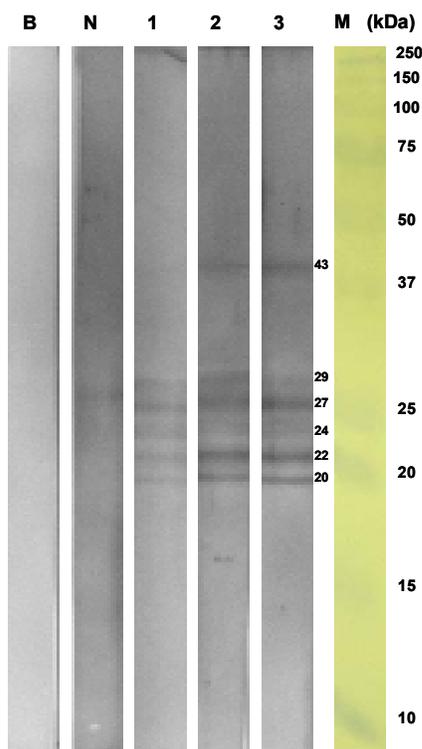


Figura 9. Reconocimiento de antígenos por los anticuerpos de ovejas infectadas con *O. ovis* de los grupos Progenitor-progenie.

¹B: Blanco; N: agrupación de 6 sueros negativos; 1, 2, 3: agrupación de 5 sueros de ovejas con los títulos más altos de IgG de las Progenitor-progenie 1, 2, 3, respectivamente.

Relación entre las respuestas de anticuerpos IgG y la carga larvaria o desarrollo larvario de *O. ovis*

Las respuestas sistémicas y locales de IgG se correlacionaron altamente ($P=0.001$) en el grupo Progenitor-progenie 1 ($r= 0.57$), 2 ($r=0.58$), 3 ($r=0.53$). No se encontraron relaciones estadísticamente significativas entre las respuestas de IgG y la carga larvaria o el desarrollo larvario de *O. ovis* en las ovejas del grupo Progenitor-progenie 1. Sin embargo, se observaron algunos coeficientes de correlación negativos significativos en los grupos Progenitor-progenie 2 y 3 (Tabla VIII).

Carga larvaria. La carga larvaria de L2 se correlacionó negativamente con la respuesta sistémica de IgG específica para L3SGC en las ovejas del grupo Progenitor-progenie 2 (Tabla VIII). De manera similar, la carga larvaria de L3 se asoció negativamente con la intensidad de la respuesta local de IgG en las ovejas de los grupos Progenitor-progenie 2 (usando L3SGC como antígenos de cobertura) y Progenitor-progenie 3 (usando L2CE como antígenos de cobertura).

Desarrollo larvario. Los pesos larvarios de L2 y L3 se correlacionaron negativamente con las respuestas sistémica y local de IgG en las ovejas del grupo Progenitor-progenie 2 y solamente con la respuesta local de IgG en las ovejas del grupo Progenitor-progenie 3 (Tabla VIII).

Tabla VIII. Relaciones entre las respuestas sistémicas y locales de inmunoglobulinas G y la carga larvaria o el desarrollo larvario de *O. ovis*.

<i>O. ovis</i>	Repuestas de anticuerpos	Grupo Progenitor-Progenie	$n=$ ¹	Estadio larvario	$r=$ ²	<i>P</i>	Antígeno cobertura ³
Carga	IgG sistémica	2	38	L2	-0.38	0.01	L3SGC
	IgG local	2	42	L3	-0.35	0.025	L3SGC
		3	25	L3	-0.39	0.025	L2CE
Peso	IgG sistémica	2	35	L2 + L3	-0.32	0.05	L2CE
					-0.29	0.05	L2SGC
	IgG local	2	38	L3	-0.34	0.025	L3SGC
					-0.30	0.05	L3SGC
					-0.52	0.025	L2CE
			L2 + L3	-0.43	0.05	L2CE	

¹ n = Número de ovejas positivas a la infección con este estadio larvario.

²Coefficiente de correlación.

³L2CE = Extractos crudos de larvas L2; L2SGC = Contenido de la glándula salival de larvas L2; L3SGC = Contenido de la glándula salival de larvas L3.

DISCUSIÓN

Las proteínas de la glándula salival de L2 y L3 se reconocen por ser las fracciones más antigénicas de las larvas de *O. ovis* (Angulo-Valadez et al., 2007b; Innocenti et al., 1995). La prueba de ELISA indirecta usando L2CE, L2SGC y L3SGC como antígenos de cobertura mostraron alta sensibilidad pero baja especificidad en el período de verano. Los datos reportados en este estudio confirman los estudios realizados por Tabouret et al. (2001a) en Francia y los realizados por Suárez et al. (2005) en Sardinia. Los falsos positivos observados fueron debidos a reacciones no específicas o, más probablemente, a animales en los cuales no se encontraron larvas en la necropsia pero que pudieron estar infectados previamente. Los niveles altos de anticuerpos IgG específicos pueden persistir después de la expulsión de cualquier larva madura remanente ó después de un tratamiento larvicida (Jacquiet et al., 2005).

Varios reportes sugieren que en ovejas puede ocurrir al menos una regulación inmune parcial de las poblaciones larvarias de *O. ovis*. Por ejemplo, se ha observado un retraso en el desarrollo larvario y una respuesta sistémica elevada en ovejas inmunizadas con productos excretorios-secretorios (que contienen antígenos de la glándula salival) o con proteínas de la membrana digestiva de *O. ovis* (Frugère et al., 2000; Angulo-Valadez et al., 2007a). Sin embargo, el establecimiento larvario no fue afectado en esos estudios. Más aún, la ovejas adultas parecen ser menos susceptibles a la infección por *O. ovis* que los corderos jóvenes (Dorchies y Yilma, 1996; Scala et al., 2001); lo cual sugiere, que las ovejas expuestas continuamente desarrollan competencia inmune. Sobre ello, se ha demostrado que las respuestas de protección para *Lucilia cuprina* son dependientes de la frecuencia y la cantidad de exposiciones larvarias (Eisemann et al., 1990) así como también

del origen genético de las ovejas (Sanderman et al., 1992). Estudios *in vitro* mostraron que el crecimiento larvario de *L. cuprina* fue retardado por el suero (conteniendo grandes niveles de IgG) de ovejas vacunadas o infectadas repetidamente (Bowles et al., 1987; Eisemann et al., 1990; Tellam y Eisemann, 1998; Colditz et al., 2002). Sin embargo, en la evaluación del reto larvario *in vivo*, no se pudo demostrar protección significativa con ninguno de los inmunógenos de *L. cuprina* empleados (extractos crudos, preparaciones excretorias-secretorias, y serin-proteasas purificadas) (Elkington y Mahony, 2007). En otros parásitos de ovejas, como *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: Trichostrongylidae) y *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae), se han demostrado claramente los roles de los anticuerpos sobre el desarrollo larvario *in vivo* (Stear et al., 1999; Lacroux et al., 2006). En esas infecciones parasitarias, las inmunoglobulinas deben actuar directamente en la neutralización de enzimas parasitarias y también en la cooperación con los eosinófilos para la liberación de gránulos tóxicos dependientes de anticuerpos en contacto con la cutícula del parásito (Meeusen et al., 2005; Terefe et al., 2007).

En el presente estudio, las determinaciones de las necropsias y del nivel de anticuerpos se realizaron en animales que provenían del mismo rebaño localizado en el Sur de Sardinia donde las infecciones de *O. ovis* son frecuentes y severas, especialmente en julio (época de verano). Las ovejas fueron divididas en tres grupos Progenitor-progenie de acuerdo al Carnero que las engendró. Debido al manejo común, se puede considerar que todas las 186 ovejas fueron expuestas a tasas de infección de *O. ovis* idénticas independientemente del grupo al que ellas pertenecían. Más aún, al momento del estudio, todas las ovejas habían experimentado infecciones naturales repetidas durante seis periodos de actividad de la mosca y deberían ser consideradas como ovejas altamente inmunizadas.

Acerca de la prevalencia y la intensidad de las infecciones, las longitudes y pesos larvarios mostraron alta variabilidad en cada grupo Progenitor-progenie sin diferencias significativas entre los ellos. Sin embargo, las proporciones de los tres estadios larvarios fueron significativamente diferentes entre los grupos lo que sugiere que el desarrollo larvario difirió de un grupo a otro. Adicionalmente, se observaron correlaciones significativas de las respuestas sistémicas o locales de IgG con el establecimiento y el desarrollo larvarios en algunos grupos pero no en todos. En nuestro conocimiento, este es el primer reporte en el cual la respuesta de anticuerpos IgG específicos para *O. ovis* podría ser claramente correlacionada con la supervivencia y/o el desarrollo larvarios dentro del hospedero. Este efecto de la respuesta de IgG parece estar (al menos parcialmente) bajo control genético. El retraso en el crecimiento larvario dentro del hospedero podría traer un impacto negativo serio sobre la viabilidad del adulto. [Cepeda-Palacios et al. \(2000\)](#) estimaron que una considerable reducción (40%) en las poblaciones de adultos probablemente se puede conseguir con una disminución del 40% en el peso larvario maduro. Desafortunadamente, las viabilidades de pupas y moscas de las larvas L3 recuperadas no fueron evaluadas en este estudio y deberían ser consideradas para investigaciones futuras. En conclusión, las ovejas adultas infectadas naturalmente con *O. ovis* muestran altas respuestas locales y sistémicas de anticuerpos IgG hacia las proteínas de la glándula salival de larvas L2 y L3 en la prueba de iELISA. Los niveles de inmunoglobulinas G parecen correlacionarse negativamente con la supervivencia y desarrollo larvarios dentro del hospedero. Este fenómeno probablemente estuvo bajo control genético porque solo dos grupos Progenitor-progenie mostraron esas asociaciones negativas. Los antígenos de L3SGC mostraron los mejores parámetros en la prueba de iELISA para la detección de la estrosis en ovejas.

CAPÍTULO III. Valor serodiagnóstico de los antígenos de la glándula salival de *Oestrus ovis* L. usando la prueba de iELISA en cabras

Parte I.

Desarrollo de una prueba de iELISA usando caprinos infectados experimentalmente y estudio seroepidemiológico de la estrosis caprina en Baja California Sur

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos

Se capturaron manualmente moscas grávidas ($n=4$) de *O. ovis* en rebaños caprinos de Baja California Sur, México. Las larvas de primer estadio ($n=515$) se extrajeron de los úteros de las moscas mediante la presión abdominal suave y se colocaron en solución salina fisiológica. Las larvas viables seleccionaron bajo el estereoscopio ($40\times$) para utilizarse en el experimento de infección.

Larvas L3 de *O. ovis* ($n=25$) se colectaron de la cabeza de cabras ($n=9$) sacrificadas Baja California Sur, México. Las larvas se agruparon de acuerdo a la fecha de colección y se lavaron con PBS (pH 7.4) conteniendo penicilina (100 U ml^{-1}) y estreptomycinina ($100\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) antes de su disección.

Disección larvaria y antígenos de la glándula salival

Como se describió anteriormente, las larvas L3 se disectaron, las glándulas salivales ($n=25$) se removieron y sus contenidos (L3SGC) se obtuvieron por centrifugación. La

concentración de proteína del L3SGC se determinó con el kit del ensayo del ácido bicinonínico (BCA, Pierce, Rockford, Illinois). Para asegurarse de que los antígenos no estuvieran degradados antes de usarse en la prueba de ELISA indirecta, la integridad de las proteínas se verificó visualmente por electroforesis (PAGE, Laemmli, 1970) y la actividad proteolítica se determinó en Azocoll (ver Materiales y Métodos en el Capítulo 1).

Infecciones experimentales

Veinte cabritos cruzados Nubio×Criollo de tres meses de edad (nunca infectados con *O. ovis* y mantenidos aislados de insectos voladores para evitar infecciones naturales de campo) fueron asignados al azar ($n=4$ por grupo). Los grupos infectados experimentalmente fueron 0, 12, 24, 36, y 48 L1 de acuerdo al número de larvas aplicadas. Las larvas de primer estadio se aplicaron directamente en el orificio nasal izquierdo usando una pipeta de transferencia flexible. Los signos clínicos como estornudos y secreción de moco se registraron diariamente. Los cabritos se alimentaron con heno de alfalfa a libre acceso, concentrado (300 g/día), bloques minerales y agua fresca.

Mediciones de crecimiento y actividad física

Los cabritos infectados con cero y 48 larvas L1 se dotaron de un equipo digital para medir la actividad física (Bodytronics Onyx Step Pedometer, TKO Enterprises, Inc., Fayetteville, GA) en el cuello. Las actividades de movimiento (p.ej. estornudos, agitación de la cabeza, saltos) se registraron dos veces diariamente, a las 08:00 y a las 18:00 horas. Los cabritos se pesaron bisemanalmente (después de la privación del consumo de agua y alimento por 12 horas) empezando en el día 0 de la infección.

Necropsias de los cabritos

Todos los cabritos se sacrificaron y las necropsias se llevaron a cabo en el día 67 post-infección para evitar la maduración de las larvas y que abandonaran del hospedero. La cabeza fue examinada inmediatamente con cuidado para buscar larvas de *O. ovis* en el septo nasal, turbinados, hueso etmoidal y cavidades sinusales. El número de larvas y los estadios de desarrollo se identificaron de acuerdo con [Zumpt \(1965\)](#).

Análisis de los anticuerpos IgG sistémicos

Cabritos infectados experimentalmente. Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular de cada cabrito en los grupos 0 L1, 12 L1 y 48 L1, a los días 0, 14, 42 y 67 post-infección. Los sueros fueron obtenidos por centrifugación (1500 g x 5 min) y almacenados a -20 °C hasta su uso.

Cabras infectadas naturalmente. Con el objetivo de analizar las respuestas de anticuerpos IgG sistémicos en cabras infectadas naturalmente con *O. ovis*, se tomaron muestras sanguíneas de 448 cabras provenientes de 20 rebaños de Baja California Sur, México. Los sueros se obtuvieron por centrifugación y se almacenaron a -20 °C para su uso posterior. Adicionalmente, se registró el peso vivo corporal, la edad y el sexo de cada cabra muestreada.

Prueba de iELISA

Se estandarizó un protocolo para encontrar las condiciones óptimas de la concentración de antígenos (2.5, 5.0, 10.0 µg/ml), dilución de sueros (1:50, 1:100, 1:200),

dilución del anticuerpo conjugado con peroxidasa anti-IgG de cabra (1:500, 1:1000, 1:2000), la concentración de substrato (0.2, 0.4, 0.6 mg/ml), el tiempo y la temperatura de incubación en la prueba de ELISA indirecta. Se utilizó el procedimiento descrito por Jacquet et al. (2005) como referencia inicial (ver también materiales y métodos del capítulo II). Los grupos de sueros negativo ($n=8$ cabritos no infectados) y positivo ($n=5$ cabras infectadas con *O. ovis* naturalmente) se usaron como controles. Las condiciones óptimas fueron: los antígenos de L3SGC se diluyeron a 2.5 µg/ml en buffer de carbonatos (pH 9.6), distribuidos (100 µl) en placas de 96 pozos (Nunc surface, Nunc, Denmark), e incubadas por 30 minutos a 25°C. Los pozos se lavaron tres veces con PBST (0.01 M fosfato, 0.15 M cloruro de sodio, pH 7.2 y 0.1% Tween 20). Los pozos cubiertos con antígeno se incubaron 30 minutos a 25 °C con una solución de leche descremada al 10% (200 µl) y luego se descartó la solución. Por triplicado se adicionaron muestras de suero (100 µl) diluido 1:50 en PBST y se incubaron durante 30 minutos a 25 °C. Después de los tres lavados con PBST, se adicionó el anticuerpo conjugado con peroxidasa (anti-IgG de cabra, Sigma, A5420 St. Louis, MO) diluido 1:2000 en buffer de carbonato (30 minutos de incubación a 25 °C). Se hicieron tres lavados finales con PBST antes de adicionar e incubar con 100 µl por pozo del cromógeno (0.4 mg/ml OPD; Sigma, St. Louis, MO, USA) a 25 °C. Después de 30 minutos, las densidades ópticas (DO) se determinaron en un espectrofotómetro (BioRad, Microplate reader 3350-UV) a una longitud de onda de 454 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje del control positivo. El promedio de DO de tres pozos PBST se usó como blanco. El valor de corte se estableció como el 20% del control positivo como sigue:

$$\text{Anticuerpos (\%)} = \frac{\text{DO muestra de suero} - \text{DO control negativo}}{\text{DO control positivo} - \text{DO control negativo}} \times 100$$

Análisis estadístico

Se calcularon los coeficientes de correlación de lineal para las variables larvarias y del hospedero en cabras infectadas experimental y naturalmente. Los efectos de la carga larvaria sobre el peso corporal vivo, ganancia de peso y actividad física de los cabritos se evaluaron por análisis de regresión simple. La actividad física, establecimiento larvario y la ganancia de peso corporal se cabritos infectados y no infectados se comparó usando la prueba de “t” student para muestras que tienen una varianza común y un mismo tamaño de muestra. Se usó ANOVA de una vía para comparar las respuestas de anticuerpos en cabritos infectados experimentalmente. Todos los procedimientos estadísticos se llevaron a cabo usando el software Statistica (StatSoft, 1998).

RESULTADOS

Cabritos infectados experimentalmente con larvas L1 de *O. ovis*

Signos clínicos de la estrosis. Posterior a la infección experimental, se observaron estornudos frecuentes durante los primeros 3 días; luego, se hicieron evidentes: secreciones nasales fluídas, dificultad respiratoria e incluso tos del día 14 al 31 post-infección. Los signos clínicos más severos aparecieron de los días 48 al 60. En la necropsia, se observó ligera rinosinusitis bilateral, y la mucosa nasal y sinusal era ligeramente roja con secreciones mucosas y mucopurulentas en los cabritos infectados.

*Carga y desarrollo de *O. ovis*.* Los cabritos en el grupo control resultaron sin larvas en el examen de necropsia. El promedio de larvas recuperadas de *O. ovis* en los grupos infectados fue 10 ± 4.2 larvas/cabeza de las cuales 5.9 ± 2.8 (58.8%) fueron larvas L1, 3.1 ± 1.4 (31.3 %) L2, y 1.0 ± 0.4 (10.0%) L3. El número de larvas recuperadas se incrementó de acuerdo al número de larvas aplicadas (Tabla IX). El número de larvas aplicadas se correlacionó con el número total de larvas encontradas en la necropsia ($r=0.88$, $P<0.05$), como también con el número de larvas L1 ($r=0.87$, $P<0.05$), L2 ($r=0.76$, $P<0.05$) y L2+L3 ($r=0.70$, $P<0.05$). Se encontraron diferencias estadísticas en el número de larvas recuperadas entre el grupo 12 L1 y los grupos 24, 36, y 48 L1. En contraste, la tasa de establecimiento larvario fue similar ($P<0.05$) entre grupos infectados, en el rango de 29% en el grupo 48 L1 a 40% en el grupo 24 L1.

Peso corporal vivo y ganancia de peso. El promedio de ganancia de peso de todos los grupos de cabritos fue 5.0 ± 2.6 kg. La infección con larvas de *O. ovis* no afectó ($P < 0.05$) la ganancia de peso durante los 67 días de periodo experimental (Tabla IX). No se encontraron correlaciones significativas entre el número de larvas aplicadas y la media de ganancia de peso ($r = 0.21$, $P < 0.05$) o el peso corporal vivo final ($r = 0.25$, $P < 0.05$). Similarmente, en la necropsia la carga y el desarrollo de *O. ovis* no se asoció ($P < 0.05$) con la media de la ganancia de peso o el peso corporal vivo final.

Actividad física. La actividad física fue 164 ± 155 y 206 ± 140 movimientos para los grupos 0 L1 y 48 L1, respectivamente (Tabla X). La infección de *O. ovis* incrementó la actividad física durante el experimento ($P < 0.01$) y principalmente durante los primeros 28 días post-infección (114 ± 80 vs 224 ± 139 , $P < 0.01$). Más aún, se observó una correlación alta ($r = 0.87$, $P < 0.05$) entre el número de larvas recuperadas y el número de actividad durante los primeros 28 días post-infección. Sin embargo, la media total de actividad física no se asoció con el número de larvas recuperadas ($r = 0.5$, $P < 0.05$), el número de L2+L3 ($r = 0.47$, $P < 0.05$) ni tampoco con la ganancia de peso total de los cabritos ($r = 0.54$, $P < 0.05$).

Tabla IX. Datos de la necropsia, peso vivo y ganancia de peso de los cabritos infectados experimentalmente con larvas L1 de *O. ovis* durante un periodo de 67 días.

Grupo ¹	Larvas de <i>O. ovis</i>						Cabritos		
	Aplicadas L1	Recuperadas			TEL ² (%)	Peso corporal promedio (kg)		GPT ³ (kg)	
		L1	L2	L3		Total	Inicial		Final
0 L1									
Media	0	0	0	0	0 ^a	0 ^a	10.7	15.3	4.6 ^a
D.E.	0	0	0	0	0		1.0	0.6	1.1
12 L1									
Media	12	1.8	1.8	0.8	4.2 ^b	35 ^b	11.0	16.3	4.3 ^a
D.E.	0	0.5	1.3	1.0	0.5		2.1	3.5	2.5
24 L1									
Media	24	6.5	2.3	1.0	9.8 ^c	40 ^b	11.7	16.6	4.9 ^a
D.E.	0	3.0	1.5	0.8	3.0		3.2	4.5	1.4
36 L1									
Media	36	7.0	3.8	1.5	12.3 ^c	34 ^b	11.2	16.2	4.9 ^a
D.E.	0	0.8	2.5	2.4	3.9		1.0	6.1	2.6
48 L1									
Media	48	8.3	4.8	0.8	13.8 ^c	29 ^b	12.2	18.4	6.1 ^a
D.E.	0	2.2	1.5	1.0	3.8		1.3	2.7	1.6

¹n=4 cabritos por grupo; ²Tasa de establecimiento larvario; ³GPT=Ganancia de peso total

durante el periodo de prueba.

^{abc}Las letras diferentes corresponden a diferencias estadísticas ($P<0.05$).

Tabla X. Actividad física (media diaria) registrada con un equipo indicador digital atado al cuello de los cabritos infectados experimentalmente con larvas L1 de *O. ovis*, divididos en periodos de 14 días.

Periodo	Grupo 0 L1		Grupo 48 L1 ¹	
	Media	D.E.	Media	D.E.
0-14	153 ^a	93	261 ^b	160
15-28	77 ^a	38	188 ^b	104
29-42	77 ^a	63	115 ^a	69
43-56	290 ^a	216	218 ^b	127
57-67	245 ^a	159	264 ^a	178

¹El grupo de cabritos infectados recibieron 48 larvas L1 por vía intranasal. Los valores mostrados son el reflejo de la actividad media de los cabritos cada 14 días de la suma de 2 registros diarios.

^{ab}Las letras diferentes en las columnas indican diferencias estadísticas significativas entre grupos ($P < 0.05$).

Respuesta de anticuerpos IgG sistémicos en cabritos infectados experimentalmente

La **figura 10** muestra la cinética de anticuerpos sistémicos IgG contra antígenos L3SGC en cabritos infectados experimentalmente. La concentración de las IgG sistémicas se fue incrementando hasta alcanzar el valor de corte (20% control positivo de referencia) entre los días 42 (grupo 48 L1) y 67 (grupo 12 L1). Sin embargo, las respuestas de anticuerpos no fueron diferentes ($P<0.05$) entre grupos infectados.

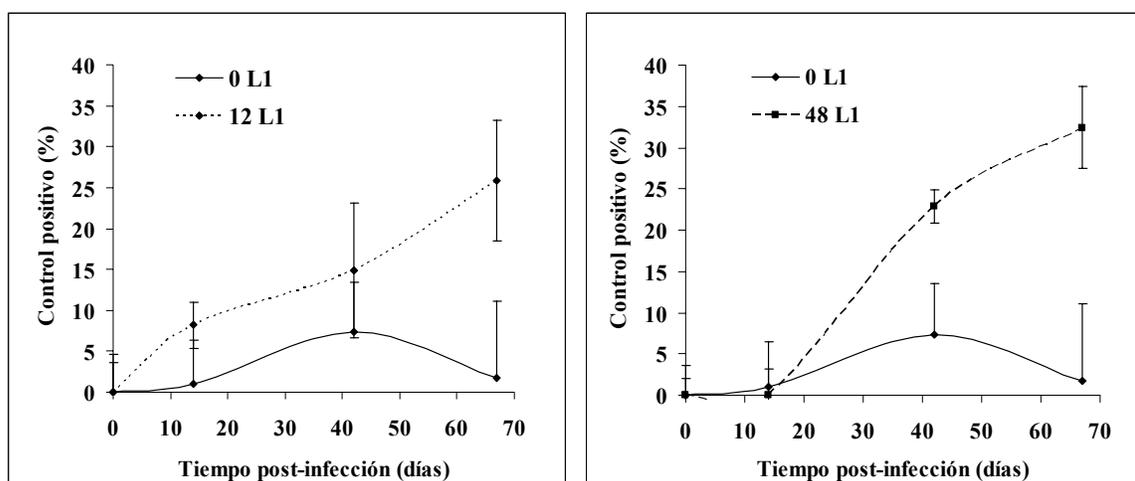


Figura 10. Cinética de los anticuerpos sistémicos IgG específicos por la prueba de ELISA indirecta usando L3SGC como antígenos de cobertura en cabritos infectados experimentalmente (media±D.E.).

Respuesta sistémica de IgG en cabras infectadas naturalmente

Todos los rebaños de cabras estudiados (100%) tuvieron anticuerpos sistémicos IgG específicos contra los antígenos L3SGC de *O. ovis* (Tabla XI). La seroprevalencia general fue 59.2%. Los anticuerpos IgG específicos se correlacionaron con la prevalencia ($r=0.58$; $P<0.05$). La media de seroconversión positiva fue 109.4% (rango de 21.2 a 277.2%). Más aún, el número de cabras seropositivas se correlacionó con la prevalencia ($r=0.78$, $P<0.05$). El peso corporal vivo de las cabras se correlacionó con la prevalencia ($r=0.23$; $P<0.05$). La respuesta de anticuerpos sistémicos de IgG contra los antígenos L3SG no se asoció ($P<0.05$) con el peso corporal vivo, la edad o el sexo en las cabras muestreadas.

Tabla XI. Respuesta sistémica de anticuerpos IgG específicos y estudio epidemiológico de la infección de *O. ovis* en cabras de B.C.S. con la prueba de ELISA indirecta usando L3SGC como antígenos de cobertura.

Rebaño	Municipio	n=	Prueba de iELISA		
			Positivos (n=)	Media de IgG (%)	Prevalencia (%)
1	La Paz	43	42	62	97.7
2	La Paz	17	11	80	64.7
3	Comondú	10	6	118	60
4	Comondú	16	15	98	93.8
5	Comondú	26	2	120	7.7
6	Comondú	25	2	78	8
7	Comondú	21	12	92	57.1
8	Comondú	30	29	72	96.7
9	Comondú	53	53	194	100
10	Comondú	50	26	118	52
11	Loreto	20	14	90	70
12	Loreto	22	6	53	27.3
13	Loreto	15	8	95	53.3
14	Loreto	13	3	148	23.1
15	Mulegé	5	3	86	60
16	Mulegé	20	14	114	70
17	Mulegé	20	9	102	45
18	Mulegé	13	4	83	30.8
19	Mulegé	21	5	58	23.8
20	Mulegé	8	1	88	12.5
Total		448	265	97.5	59.2

DISCUSIÓN

El establecimiento larvario encontrado después de la infección experimental con larvas L1 del útero de hembras grávidas ha sido reportado en ovejas (Frugère et al., 2000; Angulo-Valadez et al., 2007b). En el presente trabajo, los datos obtenidos de la necropsia indican que se recuperó un número similar de larvas a pesar de que se aplicaron más de 24 L1. Esto significa que la capacidad máxima de los cabritos de esta edad y peso para hospedar larvas de *O. ovis* se encuentra en el rango de 9 a 14. De manera similar, la correlación positiva encontrada entre el número de larvas aplicadas y el número de larvas L2 y L3 recuperadas indicó que el incremento en el número de larvas hospedadas en los cabritos indujo una tasa de maduración más rápida. A pesar de la infección con larvas de *O. ovis*, el crecimiento de los cabritos no fue afectado bajo las condiciones de alojamiento permanente. Dorchies et al. (1999) sugirieron que durante esta co-evolución parásito-hospedero, las cabras se han adaptado mejor a la infección de *O. ovis* que las ovejas. Por ello, los efectos negativos de esta parasitosis son más evidentes en ovejas que en cabras infectadas. Sin embargo, los datos encontrados indicaron que uno de los efectos de las larvas sobre los cabritos fue el incremento en la actividad física diaria. La patogenicidad inducida por *O. ovis* es provocada no solamente por la irritación mecánica de los ganchos orales y espinas cuticulares durante la locomoción larvaria, sino también por una estimulación antigénica de los productos excretados-secretados sobre la mucosa nasosinusal (Dorchies et al., 2006).

Por otra parte, los análisis de la prueba de iELISA demostraron que las proteínas de la glándula salival larval fueron antígenos útiles para detectar anticuerpos sistémicos IgG

específicos en cabras infectadas con *O. ovis*. [Goddard et al. \(1999\)](#) mencionaron que cuando la prueba de ELISA es utilizada para el diagnóstico de la estrosis, la exposición a los parásitos y las tasas de desarrollo larvario deben ser consideradas. En animales clínicamente positivos y seronegativos se requieren varias semanas para detectar una respuesta de anticuerpos, de la misma manera como ocurrió en los presentes resultados. Como resultado de una primera exposición a *O. ovis*, los cabritos desarrollaron una respuesta humoral sistémica de IgG para alcanzar el nivel de corte después de 42 días post-infección. Esta respuesta inmune no estuvo estadísticamente asociada con el número y el desarrollo de *O. ovis*. Sin embargo, la respuesta humoral alcanzada podría estar fuertemente ligada al desarrollo de larvas L2 y L3 en los cabritos. Se ha demostrado que larvas L2 y L3 en crecimiento aumentan la tasa de excreción-secreción de enzimas y antígenos sobre la mucosa nasal para su nutrición y alimentación, resultando en un incremento de la estimulación del sistema inmune del hospedero ([Tabouret et al., 2003ab](#); [Jacquiet et al., 2005](#); [Angulo-Valadez et al., 2007a](#)). También se ha reportado que las respuestas humorales de IgG contra los antígenos de los productos excretorios-secretorios (ESP) de *O. ovis* se incrementan de acuerdo al desarrollo larvario *in situ* ([Alcaide et al., 2005a](#); [Tabouret et al., 2001a](#)). Estas respuestas se han detectado usando ESP como antígenos de cobertura en pruebas de ELISA con resultados sensibles para el diagnóstico de la estrosis ([Alcaide et al., 2005ab](#); [Suárez et al., 2005](#); [Sánchez-Andrade, 2005](#); [Papadopoulous et al., 2006](#)).

Los ESP larvarios son reconocidos como los antígenos más importantes en especies que causan miasis. Como ejemplos, los antígenos de los ESP de *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae) en bovinos y de *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) en ovinos fueron inicialmente utilizados con éxito para la detección de anticuerpos usando la prueba

de ELISA en hospederos infectados (Boulard y Weintraub, 1973; Skelly y Howells, 1987). En *O. ovis*, los ESP son una mezcla de productos del tubo digestivo y productos de la glándula salival. De manera interesante los análisis de Western blot mostraron que la respuesta humoral de ovejas infectadas con *O. ovis* se dirigió principalmente contra el complejo de proteínas de 28 kDa de la glándula salival larvaria (Tabouret et al., 2001a). Este complejo proteico salival también fue fuertemente reconocido por anticuerpos sistémicos IgG de cabras infectadas con *O. ovis* (Angulo-Valadez et al., 2007a). Esto sugiere que el sistema inmune de ambas especies de hospederos, cabras y ovejas, identificaron proteínas específicas secretadas por la glándula salival de *O. ovis* durante la infección. Las respuestas de anticuerpos contra los mismos antígenos reconocidos deberían ser consideradas para mejorar el diagnóstico de la estrosis por ELISA en ovejas y cabras. Recientemente, reportamos que los antígenos de la glándula salival de larvas L3 mejoraron el valor de la prueba de iELISA para el diagnóstico de la estrosis en ovejas comparado con los antígenos somáticos o de la glándula salival de larvas L2 (Angulo-Valadez et al., 2008). En el presente estudio de campo, el 100% de los rebaños de cabras muestreados (59.2% de los animales expuestos naturalmente) tenían anticuerpos sistémicos IgG específicos contra los antígenos salivales de *O. ovis*. Esta producción de anticuerpos específica no se asoció con el peso, edad, o sexo de las cabras muestreadas. Sin embargo, la respuesta sistémica de IgG se correlacionó altamente con la prevalencia de la infección. En conclusión, los antígenos de larvarios de L3SG son eficientes para detectar respuestas sistémicas de IgG específicos contra larvas de *O. ovis* en caprinos infectadas usando la prueba de ELISA indirecta.

Parte II.

Aplicación de la prueba de iELISA en caprinos infectados en campo y examinados en necropsias

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección de *O. ovis* y disecciones larvarias

Larvas L3 de *O. ovis* ($n=25$) se colectaron de la cabeza de cabras ($n=9$) sacrificadas Baja California Sur, México. Las larvas ($n=25$) se lavaron con PBS (pH 7.4) conteniendo penicilina (100 U ml^{-1}) y estreptomicina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$). Se checó la viabilidad de cada larva y se disectaron para remover la glándula salival ($n=25$) como se describió anteriormente (ver Materiales y Métodos, Capítulo I).

Antígenos de la glándula salival

Los antígenos de L3SGC se obtuvieron, la concentración de proteína se cuantificó, y su integridad se determinó como se describió anteriormente (ver Materiales y Métodos, Capítulos I y II).

Análisis de las necropsias y muestras de suero sanguíneo

Se realizaron exámenes de necropsias de 251 cabras para detectar la presencia de *O. ovis* en la necropsia. Antes del sacrificio de cada cabra, se registró el peso corporal, la edad (muda dental) y el sexo. Las cabezas de las cabras se examinaron cuidadosamente y se registraron el número de larvas y sus estadios de desarrollo (Zumpt, 1965). Debido a la

indisponibilidad del productor para vender las cabezas de los caprinos sacrificados, el trabajo se tuvo que hacer explorando los senos frontales y cavidades cornuales. En estos sitios anatómicos se alojan solamente las larvas L2 y L3.

Las muestras sanguíneas ($n=125$) se tomaron y el suero se obtuvo por centrifugación ($1500\text{ g} \times 5\text{ min}$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se almacenó congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis de la respuesta de anticuerpos IgG usando la prueba de iELISA.

Lesiones de la estrosis en cabras infectadas

Se elaboró una escala base de lesiones y sus intensidades causadas por larvas infectivas de *O. ovis* (Tabla XII). Durante 6 meses ($n=9$ fechas de muestreo), se registraron las lesiones en los senos frontales y cavidades cornuales de cada lado anatómico de la cabeza de cabras infectadas con *O. ovis*. La mucosa normal de cabritos nunca infectados ($n=4$) se usó como referencia. El número de larvas de *O. ovis* se registró y su estado de desarrollo se clasificó de acuerdo con Cepeda-Palacios et al. (1999). Todos los análisis se realizaron por la misma persona entrenada.

Prueba de iELISA

Se utilizó la técnica de ELISA indirecta descrita en el Capítulo III, Parte I.

Tabla XII. Escala de evaluación de la severidad de las lesiones causadas por *O. ovis* en la cavidad nasal y los senos frontales de cabras examinadas en necropsias.

Hallazgos en la necropsia	Escala de evaluación				
Color de la mucosa	Blanco 0	Amarillo 1 1	Amarillo 2 2	Amarillo 3 3	Rosado 4
Presencia de sangre	Ausente 0	Presente 4			
Presencia de pus	Ausente 0	Presente 4			
Presencia de moco	Ausente 0	Poca 1	Moderada 2	Abundante 3	
Severidad de la inflamación ¹	Ausente 0	Baja 1	Moderada 2	Alta 3	Severa 4

Análisis estadístico

Los análisis de las necropsias y los sueros se agruparon en dos periodos (primavera-verano y otoño-invierno) de acuerdo con las fechas de colección. Cuando la información de cabras no fue disponible, debido a la indisposición de los caprinocultores, se excluyó dependiendo del análisis estadístico empleado. Los datos de iELISA se analizaron usando un software para estudios epidemiológicos de datos tabulados (EPIDAT 3.1, 2006). Los estadísticos descriptivos de las variables observadas se calcularon así como el análisis de correlación de lineal. Los efectos del número de larvas y el desarrollo larvario sobre la severidad de las lesiones se evaluó usando ANOVA de una vía. Los análisis se realizaron usando el software Statistica (Statsoft, 1998).

RESULTADOS

Características fenotípicas del hospedero y la infección de *O. ovis*

Los datos de la necropsia de las cabras expuestas naturalmente a la infección de *O. ovis* se resume en la **Tabla XIII**. La prevalencia anual de la estrosis caprina fue 73.9%. Durante primavera-verano y otoño-invierno las prevalencias fueron 72.9% y 75.3%, respectivamente. El número total de larvas recuperadas de los senos frontales y cuernos de cabras infectadas fue de 1,029 que correspondieron a 650 para larvas L3 y 383 para larvas L2. Durante el periodo primavera-verano se colectaron 648 larvas (L3=423; L2=228), mientras que en el periodo otoño-invierno fueron 424 larvas (L3=267; L2=158).

Peso corporal vivo. El peso corporal vivo (rango 8-95 kg) y la edad (rango 0.3-10 años) de las cabras examinadas en la necropsia se correlacionaron significativamente ($r=0.43$, $P<0.05$). También, se encontraron correlaciones significativas del peso del hospedero con el número total de larvas ($r=0.20$, $P<0.05$) y con el número de larvas L2 ($r=0.23$, $P<0.05$) encontradas en la necropsia.

Tabla XIII. Características fenotípicas del hospedero y larvas de *O. ovis* recuperadas de los senos y cavidades cornuales en las necropsias de cabras expuestas a la infección natural.

Hospedero/ <i>O. ovis</i>	Primavera-Verano		Otoño-Invierno		Total	
	Media±D.E.	<i>n</i>	Media±D.E.	<i>n</i>	Media±D.E.	<i>n</i>
Cabra						
Peso	34.9±10.2	107	35.8±13.7	86	35.3±11.9	193
Edad	3.6±2.5	105	3.3±2.5	86	3.5±2.5	191
Macho		32		39		71
Hembra		79		47		126
Intensidad de infección						
Larvas L2	3.9±5.4	59	3.4±2.8	46	3.7±4.4	105
Larvas L3	6.3±5.7	67	4.9±4.2	54	5.7±5.1	121
Larvas totales	8.3±9.0	78	7.0±5.9	61	7.7±7.8	139

**n*=Número válido de datos de cabras examinadas.

Edad. La edad del hospedero solamente se asoció positivamente con el número total de larvas ($r=0.20$, $P<0.05$) y el número de larvas L3 ($r=0.20$, $P<0.05$) encontradas en los senos y cavidades cornuales de las cabras. El sexo del hospedero no se asoció con el número o el desarrollo de *O. ovis*.

Respuesta de anticuerpos IgG sistémicos específicos

La intensidad de la respuesta sistémica de anticuerpos IgG contra los antígenos L3SGC se correlacionó significativamente con la carga larvaria ($r=0.27$, $P<0.05$) y el número de larvas L3 ($r=0.31$, $P<0.05$). No existieron asociaciones entre el nivel de anticuerpos y la edad, el peso corporal vivo, o el sexo de las cabras muestreadas.

Severidad de las lesiones causadas por *O. ovis*

Los estadísticos descriptivos de los datos de las larvas de *O. ovis* y la severidad de las lesiones en las cabras se resumen en la [Tabla XIV](#).

Tabla XIV. Estadísticos descriptivos de los datos del hospedero, de *O. ovis*, y de la severidad de las lesiones de la estrosis en cabras.

Variable	n=	Media	D.E.
<i>Cabra</i>			
Edad (años=muda dental)	36	2.39	1.40
Peso corporal vivo (kg)	36	36.83	13.21
<i>Oestrus ovis</i>			
No. larvas en el lado derecho	38	2.61	3.41
No. larvas en el lado izquierdo	38	2.39	3.49
Desarrollo larvario en el lado derecho	80	5.69	3.46
Desarrollo larvario en el lado izquierdo	75	5.07	3.77
No. total de larvas	38	3.50	3.94
Severidad de las lesiones de la estrosis			
Lesiones en el lado derecho	37	5.19	3.56
Lesiones en el lado izquierdo	37	4.97	3.53
Promedio de la severidad ¹	37	5.08	3.45

¹Se refiere a la severidad de la inflamación: 0= no visible; 1= apenas visible; 2 al 4= visible de acuerdo a la apreciación de grosor de la mucosa que indica el aumento en el número de células de la pared epitelial.

Relación de las características fenotípicas del hospedero con la carga larvaria, el desarrollo larvario, y las lesiones

Solamente la edad del hospedero ($r=0.38$, $P<0.05$) se correlacionó con el número total de larvas encontradas en la necropsia. El peso corporal vivo ($r=-0.08$) o la edad ($r=0.02$) no afectaron el desarrollo larvario de *O. ovis*. Tampoco se observó asociación ($P<0.05$) entre el peso corporal vivo ($r=0.04$) o la edad ($r=-0.02$) del hospedero con la severidad de las lesiones encontradas en los senos y las cavidades cornuales.

Relación de la carga larvaria y el desarrollo larvario con la severidad de las lesiones de la estrosis

Se encontró una correlación positiva ($r=0.38$, $P<0.05$) entre el número de larvas de *O. ovis* y la severidad de las lesiones en los senos frontales de cabras infectadas. Los valores máximos de severidad fueron observados cuando 6 larvas/cabra o más se encontraron en los senos (severidad=10). El desarrollo larvario se asoció ($r=0.50$, $P<0.05$) con las lesiones observadas en la necropsia en el rango de los inter-estadios 3 al 11 (L2 temprana a L3D5). En promedio, las lesiones causadas por el inter-estadio 3 (severidad= 7.9 ± 3.62) que corresponde a larvas L2 temprana, fueron mayores que la causadas por el inter-estadio 5 (severidad= 1.75 ± 0.35) que corresponde a larvas L2-L3. Los procesos lesivos iniciaron de nuevo cuando las larvas alcanzaron el desarrollo 6 de L3 temprana (Figura 11).

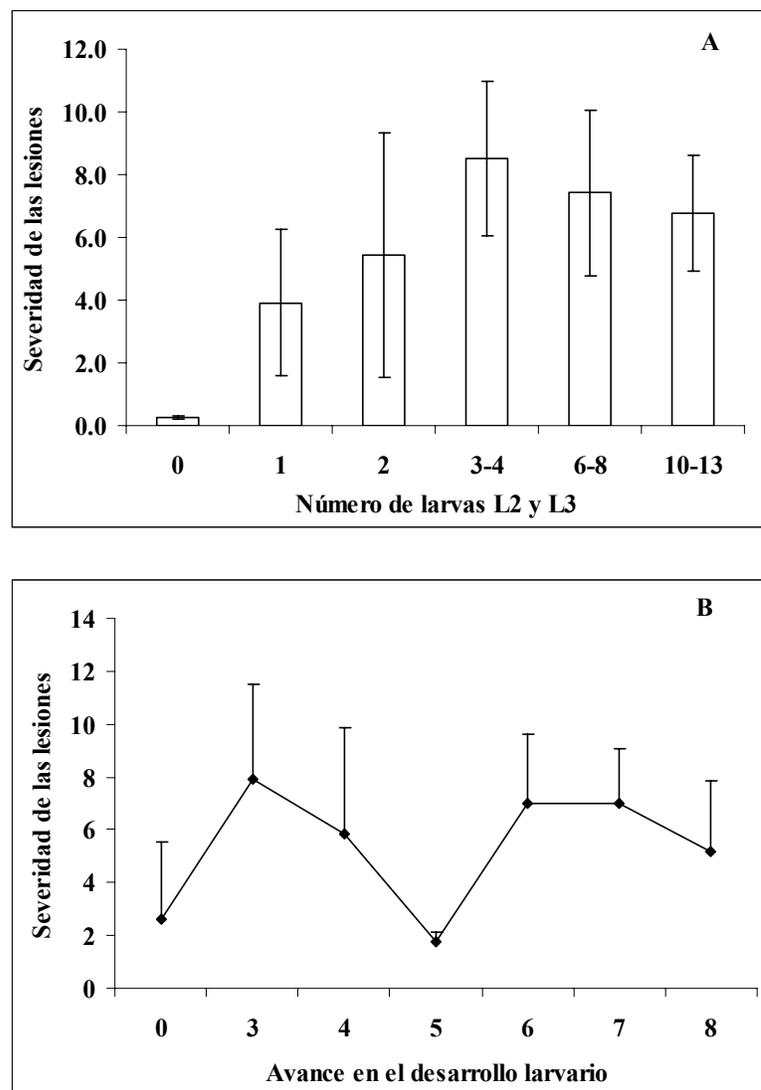


Figura 11. Relación del número de larvas de *O. ovis* (A) y el desarrollo larvario (B) con la severidad de las lesiones en los senos frontales y cavidades cornuales de cabras infectadas (media±D.E.).

En la figura 1A no se encontraron animales con 5 ó 9 larvas.

Análisis de la prueba de ELISA indirecta

Los resultados de la prueba de iELISA se muestran en las tablas **XV y XVI**. En general, se observó alta sensibilidad y baja especificidad usando L3SGC como antígenos de cobertura. La sensibilidad de la prueba de iELISA fue más alta durante el período otoño-invierno. En contraste, la especificidad fue más alta durante el período primavera-verano (**Tabla XVI**).

Tabla XV. Predicciones de la prueba de iELISA usando L3SGC como antígenos de cobertura y los datos de las necropsias de cabras expuestas a la infección natural de *O. ovis*.

Prueba de ELISA	Necropsia ^a					
	Primavera-Verano (n=66)		Otoño-Invierno (n=59)		Total	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Seropositivos	45	9	44	11	89	20
Seronegativos	8	4	1	3	9	7
Total	53	13	45	14	98	27

^aResultados de la necropsia (senos frontales y cavidades cornuales) de cabras sacrificadas; los animales fueron considerados infectados por la presencia de al menos una larva L2 ó L3.

Tabla XVI. Diagnóstico predictivo de la estrosis en cabras expuestas a la infección natural de *O. ovis* por la prueba de iELISA usando L3SGC como antígenos de cobertura.^a

Parámetros de la prueba	Primavera-Verano (%)	Otoño-Invierno (%)	Total (%)
<i>n</i> =	66	59	125
Sensibilidad	84.91	97.78	90.82
Especificidad	30.77	21.43	25.93
Valor de predicción +	83.33	80.00	89.38
Valor de predicción -	33.33	75.00	71.18
Prevalencia aparente	81.82	93.22	87.20
Prevalencia real ^b	80.30	76.27	78.40

^aResultados de la necropsia de los senos frontales y cavidades cornuales de cabras sacrificadas; los animales fueron considerados infectados por la presencia de al menos una larva L2 ó L3.

^bPrevalencia verdadera de las cabras a las que se les colectó muestra de suero sanguíneo.

DISCUSIÓN

[Cepeda et al. \(1998\)](#) reportaron una actividad infectiva permanente de la mosca de *O. ovis* con alta prevalencia a través del año en B. C. S. En el presente estudio, las larvas L2 y L3 encontradas en los senos frontales y cavidades cornuales confirman la alta prevalencia de la infección. Esas características son especialmente favorables para investigar la relación cabra-*O. ovis* bajo condiciones de campo. Por estas razones, se estudió la severidad de la lesiones causadas por *O. ovis* en cabras en donde se observó que la mayor severidad de las lesiones se asoció a los incrementos del número de larvas alojadas y del desarrollo larvario. Las severidades mayores fueron relacionadas principalmente con la presencia de los interestadios larvarios L2 temprana y L3 temprana. Esto sugiere que los daños patológicos y la estimulación inmune son más fuertes y provocados durante ó inmediatamente después de que ocurre la muda. De manera similar, [Tabouret et al. \(2003b\)](#) encontraron que los daños patológicos en ovejas infectadas fueron más severos en los senos frontales y asociados a la presencia de larvas L2 y L3. Sin embargo, no se había sugerido que este efecto podría estar relacionado con los fenómenos de mudas larvarias de *O. ovis* dentro del hospedero; aunque se han reportado la presencia de proteínas antigénicas unidas al integumento larvario ([Innocenti et al., 1997](#)).

Por otra parte, la respuesta humoral sistémica de IgG no se correlacionó con ninguna característica fenotípica del hospedero. Pero, el peso y la edad del hospedero se asoció positivamente con el número de larvas de *O. ovis*. Esto concuerda con varios autores que han reportado que las cabras adultas infectadas naturalmente alojan una mayor carga larvaria que las cabras jóvenes ([Cepeda et al., 1998](#); [Yilma y Genet, 2000](#); [Abo-Shehada et](#)

al., 2003). Lo anterior es relevante ya que los animales más viejos tienen siempre más oportunidades de ser infectados repetitivamente durante su vida. Esto sugiere que puede existir una falla en la inmunidad adaptativa de las cabras infectadas con *O. ovis*. Además, los reportes sobre resistencia inmune adquirida en ovejas son inconsistentes. Aunque [Manchenko y Manchenko \(1989\)](#) evidenciaron el rol crítico del sistema inmune en las ovejas inmunosuprimidas sobre la supervivencia de las larvas de *O. ovis*, la resistencia inmune adquirida contra la infección no es clara todavía. [Jacquet et al. \(2005\)](#) encontraron que los corderos infectados repetitivamente ($n=3$ infecciones) con *O. ovis* no desarrollaron competencia inmune. Además, se ha demostrado que actividad inmunosupresora estimulada por el parásito dentro del hospedero ([Jacquet et al., 2005](#); [Dorchies et al., 2006](#)).

En el presente estudio, la respuesta de anticuerpos IgG sistémicos se correlacionó positivamente con el número de larvas encontradas en los senos. Estos datos son valiosos para mejorar la detección de la estrosis caprina. La prueba de iELISA usando L3SGC como antígenos de cobertura mostró alta sensibilidad y baja especificidad. No obstante, las necropsias se limitaron a examinar cuidadosamente los senos frontales y cavidades cornuales. Como comparación, se ha reportado baja especificidad en pruebas de ELISA usando ESP de *O. ovis* como antígenos de cobertura en ovejas ([Suárez et al., 2005](#); [Alcaide et al., 2005a](#)) y cabras ([Alcaide et al., 2005b](#); [Sánchez-Andrade et al., 2005](#)); incluso, los antígenos L3SGC mejoraron los parámetros serológicos de la prueba aunque con baja especificidad ([Angulo-Valadez et al., 2008](#)). En el presente estudio, la prueba de iELISA resultó en una prevalencia aparente más alta que la prevalencia real (determinada a la necropsia de los senos y cavidades cornuales de las cabras), es decir, algunas cabras no

infectadas en los senos mostraron títulos altos de anticuerpos IgG específicos para *O. ovis*, resultando en falsos positivos. Los falsos positivos observados podrían deberse a reacciones no específicas. Sin embargo, puede ser más probable que se deba a animales en los cuales no se detectaron larvas en los senos frontales pero que las alojaban en las cavidades nasales ó animales que estuvieron recientemente infectados. También, se sabe que los niveles altos de anticuerpos IgG específicos pueden persistir después de la expulsión de larvas maduras remanes o después de un tratamiento larvicida (Jacquet et al., 2005). Es prometedor el hecho que los antígenos de la glándula salival sean reconocidos y útiles para el diagnóstico de la estrosis en las especies ovina y caprina (Tabouret et al., 2001a; Angulo-Valadez et al., 2007a). La siguiente meta sería purificar los antígenos específicos de la glándula salival e identificar los más apropiados en pruebas de ELISA. En conclusión, las cabras infectadas naturalmente con *O. ovis* desarrollaron respuestas de anticuerpos sistémicos de IgG específicos que fueron detectadas en la prueba de iELISA usando antígenos de la glándula salival para el diagnóstico de las estrosis caprina. La edad y el peso del hospedero se correlacionaron positivamente con la carga larvaria de *O. ovis*. La severidad de las lesiones en los senos frontales se asoció al número de larvas alojadas y fueron principalmente causadas por los inter-estadios tempranos L2 y L3.

DISCUSION GENERAL

En estos trabajos de investigación se demostró que existen proteasas en la saliva de *O. ovis*. Estos resultados son relevantes para el entendimiento de la relación *O. ovis* – hospedero porque se reportó (Tabouret et al., 2003) que no existía actividad proteolítica y otras actividades enzimáticas en la saliva del parásito. Las implicaciones relacionadas pudieran entenderse como sucede en otras larvas de insectos que parasitan mamíferos (Chapman, 1998). Las enzimas producidas por la glándula salival de *O. ovis* deben ser secretadas para realizar una digestión inicial extracorporal; y luego, la digestión intermedia y final probablemente se lleva a cabo en los espacios endo- y ecto- peritróficos del intestino medio (Mordue et al., 1980). De acuerdo con la patología de la enfermedad y la nutrición larvaria de *O. ovis*, las enzimas salivales quizá actúan sobre mucoproteínas del mucus nasal, glicocálix, proteínas actina y miosina de las microvellosidades, glicoproteínas y proteínas de las uniones intercelulares, colágeno de la lamina basal (Tipo IV, y probablemente tipo VII) y de la matriz extracelular del tejido conectivo (Tipo I), y otras moléculas de la mucosa de origen estructural o plasmático (p.ej. albúmina, inmunoglobulinas). Desafortunadamente, aún se sabe muy poco sobre la alimentación, la fisiología de la digestión, la absorción y la compartimentalización del tubo digestivo larvario en la familia Oestridae. No obstante, el alcance de estos resultados nos permite inferir la participación de moléculas producidas por la glándula salival de *O. ovis* en los procesos tróficos larvarios dentro del hospedero. Aunque no se pudo determinar la existencia de proteasas antigénicas con los métodos aquí empleados, resulta interesante que los principales antígenos de la saliva del parásito son reconocidos por los anticuerpos

sistémicos producidos por ambos hospederos infectados: ovejas y cabras. Esta información generada es significativa para el desarrollo de una técnica de diagnóstico comercial en donde sería necesario que se detectaran anticuerpos de animales infectados usando antígenos reconocidos por ambas especies hospederas. A pesar de que la sensibilidad de las pruebas de iELISA para ovejas y cabras fue alta, la especificidad fue relativamente baja. En términos prácticos las pruebas de iELISA desarrolladas (usando antígenos salivales de larvas L3) el 90 al 97% de los animales seropositivos detectados están infectados en ese momento; y por el contrario, se detectan anticuerpos anti-*O. ovis* en 74 a 50% en animales no infectados en ese momento. Esto significa que las pruebas de iELISA son capaces de discriminar un rebaño infectado de uno libre de la parasitosis. También, que su utilidad práctica es posible si se usa para estudios epidemiológicos en programas de erradicación de la enfermedad. Pero además, se puede determinar la cronobiología de la infección a partir de la cinética de anticuerpos producidos durante el año en rebaños de zonas particulares. Lo último es importante ya que los programas de manejo integrado de parasitosis incluyen estrategias como la farmacológica en donde es necesario determinar el momento exacto para aplicar una droga antiparasitaria de manera preventiva o curativa. De acuerdo con nuestros resultados y otros reportes (Cepeda et al., 1993, 1998), en Baja California Sur se puede sugerir la aplicación del antiparasitario (p.ej. Closantel, Ivermectina) de diciembre a agosto, principalmente al inicio de la primavera y antes de la temporada de lluvias de verano. Estos son los periodos del año cuando la mayoría de las larvas son de primer estadio y los niveles de anticuerpos empiezan a incrementarse como resultado de una nueva infección generacional.

Por otra parte, la investigación futura sobre esta línea de inmunología en esta parasitosis debería ser la caracterización de secuencias amino acídicas de los antígenos identificados. Esta información permitiría conocer mejor las características fisico-químicas los antígenos y sus probables funciones en la interacción *O. ovis*-hospedero. Posteriormente, se podría evaluar y seleccionar los antígenos mas apropiados para el desarrollo de un kit para el diagnóstico de la estrosis ovina y caprina. Al mismo tiempo, la información generada ayudaría a la identificación de los antígenos mas apropiados para determinar si confieren protección en vacunaciones experimentales, ya sea un solo antígeno o cócteles de antígenos salivales.

Por último, las recomendaciones para el uso de estas técnicas de ELISA desarrolladas son: el procesamiento de muestras desde las larvas, la disección larvaria, la obtención de la glándula salival y su contenido deben realizarse forzosamente entre 4 a 10 °C para evitar degradación de proteínas, y finalmente almacenarse a – 20° C; a cada lote de larvas disectadas ó de proteínas salivales recuperadas se les debe medir la concentración de proteína, la actividad proteolítica en Azocoll y el patrón de bandeo en geles de electroforesis para verificar la integridad de las proteínas procesadas antes de usarse en las pruebas de ELISA. De la misma manera si los extractos preparados fueron almacenados por más de un mes debe verificarse de nuevo lo antes mencionado. Todo lo recomendado es importante para que la información serodiagnóstica y epidemiológica generadas sean repetibles y confiables.

CONCLUSIONES

Se comprobó que existen actividades proteolítica y antigénica en el contenido de la glándula salival de larvas de *O. ovis* que parecen estar involucradas en la nutrición larvaria y la inmunomodulación del hospedero. Aunque se encontraron bandas proteolítica y antigénica del mismo peso molecular, no se pudo determinar si eran de proteasas antigénicas con los métodos aquí empleados.

Los antígenos de la glándula salival de *O. ovis* mejoraron los parámetros serológicos de la prueba ELISA indirecta para detectar la estrosis ovina. Sin embargo no fueron estadísticamente diferentes respecto a usar extractos crudos de larvas L2.

La prueba de ELISA indirecta usando los antígenos de la glándula salival de *O. ovis* fue eficiente para detectar anticuerpos específicos en caprinos infectados con *O. ovis*

REFERENCIAS

- Abella, N., 1990. Etude de la muqueuse nasale de moutons parasite par *Oestrus ovis*: Identification et numération des éosinophiles et des mastocytes. Mémoire D.E.A. Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Abo-Shehada, M.N., Batainah, T., Abuharfeil, N., Torgerson, P.R., 2003. *Oestrus ovis* larval myiasis among goats in northern Jordan. *Prevent. Vet. Med.* 59, 13-19.
- Akapo, A.J., Bornarel, P., Pangui, L.J., Sarradin, P., 1993. *Oestrus ovis* infection and bacterial flora in sheep from Senegal. *Rev. Med. Vet.* 144, 331-334.
- Alcaide, M., Reina, D., Frontera, E., Navarrete, I., 2005a. Analysis of larval antigens of *Oestrus ovis* for the diagnosis of oestrosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Med. Entomol.* 19, 151-157.
- Alcaide, M., Reina, D., Frontera, E., Navarrete, I., 2005b. Epidemiology of *Oestrus ovis* (Linneo, 1761) infestation in goats in Spain. *Vet. Parasitol.* 130, 277-284.
- Alcaide, M., Reina, D., Sánchez, J., Frontera, E., Navarrete, I., 2003. Seasonal variations in the larval burden distribution of *Oestrus ovis* in sheep in the southwest of Spain. *Vet. Parasitol.* 118, 235-241.
- Alzieu, J.P., Chiarisoli, O., 1990. Actualités sur la clinique et la thérapeutique de l'Oestrose ovine. *Le Point Vet.* 129, 173-183.
- Anderson, J.R., 2006. Oestrid Myiasis of Humans. In: *The Oestrid flies, biology, host-parasite relationships, impact and management.* Colwell, D.D., Hall, M.J.R., Scholl, P.J. (Eds.). CABI. UK. pp 201-209.
- Angulo, C.R., Garay, G.E., Garay, G.H., Bautista, G.C.R., 1983. Utilización de antígenos larvarios de *Oestrus ovis* para el diagnóstico serológico de estrosis en ovinos. *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México.*
- Angulo-Valadez, C.E., Cepeda-Palacios, R., Ascencio-Valle, F., Jacquiet, P., Dorchie, Romero, M.J., Khelifa R.M., 2007a. Proteolytic activity in salivary gland products of sheep bot fly (*Oestrus ovis*) larvae. *Vet. Parasitol.* 149, 117-125.
- Angulo-Valadez, C.E., Cepeda-Palacios, R., Jacquiet, P., Dorchie, P., Prévot, F., Ascencio-Valle, F., Ramírez-Orduña, J.M., 2007b. Effects of immunization of Pelibuey lambs with *Oestrus ovis* digestive tract protein extracts on larval establishment and development. *Vet. Parasitol.* 143, 140-146.
- Angulo-Valadez, C.E., Scala, A., Grisez, C., Prévot, F., Bergeaud, J.P., Carta, A., Cepeda-Palacios, R., Ascencio, F., Terefe, G., Dorchie, P., Jacquiet, P., 2008. Specific IgG antibody responses in *Oestrus ovis* L. (Diptera: Oestridae) infected sheep: associations with intensity of infection and larval development. *Vet. Parasitol.* 155, 257-263.
- Arbiza, A.S.J.I., de Lucas, T.J., 2001. La leche caprina y su producción. Editores Mexicanos Unidos, S.A., pp.13-34.
- Ávila, C.R., 1973. Campaña de control y erradicación del *Oestrus ovis*. Congreso Mundial de Medicina Veterinaria, México. DF. Sección IV, ponencia 2, pp. 1-6.
- Babcock, O.G., 1953. Notes on the biology of *Oestrus ovis* L. *Bull. E-871x, ARS, USDA,* pp. 1-4.

- Bautista-Garfias, C.R., Angulo-Contreras, R.M., Garay-Garzon, E., 1988. Serologic diagnosis of *Oestrus ovis* (Diptera:Oestridae) in naturally infested sheep. *Med. Vet. Entomol.* 2, 351-355.
- Bautista-Garfias, C.R., Ruiz-Navarrete, A., Morales, F., Morilla, G.A., 1982. Anticuerpos circulantes contra larvas de *Oestrus ovis* (Diptera:Oestridae) en cabras infectadas naturalmente. *Folia Entomológica Mexicana* 52, 75-86.
- Bergeaud, J.P., Durantou, C., Dorchies, P., 1994. L'œstrose ovine en Aveyron: Résultat d'une enquête sur 1036 têtes à l'abattoir de Rodez. *Rev. Med. Vét.* 145, 863-866.
- Biu, A.A., Nwosu, C.O., 1999. Incidence of *Oestrus ovis* infestation in Borno-white Sahel goats in the semi-arid zone of Nigeria. *Vet. Res.* 30,109-12.
- Boulard, C., Garrone, R., 1978. Characterization of a collagenolytic enzyme from larvae of *Hypoderma lineatum* (Insecta: Diptera, Oestriiform). *Comp. Biochem. Physiol.* 59, 251-255.
- Boulard, C., Weintraub, J., 1973. Immunological responses of rabbits artificially infested with the cattle grubs *Hypoderma bovis* (L.) and *H. lineatum* (de Vill.) (Diptera: Oestridae). *Int. J. Parasitol.* 3, 379-380.
- Bowles, V.M., Carnegie, P.R., Sandeman, R.M., 1988. Characterization of proteolytic and collagenolytic enzymes from the larvae of *Lucilia cuprina*, the sheep blowfly. *Aust. J. Biol. Sci.* 41, 269-78.
- Bowles, V.M., Carnegie, P.R., Sanderman, R.M., 1987. Immunization of sheep against infection with larvae of the blowfly *Lucilia cuprina*. *Int. J. Parasitol.* 17, 753-758.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Breev, K.A., Sultanov, F.R., 1975. On some peculiarities of nasal sheep botfly larvae, *Oestrus ovis* L. (Diptera:Oestridae). *Parasitologia.* 9, 47-56.
- Butterfield, J.F., 1900. *Oestrus ovis*. *J. Comp. Med. Vet. Arch.* 21, 23-24.
- Casu, R.E., Pearson, R.D., Jarney, J.M., Cadogan, L.C., Riding, G.A., Tellam, R.L., 1994. Excretory/secretory chymotrypsin from *Lucilia cuprina*: purification, enzymatic specificity and amino acid sequence deduced from mRNA. *Insect. Mol. Bio.* 3, 201-211.
- Cencek, T., 2003. Thermostability of *Hypoderma lineatum* antigen. *Bull. Vet. Pulawy* 47, 121-131.
- Cepeda, P.R., 2005. Bionomía de *Oestrus ovis*. El gusano del cuerno de las cabras y las ovejas. Serie Didáctica. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México.
- Cepeda, P.R., 2008. Producción de caprinos: un enfoque técnico y social. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S. México.
- Cepeda, P.R., Scholl, P.J., 2001. La estrosis en cabras y ovejas, un problema mal entendido. *Acontecer Ovino-Caprino*, 11, 62-65.
- Cepeda, R., Monroy, A., Armenta, J.A., 1998. Prevalencia de *Oestrus ovis* en rebaños de caprinos y ovinos en el Municipio de La Paz, Baja California Sur. *Mem. XIII Reunión Nacional sobre Caprinocultura.* pp. 224-228.
- Cepeda-Palacios, R. Scholl, P.J., 2000a. Factors affecting the larvipositional activity of *Oestrus ovis* gravid females (Diptera: Oestridae). *Vet. Parasitol.* 91, 93-105.

- Cepeda-Palacios, R., Scholl, P.J., 2000b. Intra-puparial development in *Oestrus ovis* gravid females (Diptera: Oestridae). *J. Med. Entomol.* 37, 239-245.
- Cepeda-Palacios, R., Greene B.E., Loya R.J.G. y Espinoza V.J.L., 1993. Incidencia de *Oestrus ovis* en rebaños de ovinos y caprinos en Baja California Sur. *Rev. Inv. Cient. Cs. Agrop.* Vol 4, 29-36.
- Cepeda-Palacios, R., Angulo-Valadez, C.E., Zenteno, A.S., Flores, H.E., Servin, V.R., Tejas, R.A., 2003. Eficacia del Nim (*Azadirachta indica* Juss) contra *Oestrus ovis*, parásito de ovejas y cabras. 3er Congreso de la Asociación Latinoamericana de especialistas en Pequeños Rumiantes y camélidos Sudamericanos. Viña del Mar, Chile. 7 al 9 de mayo.
- Cepeda-Palacios, R., Avila, A., Ramírez-Orduña, R., Dorchies, P., 1999. Estimation of the growth patterns of *Oestrus ovis* L. larvae hosted by goats in Baja California Sur, Mexico. *Vet. Parasitol.* 86, 119-126.
- Cepeda-Palacios, R., Frugère, S., Dorchies, P., 2000. Expected effects of reducing *Oestrus ovis* L. mature larval weight on adult population. *Vet. Parasitol.* 90, 239-246.
- Chambers, L., Woodrow, S., Brown, A.P., Harris, P.D., Phillips, D., Hall, M., Church, J.C., Pritchard, D., 2003. Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *British J. Dermatol.* 148, 14-23.
- Chapman, R.F., 1998. Chapter 3: Alimentary canal, digestion and absorption. In: *The Insects, structure and function.* 4th edition. Cambridge University Press. pp. 38-68.
- Chhabra, M.B., Ruprah, N.S., 1976. Observations on the incidence and biology of *Oestrus ovis* L. *Indian Vet. J.* 53, 180-184.
- Cobbett, N.G., Mitchell, W.C., 1941. Further observations on the life cycle and incidence of the sheep bot, *Oestrus ovis*, in New Mexico and Texas. *Am. J. Vet. Res.* 2, 358-366.
- Colditz, I.G., Watson, D.L., Eisemann, C.H., Tellam, R.L., 2002. Production of antibodies to recombinant antigens from *Lucilia cuprina* following cutaneous immunisation of sheep. *Vet. Parasitol.* 104, 345-350.
- Colwell, D.D., 2004. Economic aspects in management of myiasis: current status and future prospects. Colwell, D.D., Dorchies, Ph. (Eds.). *Vet. Parasitol.* 125, 93-104.
- Colwell, D.D., Hall, M.J.R., Scholl, P.J., 2006. Introduction. In: *The Oestrid flies, biology, host-parasite relationships, impact and management.* Colwell, D.D., Hall, M.J.R., Scholl, P.J. (Eds.). CABI. UK. Pp. 1-7.
- Cozab, N., 1988. Studies on incidence, biology and serodiagnosis of *Oestrus ovis* Linnaeus, 1761 (Diptera: Oestridae) in Karnataka State. *J. Agric. Sci.* 22, 290.
- De Lucas, J.T., Arbiza, A.S.I., 2000. Producción ovina en el mundo y México. Editores Mexicanos Unidos, S.A. pp. 83-95.
- Devendra, C., Mc Leroy, G.B., 1986. Producción de cabras y ovejas en los trópicos. Edit. El Manual Moderno México.
- Dolbois, C.L., 1992. Contribution à l'étude immunologique de l'oestrose ovine. Mémoire de D.E.A. Université de Lille II.
- Dolbois-Charrier, L., Dorchies, P., 1993. *Oestrus ovis* of sheep: pituitary eosinophils and mast-cells. *Vet. Res.* 24, 362-363.

- Dorchies Ph., Duranton C., Jacquet P., 1998. Pathophysiology of *Oestrus ovis* infection in sheep and goats: a review. *Vet. Record.* 142, 487-489.
- Dorchies Ph., Yilma, J.M., Sarvey, J., 1993. Prevalence of lung abscesses and interstitial pneumonia in ovine oestrosis. *Vet. Rec.* 133, 325.
- Dorchies, Ph., 1997. Physiopathologie de l'oestrose ovine et rappels cliniques. *Le Point Vet.* 28, 61-65.
- Dorchies, Ph., Alzieu, J.P., 1997. L'Oestrose ovine: revue. *Rev. Med. Vet.* 148, 565-574.
- Dorchies, Ph., Alzieu, J.P., Yilma, J.M., Donat, F., Jeanclaude, D., Chiarisoli, O., 1992. Prévention de l'oestrose ovine par deux traitements au closantel en cours d'été. Appréciation clinique et parasitologique. *Rev. Med. Vet.* 143, 451-455.
- Dorchies, Ph., Bergeaud, J.P., Tabouret, G., Duranton, C., Prévot, F., Jacquet, P., 2000. Prevalence and larval burden of *Oestrus ovis* (Linné 1761) in sheep and goats in northern Mediterranean region of France. *Vet. Parasitol.* 88, 269-273.
- Dorchies, Ph., Bergeaud, J.P., Van Khanh, N., Morand, S., 1997. Reduced egg counts in mixed infections with *Oestrus ovis* and *Haemonchus contortus*: influence of eosinophils? *Parasitol. Res.* 83, 727-730.
- Dorchies, Ph., Duranton, C., Bergeaud, J.P., Alzieu, J.P., 1996. Chronologie de l'évolution naturelle des larves d'*Oestrus ovis* (Linne 1758) chez l'agneau non immunisé. *Bulletin de la société française de parasitologie.* Tome 14, 1, 20-27.
- Dorchies, Ph., Tabouret, G., Duranton Ch., Jacquet, Ph., 1999. Relations hôte-parasite : l'exemple d'*Oestrus ovis* (Linné 1761) chez le mouton et la chèvre. *Revue Méd. Vét.* 150, 511-516.
- Dorchies, Ph., Tabouret, G., Hoste, H., Jacquet, Ph., 2006. Oestrinae host-parasite interactions. In: Colwell, D.D., Hall, M.J.R., Scholl, P.J. (Eds.), *The Oestrid flies, biology, host-parasite relationships, impact and management.* CABI. UK. pp. 191-200.
- Dorchies, Ph., Wahetra, S., Lepetitcolin, E., Prevot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.P., Hoste, H., Jacquet, Ph., 2003. The relationship between nasal myiasis and the prevalence of enzootic nasal tumours and the effects of treatment of *Oestrus ovis* and milk production in dairy ewes of Roquefort cheese area. *Vet. Parasitol.* 113, 169-174.
- Dorchies, Ph., Yilma, J.M., 1996. Current knowledge in immunology of *Oestrus ovis* infection. *Acta Parasitol. Turcica,* 20, 563-580.
- Duranton, C., 1997. Comparison de l'infestation par *Oestrus ovis* (Linné, 1761) chez la chèvre et le mouton. Thèse Doctoral. Université Paul Sabatier. Toulouse, France.
- Duranton, C., Dorchies Ph., 1997. *In vitro* culture of *Oestrus ovis* (Linne 1761) first instar larvae: its application to parasitic drug screening. *Int. J. Parasitol.* 27, 125-128.
- Duranton, C., Dorchies, P., Grand, S., Lesure, C., Oswald, I.P., 1999. Changing reactivity of caprine and ovine mononuclear phagocytes throughout part of the life cycle of *Oestrus ovis*: assessment through spontaneous and inductible NO production. *Vet Res.* 30, 371-376.
- Duranton, C., Bergeaud, J.P., Dorchies, Ph., 1995. Dot-Enzyme-Link-Immunesorbent Assay for the rapid diagnosis of ovine oestrosis. *Rev. Med. Vet.* 4, 283-286.
- Eisemann, C.H., Donaldson, R.A., Cadogan, L.C., 1995. Digestion of ovine immunoglobulin G in larvae of the sheep blowfly *Lucilia cuprina*. *Med. Vet. Entomol.* 9, 448-450.

- Eisemann, C.H., Johnston, L.A.Y., Broadmeadow, M., O'Sullivan, B.M., Donalson, R.A., Pearson, R.D., Vuovolo, T., Kerr, J.D., 1990. Acquired resistance of sheep to larvae of *Lucilia cuprina*, assessed *in vivo* and *in vitro*. *Int. J. Parasitol.* 3, 299-305.
- Elkington, R.A., Mahony, T.J., 2007. A blowfly strike vaccine requires an understanding of host-pathogen interactions. *Vaccine* 25, 5133-5145
- Elvin, C.M., Vuocolo, T., Smith, W.J.M., 1994. An estimate number of serine protease genes expressed in sheep blowfly larvae (*Lucilia cuprina*). *Insect Mol. Biol.* 3, 105-115.
- Fallis, M.A., 1940. Studies on *Oestrus ovis* L. *Can. J. Res.* 18, 442-446.
- FAO, commodity database. 2006. FaoStat. <http://faostat.fao.org/site/569/default.aspx#anchor>. Accesado: 19 agosto 2008.
- Fekry, A.A., Serougi, A.O., Ayoub, S.A., 1997. *Oestrus ovis* (sheep nasal fly) infesting the eyes and the nose of a camel keeper family. *J. Egypt Soc. Parasitol.* 27, 493-496.
- Frugère, S., Cota, L.A., Prévot, F., Cepeda, P.R., Tabouret, G., Bergeaud, J.P., Duranton, C., Dorchies, P., Jacquet P., 2000. Immunisation of lambs with excretory-secretory products of *Oestrus ovis* third instar larvae and subsequent experimental challenge. *Vet. Res.* 31, 527-535.
- Gabaj, M.M., Beesley, W.N., Awan, M.A.Q., 1993. *Oestrus ovis* myiasis in Libyan sheep and goats. *Tropical Animal Health Production*, 25, 65-68.
- Goddard, P., Bates, P., Webster, K.A., 1999. Evaluation of a direct Elisa for the serodiagnosis of *Oestrus ovis* infection in sheep. *Vet. Record.* 144, 497-501.
- Green, D.A., Dieppe, C., 1995. *Oestrus ovis* infection in Cyprus. *J. Travel Med.* 2, 262-263.
- Gregory, A.R., Schatz, S., Laubach, H., 2004. Ophthalmomyiasis caused by the sheep bot fly *Oestrus ovis* in Northern Iraq. *Optometry and vision science.* 81, 586-590.
- Guerrini, V.H., Murphy, G.M., Broadmeadow M., 1988. The role of pH in the infestation of sheep by *Lucilia cuprina* larvae. *Intern. J. Parasitol.* 18, 407-409.
- Hemmersbach-Miller, M., Sánchez-Andrade, R., Dominguez-Coello, A., Hawari, M.A., Paz-Silva, A., Carranza, C., Perez-Arellano, J.L., 2007. Human *Oestrus* sp. infection, Canary Islands. *Emerging Infectious Diseases.* 13, 950-951.
- Hennesy, J.D., Sherrill, W.J., Binder, S.P., 1977. External ophthalmomyiasis caused by *Oestrus ovis*. *American J. Ophthalmol.* 84, 802-805.
- Heussen, C., Dowdle, E.B., 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerised substrate. *Anal. Biochem.* 102, 196-200.
- Horak, I.G., 1977. Parasites of domestic and wild animals in South Africa. I. *Oestrus ovis* in sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 44, 55-64.
- Horak, I.G., Snijders, A.J., 1974. The effect of *Oestrus ovis* in infestation on Merino lamb. *Vet. Rec.* 94, 12-16.
- Ilchmann, G., Hiepe, T., 1985. Immunological studies on the diagnosis of *Oestrus ovis* infestation. *Monats. Für Vet.* 40, 304-309.
- Ilchmann, G., Betke, P., Grafe, D., 1986. Studies on oestrosis and its control in the Mongolian People's Republic. *Mh. Vet. Med.* 41, 128-132.
- Innocenti, L., Lucshesi, P., Giorgi, F., 1997. Integument ultrastructure of *Oestrus ovis* (L.)(Diptera:Oestridae) larvae: Host immune response to various cuticular components. *Int. J. Parasitol.* 27, 495-506.

- Innocenti, L., Masetti, M., Macchioni, G., Giorgi, F., 1995. Larval salivary gland proteins of the sheep nasal bot fly, (*Oestrus ovis* L.), are major immunogens in infested sheep. *Vet. Parasitol.* 60, 273-282.
- Ivanov, I., Petrov, D., 1966. On the finding of *Listeria monocytogenes* in *O. ovis* larvae. *Vet. Med. Nauk.* 3, 641-643.
- Jacquet, P., Dorchies, P., 2002. Towards a lower prevalence of *Oestrus ovis* infections in sheep in a temperate climate (south west France). *Vet. Res.* 33, 449-453.
- Jacquet, P., Ngoc, T.T.T., Nouvel, X., Prevot, F., Grisez, C., Yacob, H.T., Bergeaud, J.P., Hoste, H., Dorchies, P., Tabouret, G., 2005. Regulations of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) populations in previously exposed and naïve sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 105, 95-103.
- Jagannah, M.S., Cozab, N., Vijayasarathi, S.K., 1989. Histopathological changes in the nasal passage of sheep and goats infested with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridés). *Indian J. Anim. Sc.* 59, 87-91.
- Kato, H., Murakami, T.I., 1962. Isolation of *Listeria monocytogenes* harvest from an *Oestrus ovis* larvae from a sheep with *Listeria encephalitis*. *Jpn. J. Vet. Sci.* 24, 29-43.
- Kettle, P.R., 1973. A study on the sheep botfly, *Oestrus ovis* (Diptera : Oestridae) in New Zealand. *New Zealand Entomologist.* 5, 185-191.
- Kilani, K., Kacem, H., Dorchies, P., Franc, M., 1986. Observations sur le cycle annuel d'*Oestrus ovis* en Tunisie. *Rev. Med. Vet.* 137, 451-457.
- Lacroux, C., Nguyen, T.H.C., Andreoletti, O., Prévot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.P., Gruner, L., Brunel, J.C., Francois, D., Dorchies, P., Jacquet, P., 2006. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Vet. Res.* 37, 607-622.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laskin, J.D., Heck, D.E., Laskin, D.L., 1994. Multifunctional role of nitric oxide in inflammation. *Trends in Endocrine Metabolism* 5, 377-382.
- Lecroisey, A., Keil, B., 1985. Specificity of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. *Eur. J. Biochem.* 152, 123-130.
- Lecroisey, A., Tong, N.T., Keil, B., 1983. Hypodermin B, a trypsin-related enzyme from the insect *Hypoderma lineatum*. Comparison with hypodermin A and Hypoderma collagenase, two serine proteinases from the same source. *Eur. J. Biochem.* 134, 261-267.
- Lehane, S.M., Assinder, A.J., Lehane, M.J., 1998. Cloning sequencing, temporal expression and tissue-specificity of two serine proteases from the midgut of the blood-feeding fly *Stomoxys calcitrans*. *Eur. J. Biochem.* 254, 290-296.
- Marchenko, V.A., Marchenko, V.P., 1989. Survival of the larvae of sheep bot fly *Oestrus ovis* L. depending of the function of immune system of the host's body. *Parazitol.* 23, 129-133.
- Marchenko, V.A., Marchenko, V.P., 1991. Kinetics of specific serum antibodies in sheep infested with *Oestrus ovis* larvae. *Parazitologia.* 25, 297-304.
- Masoodi, M., Hosseini, K., 2004. External ophthalmomyiasis caused by sheep botfly (*Oestrus ovis*) larva: a report of 8 cases. *Archives of Iranian Medicine* 7, 136-139.

- Meeusen, E.N.T., Balic, A., Bowles, V., 2005. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 121-125
- Mireles, M.E.J., Albarrán, C.U., Corro, G.A., 1992. Frecuencia de *Oestrus ovis* (oestrosis) en caprinos sacrificados en Cd. Altamirano, Guerrero. *Vét. Méx.* 18, 73-74.
- Mordue, W., Goldsworthy, G.J., Brady, J., Blaney, W.M., 1980. *Insect physiology*. John Wiley & Sons. New York, USA. Pp. 14-18.
- Muharsini, S., Riding, G., Partoutomo, S., Hamilton, S., Willadsen, P., Wijffels, G. 2000. Identification and characterization of excreted-secreted serine proteases of larvae of the Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana*. *Int. J. Parasitol.* 30, 705-714.
- Murguía, M., Rodríguez, J.C., Torres, F.J., Segura, J.C., 2000. Detection of *Oestrus ovis* and associated risk factors in sheep from the central region of Yucatán, México. *Vet. Parasitol.* 88, 73-78.
- Nguyen, V.K., Bourge, N., Concordet, D., Dorchie, P., 1996. Recherche des mastocytes et des éosinophiles de la muqueuse respiratoire chez le mouton infesté naturellement par *Oestrus ovis* (Linné 1761). *Parasite* 3, 217-221.
- Nguyen, V. K., Delverdier, M., Jacquiet, P., Dorchie, Ph., 1998. Expression tissulaire de l'épitope Ki-67 dans le compartiment épithélial de la muqueuse nasale du mouton et de la chèvre infestés naturellement par *Oestrus ovis* (Linné 1761). *Rev. Med. Vet.* 149, 1109-1113.
- Nguyen, V.K., Jacquiet, P., Cabanie, P., Dorchie, Ph., 1999a. Etude semi-quantitative des lésions des muqueuses respiratoires supérieures chez le mouton infesté naturellement par *Oestrus ovis* (Linné 1761). *Rev. Med. Vet.* 150, 43-46.
- Nguyen, V.K., Jacquiet, P., Durantou, C., Bergeaud, J.P., Prevot, F., Dorchie, P.h., 1999b. Réactions cellulaires des muqueuses nasales et sinusales des chèvres et des moutons à l'infestation naturelle par *Oestrus ovis* (Linné 1761) (Diptera: Oestridae). *Parasite* 2, 141-149.
- Nisbet, A.J., Huntley, J.F., 2006. Progress and opportunities in the development of vaccines against mites, fleas and myiasis-causing flies of veterinary importance. *Parasite Immunol.* 28, 165-172.
- Omar, M.S., Das, A.B., Osman, N.I., 1988. External ophthalmomyiasis due to the sheep nostril botfly larva *Oestrus ovis* in Saudi Arabia. *Annals Trop. Med. Parasitol.* 82, 221-223.
- Pampiglione, S., Giannetto, S., Virga, A., 1997. Persistence of human myiasis by *Oestrus ovis* L. (Diptera: Oestridae) among shepherds of the Etnean area (Sicily) for over 150 years. *Parassitologia* 39, 415-418.
- Pandey, V.S., Ouhelli, H., 1984. Epidemiology of *Oestrus ovis* infection of sheep in Morocco. *Trop. Anim. Hlth Prod.* 16, 246-252.
- Pangui, L.J., Dorchie, Ph., Belot, J., 1988. Contribution a l'étude épidémiologique de l'oestrose ovine au Sénégal. *Rev. Med. Vet.* 139, 701-704.
- Papadopoulos, E., Prevot, F., Diakou, A., Dorchie, Ph., 2006. Comparison of infection rates of *Oestrus ovis* between sheep and goats kept in mixed flocks. *Vet. Parasitol.* 138, 382-385.
- Pathak, K.M.L., 1992. Incidence of *Oestrus ovis* in sheep and goats in Rajasthan state of India. *Indian J. of Anim. Sci.* 62, 50.

- Piliponsky, A.M., Gleich, G.J., Bar, I., Levi-Schaffer, F., 2002. Effects of eosinophils on mast cells: a new pathway for the perpetuation of allergic inflammation. *Mol. Immunol.* 38, 1369-1372.
- Porchinskii, I.A., 1913. The sheep bot (*Oestrus ovis* L.), its biology, characteristics, methods of control and relation to man. *Trudy Biuro PO Entomologii* 10, 1-65.
- Pruett, J.H., Temeyer, K.B., Burkett, B.K., 1988. Antigenicity and immunogenicity of *Hypoderma lineatum* soluble proteins in the bovine host. *Vet. Parasitol.* 29, 53-63.
- Pruett, J.H.Jr., 1993. Proteolytic cleavage of bovine IgG by Hypodermin A, a serine protease of *Hypoderma lineatum* (Diptera:Oestridae). *J. Parasitol.* 79, 829-833.
- Quintero, M.T., Acevedo, A., Enriquez, J.J., 1987. Frecuencia de *Oestrus ovis* y sus lesiones en cabras. *Vét. Méx.* 18, 349-352.
- Ramalho-Ortigao, J.M., Kamhai, S., Rowton, E.D., Ribeiro, J.M., Valenzuela, J.G., 2003. Cloning and characterization of trypsin- and chymotrypsin-like proteases from the midgut of sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 33, 163-171.
- Ranatunga, P., Rajamahendran, P., 1972. Observations on the occurrence of *Oestrus ovis* L. (Dipt, Oestridae) and pleuroneumonia inn goats on a dry-zone farm in Ceylon. *Bull. Ent. Res.* 22, 173-183.
- Rogers C.E., and Knapp F.W., 1973. Bionomics of the Sheep Bot Fly, *Oestrus ovis*. *Enviroment. Entomol.* 2, 11-23.
- Rogers, C.E., 1967. An ecological study of *Oestrus ovis* Lineé. Master of Science Thesis. University of Kentucky. USA.
- Rogers, C.E., Knapp, F.W., Cook, D., Crowe, M.V., 1968. A temperature study of the overwintering site of the sheep bot fly *Oestrus ovis* L. *J. Parasitol.* 54, 164-165.
- Roitt, I., Brostoff, J., Male, D., 2002. *Immunologie*. 3e. édition. De Boeck. Belgique.
- Sánchez-Andrade, R., Romero, J.L., Suárez, J.L., Pedreira, J., Siaz, P., Arias, M., Paz-Silva, A., Panadero, R., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Scala, A., 2005. Comparison of *Oestrus ovis* metabolic and somatic antigens for the immunodiagnosis of the zoonotic myiasis oestrosis by immunoenzymatic probes. *Inmunol. Invest.* 34, 91-99.
- Sanderman, E.M., Chandler, R.A., Collins, B.J., O'Meara, T.J., 1992. Hypersensibility response and repeated infections with *Lucilia cuprina*, the sheep blowfly. *Int. J. Parasitol.* 22, 1175-1177.
- Sanderman, R.M., Feehan, J., Chandler, R.A., Bowles, V.M., 1990. Tryptic and chymotryptic proteases released by larvae of the blowfly, *Lucilia cuprina*. *Int. J. Parasitol.* 20, 1019-1023.
- Scala, A., Paz-Silva, A., Suárez, J.L., López, C., Díaz, P., Díez-Banos, P., Sánchez-Andrade, R., 2002. Chronobiology of *Oestrus ovis* (Diptera:Oestridae) in Sardinia, Italy: guidelines to chemoprophylaxis. *J. Med. Entomol.* 39, 652-657.
- Scala, A., Solinas, G., Citterio, C.V., Kramer, L.H., Genchi, C., 2001. Sheep oestrosis (*Oestrus ovis* Linné 1761, Diptera: Oestridae) in Sardinia, Italy. *Vet. Parasitol.* 102, 133-141.
- Scholl, P.J., Wedberg, J., Neher, N., Flashinski, R., 1990. Pest management principles from the commercial applicator: Animal pest control. University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, pp. 161.

- Shen, Z., Edwards, M.J., Jacobs-Lorena, M., 2001. A gut-specific serine protease from the malaria vector *Anopheles gambiae* is downregulated after blood ingestion. *Insect Mol. Biol.* 10, 111.
- SIAP. 2008. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>
- Skelly, P.J., Howells, A.J., 1987. The humoral immune response of sheep to antigens from larvae of the sheep blowfly (*Lucilia cuprina*). *Int. J. Parasitol.* 17, 1081-1087.
- Stat-soft., 1998. Statistica for Windows [Computer Program Manual]. Tulsa, OK.
- Stear, M.J., Strain, S., Bishop, S.C., 1999. How lambs control infection with *Ostertagia circumcincta*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72, 213-218
- Suárez, J.L., Scala, A., Romero, J.A., Paz-Silva, A., Pedreira, J., Arias, M., Díaz, P., Morrondo, P., Diez-Banos, P., Sánchez-Andrade, R., 2005. Analysis of the humoral immune response to *Oestrus ovis* in ovine. *Vet. Parasitol.* 134, 153-158.
- Tabouret, G., 2001. Interactions mouton-*Oestrus ovis* (Linné 1761) [Diptera : Oestridae] : Nutrition larvaire et reponse immunitaire muqueuse. Thèse Doctoral. Université Paul Sabatier.
- Tabouret, G., Bret-Bennis, L., Dorchies, P., Jacquet, P., 2003a. Serine protease activity in excretory-secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. *Vet. Parasitol.* 114, 305-314.
- Tabouret, G., Lacroux, C., Andreoletti, O., Bergeaud, J.P., Yacob, H.T., Hoste, H., Prévot, F., Grisez, C., Dorchies, P., Jacquet, P., 2003b. Cellular and humoral local immune responses in sheep experimentally infected with *Oestrus ovis* (Diptera:Oestridae). *Vet. Res.* 34, 231-241.
- Tabouret, G., Prévot, F., Bergeaud, J.P., Dorchies, P., Jacquet, P., 2001a. *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae): sheep humoral immune response to purified excreted/secreted salivary gland 28 kDa antigen complex from second and third instar larvae. *Vet. Parasitol.* 101, 53-66.
- Tabouret, G., Vouldoukis, I., Duranton, C., Prevot, F., Bergeaud, J.P., Dorchies, P., Mazier, D., Jacquet, P., 2001b. *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae): effects of larval excretory/secretory products on nitric oxide production by murine RAW 264:7 macrophages. *Parasite Immunol.* 23, 111-119.
- Tamashiro, W.K., Rao, M., Scott, A.L., 1987. Proteolytic cleavage of IgG and other protein substrates by *Dirofilaria immitis* microfilarial enzymes. *J. Parasitol.* 73, 149-154.
- Taylor, D., Szalanski, A., Peterson, R., 1996. Mitochondrial DNA variation in screwworm. *Med. Vet. Entomol.* 10, 161-169.
- Tellam, R.L., Eisemann, C.H., 1998. Inhibition of growth of *Lucilia cuprina* larvae using serum from sheep vaccinated with first-instar larvae antigens. *Int. J. Parasitol.* 28, 439-450.
- Terefe, G., Dorchies, P., Jacquet, P. 2007. Trends and challenges in the effective and sustainable control of *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Review Parasite*, 14, 3-14.
- Terefe, G., Yacob, H.T., Grisez, C., Prevot, F., Dumas, E. Bergeaud, J.P., Dorchies, Ph., Hoste H., Jacquet, P., 2005. *Haemonchus contortus* egg excretion and female length reduction in sheep previously infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. *Vet. Parasitol.* 128, 271-283.

- Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109, 1–62.
- Tesfaye, R., 1993. Epidemiology and biology of *Oestrus ovis* in Western Shoa, Ethiopia. DVM Thesis, Faculty of Veterinary Medicine, Addis Ababa University. 32-47.
- Touré, S.M., 1994. Myiases of economic importance. *Rev. Sci. Tech.* 3, 1053-1073.
- Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350-4354.
- Uslu, U., Dik, B., 2006. Prevalence and intensity of *Oestrus ovis* in Akkaraman sheep in the Konya region of Turkey. *Med. Vet. Entomol.* 20, 347–349.
- Walter, W., Froggatt, E.L.S., 1911. The nasal fly of sheep (*Oestrus ovis*) in Australia. *Agriculture Gazette of N.S.W.* pp. 223-227.
- Yacob, H.T., Dorchies, Ph., Jacquiet, Ph., Bleuart, C., Prevot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.P., Hoste, H., 2004a. Concurrent parasitic infections of sheep: depression of *Trichostrongylus colubriformis* populations by subsequent infection with *Oestrus ovis*. *Vet. Parasitol.* 121, 297-306.
- Yacob, H.T., Duranton-Grisez, C., Prevot, F., Bergeaud, J.P., Bleuart, C., Jacquiet, Ph., Dorchies, Ph., Hoste, H., 2002. Experimental concurrent infection of sheep with *Oestrus ovis* and *Trichostrongylus colubriformis*: negative interactions between parasite populations and related changes in cellular responses of nasal and digestive mucosae. *Vet. Parasitol.* 104, 307-317.
- Yacob, H.T., Jacquiet, Ph., Prevot, F., Bergeaud, J.P., Bleuart, C., Dorchies, Ph., Hoste, H., 2004b. Examination of the migration of first instar larvae of the parasite *Oestrus ovis* (Linnaeus 1761) [Diptera: Oestridae] in the upper respiratory tract of artificially infected lambs and daily measurements of kinetics of blood eosinophilia and mucosal inflammatory response associated with repeated infection. *Vet. Parasitol.* 126, 339-347.
- Yacob, H.T., Terefe, G., Jacquiet, Ph., Hoste, H., Grisez, C., Prévot, F., Bergeaud, J.P., Dorchies, Ph., 2006. Experimental concurrent infection of sheep with *Oestrus ovis* and *Trichostrongylus colubriformis*: Effects of antiparasitic treatments on interactions between parasite populations and blood eosinophilic responses. *Vet. Parasitol.* 137, 184-188
- Yilma, J.M., 1992. Contribution à l'étude de l'épidémiologie, du diagnostic immunologique et de la physiopathologie de l'OEstrose ovine (*Oestrus ovis*, linné 1761). Thèse Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Yilma, J.M., Dorchies, Ph., 1991. Epidemiology of *Oestrus ovis* in southwest of France. *Vet. Parasitol.* 40, 315-323.
- Yilma, J.M., Dorchies, Ph., 1993. Essais d'infestations expérimentales de l'agneau par des larves d'*Oestrus ovis*. *Bull. de la Soc. Française de Parasitol.* 11, 43-47.
- Yima, J.M., Genet, A., 2000. Epidemiology of the sheep nasal bot, *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae), in Central Ethiopia. *Revue Méd. Vét.* 151, 143-150.
- Zumpt, F., 1965. Myiasis in Man and Animals in the Old World. Butterworth, London, p. 267.