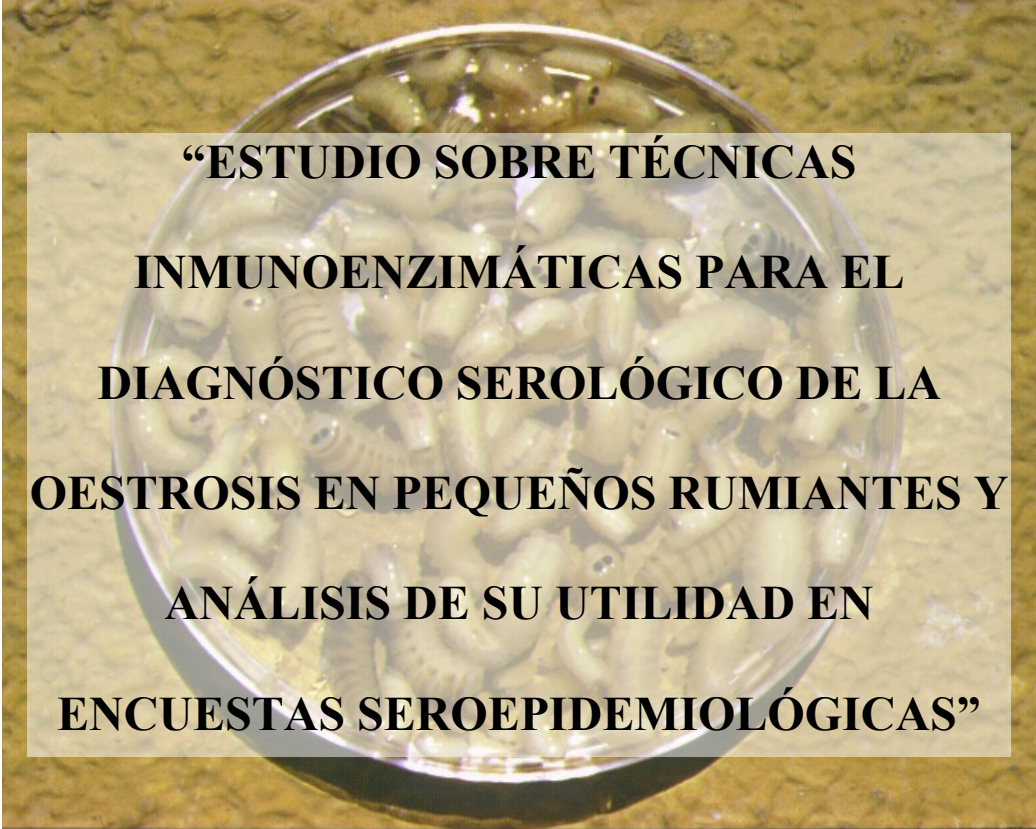


UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTADE DE VETERINARIA DE LUGO



**“ESTUDIO SOBRE TÉCNICAS
INMUNOENZIMÁTICAS PARA EL
DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA
OESTROSIS EN PEQUEÑOS RUMIANTES Y
ANÁLISIS DE SU UTILIDAD EN
ENCUESTAS SEROEPIDEMIOLÓGICAS”**

JOSÉ LUIS ROMERO DELGADO

Lugo, julio 2009



**UNIVERSIDADE DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA**

Departamento de Patoloxía Animal
Facultade de Veterinaria
Campus Universitario, s/n.
27002 LUGO (España)
Tfno. 982 252 231 – 982 223 996
Fax 982 252 195

DÑA. RITA SÁNCHEZ-ANDRADE FERNÁNDEZ,
Profesora Titular del Área de Sanidade Animal de la Facultade de Veterinaria de Lugo,
Universidade de Santiago de Compostela,

DÑA. MARÍA PATROCINIO MORRONDO PELAYO, Catedrática del Área de
Sanidade Animal de la Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de
Compostela,

D. ADOLFO PAZ SILVA, Profesor Titular del Área de Sanidade Animal de la Facultade
de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela,

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“APLICACIÓN DE TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS AL DIAGNÓSTICO DE OESTROSIS OVINA”**, que presenta D. JOSÉ LUIS ROMERO DELGADO para optar al Título de Doctor en Veterinaria, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de los abajo firmantes, y en su opinión, reúne las condiciones legales precisas.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman en Lugo, a 29 de junio de 2009.

Rita Sánchez-Andrade
Fernández

Patrocinio Morrondo
Pelayo

Adolfo Paz Silva

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1.- ETIOLOGÍA DE LA OESTROSIS.....	7
2.2.- CICLO BIOLÓGICO Y CRONOBIOLOGÍA.....	10
2.3.- RELACIÓN PARÁSITO-HOSPEDADOR.....	17
2.3.1.- Respuesta inmunitaria.....	17
a) Respuesta inmunitaria humoral del hospedador.....	21
b) Factores que condicionan la respuesta inmunitaria en ganado ovino.....	25
2.4.- DIAGNÓSTICO DE LA OESTROSIS.....	27
2.4.1.- Signos clínicos.....	27
2.4.2.- Métodos directos.....	30
2.4.3.- Técnicas inmunoenzimáticas.....	31
2.5.- PREVALENCIA DE LA OESTROSIS.....	32
2.5.1.- Por métodos directos.....	32
2.5.2.- Mediante ELISA-indirecto.....	38
2.6.- TRATAMIENTO DE LA OESTROSIS.....	43
2.6.1.- Determinación de la eficacia del tratamiento frente a <i>O. ovis</i>	45
2.6.2.- Efecto del tratamiento frente a <i>O. ovis</i> sobre la salud de las ovejas.....	46
3.- CAPÍTULO I: INMUNODIAGNÓSTICO DE OESTROSIS CON PRUEBAS INMUNOENZIMÁTICAS.....	47
4.- CAPÍTULO II: RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL EN GANADO OVINO CON OESTROSIS.....	63

5.- CAPÍTULO III: SEROPREVALENCIA DE OESTROSIS Y QUIMIOTERAPIA.....	83
6.- CAPÍTULO IV: ALTERACIONES DE LOS PARÁMETROS HEMÁTICOS EN OVEJAS CON OESTROSIS NATURAL.....	103
7.- CONCLUSIONES.....	124
8.- RESUMEN.....	127
9.- BIBLIOGRAFÍA.....	134

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de este trabajo, y de un modo especial:

A mis directores, los Profs. Dres. Sánchez-Andrade Fernández, Morrondo Pelayo y Paz Silva, por proponerme el tema de esta Tesis, introducirme en la Investigación y orientarme en el desarrollo del trabajo sin escatimar su tiempo, haciendo que esta labor fuese especialmente agradable.

Al Catedrático de Patología Animal, D. Pablo Díez Baños, por brindarme la posibilidad de trabajar con el grupo de Parasitología y Enfermedades parasitarias de la Facultad de Veterinaria de Lugo.

Al Dr. José Luis Suárez García de Paredes por su inestimable ayuda en la realización de la parte experimental del estudio.

A todos los integrantes de la Cátedra de Parasitología y Enfermedades, profesores, doctores y doctorandos por su ayuda y colaboración en todo momento.

A mi familia, por la paciencia y comprensión que han mostrado en el transcurso de mi etapa universitaria.

Para la ejecución del trabajo que se recoge en la presente Memoria de Doctorado se ha contado con la financiación proporcionada gracias a la concesión del Proyecto de Investigación “ESTUDIO PROTEÓMICO DE ANTÍGENOS DE PARÁSITOS RESPONSABLES DE ZONOSIS”, por la Consellería de Innovación e Industria, Xunta de Galicia, durante los años 2006-2007.

Una parte de los resultados obtenidos durante la realización de la presente Memoria han sido publicados en los artículos siguientes:

SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; ROMERO, J.A.; SUÁREZ, J.L.; PEDREIRA, J.; DÍAZ, P.; ARIAS, M.; PAZ-SILVA, A.; 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. **Immunological Investigations**, 101: 89-97.

SUÁREZ, J.L.; SCALA, A.; ROMERO, J.L.; PAZ, A.; PEDREIRA, J.; ARIAS, M.S.; DÍAZ, P.; MORRONDO, P.; DÍEZ, P.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R. (2005). Analysis of the humoral immune response to *Oestrus ovis* in ovine. **Veterinary Parasitology**, 134: 153-158.

J.A. ROMERO, M.S. ARIAS, J.L. SUÁREZ, A. PAZ-SILVA, I. FRANCISCO, F. ALONSO, F.J. CORTIÑAS, P. DÍAZ, P. MORRONDO, P. DÍEZ-BAÑOS, A. SCALA, R. SÁNCHEZ-ANDRADE. (2009). Análisis de anticuerpos séricos (IgA, IgM e IgG) para determinar la seroprevalencia de oestrosis ovina y evaluar un tratamiento. **The Veterinary Journal** (aceptado para su publicación)



1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

Entre los objetivos principales de la Política Agraria Común aprobada por la Unión Europea en 1992, destacaban garantizar un nivel de vida equitativo para los ganaderos, promover el incremento de la productividad ganadera y la explotación de algunas especies animales, como la ovina y la caprina. En esta línea, se ha favorecido el desarrollo armónico en áreas donde el producto interior bruto es inferior al 75% de la media comunitaria, siendo Galicia una de las 50 regiones desfavorecidas (regiones FEDER tipo I) de la Unión Europea, que comprende el 22% de la población (Osoro y Martínez-Vasallo, 2000).

Para conseguir estos objetivos se concedieron importantes ayudas económicas al sector, y de este modo aumentó el número de cabezas de ovino y caprino que se explotan en algunas zonas. En la provincia de Lugo, este impulso contribuyó a que el censo de ganado ovino se incrementase en un 37'7% entre los años 1992 y 2000 (Anuario Estadística Agraria, 2000).

En el ganado ovino, la transición del modelo intensivo al extensivo supuso una apreciable mejora de la eficiencia reproductiva de los animales y contribuyó a optimizar el manejo de los pastos, lo que incrementó la rentabilidad de las explotaciones ganaderas. En esta línea se concedieron ayudas para incrementar la producción, desarrollar estructuras útiles para

mejorar las condiciones de higiene de las explotaciones, y en consecuencia, alcanzar el objetivo final de obtener productos de mayor calidad.

No obstante, la explotación en extensivo conlleva dificultades para el control parasitario del ganado, que unido a las características edáficas y climatológicas de Galicia en general, y en especial de la provincia de Lugo, favorecen el desarrollo de los ciclos biológicos de ciertos parásitos. En consecuencia, un elevado porcentaje de ovinos padecen infecciones parasitarias, como se ha comprobado en estudios previos realizados en la Cátedra de Parasitología y Enfermedades parasitarias de esta Facultad de Veterinaria de Lugo (Díez Baños *et al.*, 1989; Sánchez-Andrade *et al.*, 2001; Paz-Silva *et al.*, 2003; Pedreira *et al.*, 2006).

Entre los procesos parasitarios que afectan al ganado ovino, la oestrosis presenta una elevada prevalencia. Se ha comprobado que la infección por *Oestrus ovis* disminuye la rentabilidad de las explotaciones, al reducirse la ingesta de alimentos (Saynar *et al.*, 1986; Kaufman, 1996; Urquhart *et al.*, 2001), ocasionando hasta un 22% de menor ganancia de peso, un 16% de disminución en la producción de lana (Shcherban, 1973) y hasta el 10% de descenso de la producción láctea (Ilchman *et al.*, 1986). Además, aunque las molestias que *O. ovis* provoca en el ganado ovino y caprino, son escasos los estudios desarrollados para conocer las tasas de prevalencia e incidencia en la Península Ibérica. Los datos, además, difieren apreciablemente según la técnica de estudio utilizada, la época de toma de muestras y el área geográfica. En España los estudios de

prevalencia realizados en matadero revelan cifras de infestación del 48 al 91% (Lucientes *et al.*, 1998). En Extremadura, Reina *et al.* (2002) mediante ELISA-indirecto, comprobaron que el 80% de los ovinos estaban parasitados por *O. ovis*.

De estos resultados se deduce la importancia de disponer de un método de diagnóstico específico de la oestrosis ovina, rápido, automatizable, capaz tanto de detectar las infestaciones que cursan sin sintomatología clínica como de evaluar la eficacia antiparasitaria. El conocimiento de que el estrecho contacto de las larvas con la mucosa nasal estimula la respuesta inmunitaria por parte del hospedador ha constituido la base para el diagnóstico de la oestrosis mediante técnicas inmunoenzimáticas (Nguyen *et al.*, 1999; Caracappa *et al.*, 2000; Scala *et al.*, 2002). Sin embargo, relacionar la respuesta inmunitaria con la fase endógena del ciclo de *O. ovis* entraña algunas dificultades.

Al tener en cuenta las consideraciones señaladas en el apartado anterior, planteamos un estudio, que dividimos en varios capítulos, orientado fundamentalmente a la consecución de los siguientes

OBJETIVOS:

- 1.- Estimar la validez de la técnica ELISA utilizando antígenos de excreción/secreción de *Oestrus ovis* para el diagnóstico de la oestrosis ovina.
- 2.- Profundizar en el estudio de la respuesta inmunitaria humoral de las inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA frente a *O. ovis* y su relación con la presencia de los distintos estadios larvarios.
- 3.- Conocer la prevalencia de la oestrosis en ganado ovino de Galicia en distintas épocas del año.
- 4.- Determinar la influencia de la infestación por *O. ovis* sobre las series roja y blanca en ganado ovino.
- 5.- Analizar la posible relación entre la seroprevalencia de *O. ovis* y las variaciones de las células de la sangre.



2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ETIOLOGÍA DE LA OESTROSIS

La oestrosis es una miasis obligatoria y específica de las cavidades nasales y sinusales del ganado ovino y caprino mantenido en pastoreo, producida por las larvas de *Oestrus ovis* (Linneo, 1761). Se trata de una afección de curso



crónico y presentación estacional, caracterizada clínicamente por catarro nasal, acompañado de flujo de consistencia variable, estornudos, lagrimeo, dificultad respiratoria y movimientos anormales de la cabeza (Bunch, 1979; Hall y Wall, 1995). Esta enfermedad es propia de la ganadería extensiva, donde los animales están en contacto con el medio natural, mientras que ocurre de forma excepcional en los animales explotados en régimen intensivo (Pérez *et al.*, 1996).



Como se puede apreciar en la foto, las moscas adultas de *O. ovis* miden 12-14 mm, tiene ojos pequeños y amplia zona frontal, con piezas bucales rudimentarias, y por lo tanto no se alimentan. El tórax es de color amarillo pálido, con 4 bandas oscuras longitudinales, las alas son transparentes, marcadas por tres manchas negras en la base. El abdomen,

gris oscuro, está recubierto por una fina pilosidad grisácea o blanquecina. Las hembras son larvíparas (Puebla Domínguez *et al.*, 2005).



Las larvas 1 (L-1) miden 1 mm de longitud al comienzo de su desarrollo, son translúcidas o blanquecinas, con escaso desarrollo de sus ganchos bucales, poseen tres coronas de finas espinas que circundan sus segmentos corporales, y su extremo caudal es bilobulado y con espinas (Yacob *et al.*, 2004b).

Las L-2 miden 6 mm de longitud, son blanco-amarillentas y la dotación de espinas corporales y ganchos es menor que la de L-1. Tras la segunda muda larvaria se forma la L-3, de unos 2-3 cm de largo y 7-10 mm de ancho, su cuerpo es robusto, con la parte dorsal convexa y con franjas de finas espinas únicamente en la cara ventral, que le sirven para desplazarse; cuando está completamente desarrollada posee en la cara dorsal unas bandas quitinosas transversales características (Lapage, 1975).

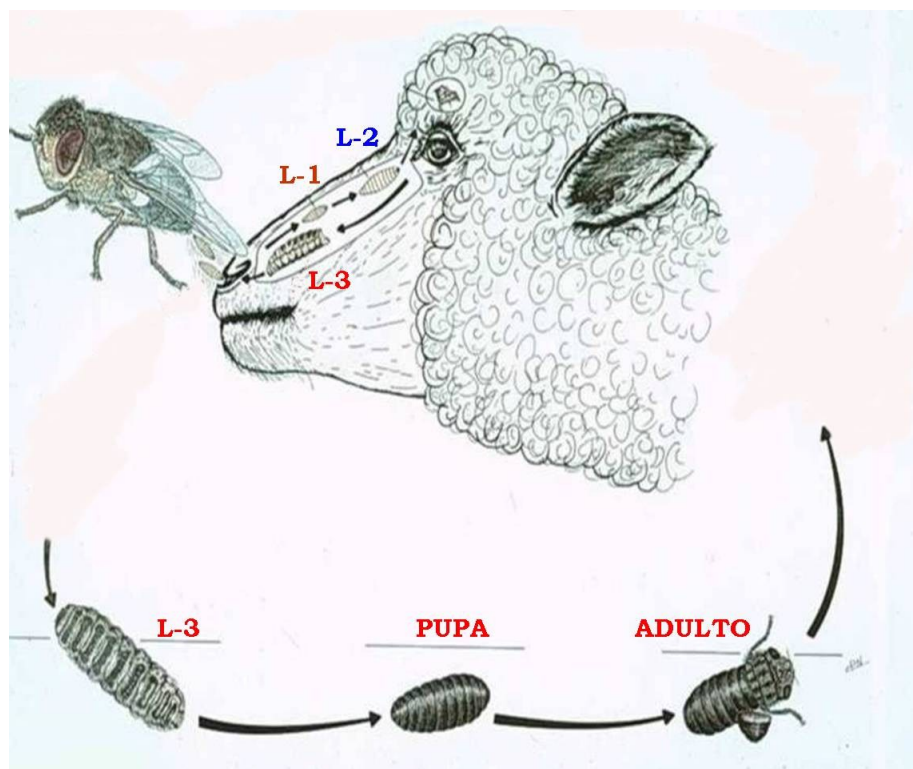


En la foto adjunta, se puede comprobar que en el último segmento de las L-2 y L-3 se distinguen las

placas estigmáticas negruzcas, pentagonales, de ángulos redondeados y perforadas por numerosos poros y el botón central. Los tres estados larvarios tienen respiración aerobia.

2.2. CICLO BIOLÓGICO Y CRONOBIOLOGÍA

El agente etiológico de la oestrosis es un parásito de amplia distribución y su presencia está generalizada en todos los rincones del mundo donde se cría ganado ovino y caprino (Zumpt, 1965). En el cuadro 1 se representa el ciclo biológico de *Oestrus ovis*.



Cuadro 1.- Ciclo biológico de *O. ovis*.

Cuando la temperatura está comprendida entre 20-30°C, las moscas copulan en el suelo y a continuación las hembras comienzan a revolotear alrededor del hospedador, probablemente atraídas por estímulos químicos (productos respiratorios como CO₂ y el propio olor del animal) y depositan entre 30-50 larvas en cada puesta, inmersas en un líquido pegajoso, en zonas cercanas a la boca y a la nariz; iniciándose de este modo la fase interna o endógena del ciclo biológico. Las larvas de primer estadio ascienden hasta las cavidades nasales y sinusales, pese a los esfuerzos del hospedador, a base de estornudos y movimientos bruscos de la cabeza, para desalojarlas (Dorchies, 1997).



El desarrollo de las L-1 depende de la generación a la que pertenezcan, ya que evolucionarán con rapidez, en un par de semanas en el caso de que hayan sido depositadas en mayo-agosto, mientras que las larvas que se depositaron en septiembre-octubre experimentan un estado de quiescencia larvaria (en estadio de L-1) que puede extenderse hasta los 9 meses. La inhibición del desarrollo larvario es el resultado de la conjugación de factores climáticos (frío, reducción del fotoperiodo) y de otros propios del parásito y de naturaleza genética (Dorchies y Alzieu, 1997). Bart y Minar (1992)

comprobaron que la mayor parte de las L-1 mueren durante el periodo de hipobiosis, debido en gran parte a las reacciones del hospedador.

Al cabo de 2 semanas, la L-1 muda a L-2 que migra preferentemente a los cornetes superiores, etmoides y senos frontales. Rogers y Knapp (1973) demostraron que aproximadamente el 92% de las L-1 no llegaban al estadio de L-2.



Después de la segunda muda larvaria se forma la L-3 que se sitúa preferentemente en cornetes y senos frontales y maxilares. Esta larva se alimenta de sangre, mucus y tejidos del hospedador, y una vez que ha terminado su desarrollo realiza el camino inverso, desplazándose hacia los orificios nasales gracias a las espinas de la cara ventral. En esta etapa es ayudada por los estornudos del hospedador y no se alimenta durante todo el trayecto, ya que previamente ha almacenado los materiales necesarios para la pupación y la vida adulta. Cepeda-Palacios *et al.* (1999) comprobaron que el mayor incremento de peso de las larvas tiene lugar después de la segunda muda.

El desarrollo de *O. ovis* de L-1 a L-3, es decir la fase endógena del ciclo, puede durar entre 1 y 11 meses, dependiendo de la época del año en que hayan sido depositadas las L-1 en el hospedador, mientras que la fase

externa se prolongará de 1 a 2 meses, en función de las condiciones climáticas (Ruíz-Martínez *et al.*, 1992; Lucientes *et al.*, 1993).

La fase externa del ciclo de *O. ovis* se inicia cuando la L-3 cae al suelo, y la formación completa del pupario dura entre 3-4 días. La metamorfosis completa que dará lugar a las moscas adultas varía entre 1 y 2 meses, en función de las condiciones climáticas. Las pupas son especialmente sensibles al frío y a la falta de humedad. El fenómeno por el cual se prolonga el tiempo de pupación cuando las



condiciones climáticas son adversas puede considerarse como una *hipobiosis externa* (Biggs *et al.*, 1998) y constituye un mecanismo de supervivencia. Breev *et al.* (1980) comprobaron



que la temperatura mínima para el desarrollo de las moscas dentro del pupario es de 12'1° C para los machos y de 11'5° C para las hembras. Rojas

(2002) señaló que la aparición de nuevas moscas se detiene cuando la temperatura es inferior a 20° C.

Algunos factores extrínsecos como la temperatura y la humedad relativa influyen en el desarrollo del ciclo. En ganado ovino de la isla de Cerdeña (Italia), Scala *et al.* (2002) comprobaron que existía una correlación positiva entre la humedad relativa y el número de L-1, y entre la temperatura media y el de L-2. Por el contrario, estos autores demostraron que el número de L-1 disminuye al aumentar la temperatura,

y que el de L-2 lo hace cuando se incrementa la humedad relativa. Al tener en cuenta que entre octubre y febrero se observaban las condiciones climáticas más desfavorables para el desarrollo del ciclo de *O. ovis* (temperaturas más bajas y precipitaciones máximas), estos autores concluyeron que en Cerdeña la diapausa tiene lugar durante este periodo.

Otro de los factores extrínsecos que influye en el desarrollo del ciclo exógeno de *O. ovis* es la altitud a la que están situados los pastos. Es necesario destacar que la presencia de moscas adultas es poco frecuente en altitudes superiores a 1500 metros (Ruíz-Martínez *et al.*, 1995). En el suroeste de España, Alcaide *et al.* (2005) observaron que las cabras de explotaciones situadas por encima de 650 metros estaban menos parasitadas que las que se encontraban a menor altitud.

El número de generaciones de moscas adultas depende del clima de las distintas áreas: en zonas de clima Atlántico, con temperaturas que oscilan entre 6° y 23° C. Yilma *et al.* (1991) señalan que hay tres generaciones de moscas: en marzo-abril, mayo-junio y en septiembre-octubre. En zonas en las que el clima es continental, con inviernos fríos y largos y veranos cortos, sólo hay una generación de adultos en el período estival, mientras que en zonas de clima mediterráneo, con inviernos suaves y veranos calurosos y no demasiado secos, las moscas pueden estar activas durante todo el año (Puebla Domínguez *et al.*, 2005).

En zonas con clima atlántico, cuando las condiciones climáticas son óptimas y el ciclo en el hospedador está activo (de marzo a septiembre); según Jacquet y Dorchies (2002), los animales están muy parasitados y la evolución de L-1 a L-3 dura 4 semanas, estando la población parasitaria constituida por un 40-70% de L-1, 10-40% de L-2 y 10-30% de L-3.

Como se expuso anteriormente, si las condiciones son desfavorables (temperaturas muy bajas en invierno), en los países con clima atlántico, las L-1 entran en diapausa, su desarrollo se detiene provisionalmente y su porcentaje aumenta hasta el 80-100% de la población parasitaria total (Dorchies y Alzieu, 1997). Asimismo, Tabouret *et al.* (2001b) demostraron que este fenómeno implicaba la reducción marcada de la actividad metabólica y migratoria de estas larvas.

En el sur de Francia el periodo de vuelo de las moscas transcurre de junio a septiembre, y durante estos meses el desarrollo de L-1 a L-3 es de aproximadamente 20 días. Al estudiar las poblaciones de larvas en ovejas sacrificadas, Tabouret *et al.* (2001c) encontraron porcentajes similares de L-1 y L-3 (25%-35%), lo que parece indicar que existe un rápido desarrollo de las L-1 y que además hay muchos adultos emergiendo de los puparios en esta época. Al principio del otoño comienza la hipobiosis, y se acumulan las L-1 en los senos, de modo que ya no se observan moscas adultas hasta finales de la primavera siguiente.

En Cerdeña (Italia) Scala *et al.* (2002) observaron que el porcentaje de L-1 oscilaba entre 2'4% (mayo) y 90'4% (noviembre); el de L-2 entre 3'4% (diciembre) y 71'4% (mayo), y el de L-3 entre 0 % (invierno) y 26'2% (mayo). Estos autores definieron 3 fases en el ciclo de *O. ovis* en Cerdeña: diapausa de octubre a febrero, fase activa del ciclo endógeno de marzo a septiembre, y salida de las moscas de los puparios de mayo a septiembre.

En algunas regiones de clima mediterráneo suave, como Marruecos o Sicilia, las moscas pueden estar activas durante todo el año y el porcentaje de L-1 es del 35 al 65%, lo que quiere decir que no hay hipobiosis (Pandey y Ouhelli, 1984; Di Marco *et al.*, 2000; Caracappa *et al.*, 2000). De igual modo, en zonas en las que hay estaciones muy secas y calurosas, Panguì *et al.* (1988) y Tibayrenc *et al.* (1999) comprobaron que no hay un verdadero periodo de hipobiosis, aunque el ciclo se desarrolla con más rapidez en los meses en los que la sequedad no es extrema. Tabouret *et al.* (2001b) observaron que cuando se encuentran porcentajes similares de los tres estadios larvarios en las cavidades nasales de los hospedadores, el desarrollo de *Oestrus* no se interrumpe, y que existen varias generaciones conviviendo al mismo tiempo.

2.3. RELACIÓN PARÁSITO-HOSPEDADOR

2.3.1. Respuesta inmunitaria

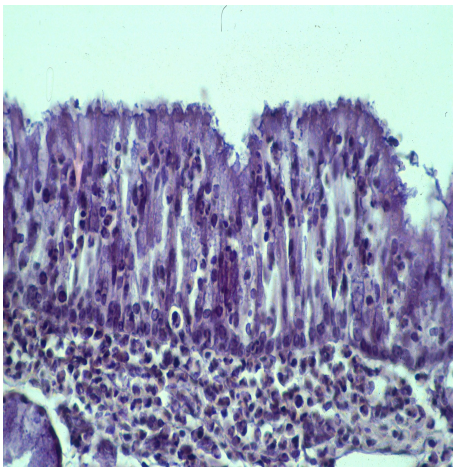
Los mecanismos de defensa frente a la infección parasitaria resultan de la acción conjunta de las barreras anatómicas (piel y mucosas), fisiológicas (pH estomacal), y de la respuesta inmunitaria inespecífica, natural o innata (Peña, 1999). Sin embargo, en ocasiones esta respuesta es insuficiente para defender al hospedador, y entonces se desarrolla una **respuesta inmunitaria específica**, que sólo se produce ante estímulos antigénicos con los que el organismo ha tenido contacto previo, participando linfocitos T, linfocitos B, linfocinas y anticuerpos.

Marchenko y Marchenko (1989), en un rebaño de ovejas al que se había administrado un tratamiento inmunosupresor, observaron que el 60% estaban parasitadas por L-1 de *O. ovis*, frente al 36% de los animales pertenecientes a otro rebaño que no habían recibido el tratamiento citado.

Duranton *et al.* (1997) comprobaron, en estudios realizados *in vitro*, que la degranulación de los eosinófilos provocaba la rápida mortalidad de las larvas de primer estadio de *O. ovis*. Aunque no se conoce bien el mecanismo de acción en las miasis, en otras parasitosis como la provocada por *Schistosoma mansoni* está asociado a mecanismos de citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente (Butterworth *et al.*, 1975).

En condiciones óptimas, en la mucosa de las vías respiratorias superiores se desencadena una rápida respuesta inflamatoria local frente a la agresión parasitaria provocada por larvas de *O. ovis* (Dorchies, 1997). Esta respuesta juega un importante papel en la interacción parásito-hospedador, ya que disminuye la velocidad de desarrollo de las larvas y provoca el aumento de su mortalidad, lo que se traduce en la disminución de la carga parasitaria (Nguyen *et al.*, 1999a; Cepeda-Palacios *et al.*, 2000).

Frugère *et al.* (2000) inmunizaron animales con productos de excreción/secreción de L-3 y concluyeron que estos productos no protegen a los hospedadores de reinfestaciones, pero producen un efecto inhibitor sobre el crecimiento larvario.



La presencia de larvas en la mucosa de las vías respiratorias provoca un aumento (local) de la cantidad de linfocitos T y B, macrófagos (imagen adjunta), eosinófilos y mastocitos (Tabouret *et al.*, 2003a). Esta respuesta es más intensa en el etmoides y los senos (lugares de desarrollo de L-2 y L-3), que en el septo nasal y los turbinales donde migran las L-1.

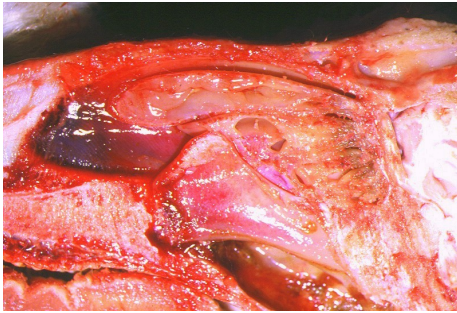
Como se aprecia en la imagen, las reacciones inflamatorias locales provocan además un aumento de la permeabilidad de la mucosa, lo que favorece el paso a la zona de proteínas plasmáticas, que juegan un papel central en el desarrollo de la



inmunidad específica, porque reconocen los antígenos y a continuación segregan una serie de citoquinas que provocan la liberación de mediadores de la inflamación; como consecuencia la mucosa se transforma en un ambiente hostil para las larvas, que tienden a alejarse del lugar en el que se habían fijado, aumentando así las posibilidades de su expulsión (Dorchies, 1997; Tabouret *et al.*, 2003a). La estimulación de la producción de IgG e IgA específicas frente al parásito, está provocada por antígenos de las glándulas salivares de las larvas y en menor medida por productos antigénicos procedentes del tracto digestivo de las mismas.

Se ha comprobado que en respuesta a la presencia de larvas de *Oestrus*, en la mucosa del tracto respiratorio anterior de las ovejas se produce un aumento significativo de las poblaciones de mastocitos, linfocitos y eosinófilos, reduciéndose sus valores en la circulación general (Nguyen *et al.*, 1996; Jacquiet *et al.*, 2005). Aunque no se ha demostrado en la oestrosis, algunas investigaciones señalaron la participación de eosinófilos y mastocitos en los mecanismos de defensa frente a infecciones por nematodos gastro-intestinales, a través de reacciones de citotoxicidad

celular anticuerpo-dependiente (ADCC) (Sinski *et al.*, 1995; Rainbird *et al.*, 1998; Stear *et al.*, 1983).



Yacob *et al.* (2004b) comprobaron que en ovejas con infección experimental por *O. ovis*, se desarrollaba una respuesta inmunitaria celular caracterizada fundamentalmente por el aumento de eosinófilos, mastocitos y linfocitos, observándose inflamación de las mucosas (como se puede apreciar en la imagen adyacente), no sólo de la mucosa nasal sino de otras anatómicamente distantes. Esta reacción inflamatoria “a distancia” influye en el desarrollo de posteriores infecciones por *Trichostrongylus colubriformis* en la mucosa intestinal (Yacob *et al.*, 2002; 2004a).

Existen muy pocos estudios en los que se hayan valorado los parámetros hemáticos de ovejas con oestrosis. Terefe *et al.* (2005) después de infectar experimentalmente ovejas con *O. ovis*, comprobaron que el número de eosinófilos alcanzaba a la 3^a semana p.i. valores de 450.000 ml⁻¹ de sangre; estos autores no detectaron anemia en las ovejas infectadas.

a) Respuesta inmunitaria humoral del hospedador

Las inmunoglobulinas o anticuerpos son el elemento efector final de la respuesta inmunitaria humoral. Este término fue propuesto para designar todas las sustancias con capacidad anticuerpo que reaccionan con el antígeno. Las inmunoglobulinas pueden ser IgM, IgA, IgG, IgD, IgE. La unión al antígeno es específica, no covalente, débil y reversible estableciéndose un equilibrio dinámico entre antígenos y anticuerpos (Peña, 1999).

Las **IgG** representan el 70-75% del total de inmunoglobulinas, se distribuyen ampliamente y de manera uniforme entre los espacios intravascular y extravascular y son los principales anticuerpos implicados en la respuesta inmunitaria secundaria. La **IgM** constituye aproximadamente el 10% del total de las inmunoglobulinas, está confinada prácticamente al espacio intravascular y es el anticuerpo predominante en la respuesta primaria contra los microorganismos infecciosos antigénicamente complejos (Abbas *et al.*, 1999).

La **IgA** representa el 15-20% del total de inmunoglobulinas séricas, predomina en las secreciones sero-mucosas, como saliva, secreción traqueobronquial, calostro, leche y secreciones genitourinarias.

Las **IgD** e **IgE** séricas alcanzan sólo una concentración ínfima, representan menos del 1% de las inmunoglobulinas plasmáticas totales.

No se conoce con exactitud cual es la función biológica de la IgD, pero se sabe que existe en la membrana de muchos linfocitos B circulantes y que puede intervenir en la diferenciación linfocitaria desencadenada por los antígenos. La IgE se halla en la membrana de los basófilos y mastocitos de todos los individuos y se asocia con fenómenos de hipersensibilidad inmediata como los provocados por muchos parásitos.

Marchenko y Marchenko (1989) infestaron corderos con 1000 L-1 de *O. ovis*, y comprobaron mediante ELISA-indirecto que se producía un incremento significativo en los valores de las IgG a partir de los 14 días p.i.; sin embargo, al realizar la infestación con 80-160 L-1 de *Oestrus* se necesitaron 21 días p.i. para que se hiciese evidente la seroconversión. Estos autores concluyeron que el ELISA es un buen test de confirmación *in vivo* de esta parasitosis, y útil en el diagnóstico diferencial con otras enfermedades como cenurosis, scrapie o listeriosis.

En estudios posteriores, Marchenko *et al.* (1991) observaron que la respuesta inmunitaria humoral frente a *O. ovis* está relacionada con la biomasa y la ontogénesis del parásito, pero no con el número de larvas que soporta el hospedador; asimismo, comprobaron que la respuesta IgG era más intensa en los animales primoinfestados que en los reinfestados.

Dorchies *et al.* (1998) apreciaron que los valores de IgG frente a antígeno de *O. ovis* se incrementaban en los meses anteriores al periodo de vuelo de las moscas, cuando las L-2 y L-3 están activas.

Innocenti *et al.* (1995) demostraron que la saliva de las larvas de *Oestrus* contiene proteínas con gran capacidad inmunógena. Tabouret *et al.* (2001a) comprobaron la existencia de un complejo proteínico de 28 kDa, capaz de estimular la respuesta humoral en las ovejas infestadas; no obstante, tras realizar la necropsia no encontraron correlación entre los niveles de anticuerpos y el número de larvas recuperadas. Por el contrario, Jacquiet *et al.* (2005), en infecciones experimentales, detectaron los valores más elevados de IgG en los animales que tenían mayor número de larvas.

Nguyen *et al.* (1999b) y Tabouret *et al.* (2003b) demostraron que la presencia de L-1 y su migración por la mucosa inducía una respuesta humoral local (IgG e IgA) y sistémica (IgG); además, comprobaron que en la mucosa del tracto respiratorio superior aumentaba la presencia de eosinófilos y mastocitos.

Scala *et al.* (2002) en ovejas de Sassari (Cerdeña), demostraron que la respuesta IgG se incrementaba a partir de abril y alcanzaba los valores máximos en junio y septiembre. Además, encontraron una correlación positiva entre los valores de IgG y la temperatura media mensual; por el contrario, obtuvieron una correlación negativa entre la respuesta IgG y la precipitación.

En ganado ovino de Grecia, Papadopoulos *et al.* (2001) comprobaron que los valores de anticuerpos eran más altos entre los meses de marzo y julio que en el invierno.

Suárez *et al.* (2005) demostraron que, en corderos con primoinfestación por *O. ovis*, las IgG aumentaban en junio y alcanzaban los valores máximos en septiembre.

En estudios recientes se ha observado correlación entre los diferentes estadios larvarios y la respuesta inmunitaria humoral. Tabouret *et al.* (2001b), en ovejas con infestación experimental, comprobaron que los valores de IgG eran superiores en verano que en invierno, concluyendo que la respuesta humoral estaba asociada a la presencia de L-2 y L-3.

Utilizando sueros de corderos de Sassari (Cerdeña, Italia), Suárez *et al.* (2005) compararon la cronobiología de *O. ovis* con las respuestas IgG, IgA e IgM, y demostraron que la presencia de L-1 estimulaba la respuesta IgM, mientras que cuando estaba activa la fase endógena del ciclo la respuesta predominante era la IgG; estos resultados coinciden con los de Jacquiet *et al.* (2005), quienes comprobaron que la respuesta IgG estaba relacionada con la presencia de L-2.

b) Factores que condicionan la respuesta inmunitaria en ganado ovino

La resistencia a las infecciones parasitarias es muy variable debido a los múltiples factores que la condicionan, entre los que destacan:

- ♣ **El agente etiológico:** las larvas en estado de hipobiosis durante largos períodos de tiempo pueden sufrir cambios en su estructura proteica desencadenando una respuesta menos intensa (Windon, 1990). Abo-Shehada *et al.* (2000) comprobaron que el número de larvas por animal era mayor en las ovejas de más edad.

- ♣ **El estado fisiológico del hospedador, la edad, los niveles de ciertas hormonas, el estado de nutrición, etc.** Los animales jóvenes menores de seis meses no poseen capacidad de respuesta inmunitaria (Miller, 1996), lo que se manifiesta en niveles inferiores de anticuerpos (Watson y Gill, 1991; Cuquerella *et al.*, 1991).

- ♣ **La presencia de otras infecciones parasitarias concurrentes.** Yacob *et al.* (2002), después de infestar experimentalmente ovejas con *O. ovis* y

Trichostrongylus colubriformis, comprobaron que la infección por estos nematodos gastro-intestinales no modificaba la biología de las larvas de *O. ovis*. Sin embargo, la presencia de larvas de *O. ovis* indujo una menor eliminación de huevos del nematodo. Además, estos autores denunciaron que existía una correlación negativa entre la parasitación por nematodos gastro-intestinales y *O. ovis*.

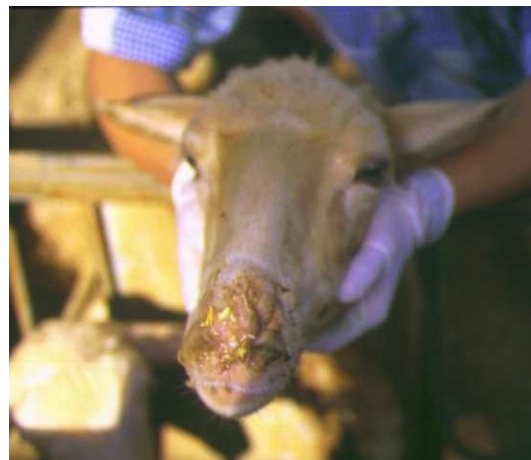
2.4. DIAGNÓSTICO DE LA OESTROSIS

2.4.1. Signos clínicos.

Las moscas adultas producen desasosiego, y estados de estrés en el ganado, debido a su revoloteo, así como a la insistencia de aproximarse a las fosas nasales, lo que impide a los animales mantener la tranquilidad, comer con normalidad, etc., provocando carreras aisladas, incluso estampidas, capaces de provocar traumatismos (Lancaster y Meisch, 1986).

La presencia de L-1 provoca en los ovinos encorvamiento, debido al deseo de frotarse el hocico contra el suelo, introduciéndolo prácticamente en la tierra. Igualmente, por la irritación del epitelio nasal, ocasionan estornudos de forma reiterada.

Las migraciones y el crecimiento larvario, son responsables de una acción mecánica de naturaleza irritante, debido a la acción de los ganchos bucales y de las espinas sobre las mucosas afectadas (Dorchies, 1997; Yacob *et al.*, 2004b). Por este motivo se origina



irritación e hinchazón de las mucosas con abundante secreción nasal de la que se alimentan las larvas, pero que puede ser tan abundante como para

salir por las fosas nasales. Se produce así rinitis, sobre todo en épocas estivales, que puede ser serosa, mucosa o mucopurulenta.

Posteriormente, cuando las larvas adquieren mayor tamaño pueden ejercer una acción obstructiva de los orificios sinusales, impidiendo el drenaje de dichos senos y apareciendo procesos sinusíticos, sobre todo en épocas otoñales e invernales (Tabouret *et al.*, 2001c). Igualmente se pueden producir obstrucciones de la cavidad esofágico-traqueal, que dan lugar a trastornos respiratorios como disnea, taquipnea, ronquidos, estertores, lagrimeo, rinorrea, etc.

En general los signos clínicos y las lesiones están en concordancia con el ciclo evolutivo del parásito y difieren según la estación. Se ha demostrado la relación entre los fenómenos de hipersensibilidad generados por el desarrollo de las larvas, fundamentalmente debidos a sustancias polipeptídicas eliminadas por sus glándulas salivares, y la aparición de los signos clínicos. En opinión de diferentes autores (Cepeda-Palacios *et al.*, 1999; Frugère *et al.*, 2000; Tabouret *et al.*, 2003a), estos fenómenos tienen más importancia en la patogenia del proceso que el tamaño de las larvas, o la acción traumática generada por los ganchos del cefalo esqueleto.

Durante el desarrollo de las larvas tiene lugar la liberación de productos de actividad inmunosupresora, que junto a la acción vehiculadora de micrororganismos como *Pasteurella* o *Clostridium*, pueden

inducir la aparición de infecciones secundarias. Las muertes son excepcionales, pero en ocasiones se producen debido a infecciones oportunistas, especialmente ocasionadas por gérmenes piógenos, que reblandecen los tejidos adyacentes, lo que favorece la colonización del SNC (Lancaster y Meisch, 1986). En casos de infecciones masivas, puede originarse un proceso encefalítico purulento, con síntomas como vértigo, hiperexcitación con fases depresivas de inmovilidad, posturas anómalas, giros de cabeza y cuello, incoordinación, y en general síntomas semejantes a la cenurosis, por lo que esta enfermedad se conoce como “falsa modorra o torneo” (Innocenti *et al.*, 1997). Tras la eliminación de las L-3, es habitual que los signos clínicos remitan paulatinamente.

En un estudio realizado en Évora (Portugal), Ruíz-Martínez *et al.* (1994) observaron que la oestrosis ovina cursaba con síntomas como leve inflamación nasal y pelo de la cara hirsuto e inflamación supraciliar y maxilar en animales con elevada carga parasitaria. Sin embargo, los signos clínicos más frecuentes fueron de tipo respiratorio como rinorrea (unilateral o bilateral), con secreción de consistencia variable de serosa a purulenta. La respiración se volvió entrecortada con accesos de taquipnea, acompañada de ronquidos, estertores y lagrimeo. Asimismo, el comportamiento de los animales también resultó afectado, con violentas sacudidas de la cabeza, pateos del suelo con las extremidades anteriores, carreras continuadas, la cabeza contra otros congéneres para protegerse frente al ataque de las moscas adultas, edemas periorbitales, incoordinación o torneo.

2.4.2. Métodos directos.

Las larvas de *Oestrus* no producen elementos de diseminación, y por tanto resulta difícil realizar un análisis parasitológico directo en el animal vivo; sólo el azar lo haría posible y siempre estaría vinculado a la eliminación de L-3 maduras, por lo que los signos clínicos más característicos de la enfermedad, descritos anteriormente, deben de analizarse teniendo en cuenta el conocimiento de la zona y su relación con la biología del parásito (época de vuelo, número de generaciones, momento del contagio).

Aunque la obtención de las larvas de forma directa puede intentarse en el animal vivo mediante rinoscopia tradicional o mediante fibra óptica, el diagnóstico directo se realiza habitualmente sobre el cadáver (Yilma y Dorchies, 1991). Una vez abierta la cabeza longitudinalmente, las larvas se observan alojadas en las distintas cavidades nasales y sinusales, y también pueden encontrarse en faringe, esófago y tráquea. Por lo general, las larvas de *O. ovis* suelen constituir un hallazgo de matadero.

2.4.3. Técnicas inmunoenzimáticas.

El objetivo principal de una técnica eficaz de diagnóstico consiste en detectar animales parasitados precozmente, que permitió actuar antes de que el parásito produzca las correspondientes lesiones. Entre estas técnicas destacan el test de intradermo-reacción (Ilchmann y Hiepe, 1985), la hemaglutinación indirecta con antígeno de L-2 de *O. ovis* (Bautista *et al.*, 1988), y la técnica de inmunoensayo en capa delgada (Murguía-Olmedo *et al.*, 1988). Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron del todo satisfactorios, y en la actualidad el enzimoimmunoensayo indirecto o ELISA-indirecto, desarrollado por Yilma y Dorchies (1993), es la técnica más utilizada para la realización de encuestas seroepidemiológicas.

En el diagnóstico de oestrosis por ELISA-indirecto se han utilizado diferentes antígenos: somáticos o de excreción/secreción (Goddard *et al.*, 1999); de L-1, L-2 ó L-3 (Scala *et al.*, 2001). Posteriormente, Sánchez-Andrade *et al.* (2005) demostraron que los mejores resultados se obtenían con antígeno de excreción/secreción de L-2.

2.5. PREVALENCIA DE LA OESTROSIS

2.5.1. Por métodos directos.

En España los trabajos destinados a conocer la importancia de la oestrosis se refieren al centro y sur peninsular, y no se tienen datos suficientes acerca de la presencia de esta parasitosis en el norte del país.

En un matadero del sur de España, Ruíz-Martínez *et al.* (1992) recogieron larvas de *O. ovis* en el 56% de los ovinos sacrificados.

En estudios realizados en ungulados silvestres, Moreno *et al.* (1999) estimaron que el 46% de los muflones del sur de España estaban parasitados por larvas de *O. ovis* con una intensidad media de 9´6 larvas por animal.

En el suroeste de España, Reina *et al.* (2000) detectaron que el 80´6% de los ovinos sacrificados en un matadero de Coria tenían larvas de *O. ovis*. Esta prevalencia es muy superior a la denunciada por García-Cuadrado *et al.* (1995) en un estudio realizado en 91 corderos sacrificados en Extremadura, en el que constataron una prevalencia media anual de 31´87%.

Pérez *et al.* (1996) realizaron un estudio sobre la prevalencia de la oestrosis en cabras pirenaicas (*Capra pyrenaica*) en el Parque Natural de

Sierra Nevada, y comprobaron que el 74% estaban parasitadas, porcentaje superior al 39´4% que señalaron Alcaide *et al.* (2005) en cabras del centro de España.

Lucientes (2000) denunció que el 71´18% de los ovinos examinados en mataderos del Valle medio del Ebro estaban parasitados.

En el sur de Portugal, Ruíz-Martínez (1997), señaló que el 91% del ganado ovino sacrificado estaba parasitado por larvas de *Oestrus*.

En Marruecos, Pandey y Ouhelli (1984) observaron que la prevalencia de la infección por *Oestrus* variaba desde el 10% en el mes de junio al 100% en septiembre, y el mayor número de larvas recogidas en un animal fue 35 en el mes de septiembre.

Dorchies *et al.* (2000) en un estudio realizado durante un año en el sur de Francia, obtuvieron una prevalencia media del 43´4%; los valores más bajos se detectaron en el mes de febrero (14´3%) y los más elevados en octubre (65%) que es cuando comienza la hipobiosis larvaria. Estos resultados son similares a los observados por Alziev *et al.* (1994) en la región de Limousin y a los de Bergeud *et al.* (1994) en la de Aveyron. Asimismo, en la región de Pamiros situada en el suroeste francés, Yilma y Dorchies (1991), realizaron un estudio sobre ovinos adultos, obteniendo una prevalencia media anual del 55%.

En Sicilia (Italia) con un clima igualmente mediterráneo, pero con estaciones menos marcadas, Di Marco *et al.* (2000) observaron que el 55'7% de las ovejas adultas sacrificadas en un matadero local de Messine estaban infestadas por larvas de *Oestrus*. Estos autores afirmaron que en Sicilia no se puede identificar el periodo de diapausa ya que la distribución de los distintos estadios larvarios es similar durante todo el año; asimismo, constataron la presencia de dos a tres generaciones de adultos de *O. ovis* al año, la primera en abril, la segunda de junio a julio y la tercera de agosto a septiembre.

Los datos anteriores coinciden con los aportados por Caracappa *et al.* (2000) también en Sicilia, quienes citaron una prevalencia media anual del 55'8%, con una tasa de infestación media de 9'4 larvas por animal. El porcentaje de los distintos estados larvarios fue similar durante todo el año, por lo que concluyeron que en las condiciones climáticas de Sicilia no se producía el fenómeno de hipobiosis.

Scala *et al.* (2001) comprobaron que en Cerdeña (Italia), el 73'8% del ganado ovino sacrificado tenía larvas de *O. ovis*, y definieron además tres periodos claros del ciclo del parásito, diapausa de octubre a febrero, fase endógena activa del ciclo de marzo a septiembre, y fase externa de mayo a septiembre.

En Jordania, Abo-Shehada *et al.* (2000) observaron que entre marzo de 1996 y julio de 1997 la prevalencia media anual de *O. ovis* era del 58%.

El mayor número de L-1 se obtuvo entre los meses de julio a octubre, siendo el porcentaje de L-1 del 75-78% sobre el total de larvas.

En la India, Chapra y Ruprah (1976) comprobaron que el 80'9% de los animales examinados en un matadero de Izar se hallaban parasitados, y D'Souza *et al.* (1992) constataron que el 90% de los ovinos procedentes de Hebbal tenían larvas de *O. ovis*.

Los estudios sobre la prevalencia de la oestrosis en países semiáridos de África son muy numerosos. En Nigeria, Bin y Nwosu (1999) obtuvieron una prevalencia del 53'8% en cabras de raza *Borno-white Sahel*; el mayor porcentaje de L-3 lo detectaron entre los meses de mayo y septiembre, mientras que las L-1 fueron las más numerosas entre junio y octubre. En Libia, Gabaj *et al.* (1993) observaron una prevalencia del 18'4% en ovejas y cabras.

En Zimbabwe, Pandey (1989) observó que la prevalencia variaba del 6% en el mes de abril al 52% detectado en noviembre, siendo en este mes cuando encontraron también el mayor número de larvas por cabeza (57). Además afirmaron que en Zimbabwe existen al menos tres generaciones de moscas al año.

Vassiliades (1987) en un estudio realizado en Dakar (Senegal), entre marzo y diciembre, comprobó que la prevalencia de oestrosis en ovejas y cabras de dicha región era del 46'39% y 57'89%, respectivamente.

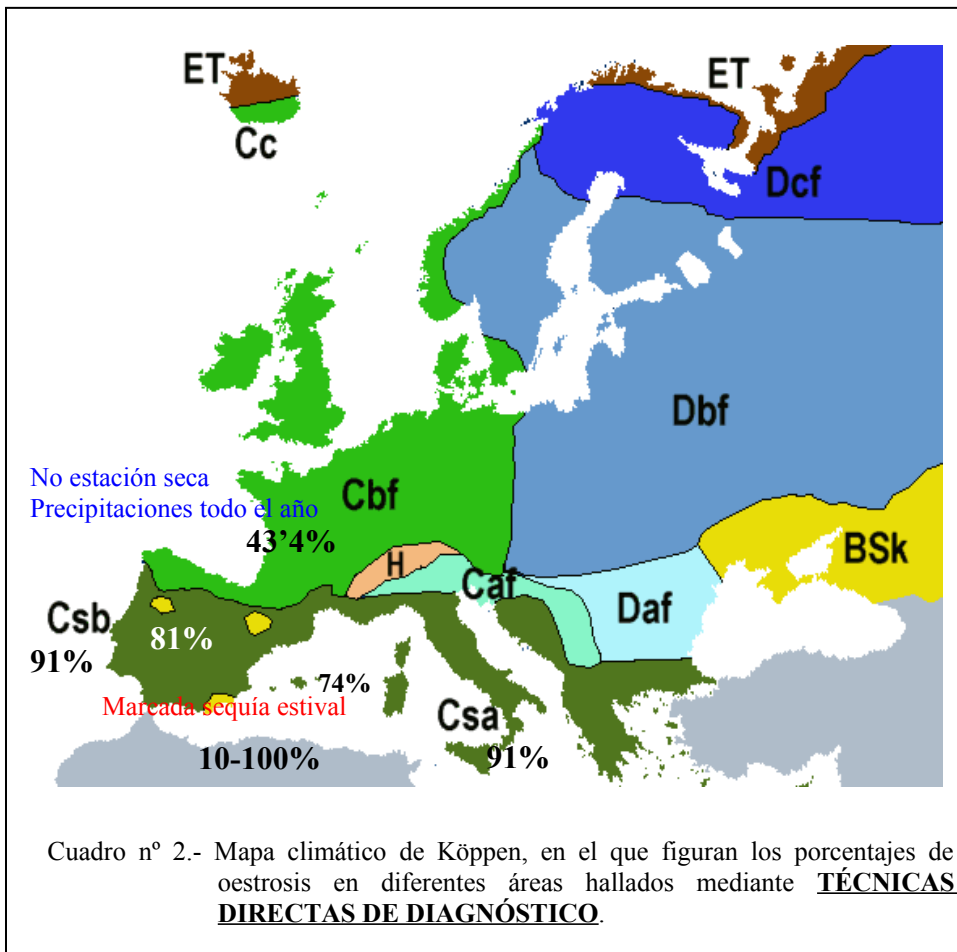
En Suráfrica, Horak (1977) apreció que entre la primavera y el final del verano los corderos de 1 mes de edad ya estaban parasitados por larvas de *O. ovis*. Horak y Butt (1977) realizaron un estudio durante 13 meses con cabras sacrificadas en un matadero de Johannesburgo, y comprobaron que la prevalencia media era del 73´8% y la media de larvas por cabeza de 4´4.

En Cuba, Puebla Domínguez *et al.* (2005) indicaron que la oestrosis constituye un problema en la provincia de Guantánamo por su elevada incidencia.

En ganado caprino de Perú, Rojas (2000) comprobó que la incidencia de oestrosis oscilaba entre el 50 y el 60%.

Incluso en regiones con inviernos muy fríos como Siberia, Migunov y Timofeev (1991) señalaron que la prevalencia media anual se situaba en el 48´76%, con una intensidad de infestación que oscilaba entre 13 y 18 larvas por animal.

En el cuadro 2 se representa el mapa climático de Köppen, dividido en diferentes zonas en función de algunos parámetros como temperaturas máximas y mínimas, humedad relativa, etc. Asimismo, se recogen los porcentajes de prevalencia de oestrosis de algunos países de Europa y África obtenidos mediante diagnóstico directo.



BSk: estepa cálida y fría.

Caf: templado mediterráneo.

Cbf: templado oceánico.

Cc: oceánico.

Csa: templado mediterráneo.

Csb: templado mediterráneo.

Daf: continental suave.

Dbf: continental fresco.

Dcf: continental subártico.

H: tundra.

2.5.2. Mediante ELISA-indirecto.

La respuesta inmunitaria de los ovinos frente a *O. ovis* ha sido estudiada mediante distintas técnicas y usando extractos de los distintos estadios larvarios como antígeno: intradermo reacción (Ichmann y Hiepe, 1985), hemoaglutinación indirecta (Bautista *et al.*, 1988) y sobre todo mediante ELISA (Marchenko y Marchenko, 1991; Yilma, 1992; Scala *et al.*, 2002; Sánchez-Andrade *et al.*, 2005; Alcaide *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2005).

El primer test ELISA en el que se tuvieron en cuenta las condiciones climáticas y como consecuencia la fase del ciclo para valorar los resultados, fue descrito por Goddard *et al.* (1999) en Inglaterra. Estos autores utilizaron como antígeno extracto crudo de larvas de primer estadio, y destacan que las posibles diferencias en las poblaciones de los hospedadores y las variaciones estacionales y regionales del parásito hay que considerarlas a la hora de valorar los resultados de los estudios epidemiológicos sobre oestrosis cuando se utiliza la técnica ELISA.

Sánchez-Andrade *et al.* (2005) demostraron que con el antígeno metabólico de L-2 se obtenían los mejores resultados para el diagnóstico, mediante ELISA, de las infecciones por *O. ovis*.

La mayor parte de los estudios publicados en los que se valora la respuesta inmunitaria humoral frente a *O. ovis*, utilizan ELISA-indirecto y productos metabólicos de L-2, aunque otros autores como Alcaide *et al.*

(2005) demostraron que la especificidad de esta técnica mejora cuando se utiliza como antígeno productos metabólicos de L-1 en invierno y de L-2 en el verano.

En España, los primeros estudios seroepidemiológicos demostraron que el 56'5% de las ovejas del sur de España y Norte de Marruecos eran positivas a *O. ovis* (Ruíz-Martínez *et al.*, 1992). En Extremadura, Reina *et al.* (2002) comprobaron que el 80'43% de los rebaños ovinos eran seropositivos.

Asimismo, en Extremadura, en un estudio posterior, Alcaide *et al.* (2002) analizaron 2000 sueros procedentes de todas las comarcas cacereñas, resultando que la seroprevalencia era del 74%. Estos mismos autores, en un estudio más amplio que incluyó explotaciones ovinas del suroeste español, localizadas en Badajoz, Cáceres y Córdoba, detectaron una seroprevalencia similar (74'4%). Al realizar un estudio similar en cabras, Alcaide *et al.* (2005) encontraron que el 91% tenían valores de IgG considerados positivos.

En Europa, la situación varía en función del clima de los distintos países. Distintos autores han realizado trabajos encaminados a conocer la seroprevalencia de la oestrosis, todos ellos denuncian valores muy elevados, aunque el mayor porcentaje de animales infestados se describe en el área mediterránea.

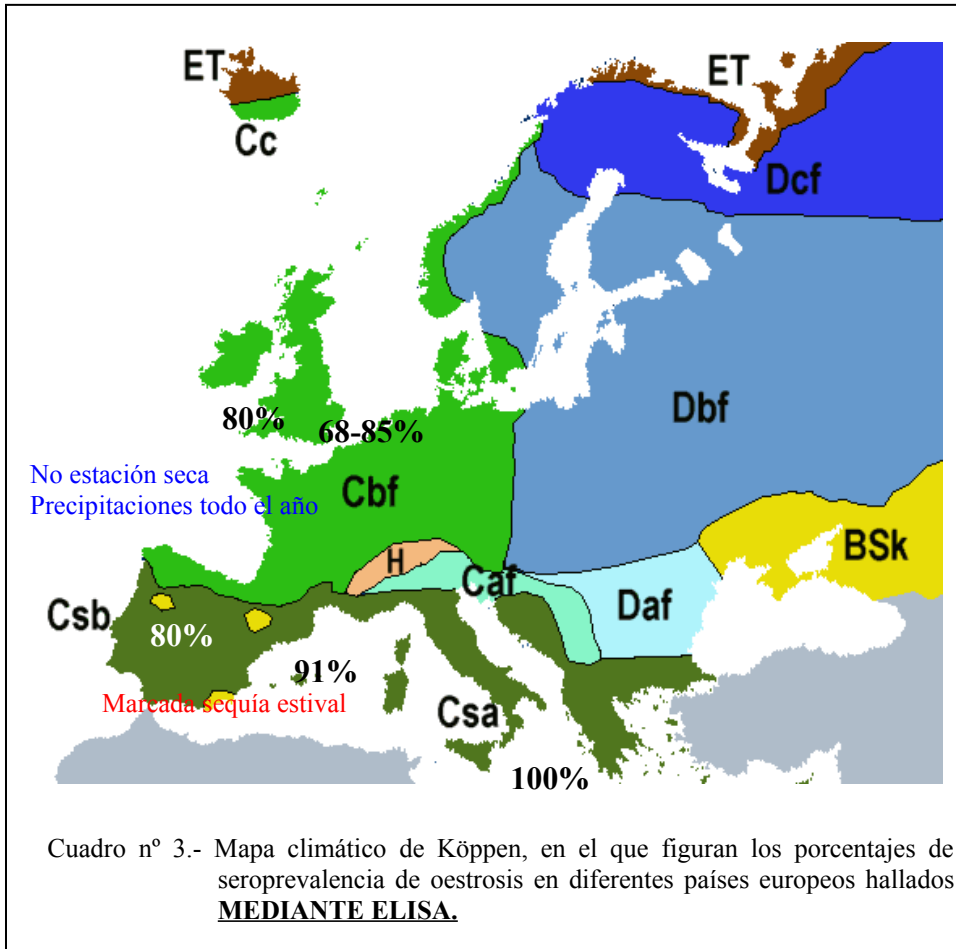
En Cerdeña (Italia), Scala *et al.* (2002) detectaron que el 91% del ganado ovino adulto tenía niveles de anticuerpos séricos considerados positivos. Al analizar los resultados obtenidos por explotación, estos autores denuncian que en el 100% de los rebaños ovinos de la zona había hay algún animal seropositivo.

En Grecia, Papadopulos *et al.* (2001) realizaron un estudio para establecer la seroprevalencia de ovejas y comprobaron que el 100% de las ovejas tenían valores de IgG considerados positivos frente a *O. ovis* durante todo el año; los títulos más elevados de anticuerpos se detectaron entre marzo y julio y los más bajos en invierno.

En países en los que el clima varía mucho con las estaciones, Bauer *et al.* (2002) en una encuesta seroepidemiológica sobre 110 rebaños del suroeste de Alemania, observaron que entre el 68 y el 85% de las explotaciones eran positivas y que la seroprevalencia individual se situaba era del 50%.

En Inglaterra, Goddard *et al.* (1999) señalaron que la prevalencia de oestrosis en explotaciones ubicadas en distintas regiones alcanzaba el 80%, declarando endémica la región sur del país.

En el cuadro nº 3 se resumen los porcentajes de seroprevalencia de oestrosis en diferentes países europeos.



BSk: estepa cálida y fría.

Caf: templado mediterráneo.

Cbf: templado oceánico.

Cc: oceánico.

Csa: templado mediterráneo.

Csb: templado mediterráneo.

Daf: continental suave.

Dbf: continental fresco.

Dcf: continental subártico.

H: tundra.

Los estudios sobre la seroprevalencia de la oestrosis en África son muy numerosos. Dorchies *et al.* (1999) tras la estandarización de la técnica inmunoenzimática ELISA, realizaron encuestas serológicas en siete países. En Burkina-Faso se detectó que el 86% de los ovinos eran positivos, en Costa Ivory el 68%, en Nigeria el 98'3%, en Togo el 88'6%, en Senegal el 90'1%, en Etiopía el 54'7% y en Gabón el 75'2%.

En el continente americano, Murguía *et al.* (2000) detectaron que en la provincia de Yucatán (México) el 77% de los rebaños presentaban al menos un animal con anticuerpos frente a *O. ovis*, siendo la seroprevalencia individual en dicho estado del 30%.

2.6. TRATAMIENTO DE LA OESTROSIS

Desde hace algunos años, la mayoría de los tratamientos frente a las larvas de *O. ovis* se basan en la administración de lactonas macrocíclicas **empleando diferentes vías**. Es importante destacar que en todos los ensayos realizados hasta la fecha, la eficacia terapéutica de los diferentes fármacos se determinó mediante la necropsia de los animales transcurridos 15-30 días de la aplicación de los antiparasitarios.

En un ensayo para analizar el efecto de una dosis de 7'5 mg kg p.v.⁻¹ de rafoxanida **por vía oral**, Sanyal *et al.* (1986) observaron que a los 2 meses del tratamiento las ovejas habían ganado 3'52 kg de peso; además, tras su sacrificio, no encontraron larvas de *O. ovis*.

Yazwinski *et al.* (1983) evaluaron el efecto de una dosis de 200 µg kg p.v.⁻¹ de ivermectina, administrada por vía oral, sobre las larvas de *O. ovis* en ganado ovino y comprobaron que la eficacia era del 100%.

En ovejas con oestrosis natural, Lucientes *et al.* (1998) comprobaron que la eficacia del tratamiento con 0'2 mg kg p.v.⁻¹ de ivermectina vía oral, era del 100% de las larvas.

Dorchies *et al.* (1997) llevaron a cabo un experimento para estudiar la eficacia de closantel e ivermectina frente a la oestrosis ovina. En un grupo de animales tratados con una dosis de 10 mg kg p.v.⁻¹ de closantel

vía oral, comprobaron que se eliminaba el 100% de las larvas e idéntico resultado obtuvieron cuando utilizaron $200 \mu\text{g kg p.v.}^{-1}$ de ivermectina vía subcutánea; mientras que cuando utilizaron ivermectina oral la eficacia fue del 98%.

En ovejas con oestrosis natural, Dorchies *et al* (2001) utilizaron $200 \mu\text{g kg p.v.}^{-1}$ de doramectina **intramuscular**, y tras el sacrificio de las ovejas observaron que la eficacia del tratamiento sobre las larvas 1 del parásito fue del 100%.

Rugg *et al.* (1997) valoraron la eficacia de una **cápsula de liberación retardada de ivermectina** en ovejas con oestrosis, y observaron que su eficacia era del 100% en todos los animales; estos resultados son similares a los hallados por Rehbein *et al.* (1998) cuando administraron una cápsula de liberación de controlada de ivermectina a un grupo de ovejas de raza merino infestadas de forma natural por *O. ovis*, comprobando que se conseguía la eliminación de más del 99% de las larvas del parásito.

En los últimos años se ha probado la administración de antiparasitarios por **vía pour on**. En ovejas con oestrosis natural, Hoste *et al.* (2004) comprobaron que la eficacia de una dosis de $0'5 \text{ mg kg p.v.}^{-1}$ de eprinomectina **pour on** era del 97'7%. En una experiencia posterior, Habela *et al.* (2006) comprobaron que la eficacia de una dosis de $0'5 \text{ mg kg p.v.}^{-1}$ y otra de $1 \text{ mg kg p.v.}^{-1}$ de eprinomectina **pour on**, en ovejas infestadas de forma natural, era del 83'5% y del 100%, respectivamente.

2.6.1. Determinación de la eficacia del tratamiento frente a *O. ovis*.

Hasta la fecha, el procedimiento para la evaluación de la eficacia de los diferentes tratamientos disponibles frente a la infestación por *O. ovis* implican el sacrificio de los animales, examen de la cabeza e identificación de los diferentes estadios larvarios.

Se ha aplicado la técnica ELISA para la estimación de la seroprevalencia de oestrosis en ganado ovino en diversas áreas europeas, como ya se ha reflejado con anterioridad, pero son muy escasos los estudios en los que se han aplicado estos procedimientos inmunoenzimáticos para la valoración de tratamientos frente a *O. ovis*. Ramírez *et al.* (2006) comprobaron que en ovejas tratadas con ivermectina, la respuesta inmunitaria IgG disminuía a las 6 semanas del tratamiento, y que el porcentaje de animales positivos por ELISA pasaba del 100% al 56%.

2.6.2. Efecto del tratamiento frente a *O. ovis* sobre la salud de las ovejas.

En la bibliografía disponible son escasas las referencias a los signos clínicos que cursan con la oestrosis en ganado ovino. La mayoría de las investigaciones han tratado de establecer la patogenicidad de las larvas sobre las mucosas de las vías respiratorias (Duranton *et al.*, 1997; Tabouret *et al.*, 2003a; Jacquiet *et al.*, 2005).

Terefe *et al.* (2005) comprobaron que en ovejas con oestrosis experimental se alcanzaban valores de eosinófilos de 450.000 ml^{-1} a la 3ª semana post-infección; estos autores no detectaron anemia en las ovejas infestadas.

Tampoco existen referencias a las variaciones de los parámetros hemáticos experimentadas por las ovejas después del tratamiento. Las únicas menciones hacen alusión a la desaparición de signos clínicos como exudado nasal, *torneo*, disnea (Lucientes, 2000).



**3.- CAPÍTULO I:
INMUNODIAGNÓSTICO DE
OESTROSIS CON PRUEBAS
INMUNOENZIMÁTICAS**

Immunological Investigations, 34: 91-99, 2005.

Comparison of *Oestrus ovis* Metabolic and Somatic Antigens for the Immunodiagnosis of the Zoonotic Myiasis Oestrosis by Immunoenzymatic Probes

R. Sánchez-Andrade, J.A. Romero, J.L. Suárez, J. Pedreira, P. Díaz, M. Arias, A. Paz-Silva, R. Panadero, P. Díez-Baños, P. Morrondo, A. Scala

RESUMEN

El control de las zoonosis implica la reducción de los hospedadores animales infectados, y la primera medida consiste en disponer de pruebas de diagnóstico adecuadas y fiables. Se desarrolló un estudio experimental para determinar el antígeno (metabólico o somático) más apropiado para la detección de la miasis zoonótica oestrosis (*Oestrus ovis*) mediante pruebas inmunoenzimáticas. Para conseguir este objetivo, un rebaño de 23 cabras no infestadas se mantuvo en un pasto en Sassari (Cerdeña, Italia) para permitir su infestación. Se tomaron muestras de sangre de las cabras con periodicidad mensual y los sueros se procesaron mediante ELISA indirecto. Después de comparar los resultados de la cronobiología de *O. ovis*, observamos que la respuesta inmunitaria humoral IgG frente a los antígenos metabólicos aumentaba sólo durante el periodo de riesgo real de infestación (cuando las moscas vuelan, de mayo a septiembre), mientras que las absorbancias frente a los productos somáticos fueron positivas desde el inicio del estudio (en enero, antes de la infestación).

Concluimos que los productos de excreción/secreción son más útiles y apropiados para el inmunodiagnóstico de oestrosis en cabras, porque posibilita el establecimiento de una relación directa entre el desarrollo de *O. ovis* y la respuesta inmunitaria humoral IgG, lo que facilita un diagnóstico más preciso.

PALABRAS CLAVE: oestrosis, antígenos de excreción/secreción, antígenos somáticos, ELISA, diagnóstico de zoonosis

INTRODUCCIÓN

La oestrosis es una zoonosis parasitaria provocada por las moscas de *Oestrus ovis* que afecta principalmente al ganado ovino y caprino, aunque también puede hacerlo a personas (Dar *et al.*, 1980; Delhaes *et al.*, 2001). Las moscas adultas depositan sus estadios juveniles (larvas L1) en los ollares, penetran activamente en las cavidades nasales y migran hacia el etmoides, donde mudan a L2. En los senos tiene lugar la transformación de L2 en L3, que son expulsadas del hospedador al suelo, donde pupan (Hall y Wall, 1995).

La infestación en ovejas y cabras está asociada con rinitis crónica y sinusitis con descarga mucopurulenta (Goddard *et al.*, 1999). Se trata de un proceso que cursa con pérdida de apetito, emaciación y conjuntivitis (Dorchies *et al.*, 1993).

Aunque las personas en contacto con animales (granjeros, pastores, cuidadores de camellos) intentan reducir la posibilidad de infestación mediante la colocación de un pañuelo alrededor de la cara, o fumando mientras están en contacto con los animales (Pampiglione *et al.*, 1997), se produce la infestación por estos dípteros, que puede dar lugar a diferentes presentaciones. Existen dos formas principales: oftalmomiasis y miasis faríngea (Fekry *et al.*, 1997), y los síntomas se hacen visibles de forma súbita, con una sensación de hipertermia y dolor en el tórax, seguido de tos y otros signos respiratorios, nasales, oculares o auriculares (Masoodi y Hosseini, 2003). Se ha demostrado que el 80'3% de los pastores del área del Etna (Sicilia, Italia) han contraído miasis por las larvas de *O. ovis* (Pampiglione *et al.*, 1997).

Esta miasis ocurre en regiones secas y cálidas como los países del Mediterráneo, donde esta zoonosis es endémica, y también se ha diagnosticado en países de América Central (Murguía *et al.*, 2000). Asimismo, ha sido detectada en Arabia Saudí (Alahmed, 2000), Norte de Jordania (Abo-Sehada *et al.*, 2000), Egipto (Amin *et al.*, 1997), Libia (Gabaj *et al.*, 1993), Italia (Caracappa *et al.*, 2000; Scala *et al.*, 2001), Sur de España (Alcalde *et al.*, 2003) y Sur de Francia (Dorchies *et al.*, 2000). También se ha diagnosticado en los condados más cálidos del Sur del Reino Unido (Goddard *et al.*, 1999) y Suroeste de Alemania (Bauer *et al.*, 2002).

En rumiantes, la oestrosis se diagnostica de forma rutinaria mediante la observación de larvas de *O. ovis* en los animales una vez que

han sido sacrificados, pero es una necesidad importante detectar esta zoonosis parasitaria en personas. Se han aplicado algunas pruebas inmunoenzimáticas como el ELISA-indirecto para el diagnóstico de oestrosis (Goddard *et al.*, 1999; Caracappa *et al.*, 2000; Scala *et al.*, 2002); no obstante, aunque se pueden emplear dos preparados antigénicos de larvas de *O. ovis*, metabólicos y somáticos, su idoneidad no ha sido probada todavía. El antígeno somático se obtiene de la rotura de las larvas con un homogeneizador tisular, mientras que los antígenos de excreción/secreción son productos liberados por las larvas durante su incubación en medios adecuados.

En la presente investigación se compararon los antígenos somáticos y de excreción/secreción de *O. ovis* para determinar cuál es más adecuado para el diagnóstico de oestrosis por ELISA. Para este propósito, se mantuvo un rebaño de cabras en primer año de pastoreo, en condiciones semi-extensivas en Sassari (Cerdeña, Italia) con objeto de facilitar su infestación. Cada mes se obtuvieron sueros de estos animales y se analizaron para el diagnóstico de oestrosis. Los resultados se compararon con la cronobiología de este parásito en la misma región (Scala *et al.*, 2002), para estimar con qué antígeno se establecía la mejor correlación entre el riesgo de infestación por *O. ovis* y la respuesta inmunitaria humoral IgG.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cabras

En este estudio se emplearon 2 grupos de cabras de 3 meses de edad sin infestar por *O.ovis* y se mantuvieron en una granja de Sassari (Cerdeña, Italia). El G-1 estaba constituido por 23 cabras que pastaron durante todo el año, y el G-2 por 6 cabras que se mantuvieron estabuladas para evitar su infestación por *O. ovis*.

El rebaño en pastoreo (G-1) se alimentaba en general de pastos naturales, caracterizados principalmente por especies vegetales anuales. Las cabras del G-2 se alimentaron con heno y hierba. Como práctica común en la región donde se realizó este estudio, el grupo G-1 se mantenía en el exterior y sólo se llevaba a los apriscos durante la noche. Se obtuvieron muestras de sangre cada mes de la vena yugular, y los sueros se mantuvieron a -35°C hasta su utilización.

Preparación de los antígenos de O. ovis

Para obtener las larvas de *O. ovis*, en un matadero local se recogieron cabezas de cabras con infestación natural y se abrieron para recuperar las larvas en el septum, y en las cavidades sinusales, etmoideas y turbinas. Después de identificar las larvas, se seleccionaron las L2 y se lavaron en tampón salino fosfato PBS (pH 7.4) antes de la preparación de los antígenos (Scala *et al.*, 2002).

Los antígenos de excreción/secreción (ESA) se obtuvieron tras la incubación de larvas L2 en medio de cultivo RPMI a temperatura ambiente durante 3 días; el medio se recogía y se renovaba cada 3 horas. Para preparar el antígeno somático (SA), las larvas de segundo estadio se fragmentaron con un homogeneizador tisular y a continuación se centrifugó el producto resultante. El sobrenadante así obtenido se conservó a -70°C hasta su empleo. Antes de ello, se estimó la concentración proteica de ambos antígenos con el kit BCA de Pierce.

ELISA-indirecto

Los antígenos de *O. ovis* se diluyeron en PBS hasta una concentración de $1\ \mu\text{g ml}^{-1}$ (ESA) ó $3\ \mu\text{g ml}^{-1}$ (SA) para tapizar los pocillos de placas de microtitulación (Costar, Corning Inc., NY, USA). Las muestras de suero se diluyeron 1:50 en PBS con Tween al 0'05% y leche desnatada al 1%, empleándose como inmunoconjugado un anticuerpo monoclonal anti-IgG de cabra marcado con peroxidasa (γ heavy chain specific, Sigma-Aldrich Co., MO, USA) a dilución 1:1500. A continuación se añadieron a cada pocillo 100 μl de substrato compuesto por 10 mg de *orto*-fenilendiamina disueltos en 12 ml de tampón citrato (pH 5) y 10 μl de H_2O_2 al 30%. Las placas se incubaron en oscuridad durante 15 minutos y a temperatura ambiente. La reacción colorimétrica se detuvo colocando 100 μl de H_2SO_4 3N, y las absorbancias se leyeron en un espectrofotómetro a 492 nm (Titertek Multiskan, Hämeenlinna, Finland).

Como testigos positivos y negativos se emplearon mezclas de sueros de 5 cabras infestadas y otras 5 sin infestar, respectivamente. Los sueros testigo positivos se obtuvieron de animales que albergaban un número importante de larvas de *O. ovis* cuando fueron sacrificadas en el matadero, y los sueros testigo negativos de las cabras del G-2. Es importante destacar que tras el sacrificio de estos animales (G-2), no se encontraron larvas en sus cabezas.

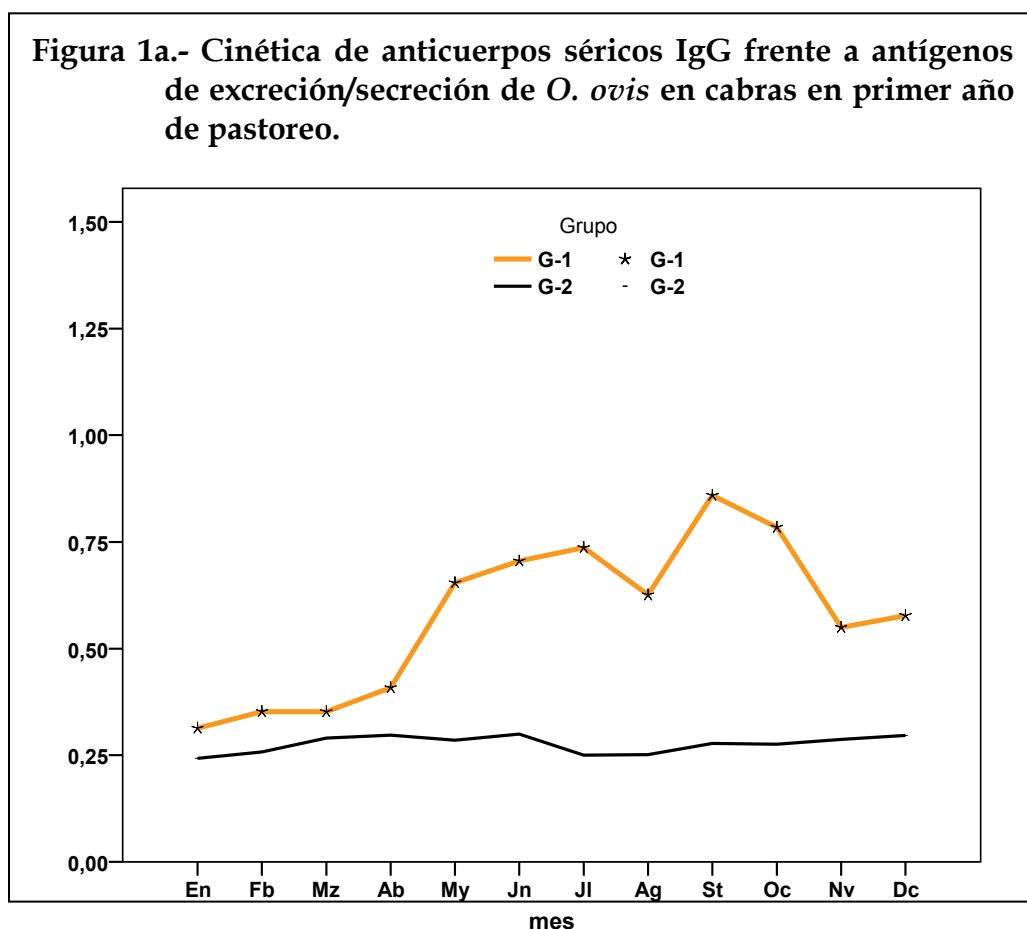
Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con un análisis de varianza (ANOVA), considerando que existían diferencias significativas si $p < 0.05$. La prueba de correlación de Pearson se empleó en la evaluación de la existencia de correlación entre las diferentes variables consideradas. Todas las estimaciones se realizaron con el paquete estadístico SPSS, versión 11.5.1. (SPSS Inc., 2002).

RESULTADOS

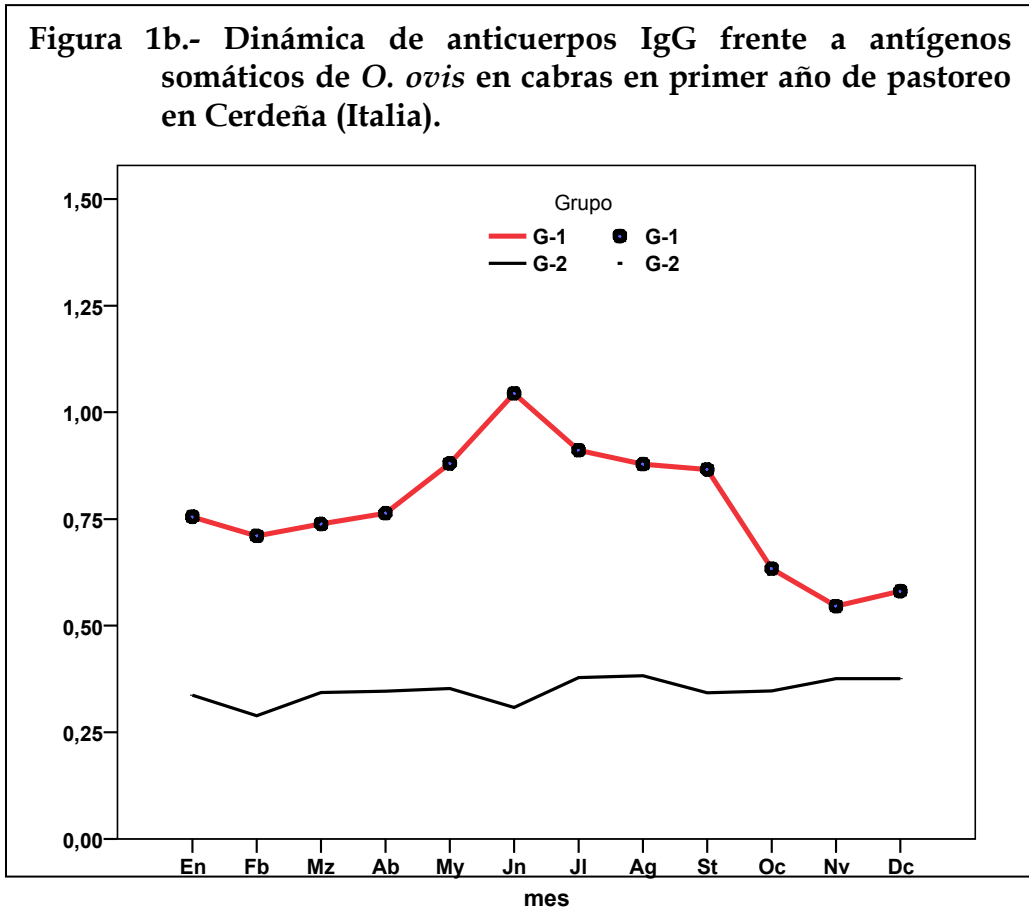
La Figura 1a representa la respuesta IgG humoral frente a los antígenos ESA de *O. ovis* en cabras con infestación natural. Desde enero hasta abril, los valores de IgG fueron negativos en ambos grupos y con ANOVA se comprobó que no existían diferencias significativas entre ellos. Los niveles de IgG comenzaron a aumentar de forma significativa en mayo y continuaron haciéndolo hasta el mes de julio. Después de disminuir en agosto, los anticuerpos alcanzaron el valor máximo en

septiembre, y a continuación se redujeron hasta diciembre, aunque las absorbancias del G-1 siempre fueron superiores a las del G-2. Con ANOVA se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los meses de mayo y diciembre.



La cinética de anticuerpos frente a los productos SA de *O. ovis* se representa en la Figura 1b. Se detectaron valores positivos desde el mes de enero, alcanzándose el máximo en junio. Entre julio y diciembre, se apreció una disminución significativa en los valores de IgG, aunque nunca

se aproximaron a las absorbancias de los testigos negativos. Las diferencias entre el G-1 y el G-2 resultaron significativas en todos los meses del estudio.



La evolución mensual de la prevalencia de oestrosis caprina se muestra en la Tabla 1. Con los ESA comprobamos que el porcentaje de cabras con valores positivos de IgG oscilaba entre el 0% (enero-abril) y el 100% (mayo-julio). Al emplear SA la prevalencia de oestrosis varió entre el 22,2% (enero-marzo) y el 100% (mayo-septiembre).

Tabla 1.- Porcentaje mensual de cabras positivas a los antígenos somáticos y de excreción/secreción de L2 de <i>Oestrus ovis</i> en Sassari, Cerdeña, Italia.		
	Cabras positivas a los antígenos de excreción/secreción de L2 de <i>Oestrus ovis</i>	Cabras positivas a los antígenos somáticos de L2 de <i>Oestrus ovis</i>
Enero	0	22'2 (4/18)
Febrero	0	22'2 (4/18)
Marzo	0	22'2 (4/18)
Abril	55'5 (10/18)	55'5 (10/18)
Mayo	100 (18/18)	100 (18/18)
Junio	100 (18/18)	100 (18/18)
Julio	100 (18/18)	100 (18/18)
Agosto	88'9 (16/18)	100 (18/18)
Septiembre	94'5 (17/18)	100 (18/18)
Octubre	88'9 (16/18)	83'3 (15/18)
Noviembre	83'3 (15/18)	100 (18/18)
Diciembre	83'3 (15/18)	94'5 (17/18)

DISCUSIÓN

La oestrosis es una enfermedad parasitaria frecuente en ovejas y cabras de algunos países. El control adecuado de esta enfermedad se basa en el diagnóstico correcto, tratamiento eficaz y evaluación de la eficacia de este tratamiento. Sin embargo, esta miasis se detecta frecuentemente mediante la observación de larvas en los animales una vez que han sido sacrificados.

El ELISA-indirecto permite el diagnóstico de oestrosis, aunque falta por determinar el antígeno a utilizar, metabólico o somático. Con este

objetivo, en la presente investigación se analizó la respuesta inmunitaria humoral IgG frente a antígenos de excreción/secreción y somáticos de *O. ovis*, en cabras en primer año de pastoreo. Con los productos metabólicos la cinética de IgG aumentó de mayo a septiembre. Sin embargo, la respuesta anticuerpo frente a los productos somáticos se incrementó de enero a junio, disminuyendo posteriormente hasta diciembre. En Cerdeña, la fase activa del ciclo exógeno (moscas adultas) tiene lugar entre marzo y septiembre, de modo que este es el periodo de mayor riesgo de infestación para animales y personas (Scala *et al.*, 2002).

Teniendo en cuenta nuestros resultados, el incremento de las absorbancias frente a los antígenos metabólicos en marzo parece deberse al estímulo antigénico que provoca la infestación por los primeros estadios de *O. ovis*, de modo que el cese de tal estímulo es responsable de la reducción de la respuesta IgG.

Más aún, los resultados obtenidos con los antígenos somáticos indican que las cabras presentan valores positivos de absorbancias en enero, lo que no guarda relación con la cronobiología de este parásito porque no es posible la aparición de moscas hasta marzo-abril, imposibilitando por tanto la infestación de las cabras (Hall y Wall, 1995).

Las zoonosis parasitarias se pueden transmitir de animales a personas de varios modos, en función del ciclo vital del parásito, tipo de hospedadores y distribución geográfica de las especies. Se ha publicado

que un elevado porcentaje de pastores contrajeron oestrosis en la región del Etna (Sicilia, Italia) y en el Sur de Irán. Diferentes investigaciones hacen notar que esta miasis debería considerarse como una enfermedad ocupacional entre los granjeros que cuidan ovejas, cabras e incluso camellos (Pampiglione *et al.*, 1997; Masoodi y Hosseini, 2003).

El riesgo de transmisión de esta enfermedad por los animales se puede reducir tomando algunas medidas de control, y la primera debería consistir en la aplicación de técnicas adecuadas para el diagnóstico correcto en los hospedadores animales, así como su tratamiento cuando sea necesario. En este trabajo, se puso de manifiesto que se puede conseguir la detección más adecuada y precisa de oestrosis si se emplean antígenos de excreción/secreción para el análisis de la respuesta IgG.

La detección correcta de oestrosis en rumiantes es el primer parámetro necesario para el control de esta parasitosis en estos animales, y reducir de este modo las posibilidades de infestación en personas. A través de este estudio llegamos a la conclusión de que los productos de excreción/secreción son más útiles que los somáticos para el inmunodiagnóstico de oestrosis, puesto que es posible establecer una correlación directa entre la respuesta inmunitaria humoral IgG y la infestación por larvas de *O. ovis*, permitiendo un diagnóstico más apropiado. Recomendamos su empleo en encuestas epidemiológicas, necesarias para obtener una estimación real de la distribución de esta miasis.

AGRADECIMIENTOS

A los autores les gustaría agradecer a Ph. Jacquiet (INRA, Toulouse, Francia) la revisión crítica del manuscrito, y a B. Valcárcel por colaborar en su redacción.

Este estudio se financió, en parte, mediante una beca de investigación concedida a la Dra. R. Sánchez-Andrade Fernández por la Xunta de Galicia (España), y gracias al Proyecto de Investigación PGIDT00PX126102PR (XUGA, España).

BIBLIOGRAFÍA

- Abo-Sehada, M. N., Arab, B., Mekbel, R., Williams, D., Torgerson, P. R. (2000). Age and seasonal variations in the prevalence of *Oestrus ovis* larvae among sheep in Northern Jordan. **Prev. Vet. Med.** **16**: 205–212.
- Alahmed, A. M. (2000). Seasonal infestation of *Oestrus ovis* larvae in sheep heads in central region of Saudi Arabia. **J. Egypt. Soc. Parasitol.** **30**: 895–901.
- 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(3–4)**: 235–241.
- Amin, A. R., Morsy, T. A., Shoukry, A., Mazyad, S. A. (1997). Oestrid head maggots in slaughtered sheep in Cairo abattoirs. **J. Egypt. Soc. Parasitol.** **27**: 855–861.

- Bauer, C., Steng, G., Prevot, F., Dorchies, P. (2002). Seroprevalence of *Oestrus ovis* infection in sheep in Southwestern Germany. **Vet. Parasitol.** **110**: 137-143.
- Caracappa, S., Rilli, S., Di Marco, V., Dorchies, P. (2000). Epidemiology of ovine oestrosis (*Oestrus ovis* Linné 1761, Diptera: Oestridae) in Sicily. **Vet. Parasitol.** **92**: 233-237.
- Dar, M. S., Amer, M. B., Dar, F. K., Papazotos, V. (1980). Ophthalmomyiasis caused by the sheep nasal bot, *Oestrus ovis* (Oestridae) larvae, in the Benghazi area of Eastern Libya. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **74 (3)**: 303-306.
- Delhaes, L., Bourel, B., Pinatel, F., Cailliez, J. C., Gosset, D., Camus, D., Dei-Cas, E. (2001). Human nasal myiasis due to *Oestrus ovis*. **Parasite** **8 (4)**: 289-296.
- Dorchies, P., Yilma, J. M., Savey, J. (1993). Prevalence of lung abscesses and interstitial pneumonia in ovine oestrosis. **Vet. Rec.** **133**: 325.
- Dorchies, P., Bergeaud, J. P., Tabouret, G., Durantou, C., Precot, F., Jacquiet, 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.
- Fekry, A. A., el 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 (2)**: 493-496.
- Gabaj, M. M., Beesley, W. N., Awan, M. A. (1993). *Oestrus ovis* myiasis in Libyan sheep and goats. **Trop. Anim. Health Prod.** **25 (2)**: 65-68.

- Goddard, P., Bates, P., Webster, K. A. (1999). Evaluation of a direct ELISA for the serodiagnosis of *Oestrus ovis* infections in sheep. **Vet. Rec.** **144**: 497-501.
- Hall, M., Wall, R. (1995). Myiasis of humans and domestic animals. **Adv. Parasitol.** **35**: 257-334.
- Masoodi, M., Hosseini, K. (2003). The respiratory and allergic manifestations of human myiasis caused by larvae of the sheep bot fly (*Oestrus ovis*): a report of 33 pharyngeal cases from Southern Iran. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** **97**: 75-81.
- Murguia, 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 Yucatan, Mexico. **Vet. Parasitol.** **88 (1-2)**: 73-78.
- 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.
- 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.
- Scala, A., Paz-Silva, A., Suárez, J. L., López, C., Díaz, P., Díez-Baños, P., Sánchez-Andrade Fernández, R. (2002). Chronobiology of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) in Sardinia, Italy: guidelines to chemoprophylaxis. **J. Med. Entomol.** **39**: 652-657.



**4.- CAPÍTULO II:
RESPUESTA INMUNITARIA
HUMORAL EN GANADO OVINO
CON OESTROSIS**

Veterinary Parasitology, 134: 153-158, 2005.

Analysis of the humoral immune response to *Oestrus ovis* in ovine

J.L. Suárez, A. Scala, J.A. Romero, A. Paz-Silva, J. Pedreira, M. Arias, P. Díaz, P. Morrondo, P. Díez-Baños, R. Sánchez-Andrade

RESUMEN

Se analizó la respuesta anticuerpo (IgG, IgM e IgA) frente a *Oestrus ovis* en ovejas adultas y en corderos en primer año de pastoreo en Cerdeña (Italia), mediante una prueba ELISA y antígenos de excreción/secreción de larvas 2 de *O. ovis*. Antes de ser sacrificadas, se obtuvieron muestras de sangre de 208 ovejas, y posteriormente se retiraron las cabezas y se abrieron a lo largo del eje longitudinal para recoger los parásitos de las cavidades nasales, turbinales y sinusales. Además, durante un año se tomaron mensualmente muestras de sangre de los corderos del G-1 (mantenidos en régimen semi-intensivo) y del G-2 (estabulados para evitar la infestación por *O. ovis*). En las ovejas se observó una correlación significativa y positiva entre el número de larvas de primer estadio de *O. ovis* y los valores de IgM, y entre las larvas de segundo estadio y las absorbancias IgG. En los corderos del G-1, todas las clases de anticuerpos aumentaron de forma significativa a partir del mes de julio. Los valores más elevados de IgG se alcanzaron en septiembre y disminuyeron en noviembre-diciembre. La respuesta IgM más intensa se observó en el mes

de noviembre, y la respuesta IgA mostró valores muy pequeños durante todo el estudio.

Comparando estos datos con la cronobiología de *O. ovis* en esta región, llegamos a la conclusión de que la primera infestación ocurre en mayo, y supone un estímulo para la producción de anticuerpos humorales. En el mes de octubre comenzó la reducción de los valores de IgG, lo que significa el comienzo de la fase de diapausa, mientras que la respuesta IgM parece asociarse a la presencia de L1 en las cavidades nasales. Los datos obtenidos nos inducen a proponer un tratamiento precoz del ganado ovino en junio-julio, que evitaría la maduración de las larvas L1 de *O. ovis*, impidiendo el desarrollo de manifestaciones clínicas e interrumpiendo el ciclo vital de este parásito.

PALABRAS CLAVE: *Oestrus ovis*, ganado ovino, IgG, IgM, IgA, ELISA

INTRODUCCIÓN

La oestrosis es una miasis que afecta principalmente al ganado ovino y caprino, aunque también puede afectar a pacientes humanos (Lucientes *et al.*, 1997). Masoodi y Hosseini (2003) observaron algunos casos de personas con alteraciones faríngeas y manifestaciones respiratorias en el Sur de Irán, aunque las infestaciones oculares son las más prevalentes (Pampiglione *et al.*, 1997; Prosl y Meyer, 2003).

Las moscas adultas depositan el primer estadio larvario en los ollares de las ovejas, y las larvas migran al interior de las cavidades nasales. Las larvas 1 (L1) se dirigen al etmoides donde mudan a L2. En los senos, las larvas L2 se transforman en L3, que son expulsadas mediante estornudos y caen al suelo, donde pupan (Hall y Wall, 1995). Las moscas adultas tienen un aparato oral rudimentario y no funcional, por lo que son incapaces de nutrirse. Las larvas, en contacto estrecho con las mucosas del hospedador, desempeñan un papel esencial en el proceso de acumulación de nutrientes para los tres estadios del ciclo vital.

La oestrosis es endémica en algunas regiones de clima cálido en las que predominan las estaciones secas, como los países del Mediterráneo, y se ha descrito en muchos países de África (Kilani *et al.*, 1986; Horak *et al.*, 2001), Arabia Saudí (Alahmed, 2000), Norte de Jordania (Abo-Sehada *et al.*, 2000), Egipto (Amin *et al.*, 1997), Italia (Caracappa *et al.*, 2000; Scala *et al.*, 2001, 2002), Sur de Francia (Dorchies *et al.*, 2000) y también en otras localizaciones como en los condados del Sur del Reino Unido (Goddard *et al.*, 1999) y en el Suroeste de Alemania (Bauer *et al.*, 2002).

Las interacciones entre las larvas de *O. ovis* y el sistema inmunitario de los hospedadores se han investigado insuficientemente. Tabouret *et al.* (2003) evaluaron las respuestas IgG e IgA en la mucosa nasal de ovejas infestadas de forma experimental con *O. ovis*, en tanto que algunos estudios investigaron la variación estacional de IgG específicas frente a *O. ovis* en ganado ovino (Papadopoulos *et al.*, 2001; Scala *et al.*, 2002).

El principal objetivo del presente estudio fue evaluar la cinética de las respuestas sistémicas IgG, IgM e IgA en ganado ovino frente a *O. ovis*. Este conocimiento puede resultar de utilidad para conocer de forma detallada la cronobiología del parásito, identificar los periodos de mayor riesgo, así como el periodo más adecuado para administrar un tratamiento precoz con el que prevenir el desarrollo de lesiones en animales infestados. Para este propósito, se diseñaron dos experimentos. En el primero, se analizó la respuesta inmunitaria humoral en ovejas con oestrosis natural y los parásitos se recogieron de sus cavidades nasales. En el segundo estudio, la respuesta inmunitaria sistémica se evaluó durante un año en corderos, a través de la obtención mensual de muestras de sangre de dos grupos de animales, uno mantenido en pastoreo y el otro estabulado desde su nacimiento para evitar la infestación.

MATERIAL y MÉTODOS

Experimento 1

En febrero de 2004 se obtuvieron muestras de suero de 208 ovejas adultas antes de su sacrificio en matadero local (Sassari, Cedeña, Italia), y posteriormente se retiraron las cabezas y se cortaron a lo largo del eje longitudinal para recoger los parásitos de las cavidades nasales, turbinas y senos según el protocolo descrito por Yilma y Dorchies (1991). Los sueros se analizaron con un ELISA-indirecto empleando antígenos de excreción/secreción de L2.

Experimento 2

Se obtuvieron mensualmente muestras de sangre de corderos de raza autóctona Sarda en una explotación ganadera de Sassari. Los sueros se mantuvieron a -35° C hasta su empleo. Los animales se dividieron en dos grupos, el G-1: 14 animales de 3 meses de edad que se mantuvieron en pastoreo y el G-2: 5 corderos de la misma edad que permanecieron estabulados con objeto de evitar la infestación por *O. ovis*.

Los corderos del G-1 se mantuvieron pastos naturales, compuestos principalmente por especies vegetales anuales. Los del G-2 se alimentaron con hierba verde y heno.

Preparación de los antígenos de excreción/secreción de O. ovis

El empleo de los antígenos de excreción/secreción se fundamenta en investigaciones previas en las que se demostró su utilidad (Scala *et al.*, 2002; Sánchez-Andrade *et al.*, 2005). Estos productos se obtuvieron mediante la incubación de larvas L2 en medio de cultivo RPMI a temperatura ambiente durante 3 días; el medio se recogía y se renovaba cada 6 horas.

Las larvas L2 se recogieron de las ovejas del experimento 1. Una vez identificadas, se lavaron en tampón salino fosfato (PBS, pH 7.4), y a continuación se incubaron en medio de cultivo RPMI.

El punto de corte se estableció como la media de las absorbancias consideradas negativas del G-2 más 3 veces la desviación estándar (Scala *et al.*, 2002); de este modo, el valor fue de 0´3634 para la IgM y de 0´3415 para la IgG.

ELISA-indirecto

Para analizar la respuesta IgG, los antígenos de excreción/secreción de *O. ovis* se diluyeron en PBS hasta una concentración de $3 \mu\text{g ml}^{-1}$, con la que se sensibilizaron los pocillos de placas de microtitulación (Costar®, Corning Inc., NY, USA), según Scala *et al.* (2002). Las muestras de suero se diluyeron 1:50 en PBS con Tween al 0´05% y leche desnatada al 1%, empleándose como inmunoconjugado un anticuerpo policlonal anti-IgG de oveja marcado con peroxidasa (Sigma-Aldrich Co., MO, USA) a dilución 1:1500. A continuación se añadieron a cada pocillo 100 μl de substrato compuesto por 10 mg de *orto*-fenilendiamina disueltos en 12 ml de tampón citrato (pH 5) y 10 μl de H_2O_2 al 30%. Las placas se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción colorimétrica se detuvo con la adición de 100 μl de H_2SO_4 3N, y las absorbancias se leyeron en un espectrofotómetro a 492 nm (Titertek Multiskan, Hämeenlinna, Finland).

La evaluación de los anticuerpos IgA e IgM se realizó con una concentración de antígeno de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ y $2 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente. Los sueros se diluyeron a 1:50, el anticuerpo (mouse) anti-IgA a 1:500, el anti-

IgM a 1:750, y el inmunocojugado se utilizó a 1:500 y 1:1000, para cada caso.

Como testigos positivos y negativos se emplearon mezclas de sueros de 5 animales infestados y de otros 5 sin infestación, respectivamente. Los sueros testigo positivos se obtuvieron de las ovejas del experimento 1, en las que se hallaron larvas de *O. ovis* cuando fueron sacrificadas en el matadero, y los sueros testigo negativos de los corderos del G-2.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con un análisis de varianza (ANOVA), utilizándose el contraste de Bonferroni cuando existían diferencias significativas ($p < 0.05$). Los valores de absorbancias así como los de las cargas parasitarias se analizaron mediante *t* de Student.

La prueba de correlación de Pearson se empleó en la evaluación de la existencia de correlación entre las diferentes variables consideradas. Todas las estimaciones se realizaron con el paquete estadístico SPSS, versión 11.5.1. (SPSS Inc., 2002).

RESULTADOS

Experimento 1

El número total de larvas de *O. ovis* que se recogieron de las cabezas de las ovejas fue de 1360 (Tabla 1), con una media de $6'54 \pm 7'25$ y prevalencia del 75%. El número de larvas por oveja osciló entre 0 y 24.

La prevalencia de *O. ovis* fue del 75% (156/208) y como se recoge en la Tabla 1, el porcentaje de L1 fue 80'15%, 9'5% de L2 y 10'35% de L3, con una carga parasitaria media de $5'39 \pm 5'75$ para las larvas de primer estadio, $0'64 \pm 1'31$ para las de segundo estadio y $0'69 \pm 1'01$ para las de tercer estadio.

	Número	Porcentaje
Larvas L1	1090	80'15
Larvas L2	129	9'5
Larvas L3	141	10'35
Total	1360	

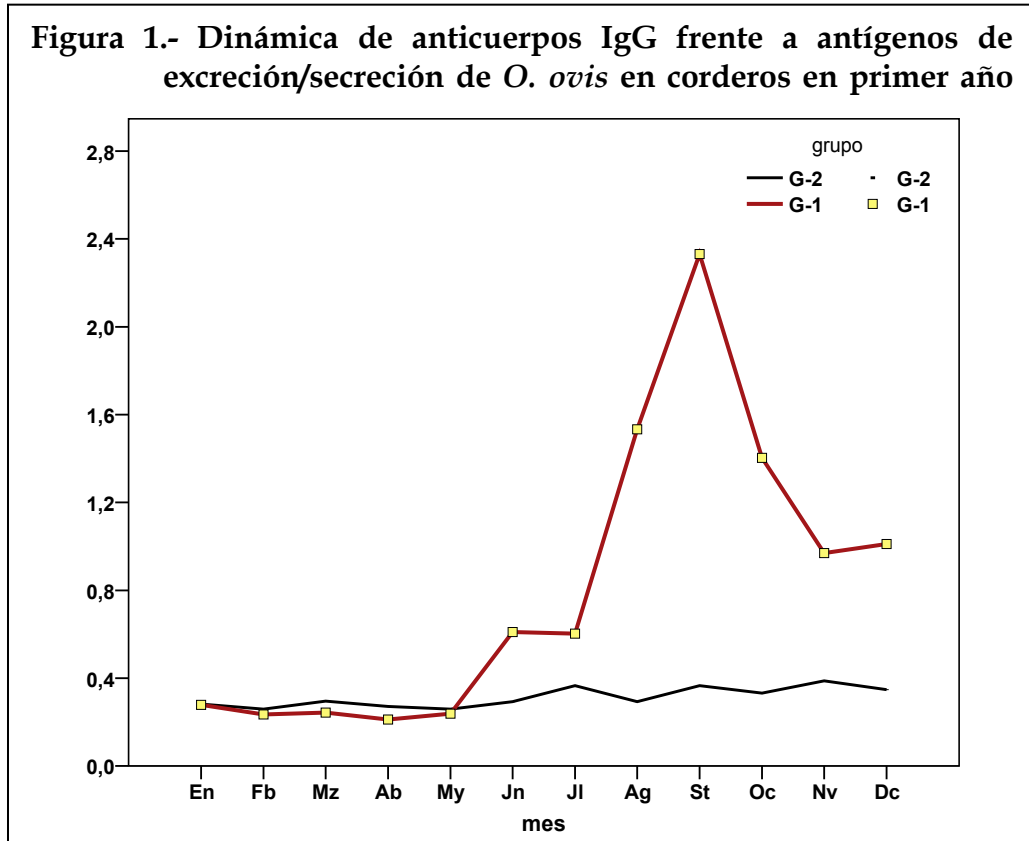
La Tabla 2 muestra los porcentajes de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo y prevalencia aparente.

Tabla 2.- Parámetros estadísticos para IgM e IgG frente a antígenos de excreción/secreción de L2 de <i>O. ovis</i> (Cerdeña, Italia) ($n= 208$).		
	IgM	IgG
Sensibilidad (%)	97'4	96'1
Especificidad (%)	90'4	55'8
Valor predictivo positivo (%)	96'8	86'7
Valor predictivo negativo (%)	92'2	82'8
Prevalencia aparente	75'5	83'2

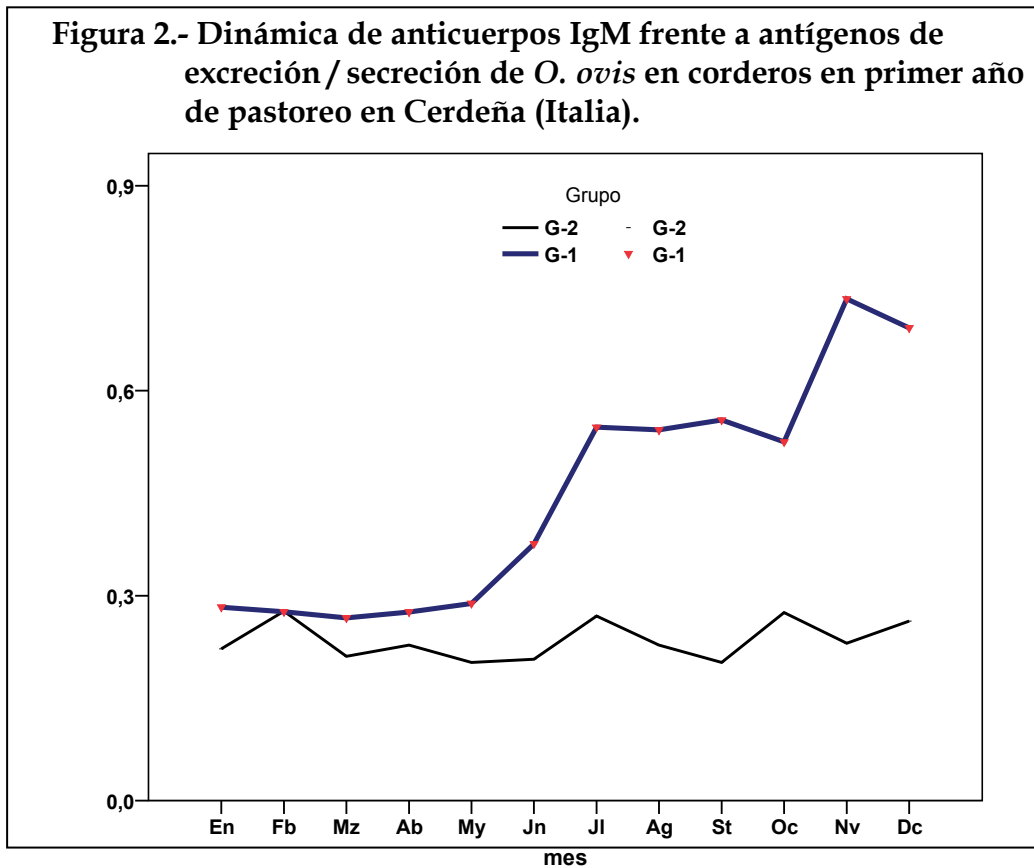
Mediante la prueba de Pearson se comprobó que había una correlación significativa y positiva entre el número de L1 y las absorbancias IgM ($r^2= 0'655$, $p= 0'001$), y entre el número de larvas L2 y las densidades ópticas de IgG ($r^2= 0'731$, $p= 0'001$).

Experimento 2

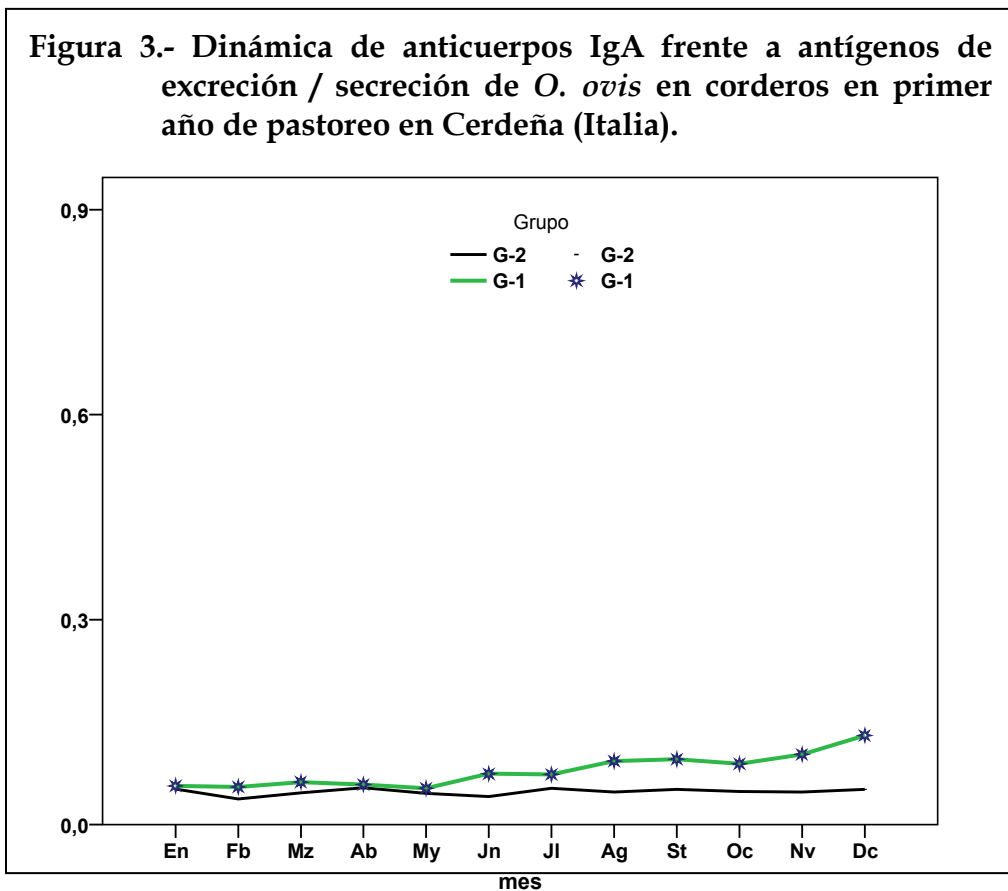
La Figura 1 refleja la cinética de IgG. En los corderos del G-1 los valores de absorbancia aumentaron de forma significativa desde junio y alcanzaron el valor máximo en septiembre, descendiendo desde este mes hasta noviembre. En el grupo testigo (G-2) la respuesta IgG fue constante durante todo el estudio. Con ANOVA se comprobó que las diferencias entre los corderos infestados y los testigos resultaron significativas ($p < 0'05$) desde julio a diciembre.



En los corderos del G-1 la respuesta IgM (Fig. 2) aumentó en junio, mientras que en el G-2 los valores se mantuvieron constantes durante todo el año de estudio. En el G-1 los anticuerpos IgM alcanzaron un valor meseta de julio a octubre, y a continuación aumentaron de nuevo. Con ANOVA se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los corderos del G-1 y los del G-2 entre los meses de junio y diciembre.



En la Figura 3 se puede comprobar que la respuesta IgA fue muy similar en los corderos del G-1 y del G-2, siendo en ambos grupos los valores de absorbancia muy bajos. Sólo se apreció un débil y significativo incremento en el G-1 a partir del mes de julio.



En los corderos del G-1, la respuesta más elevada se obtuvo con los anticuerpos IgG y la más pequeña con los IgA. El test de Pearson mostró que existía correlación significativa entre las curvas de IgG e IgM ($r^2= 0\text{'}543, p= 0\text{'}001$), IgG e IgA ($r^2= 0\text{'}407, p= 0\text{'}001$) y también de IgM e IgA ($r^2= 0\text{'}542, p= 0\text{'}001$).

DISCUSIÓN

En Cerdeña la cronobiología de la oestrosis tiene tres periodos (Scala *et al.*, 2002); la diapausa (octubre-febrero), la fase activa del ciclo endógeno (marzo-septiembre) y la fase exógena (mayo-septiembre).

La detección de la oestrosis se lleva a cabo generalmente mediante la necropsia de los animales en el matadero, aunque el conocimiento de que la exposición a antígenos de *O. ovis* estimula la producción de anticuerpos IgG específicos se ha utilizado en el diagnóstico mediante pruebas ELISA (Caracappa *et al.*, 2000; Papadopoulos *et al.*, 2001; Scala *et al.*, 2002). En el presente estudio, la evaluación de la cinética de IgG en corderos en primer año de pastoreo en Cerdeña (Italia) mostró que los anticuerpos aumentaban a partir del mes de junio y alcanzaban el máximo valor en septiembre.

Todos los estudios previos analizaron la respuesta IgG, pero es necesario tener en cuenta que los valores considerados positivos sólo indican el contacto previo con los antígenos parasitarios y, como hemos comprobado en otros estudios sobre trematodos, no necesariamente la presencia de infección activa (Sánchez-Andrade *et al.*, 2001). Por esta razón, se procedió al análisis de las respuestas IgA e IgM. Los anticuerpos IgM aumentaron desde junio y el valor máximo se obtuvo en noviembre-diciembre; la respuesta IgA fue muy baja y experimentó pequeñas

variaciones, lo que concuerda con los resultados de Jacquiet *et al.* (comunicación personal).

En un intento de explicar estos resultados se desarrolló un estudio para establecer la posible relación entre los diferentes estadios de *O. ovis* y la respuesta anticuerpo en ganado ovino. De este modo se comprobó que los valores de IgM y la presencia de L1 estaban correlacionados, así como las L2 y la respuesta IgG.

En corderos en primer año de pastoreo, el incremento observado en la respuesta inmunitaria humoral IgG desde junio-julio parece indicar que la producción de estos anticuerpos depende del metabolismo activo de las larvas de *O. ovis*, lo que coincide con los resultados de Dorchies *et al.* (1998), y el desarrollo de L1 a L2 y L3 estimula la producción de anticuerpos IgG. Sin embargo, durante la diapausa (que transcurre entre octubre y febrero en Cerdeña), las L1 depositadas al final de verano reducen su actividad y metabolismo, permaneciendo quiescentes en las cavidades nasales, de modo que no se produce presentación de antígenos al sistema inmunitario, o se hace en muy pequeños niveles (Goddard *et al.*, 1999).

El incremento de los anticuerpos IgM durante la fase activa y la diapausa muestra que esta respuesta inmunitaria humoral no está asociada al metabolismo activo de larvas de *O. ovis*. Además, los valores más elevados de IgM se obtuvieron precisamente durante la diapausa

(noviembre-diciembre), lo que indica que el estímulo antigénico para la producción de IgM guarda relación con la presencia de larvas L1, que predominan en este periodo (Dorchies *et al.*, 1998; Caracappa *et al.*, 2000; Scala *et al.*, 2001).

Scala *et al.* (2002) comprobaron que en Cerdeña el periodo de vuelo de las moscas adultas tiene lugar entre los meses de marzo y septiembre, por lo que nuestros resultados parecen indicar que la infestación primaria de los corderos ocurre en mayo, y explica que todos los anticuerpos analizados no aumentasen hasta junio-julio.

La oestrosis es responsable de pérdidas económicas importantes, de modo que es necesario establecer medidas apropiadas para su control y prevención. Rogers y Knapp (1973) observaron que las larvas maduran más rápidamente y en mayor número en corderos que en animales adultos expuestos a infestaciones previas, por lo que son responsables del mantenimiento de esta miasis.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en la presente investigación, y que en Cerdeña el periodo de nacimiento de los corderos ocurre en noviembre-diciembre, aconsejamos a los ganaderos de ovejas de esta zona que consideren la posibilidad de aplicar un tratamiento precoz a los corderos en junio-julio, como una medida eficaz para prevenir la maduración de larvas L1, evitando así el desarrollo de manifestaciones clínicas en los corderos infestados y reduciendo las pérdidas económicas

provocadas por la oestrosis. Se están desarrollando más estudios para conseguir un mayor conocimiento sobre el papel de la IgM en la oestrosis ovina y su relación con la presencia de L1 en las cavidades nasales del ganado ovino.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a B. Valcárcel su contribución en la redacción del manuscrito.

Este estudio se financió, en parte, mediante una beca de investigación concedida a la Dra. R. Sánchez-Andrade Fernández por la Xunta de Galicia (España), y gracias al Proyecto de Investigación PGIDT00PX126102PR (XUGA, España).

BIBLIOGRAFÍA

- M.N. Abo-Sehada, B. Arab, R. Mekbel, D. Williams and P.R. Torgerson (2000). Age and seasonal variations in the prevalence of *Oestrus ovis* larvae among sheep in northern Jordan. **Prev. Vet. Med.** **16**: 205-212.
- A.M. Alahmed (2000). Seasonal infestation of *Oestrus ovis* larvae in sheep heads in central region of Saudi Arabia. **J. Egypt. Soc. Parasitol.** **30**: 895-901.

- A.R. Amin, T.A. Morsy, A. Shoukry and S.A. Mazyad (1997). Oestrid head maggots in slaughtered sheep in Cairo abattoirs. **J. Egypt. Soc. Parasitol.** **27**: 855–861.
- C. Bauer, G. Steng, F. Prevot and P. Dorchies (2002). Seroprevalence of *Oestrus ovis* infection in sheep in south-western Germany. **Vet. Parasitol.** **110**: 137–143.
- S. Caracappa, S. Rilli, V. Di Marco and P. Dorchies (2000). Epidemiology of ovine oestrosis (*Oestrus ovis* Linné 1761 Diptera: Oestridae) in Sicily. **Vet. Parasitol.** **92**: 233–237.
- P. Dorchies, J.P. Bergeaud, G. Tabouret, C. Duranton, F. Precot and P. Jacquiet (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.
- P. Dorchies, C. Duranton and P. Jacquiet (1998). Pathophysiology of *Oestrus ovis* infection in sheep and goats: a review, **Vet. Rec.** **142**: 487–489.
- P. Goddard, P. Bates and K.A. Webster (1999). Evaluation of a direct ELISA for the serodiagnosis of *Oestrus ovis* infections in sheep. **Vet. Rec.** **144**: 497–501.
- M. Hall and R. Wall (1995). Myiasis of humans and domestic animals. **Adv. Parasitol.** **35**: 257–334.
- I.G. Horak, K.M. Macivor and C.J. Greeff (2001). Parasites of domestic and wild animals in South Africa. XXXIX. Helminth and arthropod parasites of Angora goats in the southern Karoo. Onderstepoort. **J. Vet. Res.** **68**: 27–35.

- M. Kilani, H.H. Kacem, P. Dorchies and M. Franc (1986). Observations sur le cycle annuel d'*Oestrus ovis* en Tunisie. **Rev. Med. Vet.** **137**, p p. 451-457.
- J. Lucientes, A. Clavel, M. Ferrer-Dufol, H. Valles, M.A. Peribáñez, M.J. Gracia-Salinas and J.A. Castillo (1997). Short report: one case of nasal human myiasis caused by third stage instar larvae of *Oestrus ovis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **56**: 608-609.
- M. Masoodi and K. Hosseini (2003). The respiratory and allergic manifestations of human myiasis caused by larvae of the sheep bot fly (*Oestrus ovis*): a report of 33 pharyngeal cases from southern Iran. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** **97**: 75-81.
- S. Pampiglione, S. Giannetto and A. Virga (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.
- E. Papadopoulos, F. Prevot, P. Jacquiet, C. Duranton, J.P. Bergeaud, E. Kalaitzakis and P. Dorchies (2001). Seasonal variation of *Oestrus ovis*-specific antibodies in sheep and goats mixed flocks in Greece. **Vet. Parasitol.** **95**: 73-77.
- H. Prosl and J. Meyer (2003). Ophthalmomyiasis caused by *Oestrus ovis* in a 3-year-old boy. **Wien. Klin. Wochenschr.** **115**: 76-79.
- C.E. Rogers and F.W. Knapp (1973). The bionomics of the sheep bot fly (*Oestrus ovis*). **Environ. Entomol.** **2**: 11-23.
- R. Sánchez-Andrade, A. Paz-Silva, J.L. Suárez, R. Panadero, J. Pedreira, P. Díez-Baños and P. Morrondo (2001). Effect of fasciolicides on the

- antigenaemia in sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. **Parasitol. Res.** **87**: 609–614.
- R. Sánchez-Andrade, J.L. Suárez, J. Pedreira, P. Díaz, M. Arias, A. Paz-Silva, R. Panadero, P. Díez-Baños, P. Morrondo and A. Scala (2005). Comparison of *Oestrus ovis* metabolic and somatic antigens for the immunodiagnosis of the zoonotic myasis oestrosis by immunoenzymatic probes. **Immunol. Invest.** **34**: 91–99.
- A. Scala, A. Paz-Silva, J.L. Suárez, C. López, P. Díaz, P. Díez-Baños and R. Sánchez-Andrade (2002). Chronobiology of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) in Sardinia, Italy: guidelines to chemoprophylaxis. **J. Med. Entomol.** **39**: 652–657.
- A. Scala, G. Solinas, C.V. Citterio, L.H. Kramer and C. Genchi (2001). Sheep oestrosis (*Oestrus ovis* Linné 1761, Diptera: Oestridae) in Sardinia, Italy. **Vet. Parasitol.** **102**: 133–141.
- G. Tabouret, C. Lacroux, O. Andreoletti, J.P. Bergeaud, Y. Hailu-Tolosa, H. Hoste, F. Prevot, C. Grisez, P. Dorchies and P. Jacquiet (2003). Cellular and humoral local immune responses in sheep experimentally infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). **Vet. Res.** **34**: 231–241.
- J.M. Yilma and Dorchies (1991). Epidemiology of *Oestrus ovis* in southwest France. **Vet. Parasitol.** **40**: 315–323.



**5.- CAPÍTULO III:
SEROPREVALENCIA DE OESTROSIS
Y QUIMIOTERAPIA**

The Veterinary Journal, 2009 (ACEPTADO PARA SU PUBLICACIÓN)

ANÁLISIS DE ANTICUERPOS SÉRICOS (IgA, IgM e IgG) PARA DETERMINAR LA SEROPREVALENCIA DE OESTROSIS OVINA Y EVALUAR UN TRATAMIENTO

J.A. Romero, M.S. Arias, J.L. Suárez, A. Paz-Silva, I. Francisco, F. Alonso¹, F.J. Cortiñas, P. Díaz, P. Morrondo, P. Díez-Baños, A. Scala², R. Sánchez-Andrade.

Departamento de Patología Animal, Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002-Lugo (Spain). ¹Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia (Spain).

²Dipartimento di Biologia Animale, Sezione di Parassitologia e Malattie Parassitarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Via Vienna 2, 07100 Sassari (Italy).

RESUMEN

Se desarrollaron dos experimentos para conocer la distribución y control de la oestrosis en ovejas. En el primero se realizó una encuesta serológica para conocer la prevalencia estacional de oestrosis en ovejas de una zona con clima oceánico (noroeste de España). En la primera experiencia, a lo largo de las 4 estaciones del año, se recogieron 669 muestras de sangre seleccionadas de forma aleatoria de ovejas adultas en

pastoreo, que se analizaron para evaluar la presencia de anticuerpos IgA, IgM e IgG mediante ELISA y antígenos de excreción/secreción de L2 de *Oestrus ovis*. En el segundo experimento se evaluó el efecto de un tratamiento con ivermectina sobre la respuesta inmunitaria humoral (IgA, IgM, IgG); para ello se tomaron dos muestras de sangre, una antes del tratamiento y otra después, en un rebaño de ovejas con oestrosis natural.

El porcentaje de animales positivos a IgA fue del 34%, a IgM del 54% y a IgG del 55%. La seroprevalencia más baja se observó en primavera frente a IgA e IgM, y en invierno para IgG. Los valores más elevados de positividad a IgA se observaron en otoño, a IgM en verano y a IgG en invierno.

No se observaron ovejas con valores positivos de IgM tras la administración del tratamiento, en tanto que la reducción mediante IgA-ELISA fue del 58% y del 27% con IgG-ELISA. Estos resultados parecen poner de manifiesto que la oestrosis es una enfermedad parasitaria que precisa vigilancia en regiones con clima oceánico. La valoración de la eficacia del tratamiento se puede realizar con el análisis de la respuesta sérica IgM.

PALABRAS CLAVE: ganado ovino, *Oestrus ovis*, ELISA, seroprevalencia, tratamiento

INTRODUCCIÓN

La oestrosis es una miasis nasal que afecta principalmente a pequeños rumiantes provocada por las larvas de la mosca *Oestrus ovis* (Linneo, 1761, Diptera: Oestridae). Aunque el ganado ovino parece ser el mejor hospedador (Papadopoulos *et al.*, 2006), *O. ovis* puede infestar otros rumiantes como las cabras. Se han publicado algunos casos de oftalmitis o miasis faríngea/nasal en personas, causadas por las larvas L1 del parásito (Delhaes *et al.*, 2001; Masoodi and Hosseini, 2003; Pérez *et al.*, 2008).

La presencia de oestrosis es una enfermedad endémica en áreas del Mediterráneo, donde temperaturas cálidas y periodos secos favorecen la fase externa de esta miasis (Caracappa *et al.*, 2000; Dorchies *et al.*, 2000; Scala *et al.*, 2002; Papadopoulos *et al.*, 2006). Sin embargo, algunas investigaciones probaron la existencia de oestrosis en ovejas de áreas cálidas de zonas como el Reino Unido o Alemania (Bates, 1997; Goddard *et al.*, 1999; Bauer *et al.*, 2002).

El desarrollo de larvas en las cavidades y senos nasales puede provocar signos acusados que podrían derivar en importantes pérdidas económicas (Dorchies *et al.*, 1998; Papadopoulos *et al.*, 2006).

La posibilidad de infestación en humanos subraya la necesidad de disponer de medidas apropiadas para su control, como la quimioterapia (Fekry *et al.*, 1997). Aunque existen diferentes antiparasitarios para el

tratamiento de oestrosis, no existe suficiente información sobre los procedimientos adecuados para evaluar su eficacia.

En el presente estudio se plantearon dos ensayos. El primero consistió en una encuesta serológica para determinar la prevalencia estacional de oestrosis en ovejas de un área con clima oceánico (NO España), mediante la valoración de la respuesta inmunitaria humoral IgA, IgM e IgG con una técnica ELISA y antígenos de excreción/secreción de larvas 2 *O. ovis*. En el segundo se analizó el efecto de un tratamiento con ivermectina sobre la respuesta inmunitaria humoral (IgA, IgM e IgG) en un rebaño con oestrosis natural.

Material y Métodos

Diseño del experimento 1

Entre el mes de diciembre de 2004 y noviembre de 2005, se recogieron muestras de sangre de 669 ovejas adultas (1-10 años), y los sueros se conservaron a -35C hasta su empleo. Las muestras se obtuvieron de forma aleatoria en invierno, primavera, verano y otoño (Tabla 1).

La mayoría de los rebaños salen durante el día al pasto, y se recogen en los establos durante la noche. Los corderos nacen en noviembre-diciembre, y se destetan con aproximadamente 1 mes de edad.

La alimentación de los rebaños en el pasto consiste en especies vegetales naturales, caracterizadas por variedades anuales.

Diseño del experimento 2

Se utilizó un rebaño de 100 ovejas adultas para evaluar el efecto de un tratamiento a base de ivermectina sobre la respuesta inmunitaria humoral frente a los antígenos de L2 de *O. ovis*. En el mes de noviembre de 2005 se administró el tratamiento a 80 animales, y los otros 20 se mantuvieron sin tratar como testigos.

Un mes después de la administración de la lactona macrocíclica, se recogieron 2 muestras de sangre de cada animal.

Preparación de antígenos de excreción/secreción de L2 de *O. ovis*

Basándonos en los resultados de estudios previos (Suárez *et al.*, 2005), consideramos adecuada la utilización de estos productos antigénicos. Las larvas 2 se obtuvieron de ovejas infestadas de forma natural y sacrificadas en un matadero de Sassari (Cerdeña, Italia). Las L-2 se lavaron en tampón fosfato PBS (pH 7.4) y a continuación se mantuvieron en medio líquido RPMI a temperatura ambiente durante 6 horas. El medio se recogió, se dializó de forma exhaustiva frente a agua y se liofilizó para asegurar su correcta conservación.

ELISA

Los sueros se analizaron mediante un ELISA indirecto y productos de excreción/secreción de L2 de *O. ovis* (Suárez *et al.*, 2005). El antígeno se diluyó en PBS hasta una concentración de $3 \mu\text{g ml}^{-1}$ para sensibilizar los pocillos de placas de microtitulación (Costar[®], Corning Inc., NY, USA). Para analizar la respuesta IgG, se añadieron los sueros (diluidos 1:50 en PBS con 0'05% Tween y 1% de leche descremada); como inmunoconjugado se empleó rabbit anti-ovine IgG (Sigma-Aldrich Co., MO, USA) a 1:1.500 y las absorbancias se leyeron en un espectrofotómetro de placas a 492 nm (Titertek Multiskan[®], Hämmelina, Finland).

Para evaluar las respuestas IgA e IgM, se empleó una concentración de antígeno de 10 y $2 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente; los sueros se utilizaron a 1:50, como segundo anticuerpo se emplearon mouse anti-ovine IgA y IgM a 1:500 y 1:750, respectivamente, mientras que como inmunoconjugado se empleó HRP-labelled rabbit anti-mouse IgG a 1:500 y 1:1000.

Como sueros testigo positivos y negativos se utilizaron muestras de 5 ovejas infestadas y de otras 5 no infestadas. Los sueros positivos se obtuvieron de ovejas que en la necropsia tenían un número elevado de larvas de *O. ovis*. Las muestras séricas negativas procedían de 5 corderos que siempre se mantuvieron estabulados para evitar la infestación por el parásito. El punto de corte se determinó como el valor medio de las densidades ópticas de los sueros negativos más 3 veces la desviación

estándar (Suárez *et al.*, 2005). De este modo, se consideraron como valores positivos absorbancias superiores a 0'3415 para la IgG, de 0'3241 para la IgA y de 0'3634 para la IgM.

Valoración del tratamiento

La eficacia de la ivermectina se determinó mediante el cálculo de la reducción de los valores de los porcentajes de ovejas positivas (Porcentaje de Eficacia 1, PE1) y de los valores de absorbancias (PE2) según las fórmulas:

$$PE1 = \frac{N \text{ ovejas positivas} - N \text{ ovejas negativas}}{N \text{ ovejas positivas}} \times 100$$

$$PE2 = \frac{DO \text{ ovejas positivas} - DO \text{ ovejas negativas}}{DO \text{ ovejas positivas}} \times 100$$

Variaciones de parámetros climáticos

Para establecer el modelo climático del área donde se desarrolló el estudio, se recogieron los valores medios mensuales de temperatura máxima, mínima, precipitación y humedad relativa. Los valores se obtuvieron de estaciones meteorológicas automatizadas.

Análisis estadístico

La presencia de diferencias entre los diferentes parámetros se estableció con ayuda de análisis de varianza (ANOVA), considerando que existía significación si $p < 0'05$.

Se aplicó el test de Pearson para analizar las correlaciones entre las diferentes variables consideradas. Todas las pruebas se realizaron con el programa SPSS, versión 15 (SPSS Inc., 2007).

Los resultados de seroprevalencia se expresaron como porcentajes y el Intervalo de Confianza al 95% (IC 95%).

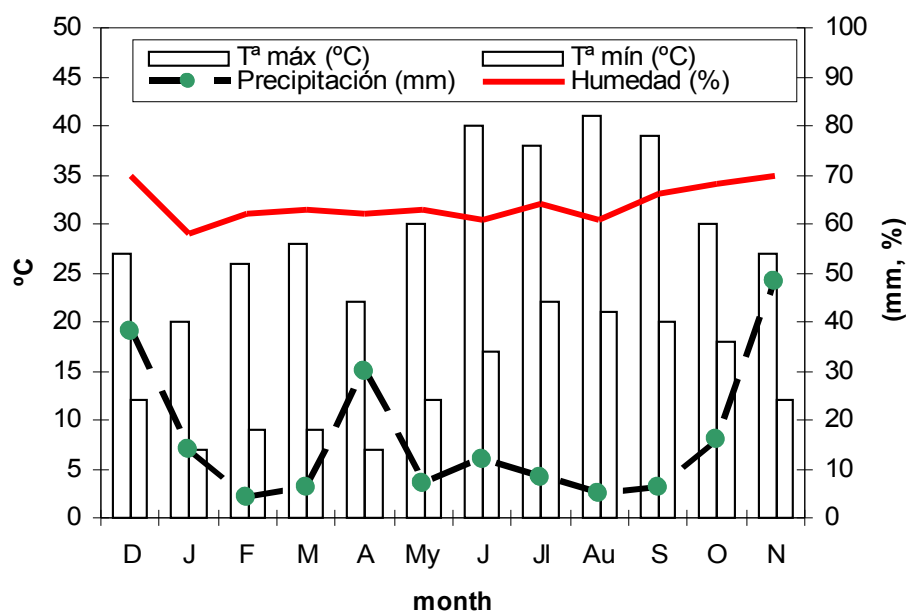
RESULTADOS

Modelo climático

Los valores medios mensuales de la temperatura máxima y mínima, precipitaciones y humedad relativa se representan en la Figura 1. La precipitación más elevada se obtuvo en noviembre-diciembre y después en abril. Las temperaturas más altas se obtuvieron en los meses de verano y las más bajas en los de invierno. El porcentaje de humedad relativa alcanzó valores más o menos constantes durante todo el año, oscilando entre el 58% en enero y el 71% en noviembre.

Figura 1.- Parámetros climáticos característicos de un clima oceánico

(NO de España)



Experimento 1

Las variaciones en la seroprevalencia de oestrosis se resumen en la Tabla 1. El porcentaje de animales positivos a IgA varió entre el 17% (11, 23) en invierno y el 54% (47, 61) en otoño; la seroprevalencia de IgM osciló entre el 48% (40, 56) en verano y el 60% (52, 68) en invierno, en tanto que la seroprevalencia de ovejas con valores considerados positivos de IgG se situó entre el 31% (24, 38) en invierno y el 75% (68, 82) en verano. Estas diferencias resultaron significativas mediante análisis de Chi cuadrado ($p < 0'05$).

En la Tabla 1 se representan los valores de absorbancias IgA, IgM e IgG. Tal como se había observado para las seroprevalencias, los mayores valores se obtuvieron en otoño para la IgA, en invierno para la IgM y en verano para la IgG. Con ANOVA se comprobó que estas diferencias eran significativas ($p < 0'05$).

Mediante el análisis de Pearson, se observó que las absorbancias IgA e IgM estaban correlacionadas ($r^2 = 0'618$, $p = 0'001$).

Tabla 1.- Prevalencia estacional de oestrosis determinada mediante anticuerpos séricos (IgA, IgM and IgG) en un área con clima oceánico (NO de España) ($n = 669$). Valores de absorbancia (expresados como media \pm SD) frente a antígeno de excreción / secreción de L-2 de *Oestrus ovis*.

ESTACIÓ N	Nº	IgA		IgM		IgG	
		Positive	OD	Positive	OD	Positive	OD
Otoño	174	94	0'160 \pm 0'028	92	0'363 \pm 0'124	129	0'721 \pm 0'225
Invierno	163	28	0'092 \pm 0'032	98	0'584 \pm 0'142	51	0'474 \pm 0'256
Primavera	169	56	0'123 \pm 0'039	96	0'491 \pm 0'297	66	0'475 \pm 0'174
Verano	163	49	0'150 \pm 0'042	78	0'261 \pm 0'133	122	0'812 \pm 0'381
Estadística		$\chi^2 = 20'205$ $P = 0'011$	F = 22'061 $P = 0'001$	$\chi^2 = 10'119$ $P = 0'018$	F = 8'126 $P = 0'022$	$\chi^2 = 14'233$ $P = 0'008$	F = 13'958 $P = 0'003$

El análisis global de la respuesta inmunitaria humoral frente a los antígenos de larvas 2 de *O. ovis* se muestra en la Tabla 2. El porcentaje de ovejas positivas sólo a IgM o IgG fue similar (11-12%; 9, 13), y no se observaron casos únicamente con valores positivos de IgA.

Tabla 2.- Respuesta humoral (IgA, IgM, IgG) frente a antígeno excretor / secretor de L-2 de *Oestrus ovis* en ovejas mantenidas en pastoreo en un área con clima oceánico (NW de España) (n= 669).

IgA	IgM	IgG	n
-	-	-	178
+	-	-	0
-	+	-	79
-	-	+	74
+	+	-	44
+	-	+	53
-	+	+	111
+	+	+	130

El porcentaje de ovejas positivas a alguna de las inmunoglobulinas fue del 73% (70, 76), variando entre el 34% (30, 38) a IgA, 54% (50, 58) a IgM y 55% (51, 59) a IgG. Al determinar la presencia de respuestas múltiples, comprobamos que el 7% (5, 9) de las ovejas eran positivas a IgA + IgM, el 8% (6, 10) a IgA + IgG, y el 17% (14, 20) a IgM + IgG. Al considerar las 3 inmunoglobulinas, la seroprevalencia de oestrosis fue del

19% (16, 22). Se estableció una correlación significativa entre el diagnóstico de IgA y de IgM ($\kappa= 0'179, p= 0'030$).

Experimento 2

Antes de la administración de la ivermectina, la seroprevalencia de oestrosis en el grupo G-T varió entre el 41% (31, 51) por ELISA-IgA y el 62% (52, 72) por ELISA-IgG (Tabla 3).

Tabla 3.- Evaluación mediante el estudio de la respuesta inmune (IgA, IgM and IgG) de la eficacia de un tratamiento con ivermectina frente a larvas de *Oestrus ovis*.

		IgA		IgM		IgG	
G-T (80)	0	41	0.1202 ± 0.074	48	0.391 ± 0.214	62	0.677 ± 0.284
	1	17	0.042 ± 0.020	0	0.1450 ± 0.0917	35	0.302 ± 0.170
	PE1	59%		100%		43%	
	PE2	31%		61%		41%	
Statistics	$\chi^2= 11.268$ $P= 0.003$	$F= 32.860$ $P= 0.001$	$\chi^2= 38.254$ $P= 0.001$	$F= 54.225$ $P= 0.001$	$\chi^2= 20.205$ $P= 0.011$	$F= 62.418$ $P= 0.001$	
	Sample	Positive	OD	Positive		Sample	Positive
G-C (20)	0	10	0.131 ± 0.062	9	0.423 ± 0.183	13	0.668 ± 0.232
	1	10	0.129 ± 0.073	9	0.399 ± 0.196	11	0.644 ± 0.224

No se observaron ovejas positivas a IgM después de la administración de la ivermectina, y el porcentaje de animales positivos a IgA e IgG experimentó una reducción significativa.

El porcentaje de eficacia 1 (PE1) fue del 59% (49, 69) para la IgA y del 43% (33, 53) para la IgG. No se observaron variaciones en la seroprevalencia del G-C.

Mediante ELISA se comprobó que existía una reducción significativa en los valores de absorbancias, y el PE2 alcanzó cifras del 61% para la IgM y el 41% para la IgG (Tabla 3). Con ANOVA se observaron diferencias para las densidades ópticas IgA, IgM e IgG en el G-T ($p < 0'05$), en tanto que las absorbancias fueron similares en el G-C. Es importante destacar que ninguna de las ovejas tratadas mostró efectos adversos o alteraciones después de la administración de la ivermectina.

DISCUSIÓN

En investigaciones previas se ha demostrado que bajo condiciones climáticas desfavorables, caracterizadas por temperaturas bajas, elevadas precipitaciones y porcentajes de humedad relativa, las larvas 1 de *O. ovis* están en la fase de diapausa (Scala *et al.*, 2002). En el área en la que se efectuó el presente estudio, estas condiciones se dan entre los meses de octubre y abril. Las condiciones climáticas mejoran de mayo a septiembre, observándose un incremento significativo de la temperatura junto con una reducción de las precipitaciones.

La presencia de larvas L1 quiescentes en las cavidades nasales, fenómeno que predomina en el periodo de diapausa, se ha relacionado con un incremento de la intensidad de la respuesta inmunitaria IgM (Suárez *et al.*, 2005). En el presente estudio, la observación de los mayores valores de IgM en invierno y primavera, cuando las condiciones son desfavorables para el desarrollo de la fase externa de *O. ovis*, podría asociarse a la actividad reducida de las L1 en las ovejas infestadas, como se demostró en investigaciones previas.

Diversos estudios muestran que el metabolismo activo de las larvas de *O. ovis* en el interior de las cavidades nasales, caracterizada por el desarrollo de L1 a L2 y a L3, estimula la síntesis de anticuerpos IgG (Dorchies *et al.*, 1998; Goddard *et al.*, 2002). En ovejas mantenidas en pastoreo, se comprobó que la respuesta IgG aumentaba en verano-otoño y disminuía en invierno-primavera, lo que parece sustentar la hipótesis de que durante estos periodos transcurren las fases activa y de diapausa, respectivamente (Scala *et al.*, 2002).

Se ha dedicado escasa atención a la interpretación de los resultados de serología que proceden del análisis de la respuesta inmunitaria humoral frente a *O. ovis*. Suárez *et al.* (2005) demostraron en corderos de primer año de pastoreo que los valores de IgA eran bajos y que aumentaban débilmente después de la infestación. Esta respuesta inmunitaria se ha asociado con frecuencia a un estímulo local en el epitelio de conductos, mucosas, etc., lo que podría explicar los bajos valores de

IgA en las muestras analizadas. En el presente estudio, las asorbancias IgA más elevadas coincidieron con las condiciones externas favorables para la fase de salida del parásito, de modo que parece muy probable la asociación entre estas dos observaciones. Por el contrario, la respuesta IgA más reducida tuvo lugar en invierno, lo que podría indicar la reducción del metabolismo de las larvas de *O. ovis* durante esta estación, de acuerdo con los resultados obtenidos para la respuesta IgG.

Se ha demostrado que la oestrosis es endémica en pequeños rumiantes en áreas de clima mediterráneo como el sur de Europa (Papadopoulos *et al.*, 2007; Caracappa *et al.*, 2000; Dorchies *et al.*, 2000; Scala *et al.*, 2002). Sin embargo, en una encuesta desarrollada en el suroeste de Alemania, Bauer *et al.* (2002) comprobaron mediante el análisis de la respuesta IgG que la seroprevalencia de oestrosis ovina era del 50%. Estos resultados coinciden con los de Bates (1997) en los condados más cálidos del Reino Unido.

Si consideramos la asociación entre la respuesta IgM y la presencia de L1 en las cavidades nasales, el hallazgo de que ninguna oveja era positiva a IgM después del tratamiento con ivermectina parece indicar que la lactona macrocíclica provocó la eliminación de las larvas L1 de *O. ovis* en los animales tratados.

La reducción significativa en las respuestas IgA e IgG en las ovejas tratadas podría atribuirse a una disminución en el estímulo antigénico provocado por la presencia de larvas del parásito. Estos resultados

subrayan la utilidad de este ensayo para evaluar la eficacia de un tratamiento con ivermectina, evitando la necesidad del sacrificio de los animales.

CONCLUSIONES

Estos resultados demuestran que la infestación por *Oestrus* es importante en pequeños rumiantes de áreas con un clima *a priori* no demasiado favorable, como en el noroeste de España, donde concurren condiciones climáticas de tipo oceánico, de modo que se deben tener en cuenta medidas encaminadas a su control. Con este propósito, se desarrolló un ensayo para estimar la utilidad del estudio de la respuesta inmunitaria humoral para evaluar la eficacia de un tratamiento con ivermectina en ovejas con oestrosis natural. La lactona se administró en noviembre, de acuerdo a las indicaciones de Scala *et al.* (2002), quienes recomendaron la quimioterapia en la fase de diapausa, puesto que de esta forma se evitaría el desarrollo de L1 a L2, y de L2 a L3.

En este estudio concluimos que la oestrosis también es una miasis extendida en los pequeños rumiantes de áreas de clima oceánico. El control de estas parasitosis se puede realizar mediante la administración de un tratamiento, y su eficacia valorada mediante el análisis de la respuesta IgM.

CONFLICTO DE INTERÉS

Ninguno de los autores de este trabajo ha tenido relación contractual o persona con otras personas u organizaciones que podrían influir desfavorablemente en el contenido de este artículo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean hacer público su agradecimiento a B. Valcárcel por su valiosa contribución en la edición del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

Alcaide, M., Reina, D., Sánchez-López, J., Frontera, E., Navarrete, I. (2005). Seroprevalence of *Oestrus ovis* (Diptera, Oestridae) infestation and associated risk factors in ovine livestock from southwestern Spain. **Journal of Medical Entomology** **42**, 327-331.

Bates, P.G. (1997). The sheep nasal bot fly (*Oestrus ovis*): a forgotten parasite. In: **Proceedings of the Meeting of the Sheep Veterinary Society, Buxton, UK**: 47-52.

Bauer, C., Steng, G., Prevot, F., Dorchies, P. (2002). Seroprevalence of *Oestrus ovis* infection in sheep in southwestern Germany. **Veterinary Parasitology** **110**: 137-143.

Caracappa, S., Rilli, S., Di Marco, V., Dorchies, P. (2000). Epidemiology of ovine oestrosis (*Oestrus ovis* Linné 1761, Diptera: Oestridae) in Sicily. **Veterinary Parasitology** **92**: 233-237.

Delhaes, L., Bourel, B., Pinatel, F., Cailliez, J.C., Gosset, D., Camus, D., Dei-Cas, E. (2001). Human nasal myiasis due to *Oestrus ovis*. **Parasite 8**: 289-296.

Dorchies, P., Duranton, C., Jacquiet, P. (1998). Pathophysiology of *Oestrus ovis* infection in sheep and goats: a review. **Veterinary Record 142**: 487-489.

Dorchies, P., Bergeaud, J.P., Tabouret, G., Duranton, C., Prevot, F., Jacquiet, P. (2000). Prevalence and larval burden of *Oestrus ovis* (Linné 1761) in sheep and goats in northern mediterranean region of France. **Veterinary Parasitology 88**: 269-273.

Fekry, A.A., el Serougi, A.O., Ayoub, S.A. (1997). *Oestrus ovis* (sheep nasal fly) infesting the eyes and the nose of a camel keeper family. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology 27**: 493-496.

Goddard, P., Bates, P., Webster, K.A. (1999). Evaluation of a direct ELISA for the serodiagnosis of *Oestrus ovis* infections in sheep. **Veterinary Record 144**: 497-501.

Habela, M., Moreno, A., Gragera-Slikker, A., Gómez, J.M., Montes, G., Rodríguez, P., Alvinerie, M. (2006). Efficacy of eprinomectin pour-on in naturally *Oestrus ovis* infested merino sheep in Extremadura, South-West Spain. **Parasitology Research 99**, 275-280.

Hemmersbach-Miller, M., Sánchez-Andrade, R., Domínguez-Coello, A., Meilud, A.H., Paz-Silva, A., Carranza, C., Pérez-Arellano, J.L. (2008). Human *Oestrus* sp. infection, Canary islands. **Emergent and Infectious Diseases 13**: 950-952.

Lucientes, J., Castillo, J.A., Ferrer, L.M., Peribáñez, M.A., Ferrer-Dufol, M., Gracia-Salinas, M.J. (1998). Efficacy of orally administered ivermectin against larval stages of *Oestrus ovis* in sheep. **Veterinary Parasitology 75**: 255-259.

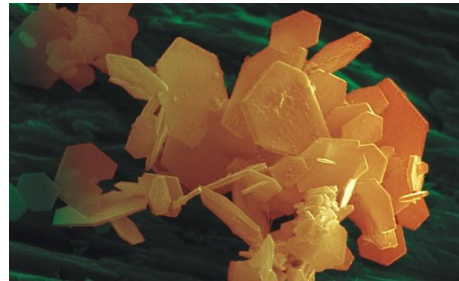
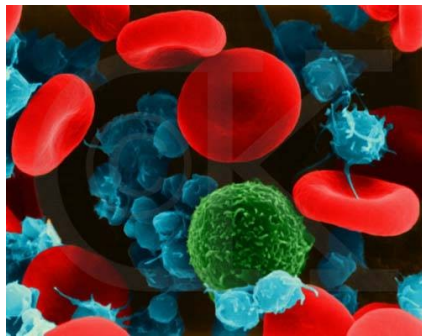
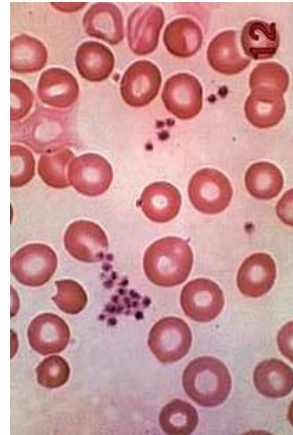
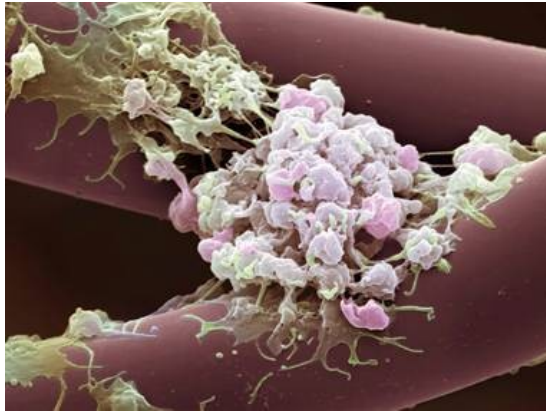
Masoodi, M., Hosseini, K. (2003). The respiratory and allergic manifestations of human myiasis caused by larvae of the sheep bot fly (*Oestrus ovis*): a report of 33 pharyngeal cases from southern Iran. **Annals of the Tropical and Medicine Parasitology 97**: 75-81.

Papadopoulos, E., Prevot, F., Diakou, A., Dorchie, P. (2006). Comparison of infection rates of *Oestrus ovis* between sheep and goats kept in mixed flocks. **Veterinary Parasitology 138**: 382-385.

Sánchez-Andrade, R., Romero, J.A., Suárez, J.L., Pedreira, J., Díaz, 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. **Immunological Investigations 34**: 91-99.

Scala, A., Paz-Silva, A., Suárez, J.L., López, C., Díaz, P., Díez-Baños, P., Sánchez-Andrade Fernández, R. (2002). Chronobiology of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) in Sardinia, Italy: guidelines to chemoprophylaxis. **Journal of Medical Entomology 39**: 652-657.

Suárez, J.L., Scala, A., Romero, J.A., Paz-Silva, A., Pedreira, J., Arias, M., Díaz, P., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Sánchez-Andrade, R. (2005). Analysis of the humoral immune response to *Oestrus ovis* in ovine. **Veterinary Parasitology 134**: 153-158.



**6.- CAPÍTULO IV:
ALTERACIONES DE LOS
PARÁMETROS HEMÁTICOS EN
OVEJAS CON OESTROSIS
NATURAL**

Variaciones de los parámetros hemáticos en ovejas con oestrosis natural

INTRODUCCIÓN

En general los signos clínicos y las lesiones se corresponden con las fases del ciclo evolutivo del parásito. La presencia de L-1 se ha asociado a posiciones de encorvamiento en el ganado ovino. Cuando las larvas adquieren mayor tamaño llegan a obstruir los orificios sinusales, impidiendo el drenaje de dichos senos y apareciendo procesos sinusíticos, sobre todo en épocas otoñales e invernales (Tabouret *et al.*, 2001). Estas obstrucciones también pueden aparecer en la cavidad esofágico-traqueal, y pueden dar lugar a trastornos respiratorios como disnea, taquipnea, ronquidos, estertores, lagrimeo, rinorrea, etc.

Las moscas adultas producen desasosiego, y estados de estrés en el ganado ovino, que pueden provocar carreras aisladas, incluso estampidas, capaces de provocar traumatismos (Lancaster y Meisch, 1986). Sanyal *et al.* (1986) observaron que en ovejas con oestrosis se producía una ganancia de peso de 3'52 kg a los 2 meses de la administración de un tratamiento con rafoxanida.

La mayoría de las investigaciones que tratan de establecer la patogenicidad de las larvas de *O. ovis* se han centrado en el estudio de las mucosas de las vías respiratorias (Duranton *et al.*, 1997; Tabouret *et al.*,

2003; Jacquet *et al.*, 2005). Existen muy pocos estudios en los que se hayan valorado los parámetros hemáticos de ovejas con oestrosis. Terefe *et al.* (2005) después de infectar experimentalmente ovejas con *O. ovis*, comprobaron que el número de eosinófilos alcanzaba a la 3ª semana p.i. valores de 450.000 ml^{-1} de sangre; estos autores no detectaron anemia en las ovejas infectadas.

Con objeto de proporcionar mayor información acerca de las alteraciones provocadas por la infestación de larvas de *O. ovis* en las ovejas a nivel sistémico, se desarrolló un estudio en el que se analizaron las variaciones de los parámetros hemáticos de las series roja y blanca en ovejas de la Comunidad Autónoma Gallega. Estos resultados se relacionaron con el diagnóstico de oestrosis mediante el análisis de las respuestas inmunitarias humorales IgA, IgM e IgG.

MATERIAL Y MÉTODOS

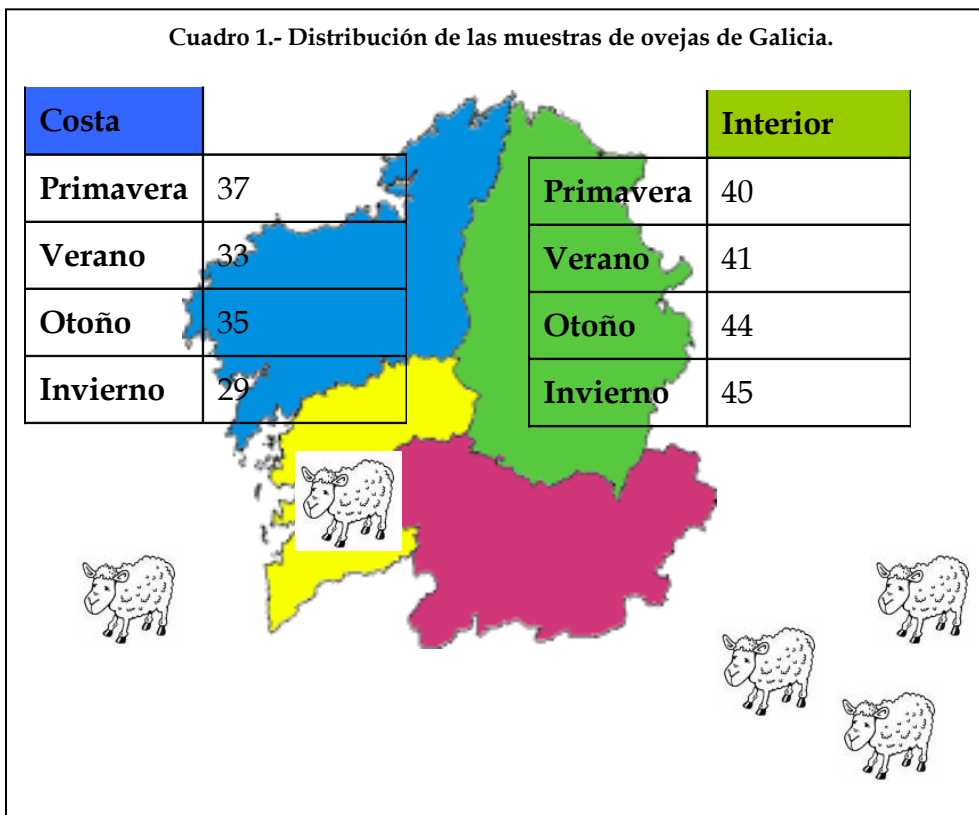
Diseño experimental

Durante el año 2004 se recogieron 2 muestras de sangre (una con heparina y otra sin ella) de 304 ovejas seleccionadas de forma aleatoria de dos zonas diferentes de Galicia. Zona I, 134 muestras de la Costa de A Coruña, y Zona II, 170 muestras de la zona interior de Lugo. Las muestras se obtuvieron en los periodos de primavera, verano, otoño e invierno, como se aprecia en el cuadro nº 1. La estimación del número de muestras necesario se hizo considerando un valor de precisión (I) de 0'06, y una

prevalencia del 50%, de forma que se necesitarían 267 muestras (Thrusfield, 1997).

La sangre heparinizada se analizó en un Coulter-Counter con objeto de establecer el grado de alteración que supone la presencia de oestros en la cavidad nasal. Las muestras sin heparina se dejaron desuerar a temperatura ambiente; los sueros se analizaron mediante un ELISA y antígeno OL2ES, para determinar la cinética de IgG, IgA e IgM.

Cuadro 1.- Distribución de las muestras de ovejas de Galicia.



	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Total
Total	77	74	79	74	304

Obtención de antígenos de excreción secreción de *Oestrus ovis*.

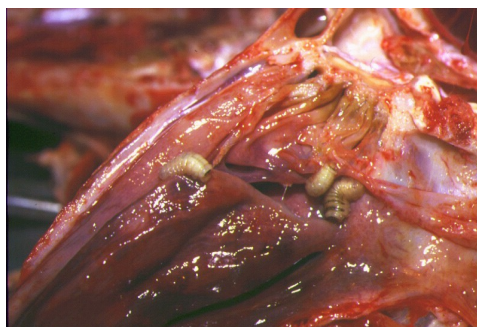
El proceso seguido para conseguir antígenos de excreción/secreción de larvas 2 de *O. ovis* (OL2ES) se inició con la obtención de 208 cabezas de ovejas sacrificadas en un matadero local de Sassari (Cerdeña, Italia); las cabezas se abrieron en sentido sagital para recoger las larvas del parásito (Yilma y Dorchies, 1991) (cuadro nº 2).

Las larvas identificadas como L-2 se lavaron en tampón fosfato PBS, y a continuación se incubaron en estufa a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5% durante 3 días, renovándose el medio cada 6-8 horas aproximadamente (Suárez *et al.*, 2005). El antígeno así obtenido se pasó por un filtro de 0'22 µm para eliminar los detritus, y se congeló a -80°C. Se calculó la concentración proteica antes de su utilización mediante el kit BCA[®] (Pierce, Illinois, USA).

ELISA-indirecto

Las muestras se analizaron mediante un ELISA y antígeno de excreción-secreción de larvas 2 de *O. ovis* (cuadro 7) (Scala *et al.*, 2002). Se utilizaron placas de microtitulación de P.T.E.G. (polyethylene terephthalate glycol) de fondo plano (Costar, Fast-Binder). Con el fin de minimizar en lo posible las variaciones debidas a las placas, todas las que se emplearon pertenecían al mismo lote. Las sales y detergentes empleados para la preparación de soluciones tampón fueron de la firma Panreac.

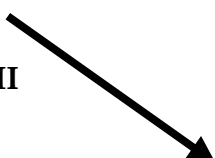
Cuadro 2.- Obtención de antígenos OL2ES.



Lavado de larvas L2 en
tampón fosfato PBS



Medio de incubación RPMI



Incubación a 37° C y atmósfera de CO₂ al 5% durante 3 días.

Las soluciones utilizadas en el ELISA fueron:

Tampón fosfato salino (PBS) pH= 7,5

- Cloruro sódico (NaCl) 0'14 M
- Cloruro potásico (KCl) 2'7 mM
- Fosfato monopotásico (KHPO₄) 1'5 mM
- Fosfato disódico (Na₂HPO₄) 8 mM

Tampón citrato fosfato pH= 4

- Ácido cítrico 24'3 mM
- Fosfato disódico 51'4 mM

PBS-Tween (PT)

- Detergente Tween 20 diluido al 0'1% en PBS

PTL

- Leche en polvo diluida al 2% en PT

Ácido sulfúrico 3N

Antes de procesar las muestras séricas, y con objeto de determinar cuáles eran las condiciones en las que se obtenían mayores diferencias entre los sueros de animales infectados (positivos) y de los testigos (negativos), se hicieron las pruebas correspondientes con diferentes diluciones de los antígenos, sueros e inmunoconjugados. Además, en cada placa se disponían un grupo de sueros positivos y otro de negativos, que procedían de muestras de animales cuyos antecedentes respecto a su infección por *O. ovis* se conocían. El protocolo de la técnica ELISA para la detección de IgG se recoge en el Cuadro 3.

Cuadro 3.- Protocolo del ELISA-indirecto para la detección de anticuerpos específicos (IgG) en sueros de corderos.	
1. Sensibilización de las placas.	OL2ES 3 μg proteína ml^{-1}
2. Bloqueo puntos unión inespecífica.	PBS + Tween + leche desnatada
3. Muestras problema.	Sueros 1/50
4. Inmunoconjugado.	Marcado con peroxidasa 1/1500
5. Substrato.	OPD + citrato + H_2O_2

La determinación de IgM e IgA se hizo de acuerdo al protocolo anterior, con algunas modificaciones: la concentración de OL2ES fue de 2 y 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente, y se utilizó como inmunoconjugados mouse anti-ovine IgM e IgA a 1/750 y 1/500 (Suárez *et al.*, 2005).

Para determinar si un suero se consideraba positivo o negativo frente a OL2ES, se estableció el **punto de corte**, que se calculó como el valor medio de las absorbancias del G-2 más 3 veces la desviación estándar (Scala *et al.*, 2002), de modo que este valor resultó 0'3634 para la IgM, 0'1123 para la IgA y 0'3415 para la IgG.

Análisis hematológicos

Como se expuso con anterioridad, de cada animal se extrajeron 2 muestras de sangre, una con heparina y otra sin ella. En las muestras heparinizadas se determinó la cifra total de eritrocitos y glóbulos blancos, y contenido en hemoglobina, utilizando para ello un contador hematológico electrónico semi-automático Microcell Counter modelo F-

800 (Sysmex®), que emplea un diluyente isotónico (Cellpack®) cuyos componentes activos son:

NaCl	6'38 g l ⁻¹
Ácido bórico	1'0 g l ⁻¹
Tetraborato de Na ⁺	0'2 g l ⁻¹
Heparina sódica	

Además, se utilizó un hemolizante diferencial para dos poblaciones (Quicklyser II®).

Los valores de hematocrito se determinaron mediante la técnica de Strumia *et al.* (1954), que consiste en el empleo de tubos capilares de 75 x 1'1 mm muy heparinizados en un borde, que se llenaban de sangre por capilaridad. A continuación se sellaban con plastilina y se centrifugaban a 1500 x g durante 6 minutos en una centrífuga orto-clino. Posteriormente, con ayuda de una regla graduada se calculó la proporción porcentual del volumen globular con respecto al total.

Análisis estadístico

Todos los datos recogidos en las distintas fases de este estudio se procesaron con ayuda de la hoja de cálculo Microsoft Excel versión 12. El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS para Windows versión 12.

En el apartado de estadística descriptiva, se determinó la *media* como indicador de tendencia y la *desviación típica* como medida de dispersión. Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó un análisis de varianza. La relación o dependencia entre las diferentes variables se midió mediante el análisis de correlación de rangos de Pearson.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a) Seroprevalencia de oestrosis en ganado ovino de Galicia

Para conocer la presencia de anticuerpos frente a *O. ovis* en ganado ovino de Galicia, se llevó a cabo una encuesta en la que se analizó la presencia de las inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA frente a los antígenos de excreción/secreción de larvas 2 del parásito (OL2ES).

El porcentaje de ovinos con valores considerados positivos para la IgG fue del 68'8% (209/304), del 33'5% (102/304) para la IgM y del 54'3% (165/304) para la IgA (cuadro 9).

Se han desarrollado algunos estudios para establecer la seroprevalencia de oestrosis mediante ELISA-indirecto, en los que se ha evaluado la respuesta IgG. En el sur de España, Ruíz-Martínez *et al.* (1993) observaron que el 56'5% de las ovejas tenían valores de IgG considerados positivos frente a *O. ovis*, y en un estudio posterior, Reina *et al.* (2000) comprobaron que este porcentaje era del 80'4% en Extremadura.

Caracappa *et al.* (2000) obtuvieron en ovinos de Sicilia (Italia) un porcentaje similar al observado en el presente estudio (55'1%) y fue inferior al observado en Cerdeña (91%) por Scala *et al.* (2001). En Alemania, Bauer *et al.* (2002) observaron que el porcentaje de ovejas del suroeste del país con anticuerpos frente a *O. ovis* oscilaba entre el 48 y el 53%.

Como se aprecia en el Cuadro 4, las seroprevalencias más elevadas se obtuvieron en verano para la IgG, invierno para la IgM y en primavera para la IgA. No se observaron diferencias significativas de estos porcentajes en relación con la época de toma de muestras. Dorchies y Alzieu (1997) afirmaron que cuando las condiciones climáticas son desfavorables, en especial temperaturas bajas y porcentajes elevados de humedad relativa, tiene lugar la fase de diapausa, y las larvas de *O. ovis* están inactivas.

Cuadro 4.- Porcentaje de ovejas positivas a la detección de diferentes inmunoglobulinas frente a OL2ES.			
	IgG	IgM	IgA
Primavera	31'5	30'3	63'4
Verano	89'7	14'6	29'3
Otoño	85'2	30'1	60'3
Invierno	72'5	51'9	51'9
<i>Media</i>	68'8	33'5	54'3

Es importante tener en cuenta que en la zona donde se desarrolló el presente estudio, las condiciones climáticas son especialmente adversas para el desarrollo del ciclo del parásito en invierno y primavera, dado que se alcanzan las temperaturas mínimas del año, y las precipitaciones son abundantes. Por el contrario, en verano y principios de otoño las temperaturas son moderadas-elevadas y las precipitaciones son escasas, lo que favorece la fase exógena del ciclo de *Oestrus*.

b) Estudio hematológico de ganado ovino en Galicia

Con objeto de establecer la existencia de alteraciones patológicas asociadas al padecimiento de oestrosis, y concretamente su influencia sobre algunos parámetros sanguíneos, se analizó una muestra de sangre entera de cada uno de los ovinos empleados, y los resultados se compararon con el diagnóstico obtenido tras el análisis de las diferentes inmunoglobulinas.

En el cuadro 5 se pueden observar los valores medios de los parámetros sanguíneos en función de la respuesta **IgM**. En las células de la serie roja sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las cifras de plaquetas; en la serie blanca se obtuvieron diferencias en los leucocitos y porcentajes de linfocitos, monocitos y granulocitos. Las ovejas consideradas positivas a oestrosis alcanzaron valores más altos de linfocitos, y más bajos de monocitos y granulocitos.

Cuadro 5.- Parámetros hemáticos y su relación con la respuesta IgM.				
	IgM -	IgM +	F	P
Eritrocitos	11'06 ± 2'39	10'58 ± 3'26		> 0'05
Hemoglobina	10'68 ± 2'55	9'87 ± 1'47		> 0'05
Hematocrito	45'98 ± 10'23	41'78 ± 5'62		> 0'05
Plaquetas	235'22 ± 102'35	156'76 ± 73'46	8'296	0'006
Leucocitos	5'28 ± 1'92	7'20 ± 3'15	8'452	0'005
% Linfocitos	53'27 ± 12'98	68'11 ± 12'12	16'59	0'001
% Monocitos	10'45 ± 2'71	7'74 ± 3'78	9'687	0'003
% Granulocitos	33'99 ± 10'44	24'15 ± 9'15	11'625	0'001

Diversos estudios han asociado la respuesta IgM a la presencia de L-1 en la cavidad nasal de las ovejas (Jacquet *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2005). Las larvas 1 de *O. ovis* se alimentan de mucus, células descamadas, etc., y están provistas de unos ganchos en su cutícula que pueden provocar pequeñas hemorragias en la mucosa nasal (Bart y Minar, 1992; Innocenti *et al.*, 1995). La observación de un descenso significativo de los niveles de plaquetas en las ovejas positivas a IgM podría ser debido a su participación en la resolución de pequeñas hemorragias en la mucosa.

En el presente estudio no se apreciaron diferencias en los valores de hematocrito, lo que coincide con los resultados obtenidos por Terefe *et al.* (2005).

Cuando las L-1 penetran en la cavidad nasal, estimulan de forma específica la producción de linfocitos (Jacquet *et al.*, 2005), al tiempo que

granulocitos y monocitos disminuyen con objeto de reducir o dificultar el avance de las larvas, mediante una serie de reacciones tisulares de naturaleza inflamatoria entre las que destacan los granulomas (Tabouret *et al.*, 2003). Esto podría explicar la reducción significativa de monocitos y granulocitos que se apreció en las ovejas que presentaban valores considerados positivos de IgM frente a los productos OL2ES. En diversos estudios se ha demostrado que en la mucosa del tracto respiratorio superior de ovejas con oestrosis se produce un incremento significativo de mastocitos y eosinófilos, mientras que su presencia en el torrente sanguíneo se reduce notablemente (Nguyen *et al.*, 1996; Yacob *et al.*, 2004).

El cuadro 6 recoge los valores medios de los diferentes parámetros sanguíneos teniendo en cuenta si los animales presentaban valores considerados positivos de **IgG** o no. Como se puede comprobar, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las cifras de leucocitos, y porcentajes de linfocitos, monocitos y granulocitos, mientras que no se observaron diferencias respecto a las células de la serie roja. Las ovejas consideradas positivas a oestrosis (L-2 y L-3) presentaron valores más bajos de linfocitos, mientras que los porcentajes de monocitos y granulocitos fueron superiores.

Cuadro 6.- Parámetros hemáticos y su relación con la respuesta IgG.				
	IgG -	IgG +	F	p
Eritrocitos	10'66 ± 3'08	11'06 ± 2'43		> 0'05
Hemoglobina	10'25 ± 2'16	10'55 ± 2'42		> 0'05
Hematocrito	42'2 ± 6'02	46'09 ± 10'40		> 0'05
Plaquetas	188 ± 95'23	225'73 ± 102'58		> 0'05
Leucocitos	6'95 ± 3'19	5'26 ± 1'80	7'029	0'010
% Linfocitos	65'58 ± 13'22	53'42 ± 13'22	11'383	0'001
% Monocitos	8'23 ± 3'69	10'41 ± 2'79	6'612	0'013
% Granulocitos	26'18 ± 10'46	33'72 ± 10'45	7'002	0'10

Se ha comprobado que a medida que las L-1 continúan su migración hacia los cornetes nasales, aumentan de tamaño y pasan a L-2, liberando diferentes productos de actividad proteolítica que facilitan su avance, y que estimulan la respuesta inmunitaria del hospedador debido a su naturaleza antigénica (Cepeda-Palacios *et al.*, 1999; Jacquiet *et al.*, 2005). Otros autores (Suárez *et al.*, 2005) demostraron que la producción de anticuerpos IgG estaba correlacionada significativamente con la presencia de L-2 y L-3 en corderos infectados con *O. ovis*.

Una vez que se alcanzan los estadios de L-2 y L-3, el estímulo antigénico es más intenso, produciéndose el incremento de los valores de IgG e IgM, y de granulocitos y eosinófilos (Nguyen *et al.*, 1996; Jacquiet *et al.*, 2005). La presencia de estas larvas en la mucosa nasal provoca

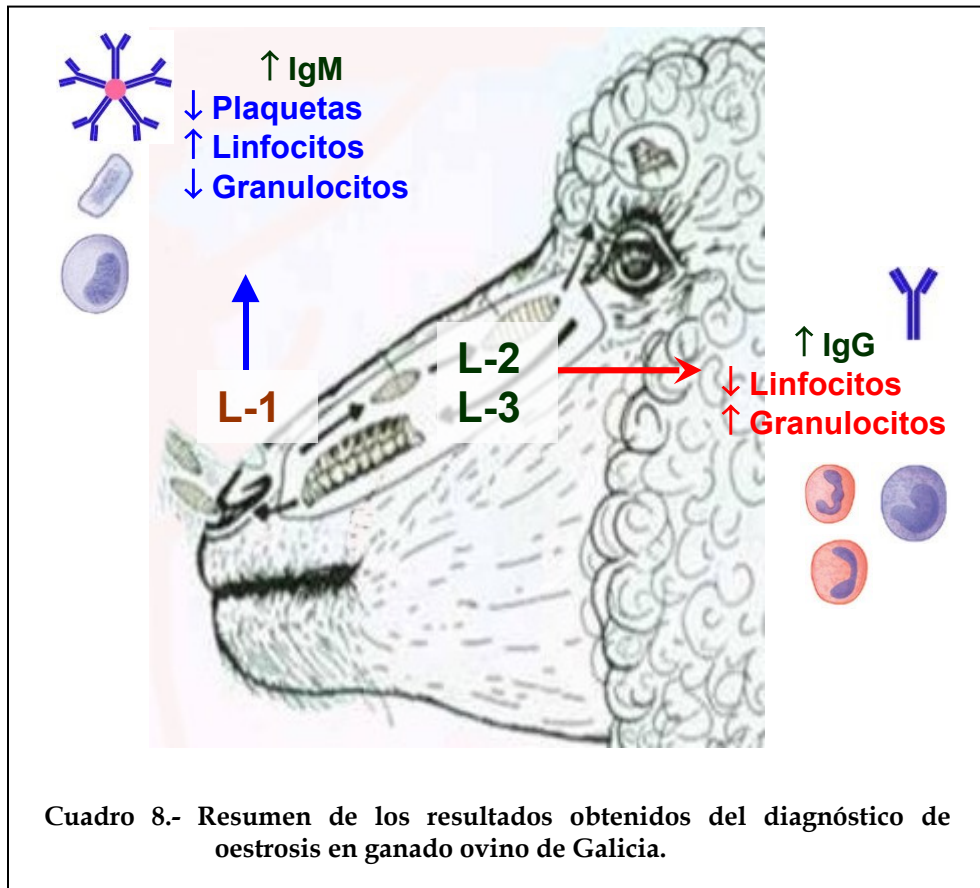
reacciones de naturaleza inflamatoria que intentan englobar las formas parasitarias (Nguyen *et al.*, 1999). Esto podría explicar la reducción significativa en los valores de linfocitos en las ovejas con cifras consideradas positivas de IgG.

La interpretación de los análisis hemáticos respecto a la detección de **IgA** reveló que estos valores eran muy similares entre sí (cuadro 7). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros analizados en función del diagnóstico de oestrosis. Como ya se mencionó anteriormente, en diversos estudios se destacó la dificultad para relacionar la respuesta IgA en ovejas infestadas por *O. ovis* y su ciclo endógeno (Dorchies *et al.*, 1998; Suárez *et al.*, 2005; Jacquiet *et al.*, 2005).

Cuadro 7.- Parámetros hemáticos y su relación con la respuesta IgA.				
	IgA -	IgA +	F	p
Eritrocitos	11'24 ± 1'32	10'90 ± 2'71		> 0'05
Hemoglobina	11'80 ± 3'56	10'36 ± 2'22		> 0'05
Hematocrito	46'27 ± 6'7	44'71 ± 9'52		> 0'05
Plaquetas	139'5 ± 135'8	218'54 ± 97'62		> 0'05
Leucocitos	5'8 ± 1'47	5'81 ± 2'52		> 0'05
% Linfocitos	52'77 ± 2'68	57'73 ± 14'75		> 0'05
% Monocitos	10'97 ± 2'67	9'6 ± 3'3		> 0'05
% Granulocitos	36'22 ± 4'43	30'90 ± 11'22		> 0'05

En el cuadro 8 se resumen los resultados obtenidos del análisis inmunológico y hemático en ovejas de Galicia. Es interesante destacar la

asociación que se establece entre la presencia de L-1, el incremento de los valores de IgM sérica y de linfocitos, y la reducción de las poblaciones de granulocitos y plaquetas. Cuando el ciclo progresa, y se producen las mudas a L-2 y L-3, la inmunoglobulina sérica predominante es la IgG, acompañada de un aumento de los granulocitos y descenso de linfocitos.



Los resultados del presente trabajo muestran que en Galicia existen cifras elevadas de seroprevalencia de oestrosis ovina, en

especial cuando se determinan mediante el análisis de la respuesta IgG frente a los antígenos OL2ES. Del análisis hemático de los animales utilizados es posible concluir que esta miasis cursa con algunas alteraciones patológicas importantes, sobre todo de parámetros sanguíneos de la serie blanca.

Bibliografía

- Bauer, C., Steng, G., Prevot, F., Dorchies, P. (2002). Seroprevalence of *Oestrus ovis* infection in sheep in southwestern Germany. **Veterinary Parasitology** **110**: 137-143.
- Caracappa, S., Rilli, S., Di Marco, V., Dorchies, P. (2000). Epidemiology of ovine oestrosis (*Oestrus ovis* Linné 1761, Diptera: Oestridae) in Sicily. **Veterinary Parasitology** **92**: 233-237.
- Cepeda-Palacios, R., Ávila, 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. **Veterinary Parasitology**, **86**: 119-126.
- Dorchies, P., Duranton, C., Jacquiet, P. (1998). Pathophysiology of *Oestrus ovis* infection in sheep and goats: a review. **Veterinary Record** **142**: 487-489.
- Dorchies, Ph., Alzieu, J.P. (1997). L'Oestrose ovine: revue. **Revue de Médecine Vétérinaire**, **148**: 565-574.
- Duranton, C., Dorchies, P. (1997). In vitro culture of *Oestrus ovis* (Linne 1761) first instar larvae: its application to antiparasitic drug screening. **International Journal for Parasitology**, **27**: 125-128.

- 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. **Veterinary Parasitology**, 60: 273-282.
- Jacquiet, P., Trinh Tran, T.N., Nouvel, X., Prevot, F., Grisez, C., Hailu, T.Y., Bergeaud, J.P., Hoste, H., Dorchies, Ph., Tabouret, G. (2005). Regulation of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) populations in previously exposed and naive sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 105: 95-103.
- Lancaster and Meisch, 1986. J.L. Lancaster and M.V. Meisch, Editors, **Arthropods in Livestock and Poultry Production**, Ellis Horwood, Chichester (1986), p. 402.
- Nguyen, V.K., Bourges, N., Concordet, D., Dorchies, P. (1996). Mast cells and eosinophils of the respiratory mucosa of sheep with *Oestrus ovis* (Linne, 1761) infection. **Parasite**, 3: 217-221.
- Nguyen, V.K., Jacquiet, P., Durantou, C., Bergeaud, J.P., Prevot, F., Dorchies, P. (1999). Reactions of cells of nasal and sinusoidal mucosa of goats and sheep naturally infected by *Oestrus ovis* Linne 1758 (Diptera: Oestridae). **Parasite**, 6: 141-149.
- Reina, D., Bonilla, F., Martínez-Moreno, J., Dorchies, Ph., Hernández, S., Navarrete, I. (2000). Preliminary results about *Oestrus ovis* in southwestern Spain. **3rd Annual Workshop COST 833 "Mange and myiasis in livestock"**.
- Ruíz-Martínez, I., Pérez Jiménez, J.M., Louassini, M. (1993). Comparative analysis of prevalence of *Oestrus ovis* L. (Diptera: Oestridae) in

- sheep horns of southern Spain and northern Morocco. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Entomologia**, 3: 421- 428.
- Sanyal PK, Maru A, Gupta AK. (1986). The use of injectable rafoxanide against natural ovine nasal myiasis. **Veterinary Parasitology** 19(1-2): 127-31.
- Scala, A., Solinas, G., Citterio, C. V., Kramer, L. H., Genchi, C. (2001). Sheep oestrosis (*Oestrus ovis* Linné 1761, Diptera: Oestridae) in Sardinia, Italy. **Veterinary Parasitology** 102: 133-141.
- Scala, A., Paz-Silva, A., Suárez, J. L., López, C., Díaz, P., Díez-Baños, P., Sánchez-Andrade Fernández, R. (2002). Chronobiology of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) in Sardinia, Italy: guidelines to chemoprophylaxis. **J. Med. Entomol.** 39: 652-657.
- Strumia, M.M., Sample, A.B., Haret, E.D. (1954). An improved micro hematocrit method. **American Journal of Clinical Pathology**, 24: 1016-1024.
- Suárez, J.L., Scala, A., Romero, J.A., Paz-Silva, A., Pedreira, J., Arias, M., Díaz, P., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Sánchez-Andrade, R. (2005). Analysis of the humoral immune response to *Oestrus ovis* in ovine. **Veterinary Parasitology** 134: 153-158.
- Tabouret G., Lacroux, C. Andreoletti O., Bergeaud J.P., Hailu-Tolosa Y., Hoste H., Prevot F., Grisez C., Dorchies P. and Jacquiet P. (2003). Cellular and humoral local immune responses in sheep experimentally infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). **Vet. Res.** 34: 231-241.

- Tabouret, G., Jacquet, P., Scholl, P., Dorchies, P. (2001). *Oestrus ovis* in sheep: relative third-instar populations, risks of infection and parasitic control. **Veterinary Research**, 32: 525-531.
- 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. **Veterinary Parasitology**, 128: 271-283.
- Thrusfield, M. (1997). **Veterinary Epidemiology**. Iowa State Press.
- Yacob, H.T., Dorchies, Ph., Jacquet, PH., Bleuart, C., Prevot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.P., Hoste, H. (2004). Concurrent parasitic infections of sheep: depression of *Trichostrongylus colubriformis* populations by a subsequent infection with *Oestrus ovis*. **Veterinary Parasitology**, 121: 297-306.
- Yilma and Dorchies (1991). Epidemiology of *Oestrus ovis* in southwest France. **Veterinary Parasitology** 40: 315-323.



7.- CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo, se extraen las siguientes **conclusiones**:

- 1.- El empleo del ELISA con antígenos de excreción/secreción de larvas 2 de *Oestrus ovis* (OL2ES) posibilita el diagnóstico de oestrosis activa en ganado ovino.
- 2.- En áreas de clima mediterráneo templado, la cronobiología de la oestrosis tiene tres periodos: diapausa (octubre-febrero), fase activa del ciclo endógeno (marzo-septiembre) y fase exógena (mayo-septiembre).
- 3.- La presencia de L-1 de *O. ovis* estimula en el ganado ovino la producción de IgM y linfocitos, y reduce las poblaciones de granulocitos y plaquetas.
- 4.- El desarrollo de L-2 y L-3 en el interior de las cavidades y senos nasales de ovejas con oestrosis está acompañado de un incremento de anticuerpos séricos de IgG, y al descenso de linfocitos.

5.- En zonas de clima oceánico concurren las condiciones adecuadas para el desarrollo del ciclo externo de *O. ovis*. La eficacia de la administración de un tratamiento para el control de esta miasis se puede valorar mediante el análisis de la respuesta IgM.

6.- La administración de un tratamiento precoz a los corderos en junio-julio es una medida eficaz para prevenir la maduración de larvas L1, evitando así el desarrollo de manifestaciones clínicas y reduciendo las pérdidas económicas.



8.- RESUMEN

Entre los procesos parasitarios que afectan al ganado ovino, la oestrosis presenta una elevada prevalencia en algunos países. En rumiantes, se sospecha de oestrosis ovina cuando aparecen algunas manifestaciones clínicas (rinitis, tos, dispnea, hemorragias nasales), y se diagnostica de forma rutinaria mediante la observación de larvas de *O. ovis* en los animales una vez que han sido sacrificados.

Existe una necesidad importante detectar esta zoonosis parasitaria en personas. Se han aplicado algunas pruebas inmunoenzimáticas como el ELISA-indirecto para el diagnóstico de oestrosis; no obstante, aunque se pueden emplear antígenos metabólicos y somáticos, su idoneidad no ha sido probada todavía.

Por estas razones, se diseñó un estudio que se articuló en cuatro apartados. En el **capítulo I** se desarrolló un estudio experimental para determinar el antígeno (metabólico o somático) más apropiado para la detección de la miasis zoonósica oestrosis (*O. ovis*) mediante pruebas inmunoenzimáticas. Se mantuvo un rebaño de 23 cabras no infestadas en un pasto en Sassari (Cerdeña, Italia) para permitir su infestación. Se tomaron muestras de sangre de las cabras con periodicidad mensual y los sueros se procesaron mediante ELISA indirecto. Después de establecer la cronobiología de *O. ovis* y la respuesta inmunitaria en las cabras, observamos que la respuesta IgG frente a los antígenos metabólicos aumentaba sólo durante el periodo de riesgo real de infestación (cuando las moscas vuelan, de mayo a septiembre), mientras que las absorbancias

frente a los productos somáticos fueron positivas desde el inicio del estudio (en enero, antes de la infestación). Concluimos que los productos de excreción/secreción son más útiles y apropiados para el inmunodiagnóstico de oestrosis.

El conocimiento de la cronobiología de *O. ovis* permite establecer los periodos de mayor riesgo de infestación, y aquellos más adecuados para administrar un tratamiento precoz con el que prevenir el desarrollo de lesiones en animales infestados. El principal objetivo del **capítulo II** fue evaluar la cinética de las respuestas sistémicas IgG, IgM e IgA en ganado ovino frente a *O. ovis*, empleando ovejas adultas y corderos en primer año de pastoreo en Cerdeña (Italia), mediante una prueba ELISA y antígenos de excreción/secreción de larvas 2 de *O. ovis*. Antes de ser sacrificadas, se obtuvieron muestras de sangre de 208 ovejas, y posteriormente se retiraron las cabezas y se abrieron a lo largo del eje longitudinal para recoger los parásitos de las cavidades nasales, turbinales y sinusales. Durante un año se tomaron mensualmente muestras de sangre de los corderos del G-1 (mantenidos en régimen semi-intensivo) y del G-2 (estabulados para evitar la infestación por *O. ovis*). En las ovejas se observó una correlación significativa y positiva entre el número de larvas de primer estadio de *O. ovis* y los valores de IgM, y entre las larvas de segundo estadio y las absorbancias IgG. En los corderos del G-1, todas las clases de anticuerpos aumentaron de forma significativa a partir del mes de julio. Los valores más elevados de IgG se alcanzaron en septiembre y

disminuyeron en noviembre-diciembre. La respuesta IgM más intensa se observó en el mes de noviembre, y la respuesta IgA mostró valores muy pequeños durante todo el estudio.

Del análisis de los resultados llegamos a la conclusión de que la primera infestación ocurre en mayo, y supone un estímulo para la producción de anticuerpos humorales. En el mes de octubre comenzó la reducción de los valores de IgG, que indica el comienzo de la fase de diapausa, mientras que la respuesta IgM parece asociarse a la presencia de L1 en las cavidades nasales. Los datos obtenidos nos indujeron a proponer un tratamiento precoz del ganado ovino en junio-julio, que evitaría la maduración de las larvas L1 de *O. ovis*, impidiendo el desarrollo de manifestaciones clínicas e interrumpiendo el ciclo vital de este parásito.

La posibilidad de infestación en humanos subraya la necesidad de disponer de medidas apropiadas para su control, como la quimioterapia. Aunque existen diferentes antiparasitarios para el tratamiento de oestrosis, no existe suficiente información sobre los procedimientos adecuados para evaluar su eficacia. En el **capítulo III** se desarrollaron dos experimentos para conocer la distribución y control de la oestrosis en ovejas. En el primero se realizó una encuesta serológica para conocer la prevalencia estacional de oestrosis en ovejas de una zona con clima oceánico (noroeste de España), recogándose a lo largo de las 4 estaciones del año, se recogieron 669 muestras de sangre seleccionadas de forma

aleatoria de ovejas adultas en pastoreo, que se analizaron para evaluar la presencia de anticuerpos IgA, IgM e IgG mediante ELISA y antígenos de excreción/secreción de L2 de *Oestrus ovis*. En el segundo experimento se evaluó el efecto de un tratamiento con ivermectina sobre la respuesta inmunitaria humoral (IgA, IgM, IgG); para ello se tomaron dos muestras de sangre, una antes del tratamiento y otra después, en un rebaño de ovejas con oestrosis natural.

El porcentaje de animales positivos a IgA fue del 34%, a IgM del 54% y a IgG del 55%. La seroprevalencia más baja se observó en primavera frente a IgA e IgM, y en invierno para IgG. Los valores más elevados de positividad a IgA se observaron en otoño, a IgM en verano y a IgG en invierno.

No se observaron ovejas con valores positivos de IgM tras la administración del tratamiento, en tanto que la reducción mediante IgA-ELISA fue del 58% y del 27% con IgG-ELISA. Estos resultados parecen poner de manifiesto que la oestrosis es una enfermedad parasitaria que precisa vigilancia en regiones con clima oceánico. La valoración de la eficacia del tratamiento se puede realizar con el análisis de la respuesta sérica IgM.

En general los signos clínicos y las lesiones se corresponden con las fases del ciclo evolutivo del parásito. La presencia de L-1 se ha asociado a

posiciones de encorvamiento en el ganado ovino. Con objeto de proporcionar mayor información acerca de las alteraciones provocadas por la infestación de larvas de *O. ovis* en las ovejas a nivel sistémico, en el **capítulo IV** se desarrolló un estudio en el que se analizaron las variaciones de los parámetros hemáticos de las series roja y blanca en ovejas de la Comunidad Autónoma Gallega. Estos resultados se relacionaron con el diagnóstico de oestrosis mediante el análisis de las respuestas inmunitarias humorales IgA, IgM e IgG.

El porcentaje de ovinos con valores considerados positivos para la IgG fue del 68'8% (209/304), del 33'5% (102/304) para la IgM y del 54'3% (165/304) para la IgA. Como se aprecia en el Cuadro 4, las seroprevalencias más elevadas se obtuvieron en verano para la IgG, invierno para la IgM y en primavera para la IgA. No se observaron diferencias significativas de estos porcentajes en relación con la época de toma de muestras.

Únicamente se estableció relación entre las variaciones de plaquetas y la presencia de **IgM**; se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de los leucocitos y porcentajes de linfocitos, monocitos y granulocitos en función del diagnóstico de **IgG** y de **IgM**. Las ovejas consideradas positivas a oestrosis alcanzaron valores más altos de linfocitos, y más bajos de monocitos y granulocitos. La interpretación de los análisis hemáticos respecto a la detección de **IgA** reveló que estos valores eran muy similares entre sí.

Los resultados del presente trabajo muestran que la aplicación de técnicas inmunoenzimáticas supone un gran apoyo para el diagnóstico y control de la oestrosis ovina, y que es posible el diagnóstico de infestación activa, así como evaluar la eficacia de un tratamiento antiparasitario.



9.- BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. (1999). *Inmunología celular y molecular*. McGraw-Hill/Interamericana de España.
- Abo-Shehada, N.M., Arab, B., Mekbel, R., Williams, D., Torgerson, P.R. (2000). Age and seasonal variations in the prevalence of *Oestrus ovis* larvae among sheep in the Northern Jordan. *Preventive Veterinary Medicine*, 47: 205-212.
- Alcaide, M., Reina, D., Frontera, E., Navarrete, I. (2005). Epidemiology of *Oestrus ovis* (Linneo, 1761) infestation in gotas in Spain. *Veterinary Parasitology*, 130: 277-284.
- Alcaide, M., Reina, D., Sánchez-López, J., Romero, G., Sierra, M.A., Navarrete, I. (2002). Situación seroepidemiológica de la oestrosis ovina en la provincia de Cáceres, España. *Producción Animal*, 174: 5-13.
- Alzieu, J.P., Dorchies, P., Donat, F., Chiarisoli, O. (1994). New findings on the epidemiology of *Oestrus ovis* and its control by closantel. *Le Point Vétérinaire*, 26: 363-369.
- Anuario de Estadística Agraria (2000). Consellería de Política Agroalimentaria e Desenvolvemento Rural. Xunta de Galicia.
- Bart, A.G., Minar, J. (1992). Probability description of regulation on the level of population and individual in the host-parasitic system using *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) as an example. *Folia Parasitologica*, 39: 75-83.
- Bauer, C., Steng, G., Prevot, F., Dorchies, P. (2002). Seroprevalence of *Oestrus ovis* infection in sheep in southwestern Germany. *Veterinary Parasitology*, 110: 137-143.

- Bautista, C.R., Angulo, R.M., Garay, E. (1988). Serological diagnosis of *Oestrus ovis* in naturally infested sheep. *Medical and Veterinary Entomology*, 2: 331-335.
- Bergeaud, J.P. ; Duranton C.; Dorchies Ph.. (1994). Study of *Oestrus ovis* in South-West of France : a slaughter-house survey in Aveyron. *Revue de Médecine Vétérinaire*.145: 863-866
- Biggs, H.C., Mc Clair, E., Muller, G.L., Anthonissen, M., Hare, K.M. (1998). A prediction model for strike in the sheep nasal fly, *Oestrus ovis* in Namibia. *Preventive Veterinary Medicine*, 33: 267-282.
- Bin, A.A., Nwosu, C.O. (1999). Incidence of *Oestrus ovis* infestation in Borno-White Sahel goats in the semi-arid zone of Nigeria. *Veterinary Research*, 30: 109-112.
- Breev, K.A., Zagretdinov, R.G., Minar, J. (1980). Influence of constant and variable temperature on pupal development of the sheep bot fly (*Oestrus ovis* L.). *Folia Parasitologica*, 27: 350-365.
- Bunch, T.D. (1979). Skeletal lesions associated with desert bighorn chronic sinusitis .En: *Desert Bighorn Council Transactions*, 25-27.
- Butterworth, A.E., Sturrock, R.F., Houba, V., Mahmoud, A.A., Sher, A., Rees, P.H. (1975). Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature*, 256: 727-729.
- Caracappa, S., Rilli, S., Zanghi, P., Di Marco, V., Dorchies, Ph. (2000). Epidemiology of ovine oestrosis (*Oestrus ovis* Linneo, 1761, Diptera: Oestridae) in Sicily. *Veterinary Parasitology*, 92: 233-237.
- Cepeda-Palacios, R., Ávila, 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. *Veterinary Parasitology*, 86: 119-126.
- Cuquerella, M., Gómez-Muñoz, M.T., Alunda, J.M. (1991). Serum IgG response of Manchego lambs to infections with *Haemonchus contortus* and preliminary characterization of adult antigens. *Veterinary Parasitology*, 38: 131-143.
- Chabrah, M.B., Rubrah, N.S. (1976). Observations on the incidence and biology of *Oestrus ovis*. *Indian Veterinary Journal*, 53: 180-184.
- D'Souza, P.E., Satynarayana, K., Jagannath, M.S., Rajeswari, Y.B., Rahman, S.A., Govindaiah, M.G. (1992). Control of nasal myiasis in sheep with rafoxanide. *Indian Veterinary Medicine*, 16: 34-36.
- Di Marco, V., Riili, S., Zanghì, P., L'Abbate, L., Vicari, D., Caracappa, S. (2000). Prevalence and the larval distribution of ovine oestrosis in Sicily. XIV Congreso SIPAOC.
- Díez-Baños, P., Morrondo-Pelayo, P., Barreiro-Lois, A., Sánchez-Andrade, R. (1989). Influencia de las medidas de control en la fasciolosis del ganado vacuno en Galicia. *Seminario de Estudios Galegos: V Jornadas de Estudio de Sanidade Animal en Galicia*, Santiago de Compostela.
- Dorchies, P. (1997). Comparative physiopathology of *Oestrus ovis* (Linne 1761) myiasis in man and animals. *Bulletin of the Academy National Medicine*, 181: 673-683.
- Dorchies, P., Bergeaud, J.P., Tabouret, G., Duranton, C., Prevot, F., Jacquiet, Ph. (2000). Prevalence and larval burden of *Oestrus ovis* (Linné, 1761) in sheep and goats in northern Mediterranean region of France. *Veterinary Parasitology*, 88: 269-273.

- Dorchies, P., Duranton, C., Jacquiet, P. (1998). Pathophysiology of *Oestrus ovis* infection in sheep and goats: a review. *Veterinary Record*, 142: 487-489.
- Dorchies, Ph., Alzieu, J.P. (1997). L'Oestrose ovine: revue. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 148: 565-574.
- Dorchies, P., Prevot, F., Duranton, C., Bergeaud, J.P., Akarpo, J., Pangui, L., Missohou, A., Deconinck, P., Ouatarra, L., Roger, F., Achi-Yaba, L., Dia, M., Jacquiet, Ph. (1999). Ostrose du mouton et de la chèvre (*Oestrus ovis*, Linneo 1761) en Afrique: résultats d'une enquête sur 3204 sérum provenant de neuf pays. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 150: 463-466.
- Duranton, C., Dorchies, P. (1997). In vitro culture of *Oestrus ovis* (Linneo 1761) first instar larvae: its application to antiparasitic drug screening. *International Journal for Parasitology*, 27: 125-128.
- Frugère, S., Cota-León, A., Prevot, F., Cepeda-Palacios, R., Tabouret, G., Bergeaud, J.P., Duranton, C., Dorchies, P., Jacquiet, P. (2000). Immunisation of lambs with excretory secretory products of *Oestrus ovis* third instar larvae and subsequent experimental challenge. *Veterinary Research*, 31: 527-535.
- Gabaj, M., Beesley, W.N., Awan, M.A. (1993). *Oestrus ovis* myiasis in libyan sheep and goats. *Tropical Animal Health and Production*, 25: 65-68.
- García-Cuadrado, N., Moreno-Hernández, B. (1995). Oestrosis ovina en una zona semiárida. IV Congreso Ibérico de Parasitología, Santiago de Compostela.

- Goddard, P., Bates, P., Webster, K.A. (1999). Evaluation of a direct ELISA for the serodiagnosis of *Oestrus ovis* infections in sheep. *Veterinary Record*, 144: 497-501.
- Habela M, Moreno A, Gragera-Slikker A, Gomez JM, Montes G, Rodriguez P, Alvinerie M. (2006). Efficacy of eprinomectin pour-on in naturally *Oestrus ovis* infested merino sheep in Extremadura, South-West Spain. *Parasitol Res.* 99(3):275-80.
- Hall, M., Wall, R. (1995). Myiasis of humans and domestic animals. *Advances in Parasitology*, 35: 257-334.
- Hoste H., Lespine A., Lemercier P., Alvinerie M.; Jacquiet P., Dorchies P. (2004). Efficacy of eprinomectin pour-on against gastrointestinal nematodes and the nasal bot fly (*Oestrus ovis*) in sheep. *The Veterinary Record*, 154, 25, 782-785
- Horak, I.G. (1977). Parasites of domestic and wild animals in South Africa. I. *Oestrus ovis* in sheep. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 44: 55-64.
- Horak, I.G., Butt, M.J. (1977). Parasites of domestic and wild animals in South-Africa. II. *Oestrus ovis* in goats. *Journal of Veterinary Research*, 44: 65-68.
- Ilchman, G., Betke, O., Gräfe, D., Gossing, S. (1986). Untersuchungen zur östrose und ihre bekämpfung in der Mongolischen Volksrepublic. *Mh. Vet. Med.*, 41: 128-132.
- Ilchman, G., Hiepe, T. (1985) Immunological studies on the diagnosis of *Oestrus ovis* infestation. *Monatshefte für Veterinarmedizin*, 40: 304-307.

- Innocenti, L., Lucchesi, P., Giorgi, F. (1997). Integument ultrastructure of *Oestrus ovis* (L.) (Diptera: Oestridae) larvae: host immune response to various cuticular components. *International Journal for Parasitology*, 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. *Veterinary Parasitology*, 60: 273-282.
- Jacquiet, P., Dorchies, P. (2002). Towards a lower prevalence of *Oestrus ovis* infections in sheep in a temperate climate (south west France). *Veterinary Research*, 3: 449-453.
- Jacquiet, P., Trinh Tran, T.N., Nouvel, X., Prevot, F., Grisez, C., Hailu, T.Y., Bergeaud, J.P., Hoste, H., Dorchies, Ph., Tabouret, G. (2005). Regulation of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) populations in previously exposed and naive sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 105: 95-103.
- Kaufmann, J. (1996). *Parasitic Infections of Domestic Animals. A diagnostic manual*. Ed. Basel Birkhäuser Verlag (Alemania).
- Lapage, G. (1975). *Parasitología Veterinaria*. Ed. Continental, S.A. (México).
- Lucientes, J. (2000). La oestrosis de los pequeños rumiantes. XXV Congreso de Producción Ovina y Caprina, Teruel.
- Lucientes, J., Castillo, J.A., Ferrer, L.M., Peribáñez, M.A., Ferrer-Dufol, M., Gracia-Salinas, M.J. (1998). Efficacy of orally administered ivermectin against larval stages of *Oestrus ovis* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 75: 255-259.

- Lucientes, J., Ferrer, E., Castillo, J.A. (1993). Epidemiología de la oestrosis ovina en Aragón. *ITEA*, 12: 580-582.
- Marchenko, V.P., Marchenko, V.A. (1989). Survival of larvae of *Oestrus ovis* L. depends on the state of the immune system of sheep. *Parazitologiya* 23: 129-133.
- Marchenko, V.P., Marchenko, V.A. (1991) Kinetics of specific serum antibodies in sheep infested with *Oestrus ovis* larvae. *Parazitologiya*, 25: 297-304.
- Migunov, I.M., Timofeev, P.V. (1991). *Oestrus ovis* infection in condition of low pasture numbers. *Veterinarnye problemy zabaikal'ya*, 26-29.
- Miller, H.R. (1996). Mucosal mast cells and the allergic response against nematode parasites. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 54: 331-336.
- Moreno, V., Pérez, J.M., Moreno, P.A., Granados, J.E., Ruíz-Martínez, I., Soriguer, C., Simón, M.A. (1999). Oestrid myiasis in European Mouflon from Spain. *Journal Wildlife Disease*, 35: 78-81.
- Murguía, M.L., 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 Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 88: 73-78.
- Nguyen, V.K., Jacquet, P., Durantou, C., Bergeaud, J.P., Prevot, F., Dorchies, P. (1999b). Reactions of cells of nasal and sinusoidal mucosa of goats and sheep naturally infected by *Oestrus ovis* Linne 1758 (Diptera: Oestridae). *Parasite*, 6: 141-149.

- Nguyen, V.K., Bourges, N., Concordet, D., Dorchies, P. (1996). Mast cells and eosinophils of the respiratory mucosa of sheep with *Oestrus ovis* (Linne, 1761) infection. *Parasite*, 3: 217-221.
- Nguyen, V.K., Jacquiet, P., Duranton, C., Bergeaud, P., Prevot, F., Dorchies, P. (1999a). Mucous cellular responses of sheep and goats naturally infected by *Oestrus ovis*. *INRA Physiopathology Respiratory Ruminants*, 6, 141-149.
- Osoro, K., Martínez-Vasallo, J. (2000). Livestock production systems and the vegetation dynamics of less favoured areas (LFAs): developing viable systems to manage semi-natural vegetation in temperate LFAs in Spain. En: *Livestock Systems in European Rural Development*. Jerry Laker, LSIRD Network, Aberdeen, UK.
- Otear, M.J., Strain, S., Bishop, S.C. (1999). How lambs control infection with *Ostertagia circumcincta*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72: 213-218.
- Pandey, V.S. (1989). Epidemiology of *Oestrus ovis* infection of sheep in the highveld of Zimbabwe. *Veterinary Parasitology*, 31: 275-280.
- Pandey, V.S., Ouhelli, H. (1984). Epidemiology of *Oestrus ovis* infection of sheep in Morocco. *Tropical and Animal Health and Production*, 16: 246-252.
- Pangui, L.J., Dorchies, P., Belot, J. (1988). Contribution à l'étude épidémiologique de l'oestrose ovine au Sénégal. *Revue du Médecine Vétérinaire*, 139: 701-704.
- Papadopoulos, E., Prevot, F., Jacquiet, Ph., Duranton, C., Bergeaud, J.P., Kalaitzakis, E., Dorchies, Ph. (2001). Seasonal variation of *Oestrus*

- ovis specific antibodies in sheep and goats mixed flocks in Greece. *Veterinary Parasitology*, 95, 73-77.
- Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Pedreira, J., Arias, M., López, C., Panadero, R., Díaz, P., Díez-Baños, P., Morrondo, P. (2003). Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. *Parasitology Research*, 91: 328-331.
- Pedreira, J., Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Arias, M., Lomba, C., Díaz, P., López, C., Díez-Baños, P, Morrondo, P. (2006). Prevalences of gastrointestinal parasites in sheep and parasite-control practices in NW Spain. *Preventive Veterinary Medicine* (en prensa).
- Peña Martínez, J. (1999). *Inmunología. Bases moleculares y celulares*. Ed. Pirámide.
- Pérez, J.M., Granados, J.E., Ruíz-Martínez, J. (1996). Prevalence and seasonality of *Oestrus caucasicus* Grunin 1948 (Diptera: Oestridae) parasitizing the Spanish bies, *Capra pyrenaica* (Mammalia: Artiodactyla). *Journal of Parasitology*, 82: 233-236.
- Puebla Domínguez, H.M., Zaldívar Quintero, N., Soñora Bonilla, R. (2005). Oestrosis. Aspectos biológicos de la miasis cavitaria ovina. *Revista electrónica de Veterinaria*, 9.
- Rainbird, M.A., MacMillan, D., Meeusen, E.N. (1998). Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. *Parasite Immunology*, 20: 93-103.

- Rehbein, S., Batty, A.F., Barth, D., Visser, M., Timms, B.J., Barrick, R.A. and Eagleson, J.S., 1998. Efficacy of an ivermectin controlled-release capsule against nematode and arthropod endoparasites in sheep. *Vet. Rec.* 142, 331-334.
- Reina, D., Bonilla, F., Alcaide, M., Sánchez-López, J., Frontera, E., Navarrete, I. (2002). Adecuación de la técnica inmunoenzimática ELISA al diagnóstico de la oestrosis en pequeños rumiantes. *Producción Animal*, 173: 5-16.
- Reina, D., Bonilla, F., Martínez-Moreno, J., Dorchies, Ph., Hernández, S., Navarrete, I. (2000). Preliminary results about *Oestrus ovis* in southwestern Spain. 3rd Annual Workshop COST 833 "Mange and myiasis in livestock".
- Rogers, C.E., Knapp, F.W. (1973). Bionomics of the sheep bot fly, *Oestrus ovis*. *Environmental Entomology*, 2: 11-23.
- Rojas, C.M. (2000). Prevención y control *Oestrus ovis* en el Perú. Caprino de la costa norte. *Revista Virtual de Parasitología*, 2.
- Rugg, D., Gogolewski, R.P., Barrick, R.A. and Eagleson, J.S., 1997. Efficacy of ivermectin controlled-release capsules for the control and prevention of nasal bot infestations in sheep. *Aust. Vet. J.* 74, 36-37.
- Ruíz-Martínez, I., Pérez Jiménez, J.M., Louassini, M. (1992). Comparative analysis of prevalence of *Oestrus ovis* L. (Diptera: Oestridae) in sheep horns of southern Spain and northern Morocco. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Entomologia*, 3: 421- 428.
- Ruíz-Martínez (1997). Las miasis. Monografía Ovis. Ed. Luzón. Madrid

- Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Suárez, J.L., Panadero, R., Pedreira, J., Díez-Baños, P., Morrondo, P. (2001). Effect of fasciolicides on the antigenaemia in sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, 87: 609–614.
- Sánchez-Andrade, R., Suárez, J.L., Pedreira, J., Díaz, 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. *Immunological Investigations*, 34: 91–99.
- Sanyal PK, Maru A, Gupta AK. (1986). The use of injectable rafoxanide against natural ovine nasal myiasis. *Vet Parasitol.* 19(1-2):127-31.
- Scala, A., Paz-Silva, A., Suárez, J.L., López, C., Díaz, P., Díez-Baños, P., Sánchez-Andrade Fernández, R. (2002). Chronobiology of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) in Sardinia, Italy: guidelines to chemoprophylaxis. *Journal of Medical Entomology*, 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. *Veterinary Parasitology*, 102: 277-284.
- Shcherban, N.F., Sazonov, A.I. (1973). Prevention of sheep nose bots. *Veterinariia*, 49: 71-73.
- Sinski, E., Bairden, K., Duncan, J.L., Eisler, M.C., Holmes, P.H., McKellar, Q.A., Murray, M., Stear M.J. (1995). Local and plasma antibody responses to the parasitic larval stages of the abomasal nematode *Ostertagia circumcincta*. *Veterinary Parasitology*, 59: 107-118.

- Stear MJ, Spooner RL. (1983). Occurrence of cytotoxic antilymphocyte antibodies in sheep. *Res Vet Sci*. 34(2):218-23.
- Strumia, M.M., Sample, A.B., Haret, E.D. (1954). An improved micro hematocrit method. *American Journal of Clinical Pathology*, 24: 1016-1024.
- Suárez, J.L., Scala, A., Romero, J.A., Paz-Silva, A., Pedreira, J., Arias, M., Díaz, P., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Sánchez-Andrade, R. (2005). Analysis of the humoral immune response to *Oestrus ovis* in ovine. *Veterinary Parasitology*, 134: 153-158.
- Tabouret, G., Bret-Bennis, L., Dorchies, P., Jacquiet, P. (2003b). Serine protease activity in excretory-secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. *Veterinary Parasitology*, 114: 305-314.
- Tabouret, G., Jacquiet, P., Scholl, P., Dorchies, P. (2001c). *Oestrus ovis* in sheep: relative third-instar populations, risks of infection and parasitic control. *Veterinary Research*, 32: 525-531.
- Tabouret, G., Lacroux, C., Andreoletti, O., Bergeaud, J.P., Hailu-Tolosa, Y., Hoste, H., Prevot, F., Grisez, C., Dorchies, P., Jacquiet, P. (2003a). Cellular and humoral local immune responses in sheep experimentally infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). *Veterinary Research*, 34: 231-241.
- Tabouret, G., Prevot, F., Bergeaud, J.P., Dorchies, P., Jacquiet, 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. *Veterinary Parasitology*, 101: 53-66.

- Tabouret, G., Vouldoukis, I., Duranton, C., Prevot, F., Bergeaud, J.P., Dorchies, P., Mazier, D., Jacquiet, P. (2001b). *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae): effects of larval excretory/secretory products on nitric oxide production by murine RAW 264.7 macrophages. *Parasite Immunology*, 23: 111-119.
- Terefe, G., Yacob, H.T., Grisez, C., Prevot, F., Dumas, E., Bergeaud, J.P., Dorchies, Ph., Hoste, H., Jacquiet, P. (2005). *Haemonchus contortus* egg excretion and female length reduction in sheep previously infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. *Veterinary Parasitology*, 128: 271-283.
- Thrusfield, M. (1997). *Veterinary Epidemiology*. Iowa State Press.
- Tibayrenc, R., Roua, B., Moumouni, R., Garba, D., Alassane, O., Dorchies, P. (1999). L'oestrose ovine au Niger: enquête de prévalence et traitement par le closantel. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 52: 47-53.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W. *Parasitología Veterinaria* (2ª Edición). Ed. Acribia, Zaragoza.
- Vassiliades, G. (1987). Oestriasis in small ruminants in Senegal. Preliminary note. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 42: 421-422.
- Watson, D.L., Gill, H.S. (1991). Effect of weaning on antibody responses and nematode parasitism in Merino lambs. *Research in Veterinary Science*, 51: 128-132.
- Winton RG. (1990). Selective breeding for the control of nematodiasis in sheep. *Revue Scientifique et Technique*, 9: 555-576.

- 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 a subsequent infection with *Oestrus ovis*. *Veterinary Parasitology*, 121: 297-306.
- Yacob, H.T., Duranton-Grisez, C., Prevot, F., Bergeaud, J.P., Bleuart, C., Jacquiet, P., Dorchies, P., Hoste, H. (2002). Experimental concurrent infection of sheep with *Oestrus ovis* and *Trichostrongylus colubriformis*: negative interactions between parasite populations and related changes in the cellular responses of nasal and digestive mucosae. *Veterinary Parasitology*, 104: 307-317.
- Yacob, H.T., Jacquiet, P., Prevot, F., Bergeaud, J.P., Bleuart, C., Dorchies, P., Hoste, H. (2004b). Examination of the migration of first instar larvae of the parasite *Oestrus ovis* (Linne 1761) [Diptera: OEstridae] in the upper respiratory tract of artificially infected lambs and daily measurements of the kinetics of blood eosinophilia and mucosal inflammatory response associated with repeated infection. *Veterinary Parasitology*, 126: 339-347.
- Yilma, J.M. (1992). Contribution à l'étude de l'épidémiologie du diagnostique 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 France. *Veterinary Parasitology*, 40: 315-323.

- Yilma, J.M., Dorchies, Ph. (1993). Essai d'infestations expérimentales d'agneaux par des larves 1 d' *Oestrus ovis*. *Bulletin de la Societe Francaise de Parasitologie*, 11: 43-47.
- Zumpt, F. (1965). *Myiasis in man and animals in the old world*. Ed. Butterworths (London).