



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**CONTRIBUCIÓN AL DIAGNÓSTICO INDIVIDUAL PARA LA DETECCIÓN  
Y CONTROL DE PEBRINA EN HEMBRAS MADRES DEL GUSANO DE  
SEDA BOMBYX MORI**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:  
**ESPINOSA REYES, JAIME**

ASESOR: MELÉNDEZ GUZMÁN, J. RAFAEL  
DORADO, MARÍA DE LOURDES

1993

MÉXICO, D.F.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

UNIVERSIDAD AGROPECUARIA AUTÓNOMA DE QUILÓN

ESCUELA DE INGENIERÍA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CONTRIBUCIÓN AL DIAGNÓSTICO INDIVIDUAL PARA LA  
DISTRIBUCIÓN Y CONTROL DE PEARSONIA EN EL TIPO DE MARRAS  
DEL CAJANO DE COCA (Cajanus caryus)

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

**P R E S E N T A :**

**JAIHE ENPINOSA REYES**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**A S E S O R I A :**

**M. V. Z. MRS. DE LOURDES DEBADO**

**M. V. Z. J. RAFAEL MELÉNDEZ CUYMAN**

## CONTENIDO

	RESUMEN	1
I.	INTRODUCCION	2
1.1	PRODUCCION DE SEDA EN MEXICO	3
1.2	EPIDEMIOLOGIA	5
1.3	ETIOLOGIA	8
1.4	MORFOLOGIA	9
1.5	CICLO DE VIDA	10
1.6	PATOGENIA	11
1.6.1	SINTOMATOLOGIA	11
1.7	DIAGNOSTICO	12
II.	MATERIAL Y METODOS	15
2.1	MATERIAL	15
2.2	MUESTRA	15
2.3	METODO	16
2.4	TECNICA PARA EL DIAGNOSTICO	16
2.4.1	EN LA MARIPOSA MADRE	17
2.5	EXAMEN EN FORMA INDUSTRIAL	19
2.5.1	EXAMEN EN LA FASE DE LARVAS	20
2.6	PROFILAXIS	20
2.6.1	PRODUCCION DE SIMIENTE	20
2.6.2	AREA DE CRIANZA	20
2.6.3	CONTROL	21
2.7	TRATAMIENTO	22
III	RESULTADOS	24
IV	DISCUSION	25
V	LITERATURA CITADA	26
	CUADRO	29

## RESUMEN

ESPINOSA REYES JAIME. Contribución al Diagnóstico Individual para la Detección y Control de Pebrina en Hembras Madres del Gusano de Seda *Bombyx mori* (bajo la dirección de: Ma. de Lourdes Dorado y Rafael Meléndez Gúzman).

El objetivo del presente trabajo de tesis es el contar con una metodología apropiada para el diagnóstico de la Pebrina de las hembras madres afectadas con este mal y verificar la calidad de semente en el país, ya que es requisito indispensable para desarrollar con buen éxito la sericultura nacional, así como contribuir al mejor conocimiento de la enfermedad en México. Para el logro de lo anterior se recabó información sobre el muestreo, macerado, y uso de equipo de laboratorio así como técnicas para el diagnóstico para cada una de las etapas del ciclo de vida y principalmente en la inspección para fines reproductivos. Los resultados de la información obtenida comprobaron que no existe la enfermedad de pebrina, ni pruebas para detectar las diferentes enfermedades del gusano de seda en el país. Por lo tanto se recomienda el procedimiento de identificación denominado "Método de Doble Selección Microscópica del Sistema Celular" cuyos procedimientos aplicados correctamente son altamente confiables y seguros, para todos los sericultores del país. La pebrina, es causada por las esporas de un protozooario perteneciente a los microsporidios *Nosema bombycis* Naegeli, es una enfermedad infecto-contagiosa-hereditaria que afecta principalmente los órganos del aparato digestivo y tegumentario en toda la fase del ciclo de vida del gusano de seda, (*Bombyx mori*) hasta causarle la muerte. La pebrina afecta a las mariposas hembras madres la cual repercute en los aspectos reproductivos del gusano. Esta enfermedad se disemina rápidamente por toda las áreas hasta extenderse a toda una región la cual afecta la industria sericícola.

## I. INTRODUCCIÓN

Los numerosos estudios llevados a cabo para aclarar el origen de la crianza doméstica del gusano de seda *Bombyx mori* L. no ha dado los resultados esperados. La cría del gusano de seda se remonta a los pueblos del Asia Oriental, seguramente el descubrimiento del gusano de seda y el valor de la seda misma, así como su uso, tuvo lugar en China, unos 3000 años A. de C. donde vivía el gusano en estado salvaje sin que el hombre aprovechara su valiosa producción.

Uno de los más antiguos y ciertos testimonios históricos acerca de la cría doméstica del gusano de seda, se encuentra en los escritos de Confucio de alrededor de 2500 años A. de C., la cría del gusano de seda, se le alimentó con hojas de morera y utilizó el hilo de su capullo para tejer telas y la confección de prendas de vestir.

En su tiempo China aprovechó la seda como un medio valioso de intercambio comercial con los países extranjeros. Lograron guardar las técnicas de la cría del gusano de seda y la multiplicación de la morera para su posterior industrialización por más de 30 siglos y únicamente las emperatrices y mujeres nobles conocían todos los por menores que eran métodos sumamente primitivos y artesanales.

La leyes de los reinos productores de telas de seda castigaban con severidad a quienes intentaban revelar el misterio de la cría del gusano de seda y del cultivo del árbol de la morera (*Morus sp.*). Las penas aplicadas eran la tortura y la muerte ya que era una industria tan importante en su economía y en muchos casos era el sostén del reino.

Testimonios de estos comercios, es la denominada "Ruta de la Seda" que presenta una longitud aproximada de 7 mil kilómetros atravesando regiones de China, Pakistan y los actuales países de Iran, Irak, Siria, terminando en las costas del mediterraneo en la que se desarrolló un gran tráfico en cuanto que era recorrido por caravanas que además de seda transportaban pieles, caballos, cañamo, cerámica, etc. (7,9,25,31)

Pero dadas las invasiones permanentes que sufrió el imperio Chino ayudó a la dispersión del conocimiento de la sericultura por el mundo hasta llegar a tierras europeas. España difunde la sericultura, ayudando además al florecimiento de esta industria, además de difundirla en casi todas su colonias, como también el arte milenario de tejer los finos hilos de los capullos de seda y el cultivo de la morera. (25).



En la actualidad la cría del gusano de seda y el cultivo de la morera se encuentra al alcance de todos. Los distintos gobiernos se encargarán de dirigir y publicar lo relativo a su desarrollo para que los granjeros puedan sin problema complementar sus otras actividades y que están dispuestos a dedicarse aproximadamente un mes al año a una jornada de mucha fatiga, pero que constituye una de las fuentes más lucrativas y rentables para la economía familiar en muchos países. (7.10.25).

### 1.1 Producción de seda en México.

La cría del gusano de seda o sericicultura se inició en México en tiempos de la colonia ya que misioneros dominicos trajeron la siembra del gusano y la morera, aprovechando la licencia concedida por la corona española, aunque también se dice que Hernán Cortés fue el primer introductor. Pronto la actividad sericícola prosperó ya que la morera crecía más rápidamente en la Nueva España que en la propia España debido a lo variado y benigno del clima.

Por diversas razones la cría del gusano de seda fue prohibida en la Nueva España por el Rey Felipe II, para dejarle a las Filipinas el monopolio en la producción de seda. (9.27.29.39).

En 1804 el señor cura Don Miguel Hidalgo y Castilla funda la escuela de artes y oficios en el Pueblo Nuevo de los Dolores (Dolores Hidalgo, Gto.) en la cual inició la cría del gusano de seda, pero la falta de tecnología y la prohibición del cultivo de la morera impidió que prosperara. (4.9.39).

Durante la dictadura de Porfirio Díaz, se procuró impulsar la cría del gusano de seda y la morera especialmente en los estados de Guanajuato y Michoacán. (9.27).

En 1925 se crea por decreto nacional la Comisión de Fomento y Control de la Producción Sericícola, con apoyo del gobierno del Estado de Veracruz que contaba con viveros capaces de proveer hasta tres millones de plantas de morera y un anexo para la producción de huevos seleccionados de gusano de seda de variedades ya adaptadas, y un par de máquinas devanadoras del capullo y telares para su industrialización. Pero los rendimientos finales no fueron los esperados y las esperanzas puestas en el proyecto se vieron a los pocos años desvanecidas, y para la década de los años 1930's perdió prácticamente toda la importancia económica, lo cual se debió indudablemente a que el proceso sericícola en su conjunto no

tuvo el desarrollo tecnológico requerido para competir por un lado con las fábricas de telas de fibras sintéticas, y por otro lado con la comercialización de prendas de seda importadas. (9,25).

Actualmente la producción de seda en el país es casi nula aunque algunos estados del país como Oaxaca y Guanajuato se cría el gusano de seda en forma rústica y muy artesanal.

El Centro Nacional de Sericicultura de S.A.R.H., en San Luis Potosí, fué el primer establecimiento con un programa de cultivo y propagación de moreras, crianza y reproducción del gusano de seda, de una manera más tecnificada y científica. En la actualidad cuenta con una asesoría de investigadores japoneses, en cuanto a crianza del gusano, cultivo de moreras y en el área textil, así como la de promotores para la motivación de campesinos y artesanos como posibles productores. (9,13,14,29).

A fines de 1988, la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., inició un proyecto académico, práctico y de divulgación para el fomento de la cría del gusano de seda y el cultivo de la morera con el fin de propiciar la participación de la comunidad y la capacitación de recursos humanos especializados en sericicultura, pasando a ser el segundo centro a nivel nacional. (4).

Dicha responsabilidad cayó en el Centro de Investigación, Enseñanza y Extensión de la Ganadería del Altiplano (C.I.E.E.G.A.) rancho "San Francisco", ubicado en el Municipio de Chalco en el Estado de México, en donde se encuentra muy avanzado dicho proyecto en cuanto a cultivo del árbol de mora (*Morus sp.*), de cuya hoja es el alimento para el gusano de seda, así como la adaptación de simiente japonesa al altiplano Mexicano y realizando funciones zootécnicas como la crianza, manejo y reproducción del gusano de seda.

Otras entidades Federativas se han enterado del proyecto que se promueve y en consecuencia han surgido grupos interesados Oaxaca, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Chiapas. En este contexto la U.N.A.M., y concretamente la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, se ha interesado en tomar el reto de ser pionera en la sericicultura y entiende que la columna vertebral está en ella apoyando en las investigaciones en cuanto a su patología, genética, investigación y desarrollo en sericicultura, tecnología de simiente y de las moreras, etc.

Es de imaginarse por lo antes expuesto que entre los problemas de que adolece en la actualidad la sericicultura está la escasez de árboles de morera para obtener la hoja para alimentar al gusano, la falta de locales y equipo adecuado, la falta de conocimientos para lograr que los gusanos crezcan vigorosamente lo cual repercute en la gran mortandad de gusanos por el ataque de enfermedades.

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA

Antiguamente se conocían las enfermedades del gusano de seda pero no se comprendían a los agentes causales y su nombre, diversos autores han informado de una enfermedad misteriosa que afectó los criaderos y ser la causante de la mortalidad de los gusanos en algunas zonas sericícolas de Francia atacó en el siglo XVII y en Italia en el siglo XVIII, pero su carácter esporádico solo ocasionaron daños parciales y limitados a las zonas afectadas.

Sin embargo las alteraciones patológicas que se verificaron en la segunda mitad del siglo XIX, tuvieron efectos desastrosos y se extendió a toda la producción sericícola mundial de 1845 a 1850, la nueva epizootia se manifestó por primera vez en las provincias francesas de Vancluse en 1845, luego en Herault en 1846, en Gard y Drome en 1847, en Ardeche e Isere en 1849, por último el de Cevennes en 1851 y a partir de ese año la invasión fue universal, los primeros en reportarla fueron los investigadores italianos de Osimo en 1849 y Vittadini en 1859.

Alrededor de los años de 1853 empezó a tomar mucha atención de los investigadores y sericultores el azote de la nueva enfermedad que más tarde llegó a conocerse como PEBRINA, este nombre fué puesto por de Quatrefages que proviene del provensal que significa pimienta a causa del parecido que se tiene con los granos de pimienta. Que fue uno de los investigadores que se dedicó a estudiar este terrible mal y el primero que dió la noticia del brote en el Valle de Cavollon, en el claustro de Avignón en Francia, pero sin conocer su causa y a partir de esta fecha ya no se pudieron producir en Francia los huevos del gusano de seda. (7,9,10,11,27,30,35).

El Área de infección aumentó rápidamente y la demanda de la simiente sana aumentó también, mientras que la poca que se proporcionaba tuvo que ser traída desde distantes regiones, invirtiéndose muchos francos para que en cierto modo se pudiera sostener la importación de huevecillo libre de

enfermedades y así se sostuviera la producción de seda alcanzando su máxima producción con 26 millones de kilogramos valuados en 117 millones de francos en 1853, de este año en adelante la producción de seda decayó rápidamente.

En el caso de Italia también se presentó la enfermedad pero en una forma mucho más desastrosa que afectó a toda la industria sericícola.

En 1865 el ilustre sabio Louis Pasteur al estudiar esta enfermedad por encargo que le hiciera una comisión gubernamental encabezada por su maestro Jean Baptiste Dumas, para la investigación de la enfermedad en la ciudad provenzal de Alais al sur de París. Pasteur llegó al hecho de que la enfermedad ha existido desde periodos remotos y en muchos lugares, él encontró corpúsculos en capullos japoneses, y en varias muestras las cuales han sido preservadas hasta nuestros días en colecciones públicas. Así Pasteur llegó a la conclusión de que la enfermedad ha sido inherente en sucesivas generaciones del gusano de seda.

En 1867 De Quatrefages estimó las pérdidas sufridas por las industrias sericícolas, en los últimos 13 años seguidos de 1853, dentro de estos dos países en 100 millones de libras esterlinas, constituyéndose verdaderamente en una calamidad a escala nacional.

Alrededor de 1870 se recogieron pruebas de que los países del lejano oriente ya no podían jactarse de la inmunidad de sus gusanos a la enfermedad de pebrina. (7,10,11,27).

A raíz de estas fuertes epidemias que tuvieron lugar en el siglo pasado, fueron numerosos los investigadores y sericultores que profundizaron en el estudio de la pebrina dando a conocer muchos descubrimientos científicos.

La primera aportación en la lucha para combatir a la pebrina la realizó el francés De Meneville en 1844, el cual descubrió pequeños corpúsculos en la hemolinfa de la larva a los cuales denominó hematozoito.

De Filippi en 1850 prosiguió estos estudios localizándolos además en el tejido de la larva.

Una de las contribuciones más notables fué la del biólogo italiano Osimo de Padua, que en 1857, demostró la presencia de estos corpúsculos en la larva, en el adulto y sobre todo en los huevecillos puestos por las mariposas

manifestando el carácter hereditario de la enfermedad, el investigador italiano Vittadini, había señalado más tarde que su número aumentaba a medida que los huevecillos se aproximaban al período de cría.

También en 1857 se descubrió que los corpúsculos son esporas de un protozoo que pertenece a la clase de los microsporidios denominado *Nosema Bombycis Naggeli*.

En 1870 Louis Pasteur aprovechando las investigaciones de numerosos estudiosos principalmente de Osimo, Vittadini, Cornelia y sobre todo de Cantoni, el cual, después de haber cultivado los huevos que procedían de mariposas sin corpúsculos, había visto que los gusanos sufrían durante el cultivo la aparición de los corpúsculos, entonces según él esto probaba que el examen microscópico era inútil. Pasteur adoptó de nuevo el método de selección microscópica de los huevecillos de las mariposas del gusano de seda, retomó las técnicas prácticas y reproducibles que fracasaron en otras manos y se hizo célebre el establecer y afirmar que:

1. Los corpúsculos son las verdaderas características de la enfermedad, si no en las etapas primarias, si en la mariposa o etapa adulta.
2. Que los corpúsculos son parásitos y no solo el -- signo, sino también la causa de la enfermedad.
3. Que la enfermedad se manifiesta la misma por ser -- hereditaria, por contagio con gusanos enfermos y -- por el consumo de hojas sobre las cuales los cor-- púsculos diseminados.
4. Determinar un método para reconocer los huevos -- exentos de pebrina además de dar las recomendacio-- nes adecuadas para obtener huevecillo solamente sano. (7,9,10,11,25,27,29,30,35,36,38)

### 1.3 ETIOLOGIA

Las microsporidias son parásitos protozoarios intracelulares obligados de una amplia diversidad de organismos, que infectan a muchos insectos de importancia económica y médica, que están clasificados taxonómicamente como:

PHYLUM: Protozoa

SURPHYLUM: Microspora tiene esporas unicelulares con un filamento polar y un esporoplasma.

CLASE: Microsporidea

ORDEN: Microsporida

SUBORDEN: Monocendina tiene una sola espora independiente.

FAMILIA: Nosematidase

GENERO: Nosema

ESPECIE: Nosema bombycis

NOMBRE: Nosema bombycis Naegeli en honor de su descubridor.

Los protozoarios son los animales más primitivos, su cuerpo está formado por una sola célula que realiza todas sus funciones a través de complejas estructuras, algunos protozoarios tienen un estado en su ciclo de vida, en el cual el núcleo no tiene membrana.

Morfológicamente los protozoarios son eucarióticos es decir con núcleo encerrado en una membrana, esto se demuestra ya que son teñidos de rojo oscuro por la solución de Giemsa.

Las esporas del Nosema bombycis son binucleares, estos son redondos y compactos.

El Nosema bombycis se mueve por medio de un filamento polar constituido de polisacarido y ácido fosfatosa.

El tipo de nutrición no es especializada, va que solo obtienen sus nutrientes de los líquidos celulares ó tejidos corporales de su huésped, los cuales pasan a través de la membrana.

La reproducción de este microsporidio es por fisión binaria ó reproducción asexual en la cual cada espora se divide en dos, el plano de fusión es longitudinal, la división precoz del núcleo sin la separación del citoplasma podría ser la causa de formaciones cuatrinucleares ó en cadena que se observan en los sitios de infección.

El Nosema bombycis forma un estado de resistencia como espora que se produce dentro del organismo por la formación de una gruesa pared con uno ó más individuos, este proceso se conoce como esporogonia ó formación de esporas, que en condiciones normales de temperatura y humedad conserva su vitalidad por 50 ó 60 días y después de este tiempo va perdiendo su poder de contagio lentamente (6,9,10,11,13,20, - 21,25,26,34,40).

El agente causal de la pebrina el Nosema bombycis Naegeli en el gusano de seda ha sido estudiado por más de un siglo llegándose a conocer detalles en cuanto a su morfología, ciclo de vida, signología, forma de infección, prevención, pero es hasta en estos últimos años cuando se ha llegado a detallar más profundamente sobre este agente patógeno, gracias a los avances científicos y tecnológicos al grado de proponer posibles tratamientos.

#### 1.4 MORFOLOGIA

En cuanto a su morfología son organismos redondos ó semiovalados con membrana, el citoplasma con dos núcleos bien redondos y compactos que con la tinción de Giemsa toman la coloración de rojo oscuro en la membrana y el citoplasma se colora de azul suave.

Conforme avanza en su multiplicación se van haciendo más grandes y alargados, núcleo pierde su forma compacta hasta ser muy irregular, esto es porque se va preparando para su reproducción por fisión binaria dividiendo el citoplasma de la célula.

A la observación microscópica de fases de una muestra, si está infectada es decir si los individuos están atacados con pebrina, en el campo del microscopio se observará la presencia de cuerpecillos ovoides brillantes de contornos claros y bien definidos más o menos de la misma forma y tamaño.

Si la muestra es de una larva o crisálida (gusano joven) los corpúsculos se observarán de una forma uniforme y puede tener o no membrana, en su interior puede presentar formas cuatrinucleares o en cadena, también en su interior se observan granulitos que son verdaderos órganos reproductores que darán nacimiento a otras esporas.

En una muestra que sea de un insecto adulto o mariposa los corpúsculos se observarán en el campo del microscopio de forma ovoide de un color verde brillante y bien conformados (9,21,29,30,40).

### 1.5 CICLO DE VIDA

El germen es infectado directamente dentro de las células del huésped por medio del filamento polar, dándose así el primer paso de desarrollo intracelular, por la inyección del germen por sí mismo, durante las primeras horas después de la inoculación el *Nosema bombycis* aumenta su tamaño cuidando su apariencia redonde original. El microsporidio va creciendo y los núcleos gradualmente se van volviendo menos compactos y más irregulares en su contorno, el núcleo se parte en dos con un pequeño aumento del citoplasma alrededor de ellos, se ve como si se fuera hinchando.

El protozoario después de crecer a cierto punto se vuelve largo antes de esta presentación la multiplicación no ocurre, el alargamiento es la forma de crecimiento y multiplicación por fusión binaria esquizogonia.

La división precóz del núcleo sin la separación del citoplasma podría ser la causa de la formación en cadena, esta observación sugiere que la condición celular es disparada por la esporogonia y que esta generalmente se reconoce de dos a cuatro días después de la inoculación del agente transmisor de la enfermedad, esta forma se encuentra en la célula huésped para que se lleve a cabo la emigración, crecimiento y penetración a la nueva célula huésped, para comenzar otra vez su crecimiento y multiplicación en esta nueva célula, y así se lleva a cabo la propagación del *Nosema bombycis* Naegeli de una célula a la otra y poderse manifestar para poner en movimiento la formación de esporas e invadir todo el tejido epitelial del insecto *Bombyx mori* L. manifestar la enfermedad o llegar a morir cuando se han multiplicado de tal forma que hace imposible el funcionamiento de los órganos vitales para la vida. (9,16,20,23,26,32,40).



## 1.6 PATOGENIA

El agente etiológico de la enfermedad se introduce en el canal alimenticio de la larva, llevado en las hojas de las moreras infectadas por varios vectores o por el polvo que se acumula en la sala de crianza, además de que los factores ambientales tienen una gran importancia sobre la susceptibilidad y receptividad para el agente invasor, donde se reproduce originando una gran cantidad de esporas que invadiran cada parte del organismo, generalmente se manifiesta del centro hacia la periferia, produciéndose una alteración profunda de los tejidos, perdiéndose toda estructura celular y apareciendo sobre la piel manchas especiales o corpúsculos que son las verdaderas manifestaciones de la enfermedad, se estima que cuando la infección se ha desarrollado a este grado existe de 30 a 50 millones de esporas en su cuerpo.

Los individuos infectados diseminan las esporas por las heces fecales contagiando a sus compañeros de charolas.

Además por su caracter hereditario infecta a sus huevecillos por lo cual hay una baja fertilidad o manifestandose en las primeras edades.

En los últimos años se han demostrado que el tamaño de las esporas es superior al del micrópilo del huevo, por lo tanto la hembra no infecta al macho por vía genital (7,9,10,11,13,18,19,21,25,30,31,33,37).

### 1.6.1 SINTOMATOLOGIA

Los primeros síntomas que se notan son la falta de apetito, esto se notó por la gran cantidad de hojas que no es consumida, por lo tanto se nota el adelgazamiento, la larva se aísla y deja de moverse dando la sensación de que busca un lugar tranquilo donde morir, ya que las esporas se están multiplicando e invadiendo sus órganos vitales, hasta que aparecen sobre el tegumento, espolón, falsas patas de la larva una pigmentación que va del color negruzco al rojo vivo, estas manchas son visibles en un principio con la ayuda de un lente de aumento, pero conforme avanza la enfermedad en la larva se observan a simple vista.

Sus deyecciones en vez de ser secas y bien formadas y de un color negro se convierten en una materia rojiza y casi líquidas.

Cuando los insectos son infectados transovaricamente el síntoma más característico para identificar a la enfermedad es la muy baja fertilidad de los huevecillos y los pocos que logran nacer presentan una desigualdad muy marcada en su desarrollo, pues los gusanos son atacados poco a poco desde un principio, aunque no tenga las manchas visibles, ni diseminen las esporas por las heces, pero se están alimentando menos que los insectos sanos.

La principal sintomatología de la presencia de la enfermedad de pebrina es cuando en la cuarta y quinta edad en la fase de larva hace sentir sus terribles estragos y se empieza a ver una gran cantidad de gusanos muertos que en lugar de descomponerse se momifican y endurecen de modo que es preciso tocarlos para saber si están muertos.

No obstante la enfermedad puede aparecer en edad - más avanzada ya que en muchos casos la mayoría de los insectos completan todas las fases de su ciclo de vida, entonces las larvas suben al bosque e hilan igualmente su capullo dejándolo sin acabar y morir sin transformarse en crisálida o mariposa, los más afectados mueren en el intento.

Solo que el capullo construido así es defectuoso, - ya que es más pequeño y escaso de seda, cuando logra salir con éxito de la metamorfosis y pasar al estado adulto o de mariposa aparecen con las alas demasiado cortas y arrugadas en forma de barquillo, el abdomen grueso, además de tener las patas torcidas, el vello que cubre su cuerpo está teñido de negro.

Cuando la mariposa ovoposita tiene un alto porcentaje de simiente no fecundada y los pocos que llegan a nacer estarán ya infectados (7,9,10,11,18,22,25,27,29,30,33,35,37, - 38).

## 1.7 DIAGNOSTICO

El diagnóstico correcto es una de las bases indispensables para lograr detectar a tiempo esta enfermedad, ya que una vez declarada no hay manera de controlar, entonces el único recurso con el que se cuenta es el de planear las medidas preventivas que permitan lograr el que no se propague más, ya que no existe tratamiento adecuado.

Las distintas técnicas para la purificación, desintegración e identificación de las esporas del Nosema bombycis Naegeli han experimentado un gran adelanto en los - - últimos diez años y están basados en trabajos muy avanzados

como los estudios serológicos, bioquímicos, inmunológicos, métodos indirectos de fluorescencia de anticuerpos, determinación de Ácidos nucleicos D.N.A. y R.N.A., polisacáridos, ácido fosfatasa que son encontrados en los diferentes estadios de la esquizogonia, hasta la utilización del rayo laser, e incluso por la medición del tamaño de la espora con el equipo más tecnificado y costoso como lo demuestran los establecimientos especializados autorizados en los países sericícolas más importantes como son China, Japón, e India, además de contar con el personal especializado y mejor entrenado. (5,8,13,16,17,18,19,23,24,26,28,32,35,40).

Lo que es más importante es que los métodos usados en otros países para la identificación no son los adecuados, pues no se cuenta con el equipo y personal capacitado en el país, además de la gran variedad de características identificables y a la incidencia de dimorfismo de la familia nosematidae.

Por lo anteriormente expuesto es necesario elaborar y adaptar un sistema de identificación para el *Nosema bombycix Naegeli* cuya técnica sea uniforme, digna de confianza, así como su técnica de muestreo. Y que sobre todo pueda ser usada por todos los sericultores, técnicos e investigadores, en cualquier parte del país.

Ya que esta agro-industria vuelve a tener auge en el país, lo primordial es mantenerla libre de pebrina.

Este método debe ser objetivo y altamente seguro, además de contar con las siguientes características:

1. Que no requiera de equipo muy especializado.
2. Que sea sistemático y relativamente rápido.
3. Que las esporas no sean expuestas a productos químicos ya que este podría alterar los resultados.
4. Que solo se sometan las muestras a moderados tratamientos físicos.

El método celular o el aislamiento de las hembras en postura para evitar la propagación del mal, propuesta por Louis Pasteur, se utilizara para controlar las posturas en el "Método de doble selección microscópica del sistema celular" - que se utilizará para el diagnóstico de huevecillo, en cuanto a las larvas y adultos atacados con la enfermedad de pebrina se agregaran además las técnicas de muestreo, las formas de macerado, la utilización de reactivos, el uso de centrifuga

sencilla de laboratorio de química, microscopio compuesto y de contraste de fases, así como la utilización de equipo de laboratorio estéril y el más adecuado para este fin.

Además de contar con los requisitos y características deseadas para este método y extendiéndose el análisis a todas las etapas del ciclo de vida huevo-larva-pupa-adulto o en su defecto solamente la inspección para fines reproductivos para la venta de simiente libre de la enfermedad.

### HIPOTESIS

A través del sistema de doble selección microscópica del sistema celular se podrán detectar a tiempo las madres que son portadoras de la enfermedad de la pebrina.

### OBJETIVOS

- Detectar hembras madres afectadas de pebrina.
- Diseñar la metodología de detección.
- Contribuir a un mejor conocimiento de la enfermedad de pebrina.

## II MATERIAL Y METODOS

Las muestras que se utilizaron para el desarrollo de la Metodología de Doble Selección Microscópica fue de 218 mariposas, mismas que fueron facilitadas por PRAXIS de Oaxaca; Centro de Especies Menores de la SARH de San Luis Potosí y el CIEEGA del Rancho San Francisco de la FMVZ con 18; 50 y 150 mariposas hembras madres respectivamente estas últimas representan el 60% de la población total de hembras de una crianza.

### 2.1 MATERIAL

Cajita de plástico  
Campana de hule negro para la ovoposición  
Centrifuga ordinaria de laboratorio de química  
Cubre objetos  
Horno de desecación  
Jeringa hipodérmica desechable de 10 ml.  
Lupa  
Microscopio compuesto  
Microscopio de contraste de fases  
Mortero de porcelana  
Papel encerado  
Papel filtro  
Porta objetos  
Reloj  
Sobres de papel encerado  
Tijeras de cirujano  
Varilla de vidrio  
Agua destilada  
Colorante de Giemsa  
Hidróxido de potasio como aclarante  
(6,15,36)

### 2.2 MUESTRA

Es conveniente tomar muestras representativas de hembras - madres en diferentes etapas del desarrollo de la enfermedad, sin embargo las más recomendables son las mariposas madres después de la ovoposición, que se han destinado a la reproducción y que se debe seleccionar al 2% de la población.

Cuando se trate de pequeñas poblaciones de 500 o menos mariposas madres se seleccionaran las dos muestras tomando en cuenta el porcentaje requerido y se analizarán a todas en el

doble examen individualmente. Si se trata de una población mayor de este número lo recomendable es realizar el primer examen individualmente de todas las mariposas seleccionadas al azar, para el segundo examen se recolectara la muestra también al azar y el 2% recomendado que se analizara ahora en forma masiva.

### 2.3 METODOS

Es necesario contar con una apropiada metodología para verificar la calidad de la semente del gusano de seda en el país, con tecnología apropiada de acuerdo a las condiciones y recursos, es un requisito indispensable ya que esta es la columna vertebral para desarrollar con buen éxito la sericultura nacional.

En los dos exámenes de las mariposas madres que se realizó en forma individual a todas, cuando la obtención de huevecillo sea con fines reproductivos, y un solo examen en forma masiva para cuando sea con fines de hilatura o forma industrial.

Las mariposas hembras fecundadas y previamente seleccionadas para la reproducción fueron llevadas a ovopositar sobre una hoja de papel encerado y cubierta con una campanita de hule negro rígido con el objeto de que no se salga y evitar perder el control de su semente, se colocaron en un cuarto en penumbra por 24 horas, bien ventilado, con una temperatura constante de 25° C., con una humedad relativa de 75 a 80%, por lo tanto no se hizo ningún manejo el primer día, para que se puedan realizar en buenas condiciones las primeras funciones fisiológicas y se refleje en un mayor vigor.

Si los huevecillos son incubados inmediatamente o puestos a la venta se examinarán a las mariposas madres después de las primeras 24 horas, o en caso de que se requieran invernar para su posterior utilización en la siguiente primavera, el examen se recomienda realizarlo después de las 48 horas de ovoposición.

### 2.4 TECNICA PARA EL DIAGNOSTICO

Estimando la importancia que esta enfermedad representa para la incipiente industria sericícola nacional, se recomiendan los siguientes procedimientos para lograr un buen diagnóstico de la misma dentro del criadero o en un laboratorio especializado.

## 2.4.1 EN LA MARIPOSA MADRE

1. Se identificó a cada mariposa madre, guardándolas en sobres de papel encerado para ir utilizando de una en una, para el primer examen y en cajitas de plástico para todo el grupo de la muestra para el siguiente examen.

2. Las mariposas se deshidrataron en un horno de secado a una temperatura que no excedió los 16° C., por un tiempo de 4 a 5 horas, cuidando de que no se quemara. Este secado se realizó con el objeto de:

- Evitar la multiplicación de organismos oportunistas contenidas en las moléculas de agua, las cuales alterarían los resultados mientras no se tenga la experiencia en la morfología de las esporas.

- Conservar la morfología de las esporas.

- Procurar que la temperatura y tiempos recomendados sean seguidos correctamente, ya que un aumento en uno de ellos puede destruir o alterar la morfología de las esporas.

- Mantener y separar las mariposas madres y conservarlas ya listas en sobres y por lotes para su análisis, o en caso de que se tenga que repetir algún examen.

2.4.2 Una vez deshidratada la mariposa madre se procedió al macerado de ella, que consistió en triturar los tejidos para romper las membranas protoplasmáticas y nucleares para que se dejen libres los diferentes organelos y agentes o cuerpos extraños en este caso de las esporas causantes de la enfermedad de pebrina contenidas en la célula. (15)

- Se le cortaron las alas a las mariposas que se examinaron principalmente por que las esporas se encuentran en su cuerpo.

- Se colocaron en un mortero de porcelana (de los que se utilizan en el laboratorio de química) para realizar la

trituration, al tejido se le agregaron 2 ml. de agua destilada, para que se humedezca y se procedió al macerado, al final se agregan 2 ml. de agua destilada y se homogeniza la mezcla.

2.4.3 Con unas cuantas gotas que se tomaron con una varilla de vidrio de este macerado se coloraron en un porta objetos y cubierto con el cubre objetos, teniendo el mismo cuidado como cuando se manejan preparaciones húmedas en el laboratorio de parasitología para que sean observadas y analizadas en el microscopio óptico, empezando con el objetivo seco débil o de menor potencia e ir cambiándolo a uno de mayor potencia hasta obtener una mejor imagen y observar con claridad y mejor detalle la morfología de las esporas si la muestra es positiva, generalmente cinco campos es suficiente observar.

Este proceso tan sencillo es recomendado para cuando va se tiene la suficiente experiencia en cuanto a la morfología en sus diferentes etapas de multiplicación de la espora del *Nosema bombycis* Naegeli y en las diferentes etapas de infección en el ciclo de vida del *Bombyx mori* L.

Para todos los que se inician en el diagnóstico de la enfermedad o que no se cuente con la experiencia deseada lo mejor es realizar el purificado de las esporas el cual consiste en:

1. Obtener un macerado el cual se centrifuga a 2600 r.p.m., por 3 minutos para separar las esporas de los tejidos, en el sedimento queda el protoplasma y en el líquido sobrenadante las esporas.

2. El líquido sobrenadante es filtrado y este filtrado otra vez se centrifuga a 2600 r.p.m., durante 3 minutos, el objetivo de este segundo centrifugado es el sedimentar a las esporas, por lo tanto el líquido sobrenadante se desecha y el sedimento se disuelve con un mililitro de agua destilada.

3. Con otra varilla de vidrio son tomadas una o dos gotas de este preparado y son observadas en el microscopio para su examen.



La utilización de un microscopio de contraste de -- fases y un testigo sería lo mejor para optimizar los resultados, entonces dos gotas de cada macerado son llevadas al microscopio y se recorren con cuidado y cuatro campos que se analicen son suficientes con este sistema. (5,6,8,13,16, -- 24,28,36).

## 2.5 EXAMEN EN FORMA INDUSTRIAL

Para cuando la obtención de huevecillo sea para la hilatura y la obtención del capullo sea llevado al mercado de la industria textil, se recomienda el examen de la simiente en forma industrial ya que lo que importa es producir hilo y no la calidad del capullo.

Este proceso se debe realizar el examen masivo para la - purificación de esporas, que es un método adecuado para el rápido y efectivo análisis de la simiente explotada en forma industrial:

1. Las mariposas madres se recolectan aleatoriamente en un número de 60 mariposas para cada muestra.
2. Se deshidratan.
3. Se les quitan las alas y se colocan en los morteros para esta capacidad.
4. Se agrega 1 ml., de agua destilada por cada mariposa y se procederá al macerado, al final se agrega otro ml., por mariposa.
5. Esta mezcla ya bien homogenizada es centrifugada a - 2600 r.p.m. por tres minutos.
6. Se procede al filtrado y este se vuelve a centrifugar a 2600 r.p.m., por tres minutos, el líquido sobrenadante se desecha y el sedimento se diluye con 5 ml., de agua destilada.
7. Se observa al microscopio óptico o de contraste de - fases, siguiendo el manejo de las preparaciones húmedas y del uso del microscopio, para realizar su - análisis hasta examinar cuatro campos para dar los - resultados. (5,6,8,13,16,24,28,36).

### 2.5.1 EXAMEN EN FASE DE LARVA

Cabe señalar que es muy importante que si se requiere identificar a la enfermedad en la fase de larva se -- deben utilizar los procedimientos de purificación de esporas -- ya recomendados, ya que las estructuras anatómicas como patas, esfago, glándulas, piel, etc. alterarían los resultados.

### 2.6 PROFILAXIS

En la actividad sericícola, prácticamente no existen -- tratamientos, ya que cuando una enfermedad aparece en un criadero no es posible aplicar remedio alguno e incluso donde se pueda aplicar cualquier cura esta generalmente no proporciona los resultados esperados. Por lo tanto la ausencia o presencia de la enfermedad de pebrina en un criadero dependerá exclusivamente de la implantación de medidas y métodos profilácticos rigurosos para su prevención.

Esta profilaxis debe abarcar dos sectores que son muy -- importantes, en la industria de la producción de simiente y en los establecimientos de crianza.

#### 2.6.1 PRODUCCION DE SIMIENTE

Es obligatorio para los establecimientos de producción de simiente que por medio de investigaciones en el área genética, los gusanos de seda sean más resistentes a los agentes atmosféricos y a diferentes parásitos, por realización de apareamientos rigurosamente controlados. Exámenes patológicos del gusano, por medio de doble selección microscópica del sistema celular para que se garantice el estar libre de cualquier enfermedad.

#### 2.6.2 AREA DE CRIANZA

En el área de crianza, se deberá cuidar rigurosamente las condiciones ambientales, como son:

Temperatura promedio de 25° C.

Humedad relativa de 70-80%

Ventilación de 3-6 M3 por segundo.

Alimentación cuantitativa y cualitativa dependiendo de los requerimientos de cada edad. Las hojas de morera debe ser fresca, sin fermentación y sobre todo limpia.

Medidas estrictas de higiene mediante el lavado de todos los implementos y cuartos de crianza con formalina al 2% y enjuagar con agua limpia, si es posible secar al sol. Durante la crianza se debe mantener limpio de polvo, colocar a la entrada tapete sanitario, restricción de la entrada a personas ajenas, utilizar ropa exclusiva para el cuarto de crianza.

Efectuar una limpieza en cada cambio de camas e inmediatamente la desinfección entre mudas espolvoreando cal, y proporcionar a las crías espacios vitales en cada edad. (7,9,10,11,19,25,27,29,30,35,41).

### 2.6.3 CONTROL

Una vez que se han detectado los síntomas de la enfermedad en el criadero el control más efectivo para erradicar la enfermedad es la incineración de todos los animales enfermos, recientemente han salido al mercado nuevos productos para su control, pero todavía no superan la fase experimental.

Actualmente se permite una incidencia de pebrina del 2% en criaderos bien controlados y altamente tecnificados, pero solo con fines de obtener capullo para la industria textil.

Además de que toda el área se debe de esterilizar desarrollando el siguiente trabajo de desinfección:

1. Lavar todos los implementos de crianza fuera del local.
2. Limpieza del cuarto de crianza, tallando pisos, techos y estanterías.
3. Flamear el cuarto.
4. Desinfección del cuarto de crianza con formalina al 2%.
5. Mantener cerrado el cuarto durante 24 horas.

6. Abrir la sala de crianza: puertas y ventanas - para una buena ventilación y remover el fuerte olor a formol.
7. Sumergir los implementos de crianza en formalina al 2% durante 30 minutos.
8. Enjuagar los implementos con agua limpia y de - ser posible secar al sol.
9. Desinfectar el cuarto de crianza con formalina al 2% por segunda ocasión.
10. Mantener cerrado el cuarto por 24 horas.
11. Ventilar el cuarto para retirar el olor a formol.
12. Colocar implementos, ajustar y probar el buen funcionamiento de los instrumentos y equipo 48 horas, antes de empezar una nueva crianza. (1,- 2,3,7,9,11,19,27,29,30,41).

## 2.7 TRATAMIENTO

En los últimos años la sericultura a tenido un gran avance en todos los aspectos pero aún no se ha podido encontrar un tratamiento eficaz contra la enfermedad de pebrina, por lo que en los diferentes brotes a través del tiempo ha llevado casi a la ruina total a países de reconocido prestigio serícola lo cual a interrumpido en forma preocupante el desarrollo de esta actividad, afortunadamente y gracias a los rigurosos medios preventivos y el eficaz control después de la presencia de un brote que se hace más esporádica en los criaderos serícolas.

El amplio conocimiento sobre su fisiología y patología que se ha generado en las dos últimas décadas, una porción importante se a acumulado en los mecanismos de defensa a las enfermedades infecciosas.

Alekseenok, A. Ya., ha experimentado con unos productos que denominó Nosematol 1 y Nosematol 2, (no se especifica composición química), donde rocía el producto en forma de aerosol a las larvas de 3a, 4a, y 5a edad, infectadas artificialmente con el Nosema bombycis Naegeli a una titulación de 50 esporas por mililitro, la cual no dió resultados positivos significativos ya que la infección bajó entre un 5 y 10% en comparación con el grupo control. (2,3,7,- 9,10,11,13,19,25,27,29,30,35,37,38,41).

### III RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, - donde se examinaron 218 mariposas hembras madres, resultaron negativas a la enfermedad de Pebrina. (cuadro 1)

Este resultado reviste una gran importancia ya que Oaxaca y San Luis Potosí son las entidades donde se está llevando a cabo la cría y la explotación a nivel nacional del gusano de seda con tecnología y metodología científica apropiada.

Por lo anteriormente expuesto se considera que México es libre de la enfermedad de la Pebrina, pero se recomienda continuar con exámenes periódicos después de cada crianza. Así como proporcionar un certificado de garantía de que la simiente está libre de este mal por parte de la SARH.

#### IV DISCUSION

El presente trabajo proporciona un panorama concreto y útil sobre las características de la enfermedad de pebrina que afecta al gusano de seda; haciendo énfasis en la metodología científica para su diagnóstico, control y prevención de esta enfermedad.

Los datos aportados repercutirán positivamente ya que varios Estados han mostrado interés en los últimos años por el rescate de la sericicultura y áreas afines.

Este diagnóstico se ha constituido en un desafío para el personal dedicado a la sericicultura, principalmente porque no se cuenta con literatura especializada en el área, así como la necesidad de contar con una guía para el estudio de la más grave enfermedad que afecta al *Bombyx mori*, como también de sus factores predisponentes.

Los métodos de diagnóstico son por medio de pruebas bio-químicas, métodos directos indirectos de inmunofluorescencia, determinación de ácidos nucleicos: DNA y RNA. Así como la utilización de microscopio electrónico y rayo láser que lamentablemente resulta muy costoso y requiriendo de un personal altamente especializado, el cual no se cuenta fácilmente en el país.

Hoy más que nunca se debe transmitir a las instituciones - públicas y privadas, los principios filosóficos y la metodología que animan los trabajos de investigación en actividades factibles de rescatar, ya que se necesita un mayor número de personas especializadas en el área para un beneficio colectivo.

Por otro lado en la investigación bibliográfica sobre el tema se observó un elevado porcentaje de información sobre los usos y beneficios del gusano de seda, así como la demanda de sus subproductos por lo tanto los beneficios económicos que proporciona esta industria, aunado a la situación climática de México hace que la sericicultura sea una área nueva de desarrollo para campesinos.

Se concluye que este método es eficaz, confiable y adaptado a las necesidades del país.

## V. LITERATURA CITADA

- 1.- Alger, N. E.; Undeen, A. H.: The control of a microsporidian, Nosema sep in anopheline colony by an egg-rinsing technique. J. Invertebr. Pathol. 15: - - 321-327, (1970).
- 2.- Alekseenok, A. Ya.: Nosematol for control of nosematosis of bee and pebrine of the silkworm. Veterinariya Moscow, USSR. (10): 45-47, (1986).
- 3.- Alekseenok, A. Ya; Pavlenko, G. I.: Results of a study of the preparations "Nosematol-1" y "Nosematol-2" for the control of pebrine of the silkworm in industrial complexes. Wolochaeva T.S Moscow, USSR, 1984.
- 4.- Cano, C.: La sericicultura, viable aún para el desarrollo y la autosuficiencia. Gaceta UNAM. (2,402) 7-9, 1989).
- 5.- Cantweell, G.E.: Standard methods for counting nosema spores. Am. Bee. J. 110: 222-223, (1970).
- 6.- Carpenter, P.L.: Microbiología, 4a. ed. Interamericana, México, D. F. 1979.
- 7.- Cherubini, R.: Cría moderna y rentable del gusano de seda. Devecchi S. A., Barcelona, 1987.
- 8.- Cole, R.J.: The application of the "triangulation" method to the purification of nosema spores from insect tissues. J. Invertebr. Pathol. 15: 193-195, (1970)
- 9.- Dorado, M.L.: Contribución al estudio de la producción y comercialización del gusano de seda en México. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 1986.
10. Dubos, J.R.: Pasteur II. Salvat Edit. Barcelona, 1985.
11. Enciclopedia Británica. William Bento. Vol. 20: 666-667, Chicago, U.S.A. 1963.
12. Fries, I.; Ekbohm, G.; Villumstad, E.: Nosema avis - sampling technique and honey yield. J. Apic. Res. 23: 102-105, (1984).

13. García, J.J.A.: Proyecto de sericicultura. Memorias de -  
curso de actualización "Gusano de Seda". Mexico, D. F. -  
1989. Fac. de Med. Vet. y Zoot. 1989.
14. García, J.J.A.: La sericicultura, versatil actividad. - -  
Agro Sintesis. 20: 90-95, (1989).
15. Gaviño, T.G.: Técnicas selectas de laboratorio y de  
campo. Limusa. México, D. F. 1985.
16. Grobov, O.F.; Rodionova, Z.E.: Identification of spores -  
of Nosema bombycis from silkworm. Veterinariya Moscow. -  
USSR. (12): 70-71, (1985).
17. Grobov, O.F.; Rodionova, Z.E.: Serological diagnosis of -  
microsporidiosis in useful insects. Trudy Vsesoyuznogo -  
Instituta Eksperimental noi Veterinarii. 62: 112-116, -  
(1985). Tomado de Protozoological Absts. 11: 380, absts.  
3171, (1987).
18. Han, M.S.; Watanabe, H.: Transovarial transmission of two  
microsporidia in the silkworm. Bombyx mori and  
disease ocurrence in the progeny population. J.  
Invertebr. Pathol. 51: 41-45, (1988).
19. Horie, Y.; Watanabe, H.: Recent advances in sericulture.  
Ann. Rev. Entomol. 25: 49-71, (1980).
20. Ishihara, R.: The life cycle of Nosema bombycis as re-  
veald in tissue culture cells of Bombyx mori. J. Inver -  
tebr. Pathol. 14: 316-320. (1966).
21. Ishihara, R.; Sohi, S. S.: Infection of avarian tissue -  
culture of Bombyx mori by Nosema Bombycis spores. J. In -  
vertebr. Pathol. 8: 538-540, (1969).
22. Ishihara, R.; Tadashi, F.: The spread of pebrine within a  
colony of the silkworm, bombyx mori (Linneaus). J. In -  
vertebr. Pathol. 7: 126-131, (1965).
23. Kawarabata, T.; Hayasaka, S.: An enzyme-linked - -  
immunosorbent to detect alkali-solubre spore surface - -  
antigens of strains of Nosema bombycis (microspora: - -  
nosematidae). J. Invertebr. Pathol. 50: 118-123, (1987).
24. Kurisu, K.: Simplified calculation of the operating  
characteristics in the pebrine inspection of the grouping  
mother muths method. J. Seric. Sci. Jpn. 55 351-352, - -  
(1986).



25. Lacerca, A. M.: Cría del gusano de seda. Albatros, Buenos Aires. 1983.
26. Langley, R. C. Jr.; Cali, A.; Somberg, W. E.: two-dimensional electrophoretic analysis of spore protein of the microsporidia. J. Parasit. 73: 910-918, (1987).
27. Luz, G. J. de la.: Tratado de sericultura para la República Mexicana. Fac. de Med. Vét. y Zoot. México, D. F. - 1989.
28. Manelova, Z. E.: Methods for purification and desintegration of microsporidia spores. Trudy Vsesoyuznogo Instituta Eksperiment'li noi Veterinari. 61: 115-120, (1984). - Tomado de Protozoology Absts. 10: 301, Absts. 2617 (1986).
29. Marmolejo, G. A.: Gusano de seda, aspectos generales. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vét. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 1982.
30. Martínez, P. W.: El gusano de seda, cría, enfermedades, industrialización. Atlantidad S. A. Buenos Aires, 1942.
31. Martínez, P. W.: La morera, Atlantidad S. A. Buenos Aires, 1943.
32. Mori, H.; Sasaki, T.: Difference of proteins from inclusion bodies formed in the nucleus and cytoplasm of the cytoplasmic polyhedrosis virus-infected midgut in the silkworm Bombyx mori. J. Invertebr. Pathol. 50: 26-32, - - (1987).
33. Patil, C. S.: Preliminary investigations on cross infection of microsporidian spores from Tasar silkworm, Antheraea mylitta Drury to mulberry silkworm, Bombyx mori L. Entomon. 14: 207-210, (1989).
34. Quiroz, R. H.: Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Limusa, México, D. F. 1984.
35. Rocafort, M.: Guía del criador del gusano de seda. De Vecchi S. A. Barcelona, 1988.
36. Salazar, S. P.; Haro, A. I.: Manual de técnicas para el diagnóstico morfológico de las parasitosis. Pro. Mendez Cervantes. México, D. F. 1989.

37. Secretaría de Agricultura y Fomento.: Curso corto por -- correspondencia de sericultura y devanado de la seda. -- Dirección General de Agricultura y Ganadería. México, -- D. F. 1931.
38. S. E. P.: De la horda invisible. Colección Sepa. Dirección General de Publicaciones y Biblioteca SEP. México, -- D. F. 1981.
39. Shield, D.: Seda, la más preciada fibra textil. El Nacional 58 tomo III (20,671): 1-2, Domingo 31 de agosto de -- 1986.
40. Takizawa, H.; Vivier, E.; Petitprez, A.: Recherches cytochimiques sur la microsporidie *Nosema bombycis* au -- cours de son développement chez le ver á soie *Bombyx mori*. J. Protozool. 22: 359-368, (1975).
41. Yokoyama, T.: Sericulture. Ann. Rev. Entomol. 8: 287 -- 306, (1963).

CUADRO I. RESULTADOS OBTENIDOS POR LA PRUEBA DE  
DUBLE COLECCION MICROSCOPICA DEL SIO  
DE LAS ESCUELAS.

No. DE MARIPOSAS	PROCEDENCIA	RESULTADO
18	PRAXIS OAXACA	NEGATIVO
50	SARH S. L. P.	NEGATIVO
150	CIEEGA. UNAM.	NEGATIVO