



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“ UTILIZACION DE ANTIGENOS LARVIARIOS DE
Oestrus ovis, PARA EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO
DE OESTROSIS EN OVINOS ”**

T E S I S

Que para obtener el título de
Médico Veterinario Zootecnista

P R E S E N T A

ROSA MARGARITA ANGULO CONTRERAS

A S E S O R E S:

M. V. Z. Carlos Ramón Bautista Garfias

M. V. Z. Antonio Acevedo Hernández

MEXICO, D. F. 1983



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

I N D I C E

	PAGINA
I. RESUMEN .	1-3
II. INTRODUCCION.	4-8
HIPOTESIS.	9-10
OBJETIVOS.	11
III. MATERIAL Y METODOS.	12-33
IV. RESULTADOS.	34-57
V. DISCUSION.	58-65
VI. CONCLUSIONES.	66
VII. LITERATURA CITADA.	67-70

R E S U M E N

Se obtuvieron 100 muestras de suero y secreción nasal de borregos, en un período de tres meses, del rastro de San Felipe del Progreso, Edo. de México, y 18 sueros y secreción nasal de ovinos libres de Oestrus ovis, del Centro Experimental Pecuario de Hueytamalco, Puebla. A todos los animales se les practicó un examen post-mortem para verificar la presencia de larvas de Oestrus ovis en los cornetes y senos nasales, así como en la faringe, laringe y tráquea. Cuando se encontraron larvas, éstas se contaron y separaron en larvas del primer estadio (L1), segundo estadio (L2) y tercer estadio (L3). Se preparó un antígeno somático (extracto crudo) de cada uno de los estadios, que se recolectaron de los borregos sacrificados, así como su respectivo antisuero en conejos.

Ochenta y ocho de los borregos del rastro estaban parasitados por larvas de O. ovis. De éstos 74 (84.09%) tenían larvas del primer estadio, 46 (52.27%) larvas del segundo estadio y 16 (18.18%) larvas del tercer estadio. Los sueros de los ovinos se ensayaron con cada uno de los antígenos en la prueba de doble difusión en gel de agar (DG). Utilizando el antígeno L1, se detectaron 37 de los animales parasitados, -

obteniéndose una sensibilidad del 42.04% y una especificidad del 100%. Con el antígeno L2 se detectaron 52 de los ovinos parasitados; la sensibilidad fue del 59.09% y la especificidad del 100%. Con el antígeno L3, se detectaron 16 de los animales con larvas de O. ovis; la sensibilidad fue del 18.18% y la especificidad del 95.83%. Los sueros de los animales control fueron negativos a los 3 antígenos.

También se examinó la secreción nasal de los animales del rastro (100) y de los borregos control, utilizando los tres antígenos en la prueba de DD. Solamente 2 animales reaccionaron positivamente a la prueba. Las muestras de los borregos control fueron negativas.

Los sueros de los ovinos se ensayaron con cada uno de los antígenos en la prueba de hemaglutinación pasiva (HP). Utilizando el antígeno de larva 1, se detectaron 38 animales parasitados, obteniéndose una sensibilidad del 40.90% y una especificidad del 91.66%. Con el antígeno de larva 2 se detectaron 83 de los ovinos parasitados; la sensibilidad fue del 90.90% y la especificidad del 87.50%. Con el antígeno de larva 3, se detectaron 25 de los animales con larvas de O. ovis, la sensibilidad fue del 28.40% y la especificidad del 100%. Las muestras de los borregos control fueron negativas

También se examinó la secreción nasal descomplementada de -- los animales del rastro y de los borregos control, utilizando los tres antígenos en la prueba de HP. Solamente con el - antígeno de larva 1 se puede diferenciar entre los animales parasitados y los no parasitados. Se detectaron 43 de los ovinos parasitados, la sensibilidad fue del 47.72% y la especificidad del 95.83%. Con los otros dos antígenos no se pudo - discriminar los animales parasitados de los no parasitados.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se sugiere utilizar suero de los animales problema, el antígeno somático de larva 2 y una combinación de las pruebas de DD y HP para hacer el diagnóstico de oestrosis en ovinos.

I N T R O D U C C I O N

La mosca Oestrus ovis se encuentra distribuida mundialmente, siendo uno de los parásitos que se encuentran con más frecuencia en los lugares en donde se crían ovinos y caprinos (5,23) llegando a provocar en algunos casos, considerables pérdidas económicas (24). Una mosca hembra puede depositar cerca de 500 larvas en los ollares de los ovinos y caprinos. Las larvas del primer estadio migran en los pasajes nasales hacia la parte superior, llegando a los senos nasales y a veces a los senos frontales (13,14).

El período larvario dura alrededor de 8 a 10 meses, y al término de este tiempo, las larvas 3, salen al exterior pasando al estado pupal en pocas horas. Este período dura de 3 a 6 semanas y puede tardar más tiempo en áreas donde prevalecen las temperaturas bajas (16). Las moscas adultas pueden vivir más de 28 días (16).

En presencia de la mosca, los ovinos y caprinos están muy inquietos y bajan la cabeza tratando de tapar los ollares. Una vez que realiza la puesta de las larvas, los animales se frotan el hocico y fosas nasales contra el suelo o en diversos objetos. Los

movimientos de las larvas provocan posiciones anormales de la cabeza del animal, dirigiéndola hacia arriba, hacia abajo, lateralmente o hacia atrás, y su marcha puede ser vacilante. Se observa estornudo y una descarga nasal purulenta de mal aspecto y a veces pueden mostrar severos trastornos nerviosos (6, 11, 20, 25). En México por ejemplo, se ha observado que un ovino parasitado por Oestrus ovis gana un peso de - - 184.4 g. diarios y posteriormente a la desparasitación, gana 333.3 g. diarios (1, 2).

En los Estados Unidos se observó que, en 1965 la industria ovina perdió aproximadamente 8,000,000 de dólares, debido a la infestación por Oestrus ovis (24). En Nuevo México, Estados Unidos, se han descrito infestaciones del 90% al 95% en ovejas adultas (24).

En la Unión Soviética se ha observado que las larvas de Oestrus ovis son responsables de una alta mortalidad en corderos, encontrándose hasta 350 larvas por animal. En Sudáfrica la infestación de ovinos varía del 10% en julio al 50% entre octubre y enero (24). En el rastro municipal de Pretoria - - (Sudáfrica), se encontró, en un período de 24 meses, una infestación del 73.4% en borregos, teniendo una carga parasitaria promedio de 19.2 larvas (10).

En México se encontró una incidencia del 8% al 100% en ovinos, en Durango (1,2) y en el rastro de Ferrería, en un estudio realizado en 4,850 cabezas de ganado caprino sacrificado en un período de tres meses (marzo, abril y mayo), se encontró una incidencia por Oestrus ovis del 86.2%. Estos caprinos procedían de los estados de Zacatecas, Durango, San Luis Potosí, Guanajuato y Guerrero (21).

Por lo anterior, es de suma importancia llegar a un diagnóstico oportuno de la oestrosis, para poder utilizar a tiempo el tratamiento adecuado para esta parasitosis, y así evitar daños mayores y obtener mejores rendimientos.

En la actualidad, los métodos de diagnóstico más comúnmente utilizados son: la sintomatología, la observación de larvas al momento de ser expulsadas por los ollares de los animales y el hallazgo de parásitos a la necropsia (10, 20).

El primero no es del todo confiable, ya que los signos clínicos de la enfermedad se pueden confundir con los de otras enfermedades, principalmente de índole respiratorio, o en casos muy severos con algunas enfermedades nerviosas. Además, en muchas ocasiones las infestaciones pasan desapercibidas, ya que la presencia de pequeñas cantidades de larvas, no dan lugar a ningún trastorno aparente. Es necesario, por lo tanto, llevar a cabo una exploración cuidadosa de los vacunos -

respiratorios explorables (20) y esto no siempre es factible

Para confirmar el diagnóstico se utiliza el examen port-mortem. Se encuentra la presencia de larvas, en cavidades nasales, senos frontales, senos maxilares y conchas etmoidales, principalmente (20).

De acuerdo a lo anterior, existe la necesidad de contar con un método de diagnóstico confiable, y de fácil realización, que detecte oportunamente la infestación y agilice el tratamiento.

En general, los artrópodos productores de miasis, provocan respuestas inmunes que pueden ser detectadas por Intra-dermo reacción y por pruebas serológicas (3,4).

En el caso de Oestrus ovis, no se conoce como ocurre la respuesta inmune, probablemente sea en forma similar a la presentada por hipodermosis puesto que ambos artrópodos pertenecen a la familia Oestridae (14,18).

Un estudio realizado con suero de cabras, demuestra que las infestadas por larvas de Oestrus ovis, son capaces de dar una respuesta inmune humoral contra el parásito, y que es posible detectar esta respuesta por medio de pruebas sero

lógicas como es la prueba de Hemaglutinación Pasiva (HP) y la de doble difusión en gel de agar (DD) (15).

El estudio anterior realizado en cabras, es el único que se ha reportado sobre el diagnóstico inmunológico de Oestrus -- ovis.

No se ha realizado en ovinos y tampoco se ha estudiado si -- también la larva 1 es capaz de dar una respuesta inmune humoral contra el parásito.

En la secreción nasal de los borregos, se ha visto que aproximadamente el 40% de los anticuerpos son de la clase IgG1 - (19), por lo que existe una posibilidad de detectar anticuerpos anti-Oestrus ovis en dicha secreción, como ya se ha mostrado en borregos infectados con el virus de para-influenza 3 (22). De ser así, se facilitaría la obtención de la muestra para el diagnóstico de oestrosis sin necesidad de san- - grar al animal.

En vista de todo lo anterior, se decidió realizar el presente trabajo.

H I P O T E S I S

En un estudio realizado en caprinos (15), para hacer el diagnóstico inmunológico de Oestrus Ovis, se observó que utilizando la prueba de Doble difusión en gel (DD), de cien cabras sacrificadas, solamente tres dieron reacciones positivas con los antígenos L2 y L3.

Utilizando la prueba de Hemaglutinación pasiva (HP), se detectaron setenta y siete animales con anticuerpos anti-Oestrus ovis. (15).

Probablemente hay una respuesta inmune mayor contra el estadio larvario 2(L2), que contra el estadio larvario 3 (L3).

El antisuero anti-L2, tuvo un título de 1:256 en la prueba de Hemaglutinación pasiva (HP); con la misma prueba, se observó que los animales controles tuvieron títulos muy bajos no mayores de 1:4, lo cual indica, que al utilizar el antígeno L2 en la prueba de HP, se pueden discriminar animales infectados de los no infectados.

Se supone también, que el estadio larvario L1 de Oestrus ovis es capaz, de dar una respuesta inmune humoral contra el parásito.

Por lo expuesto anteriormente se concluye que la prueba más adecuada para detectar anticuerpos anti-Oestrus ovis es la de hemaglutinación pasiva (HP) y que es posible diferenciar animales infectados de animales no infectados utilizando el antígeno L2(15).

Se cree, además que existe la posibilidad de detectar anticuerpos anti-Oestrus ovis en la secreción nasal, igual que se han encontrado en dicha secreción, anticuerpos en cerdos infectados con el virus de parainfluenza 3 (22).

O B J E T I V O S

1. Determinar cual de los tres antígenos larvarios de Oestrus ovis es el más adecuado para el diagnóstico serológico de oestrosis en ovinos.

2. Determinar, si es posible detectar, anticuerpos anti --
Oestrus ovis en la secreción nasal de ovinos infestados y comparar los títulos, con aquéllas del suero en animales - parasitados.

3. Determinar la especificidad y sensibilidad de diferentes -
pruebas serológicas que se pueden emplear en el diagnóstico de oestrosis en ovinos.

MATERIAL Y METODOS

OBTENCION DE ANTIGENOS: (12)

1. Se recolectaron larvas de Oestrus ovis a partir de bo-- rregos sacrificados en el rastro.
2. Las larvas se separaron de acuerdo con sus características morfológicas en larva 1 (L1), en larva 2 (L2) y en larva 3 (L3). (10,14,16,20,23)
3. Se procedió a un lavado con solución salina fisiológica, hasta que el sobrenadante se observó claro.
4. Las larvas L2 y L3 fueron liofilizadas hasta ser utili- zadas.
5. Se pesaron 10 g. de cada uno de los estadios larvarios (L2 y L3), se agregaron 50 ml. de PBS (solución salina buferada) pH 7.2 y arena de mar estéril en un mortero - en baño de hielo, y se procedió a triturar hasta formar una pasta. En el caso de estadio larvario L1 se pesó - únicamente 1 g. de éste y se le agregó 5 ml. de PBS pH 7.2 ya que solamente se recolectó esta cantidad de lar- vas.

6. Se dejó en agitación lenta (con un rotor magnético) a 4° C durante 24 horas.
7. Se centrifugó a 3,000 rpm. durante 15 minutos en una -- centrifuga refrigerada (4°C).
8. El sobrenadante se filtró con un filtro Millipore de 0.22 micras; recolectándolo en tubos de ensaye estériles.
9. La cantidad de proteína se determinó por medio del método de Biuret (12).
10. El antígeno se envasó en alicuotas y se congeló (-70°C) hasta su empleo (12).

DETERMINACIÓN DE PROTEINA:

METODO DE BIURET.

REACTIVO. _

Se disolvieron 1.5 gr. de sulfato de cobre pentahidratado y 6.0 gr. de tartrato de sodio y potasio en 500 ml. de agua. Se añadieron 300ml. de NaCl al 10% libre de carbonato preparado recientemente. Se agregó agua destilada hasta completar un litro.

ESTANDAR DE PROTEINA.-

Se disolvieron 100 mg. de albúmina sérica bovina en 10 ml. de agua destilada para obtener 10 mg. de proteína/ml.

PROCEDIMIENTO:

Se colocaron las siguientes cantidades en tubos marcados:

	ml. SOLUCION ESTANDAR	ml. AGUA DESTILADA	mg/ml PROTEINA
	0.1	0.9	1
	0.3	0.7	3
	0.5	0.5	5
	0.7	0.3	7
	0.9	0.1	9
	1.0	0.0	10
Blanco	0.0	1.0	0

La muestra problema (antígeno) se diluyó de tal manera que tuviera del 1 a 10 mg/ml.

A los tubos con el blanco, estándares y con otras problema, se le agregó 4 ml. de reactivo del biuret y se mezclaron. Después de 30 minutos se les hizo turbancia a 560 nm en un espectrofotómetro "Ultrasil" modelo 100-200

Los resultados se graficaron en papel milimétrico, y se trazó la curva estándar y se interpoló la densidad óptica de cada muestra de antígeno L1, L2 y L3 para conocer su concentración de proteína (7,9,12).

METODO DE INMUNIZACION.

Preparación del antisuero contra L1, L2 y L3 de Oestrus ovis.

MATERIAL.-

1. Antígeno somático de larva 1 (L1), larva 2 (L2) y larva 3 (L3).
2. Adyuvante completo de Freund (ACF)*.
3. Jeringa de 20 ml. con aguja del número 13 (una para cada estadio larvario).
4. Vaso de precipitados (uno para cada estadio larvario).
5. 2 conejos de 2 Kg. de peso c/u, (por cada estadio larvario).

* DIFCO, Detroit, Michigan, E.U.A.

PROCEDIMIENTO.-

Este método se practicó en cada uno de los estadios larvarios de Oestrus ovis.

1. Se colocaron volúmenes iguales de antígeno en solución y adyuvante en un vaso de precipitados.
2. Con una jeringa de 20 ml. con aguja del 13, se mezcló repetidamente el antígeno y el adyuvante; succionando y expeliendo en el vaso de precipitados. - Cuando la mezcla comenzó a emulsificar, tomó una -- apariencia lechosa y espesa.
3. Se continuó mezclando la emulsión hasta que una gota de ésta, cuando se colocó sobre la superficie de un recipiente conteniendo agua, permaneció intacta.
4. El antígeno disuelto con solución salina estéril; - emulsificando con ACF se inoculó en dos conejos, de acuerdo con el siguiente protocolo de inmunización.

PROTOCOLO DE INMUNIZACION

INOCULACION NUM.	TIEMPO	D O S I S	VIA DE INOCULACION
1	Día 0	5 mg. de Ag disuelto en 1 ml. de solución salina estéril, emul- sificado con 1 ml. - ACF.	S.C. en múlti- ples si- tios.
2	Día 15	Igual que el anterior	I.M. y S.C.
3	Día 30	0.250 mg. del Ag en solución salina.	I.M.
4	Día 31	0.500 mg. del Ag en solución salina.	I.M.
5	Día 32	1 mg. del Ag en so- lución salina.	I.M.

S.C. = Subcutánea.

I.M. = Intramuscular.

El sangrado se practicó en el día 39 (una semana después de aplicar la última dosis) se separó el suero, se dispensó en frascos y se congeló a -70°C hasta su uso (12).

INMUNOELECTROFORESIS.

MATERIAL.-

1. Aparato de electroforesis.
2. Portaobjetos limpios y desengrasados.
3. Pipetas Pasteur.
4. Cámara Húmeda.
5. Agar noble.
6. Merthiolate al 1%.
7. Buffer de barbituratos (pH 8.6, ó 0.1 M, fuerza - - iónica 0.05).
8. Antígeno y antisuero específico.

PROCEDIMIENTO.-

1. Se prepararon varios portaobjetos con una ligera capa de agar de impregnación (agar noble al 10%).
2. Después se preparó una solución de agar noble al 1%, en buffer de barbituratos 0.1 M, pH 8.6:

a) Buffer de barbituratos:

Barbiturato de sodio	(0.1 M)	500.5	ml.
Acido clorhídrico	(0.1 N)	149.5	ml.
Agua destilada.		350.0	ml.

3. Al final se añadió merthiolate blanco a una concentración final de 1:10,000.
4. Los portaobjetos con agar de impregnación se colocaron en posición horizontal, y se les agregó 3 ml. - de la solución de agar al 1% caliente. Se dejó gelificar a temperatura ambiente y posteriormente se metieron en una cámara húmeda hasta su empleo.
5. Las laminillas se perforaron con un molde y se extrajo el agar de la perforación circular solamente. En el recipiente de la unidad de electroforesis se colocó la cantidad necesaria de buffer de barbituratos. Las laminillas perforadas se colocaron y se estableció el contacto entre la placa de agar y el buffer utilizando tiras (mechas) de papel filtro.
6. Se conectó la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se ajustó a la corriente a 8-10 volts/cm. de gel ó 6-8, mAmp / laminilla por 15 minutos para equilibrar el sistema.

7. Posteriormente con una pipeta Pasteur, se colocó la solución de antígeno en las perforaciones de la placa de agar. Una de las muestras de antígeno se teñió con azul de bromofenol para indicar el desplazamiento.
8. Se checó que las tiras de papel filtro estuvieran bien colocadas y se conectó nuevamente el aparato, cuidando que la corriente fuera correcta. Cuando se observó que la muestra teñida había migrado lo suficiente hacia el polo positivo (ánodo) para una separación correcta, se desconectó el aparato y se removió el agar de la canal para colocar el antisue-ro. Esto se hizo con rapidez para evitar la difusión excesiva del antígeno.
9. Las laminillas se dejaron en una cámara húmeda durante 24 a 48 horas. Se hizo la lectura en una cámara de fondo oscuro y se dibujaron los resultados obtenidos (9,12).

TOMA DE MUESTRAS.

PROCEDIMIENTO.-

Se obtuvieron 100 muestras de suero y secreción nasal -

de borregos en un período de 3 meses (julio, agosto y septiembre de 1982), del rastro de San Felipe del Progreso, Estado de México, y 18 sueros y secreción nasal de ovinos de raza Tabasco libres de Oestrus ovis del Centro Experimental Pecuario de Hueytamalco, Puebla (CEPH), originarios del Centro Experimental Pecuario de Mochochá, Yucatán, donde se considera zona libre de Oestrus ovis (Bautista, G. Comunicación personal, 1982). Las muestras de sangre se obtuvieron en el momento del sacrificio de los animales previamente identificados, estas se recolectaron en tubos de ensaye los cuales se dejaron reposar hasta la llegada al laboratorio (3-4 horas en posición horizontal), donde se les quitó el coágulo y se centrifugaron (3,000 rpm/10 minutos); el suero resultante se colocó en frascos estériles y después se congeló a -20°C hasta ser utilizado.

Las muestras de secreción nasal se tomaron basándose en el método descrito por Smith (22):

1. Se prepararon frascos con 2 torundas de algodón y 2 ml. de PBS pH 7.2 cada uno y se esterilizaron en autoclave a 15 lbs de presión/15 minutos.
2. A todos los borregos muestreados se les introdujo una torunda mojada en PBS pH 7.2 en cada ojar.

3. Se esperó 3 minutos y posteriormente se quitó la torunda de algodón y se exprimió con una jeringa estéril, recogiendo la secreción nasal junto con el PBS pH 7.2 en un frasco estéril.
4. Las muestras se centrifugaron a 3,000 rpm/10 minutos; el sobrenadante se colocó en frascos estériles y después se congeló a -20° C hasta ser utilizado.

A todos los animales se les practicó un examen post-mortem para verificar la presencia de larvas de Oestrus ovis en los cornetes nasales, senos nasales y frontales, así como en la faringe, laringe y parte de la tráquea; utilizando para ésto una sierra de Stryker. Cuando se encontraron larvas, éstas se contaron y separaron en larvas del primer estadio (L1), segundo estadio (L2), y tercer estadio (L3).

En algunos animales en los que se encontraron larvas muy pequeñas -- que difícilmente podrían ser identificadas, se procedió a recolectar las en tubos de ensaye fijándolas con glutaraldehído al 3%, y posteriormente se procesaron para ser fotografiadas con el microscopio electrónico de barrido y se identificaron basándose en el trabajo de le Fichoux, Marty y Denis (17).

TECNICA PARA LA OBSERVACION CON EL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO:

Para la observación con el microscopio electrónico de barrido las larvas fueron colocadas en fijador glutaraldehído al 3% en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 durante 3 horas a 4° C; inmediatamente fueron deshidratadas en concentraciones ascendentes de acetona, en secuencia los parafinos fueron colocados en un decandor por punto crítico, finalizado con oro en un evaporador. Las Secciónes fueron montadas en un portaobjetos y cubiertas con un película de oro. El microscopio electrónico de barrido fue utilizado para observar las larvas. Detalles de técnica de observación se encuentran en el artículo de Fichoux, Marty y Denis (17).

Se tomaron muestras histológicas de los senos nasales y frontales de algunos ovinos parasitados y de otros sa nos, con el fin de observar el tipo de lesión e infil-- tración que llegan a ocasionar las larvas de Oestrus -- ovis. Las muestras se fijaron en formaldehído fosfata do al 10% y se tiñieron con hematoxilina y eosina.

Posteriormente se observaron en un microscopio optico standard. Se llevó un registro de cada uno de los anima les muestreados en el cual se anotaron los siguientes - datos:

- a) Identificación (número)
- b) Edad
- c) Sexo
- d) Raza
- e) Presencia y número de L1, L2, L3, de Oestrus ovis
- f) Presencia de otros parásitos
- g) Lesiones en otros órganos
- h) Otros estados morbosos

PRUEBA DE DOBLE DIFUSION EN GEL.

MATERIAL.-

1. Matríz de 125 ml.
2. Platina caliente.
3. Portaobjetos desengrasados y limpios.

4. Pipetas Pasteur.
5. Cajas de Petri.
6. Aplicadores.
7. Papel filtro.
8. Molde o dado perforador de gel.
9. Agar noble.
10. PBS: pH 7.2
11. Merthiolate al 1%.
12. Antígenos de larva 1, larva 2 y larva 3 de Oestrus ovis.
13. Antisueros de cada uno de los estadios larvarios de Oestrus ovis.

PROCEDIMIENTO.-

1. En un matr az de 125 ml. se colocaron 50 ml. de PBS pH 7.2 y se agregaron 0.5 gr. de Agar noble.
2. Se calentó al fuego lento el agar hasta que no quedaron grumos. Al final, el volumen perdido por evaporación se repuso con agua destilada y se le agregaron 5 gr. de NaCl, para obtener una concentración final del 10% de NaCl (12).
3. Se le agregó merthiolate blanco a una concentración final de 1:10,000 (0.5 ml. de merthiolate al 12).

4. Se colocaron los portaobjetos secos y desengrasados en una superficie plana. Con una pipeta de punta ancha a cada laminilla se le agregaron 5 ml. del agar caliente y se dejó gelificar a temperatura ambiente.
5. El agar de los portaobjetos fue perforado con un dado o molde perforador y el agar residual se retiró con un aplicador.
6. El orificio central de una serie de laminillas se llenó con el antígeno L1 y los sueros alrededor. Con otra serie de laminillas se procedió de la misma manera pero se utilizó antígeno L2 para llenar el pozo central. Se procedió de la misma manera para el antígeno L3.
7. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda y se incubó a temperatura ambiente de 24 a 48 horas.
8. La lectura para localizar las líneas o bandas de precipitación se hizo en una cámara de fondo oscuro.
9. Se hizo un esquema de los resultados obtenidos (12).

Para la secreción nasal se llevó a cabo el mismo método.

PRUEBA DE HEMAGLUTINACION PASIVA O INDIRECTA.

MATERIAL.-

Equipo:

1. Centrífuga, capaz de 800 X gr.
2. Baños María, 37 y 56°C.
3. Tubos de centrifuga cónicos graduados de 12 ml.

Material de Cristalería:

1. Pipetas serológicas.
2. Matraces.
3. Vasos de precipitados.
4. Tubos de ensaye de 10 X 75 mm.
5. Equipo de microtitulación:
 - a) Pipetas de 0.05 ml. y 0.025 ml.
 - b) Microdilutores de 0.05 ml.
 - c) Vibrador.

Reactivos:

1. Solución de Alsever.
2. Solución salina buferada (PBS ph 7.2 y pH 6.4).
3. Suero normal de conejo (SNC).
4. Acido tánico.
5. Antígeno.
6. Suero positivo de título conocido y suero control - negativo.
7. Eritrocitos de carnero (las células se añejaron 3 - días a 4°C antes de ser usadas).

Preparación de Reactivos:

Solución Anticoagulante.

Solución de Alsever:

Dextrosa.....	2.05	gr.
Citrato de sodio dihidratado.....	0.8	gr.
Cloruro de sodio.....	0.42	gr.
Acido cítrico.....	0.055	gr. ó 055 ml.
		de Acido acético al
		10%.

Agua destilada.....100.00 ml.

(Se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C).

Solución Salina Bufferada (PBS):

Soluciones Stock:

Na_2HPO_4 , 0.15 M...21.3 g/litro de agua destilada.

KH_2PO_4 , 0.15 M...20.4 g/litro de agua destilada.

NaCl , 0.15 M... 8.8 g/litro de agua destilada.

PBS, pH 6.4:

Na_2HPO_4 0.15 M...32.3 ml.

KH_2PO_4 , 0.15 M...24.0 ml.

NaCl , 0.15 M...100.0 ml.

PBS, pH 7.2:

Na_2HPO_4 , 0.15 M...76.0 ml.

KH_2PO_4 , 0.15 M...24.0 ml.

NaCl , 0.15 M...150.0 ml.

Diluyente: Suero normal de conejo (SNC) al 1%.

Se inactivó suero de conejo normal a 56°C por 30 minutos. Se absorbió con G.R. de carnero, (0.1 ml. G.R. + 0.9 ml. suero e incubar por 30 minutos a 37°C). Se mezcló 1 ml. de suero en 99 ml. de PBS, pH 7.2.

Preparación de las diluciones de ácido tánico, 1:1,000 y 1:20,000.

Inmediatamente antes de usarse se preparó una solución fresca de una dilución 1:1,000 de ácido tánico, disolviendo 20 mg. de ácido tánico en 20 ml. de PBS, pH 7.2. Se diluyó la solución stock 1:1,000 a 1:20 para obtener la dilución de 1:20,000 que se usó en la prueba (2.0 -- ml. de 1:1,000 + 38.0 ml. PBS, pH 7.2).

A. TANIZADO DE G. R.*

1. Se lavó los G.R. 3 veces en PBS, pH 7.2 - 800 X gr. por 5 minutos 2 veces y por 10 minutos una vez.
2. Se puso 1 ml. del paquete de G.R. en 39 ml. de PBS, pH 7.2 para obtener una suspensión al 2.5%.
3. Se añadió un volumen igual (40 ml.) de solución de ácido tánico 1:20,000; se mezcló e incubó en un baño María a 37°C por 10 minutos.
4. Se sacaron los G.R. del baño María y se centrifugaron por 5 minutos a 800 X gr. El sobrenadante se descartó, y se lavó con PBS, pH 7.2, a 800 X gr. --

* G.R. (Glóbulos rojos).

por 10 minutos, los G.R. se resuspendieron en PBS, pH 6.4 para hacer una suspensión al 2.5% (1 ml. - - G.R. + 39 ml. PBS).

B. SENSIBILIZACION DE G.R. *

1. Para sensibilizar los G.R. tanizados se agregó un volumen igual de una dilución óptima de antígeno en PBS pH 6.4 a la suspensión de células y se incubó en un baño María de 37°C por 15 minutos.

Determinación de la concentración óptima de antígeno:

- a) Se preparó 4 diluciones de antígeno en PBS pH 6.4 por ejemplo: 1:25, 1:50, 1:100, 1:150.
- b) Se sensibilizaron los G.R.
- c) Se utilizó un suero negativo y otro positivo -- por cada dilución. (la concentración más baja del antígeno que da el mayor título con el suero inmune y que reaccione con el suero negativo es considerada como óptima).

* G.R. (Góbulos rojos).

2. Se centrifugó a 800 X gr. por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y después se lavaron las células 2 veces con SNC al 1% en PBS, pH 7.2; la primera a 800 X gr. por 5 minutos y la última a 800 X gr. por 10 minutos.
3. Se ajustaron los G.R. a una suspensión al 1.5% en - SNC 1% (por ejemplo: 0.15 ml. del paquete de G.R. + 9.85 ml. de SNC 1%).

C. PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA.

1. Se inactivaron los sueros por 30 minutos a 56°C.
2. En placas de microtitulación se transfirieron 0.05 ml. de SNC 1% con una pipeta a los hoyos en donde se iban a hacer las diluciones.
3. Se transfirieron 0.05 ml. de cada suero a probar, - con un microdilutor al primer hoyo que contenía - - 0.05 ml. de SNC al 1%.
4. Se hicieron doce diluciones pasando 0.05 ml. de suero a cada hoyo y eliminando los 0.05 ml. del último hoyo.

5. Las diluciones se mezclaron poniendo las placas en un vibrador. Con una pipeta se agregó 0.025 ml. de la solución sensibilizada de G.R. al 1.5%. a cada dilución de suero.
6. Se mezcló con el vibrador y se dejaron las placas - incubando a 4^dC por 12 horas.
7. Se hizo la lectura por medio de los patrones en el fondo de los hoyos (12).

CONTROLES.

Control de Diluyente. Se transfirieron 0.05 ml. de SNC 1% a varios hoyos y se agregaron 0.025 ml. de los G.R. sensibilizados al 1.5%. Esta reacción fue negativa.

Control del suero. Se preparó una suspensión al 1.5% de G.R. tanizados no sensibilizados en suero normal de conejo al 1%. Se preparó una placa por duplicado con diluciones seriadas - de los sueros a ser probados, 6 hoyos de cada suero en vez - de 12. A cada hoyo se le añadieron 0.025 ml. de G.R. tanizados no sensibilizados al 1.5%. Se obtuvo una reacción negativa (12).

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.

La sensibilidad y especificidad de las pruebas se determinó de la siguiente manera (8):

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{\text{NUM. DE ANIMALES CON OESTROSIS POSITIVOS A LA PRUEBA.}}{\text{NUM. TOTAL DE ANIMALES CON OESTROSIS.}} \times 100$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{\text{NUM. DE ANIMALES SIN OESTROSIS NEGATIVOS A LA PRUEBA.}}{\text{NUM. TOTAL DE ANIMALES SIN OESTROSIS.}} \times 100$$

R E S U L T A D O S

DETERMINACION DE PROTEINA:

Utilizando el método de Biuret se obtuvieron las siguientes cantidades de proteína / ml. de los antígenos somáticos de --

Oestrus ovis:

Antígeno de larva 1 ----- 6.10 mg/ml.
Antígeno de larva 2 -----16.25 mg/ml.
Antígeno de larva 3 -----27.2 mg/ml.

INMUNOELECTROFORESIS:

Utilizando cada uno de los antígenos somáticos de Oestrus --
ovis con su respectivo antisuero se observaron los siguien--
tes sistemas antígeno-anticuerpo (fig. 1):

Antígenos	Número de sistemas
L 1 -----	4
L 2 -----	12
L 3 -----	12

ESTUDIO POST-MORTEM:

De los 100 borregos del rastro que fueron examinados, se encontró que 88 estaban parasitados por larvas de Oestrus ovis. De éstos, 74 (84.09%) tenían larva 1; 46 (52.27%) larva 2 y 16 (18.18%) larva 3.

De los 100 animales examinados, doce resultaron negativos.

Al hacer el estudio post-mortem de los 18 borregos controles, se observó que estaban libres de larvas de Oestrus ovis.

La edad del grupo del rastro estuvo comprendida entre los 3 meses a los 6 años; los borregos controles tenían una edad entre los 6 meses y un año y medio de edad.

En el grupo de borregos muestreados del rastro hubo 69 hembras y 31 machos; los borregos controles fueron todos machos.

No hubo una raza predominante; en el grupo de borregos muestreados del rastro, la mayoría de los ovinos eran criollos; sin embargo, los ovinos controles fueron de raza Tabasco.

De los 88 animales que salieron positivos a Oestrus ovis, -- presentaron además los siguientes estados patológicos:

	No. de animales
<u>Fasciola hepatica</u> -----	29
Exudado purulento en senos nasales y ---- frontales (de causa desconocida)	7
<u>Thysanosoma actinioides</u> -----	3
(en los conductos biliares y vesícula biliar).	
Ectima contagioso -----	3
Hígados fibrosos con abscesos -----	2
(de causa desconocida)	
Diarreas -----	1
(de causa desconocida)	
Pseudotuberculosis -----	1
(Linfadenitis caseosa)	

De los 12 animales que resultaron negativos a Oestrus ovis,
presentaron los siguientes estados patológicos:

	No. de animales
<u>Fasciola hepatica</u> -----	8
<u>Thysanosoma actinioides</u> -----	2
(en los conductos biliares y vesícula biliar)	
Exudado purulento en senos nasales y ----	1
frontales (de causa desconocida)	

RESULTADOS DE LA OBSERVACION DE LARVAS AL MICROSCOPIO ELEC--
TRONICO DE BARRIDO.

Las larvas que estaban presentes en los senos nasales y fron-
tales cuyo tamaño dificultaba su diagnóstico, al ser vistas
al microscopio electrónico de barrido y de acuerdo a sus - -
características morfológicas, resultaron ser larvas 1 de - -
Oestrus ovis (foto 1, 2, 3, 4 y 5).

RESULTADOS DE LOS CORTES HISTOLOGICOS DE SENOS DE OVINOS CON
OESTROSIS.

Foto a. Seno nasal de ovino, no se observó ningún cambio.

Foto b. Seno nasal de ovino con oestrosis, presentó la pér-
dida casi total del epitelio y en el corion gran in-
filtración de linfocitos y plasmocitos.

PRUEBA DE DOBLE DIFUSION EN GEL:

De los 100 sueros de borregos del rastro probados con la técnica de doble difusión en gel con el antígeno de larva 1, se encontraron 37 reacciones de precipitación que correspondieron a animales parasitados, los animales sin oestrosis del rastro y los animales control no presentaron bandas de precipitación (cuadro 2).

La prueba con el antígeno de larva 1 tuvo un porcentaje de sensibilidad del 42.04% y una especificidad del 100% (cuadro 1).

Al probar la secreción nasal con el antígeno de larva 1 con esta misma técnica, se encontraron sólo 2 bandas de precipitación; de las cuales una correspondió a un animal con oestrosis y la otra a un animal sin oestrosis (falso positivo).

En esta prueba al correr los 100 sueros del rastro con el antígeno de larva 2, se encontraron 52 reacciones de precipitación que correspondieron a animales con oestrosis, los animales sin oestrosis del rastro igual que los controles no presentaron bandas de precipitación (cuadro 2).

Esta prueba con el antígeno de larva 2 tuvo un porcentaje de sensibilidad del 59.09% y una especificidad del 100% (cuadro 1).

La secreción nasal al ser probada con el antígeno de larva 2, igual que en larva 1, sólo se encontraron 2 bandas de precipitación que correspondía una a un animal parasitado y la otra a un animal no parasitado (falso positivo).

Al correr los 100 sueros del rastro con el antígeno de larva 3, se encontraron 17 reacciones de precipitación; de las cuales 16 correspondieron a animales con oestrosis y una a un animal negativo del rastro (falso positivo); los sueros de los animales controles fueron negativos (cuadro 2).

Esta prueba con el antígeno de larva 3 tuvo un porcentaje de sensibilidad del 18.18% y una especificidad del 95.83% (cuadro 1).

La secreción nasal al ser probada con el antígeno de larva 3 presentó igual que en los demás antígenos 2 bandas de precipitación; de las cuales una correspondió con un animal parasitado y la otra con un animal negativo.

HEMAGLUTINACION PASIVA O INDIRECTA EN SUEROS:

En esta prueba, al correr los 100 sueros de los borregos del rastro y 18 sueros de los animales control, se vió que cada uno de los estadios larvarios de Oestrus ovis (L1, L2 y L3) reaccionaron a diferentes títulos (fig. 2, 3 y 4).

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se observó que con el antígeno de larva 1 de Oestrus ovis considerando un título de 1:64 en adelante (fig. 2), se obtuvieron 38 reacciones positivas, de las cuales 36 correspondieron a animales parasitados y 2 fueron reacciones falsas positivas (cuadro 3), lo que nos da un porcentaje de sensibilidad del 40.90% y una especificidad del 91.66% (cuadro 1).

Con el antígeno de larva 2 de Oestrus ovis, considerando un título de 1:32 (fig. 3), en adelante, se obtuvieron 83 reacciones positivas, de las cuales 80 correspondieron a animales parasitados y 3 fueron falsas positivas (cuadro 3), lo que nos da un porcentaje de sensibilidad del 90.90%, y una especificidad del 87.50% (cuadro 1).

Con el antígeno de larva 3 de Oestrus ovis se observó que considerando un título de 1:64 en adelante (fig. 4), se obtuvieron 25 reacciones positivas, de las cuales 25 correspon-

dieron a animales positivos y no hubo ningún falso positivo (cuadro 3), lo que nos da un porcentaje de sensibilidad del 28.40% y una especificidad del 100% (cuadro 1).

HEMAGLUTINACION PASIVA O INDIRECTA EN LA SECRECION NASAL:

De las 100 muestras de secreción nasal de borregos del rastro probados con la técnica de hemaglutinación pasiva con el antígeno somático de larva 1 de Oestrus ovis se observó que, considerando un título de 1:16 o mayor (fig. 5), se obtuvieron 43 reacciones de aglutinación; de éstas, 42 correspondieron a animales parasitados y una a un animal sin larvas al sacrificio (cuadro 3), lo que nos da un porcentaje de sensibilidad del 47.72% y una especificidad del 95.83% (cuadro 1).

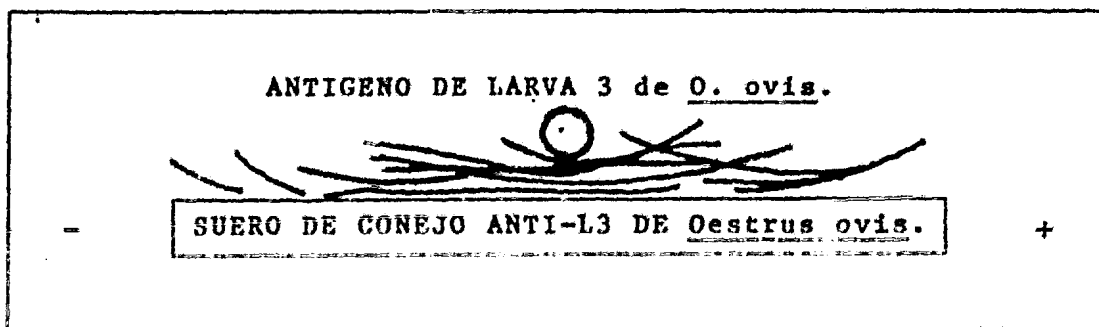
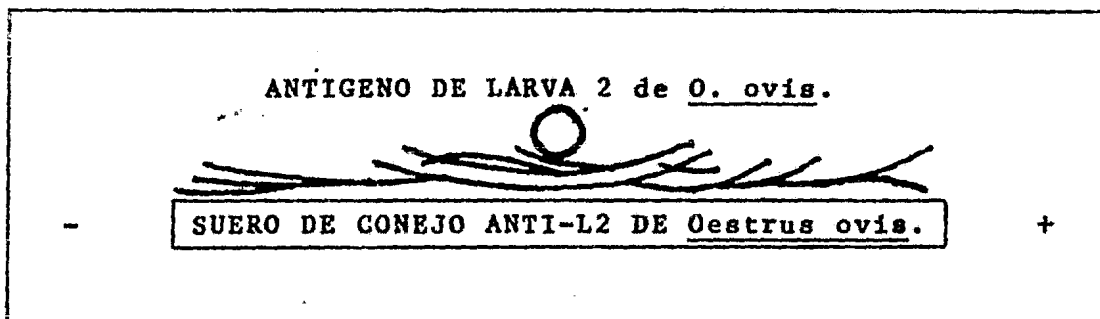
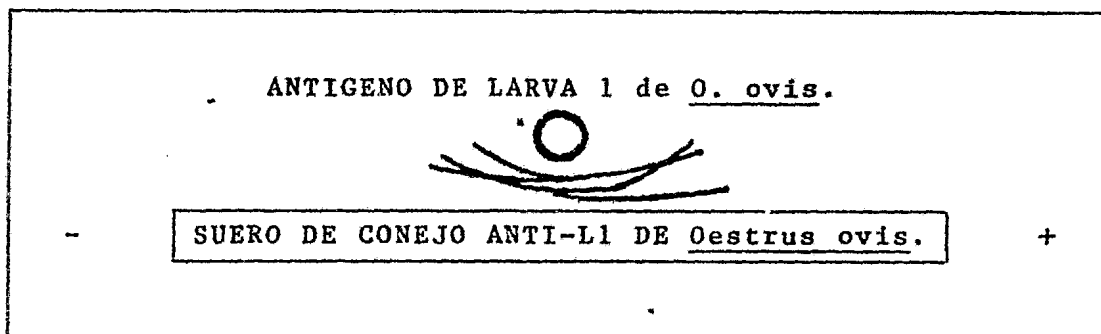
Al probar la secreción nasal de borregos con la técnica de hemaglutinación pasiva con los antígenos somáticos de larva 2 y de larva 3 de Oestrus ovis, no se observó una diferencia clara entre los ovinos infectados de los no infectados, ya que el grupo de ovinos negativos del rastro y los borregos control negativos del Centro Experimental Pecuario de Hueytamalco, Pue., daban títulos hasta de 1:4096 ó mayores, por lo

que no se pudo obtener los porcentajes de sensibilidad y especificidad.

Las secreciones nasales se probaron varias veces, dando títu los semejantes a los anteriores.

FIGURA 1

PATRON IMMUNOELECTROFORETICO DE LOS ANTIGENOS DE L1, L2 Y L3 DE Oestrus Ovis Y SUS ANTISUEROS RESPECTIVOS.



CUADRO 1

PORCENTAJES DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS PRUEBAS DE DOBLE DIFUSION EN AGAR Y HEMAGLUTINACION PASIVA, UTILIZANDO - ANTIGENO SOMATICO DE DIFERENTES ESTADIOS LARVARIOS DE OESTRUS OVIS, CON LOS SUEROS Y SECRECION NASAL DE LOS ANIMALES.

S U E R O S							* S.N.
P R U E B A S	DOBLE DIFUSION EN AGAR			HEMAGLUTINACION PASIVA (HP)			(HP)
ANTIGENOS	L1 (a)	L2 (b)	L3 (c)	L1	L2	L3	L1
% SENSIBILIDAD	42.04	59.09	18.18	40.90	90.90	28.40	47.72
% ESPECIFICIDAD	100	100	95.86	91.66	87.50	100	95.83

a) ANTIGENO LARVA 1

b) ANTIGENO LARVA 2

c) ANTIGENO LARVA 3

* S.N. SECRECION NASAL

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE DOBLE DIFUSION EN GEL (DD) UTILIZANDO LOS ANTIGENOS LARVA 1 (L1), LARVA 2 (L2) Y LARVA 3 (L3) DE Oestrus ovis, SUEROS Y SECRECION NASAL DE OVINOS DEL RASTRO Y CONTROLES.

PROCEDENCIA	No. DE SUEROS	No. DE ANIMALES CON LARVAS AL SACRIFICIO.	POSITIVOS (a) A (DD) Ag. L1 SUERO	POSITIVOS (b) A (DD) Ag. L1 S. N.	POSITIVOS A (DD) Ag. L2 SUERO	POSITIVOS A (DD) Ag. L2 S. N.	POSITIVOS A (DD) Ag. L3 SUERO	POSITIVOS A (DD) Ag. L3 S. N.
RASTRO DE - SAN FELIPE DEL PROGRESO, ESTADO DE MEXICO.	100	38	37	1	52	1	16	1
(c) (C.E.P.H.)	18	0	0	0	0	0	0	0

a) ANTIGENO.

b) SECRECION NASAL.

c) CENTRO EXPERIMENTAL PECUARIO DE HUEYTAMALCO, PUEBLA.

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION PASIVA (HP) UTILIZANDO LOS ANTIGENOS
L1, L2 y L3 DE Oestrus ovis Y LA PRESENCIA O NO DE LARVAS AL SACRIFICIO

a)

ANTIGENO	NUMERO DE ANIMALES DEL RASTRO	NUMERO DE ANIMALES CONTROL	CON LARVAS AL SACRIFICIO. *	POSITIVOS A (HP)	POSITIVOS A (HP) Y CON LARVAS AL SACRIFICIO	POSITIVOS A (HP) Y SIN LARVAS AL SACRIFICIO	NEGATIVOS A (HP) Y CON LARVAS AL SACRIFICIO	NEGATIVOS A (HP) Y SIN LARVAS AL SACRIFICIO
L 1	100	18	88	38	36	2	52	22
L 2	100	18	88	83	80	3	8	21
L 3	100	18	88	25	25	0	63	24

C U A D R O 3

- 46 -

b)

L 1	100	18	88	43	42	1	46	23
-----	-----	----	----	----	----	---	----	----

a) SUERO.

b) SECRECION NASAL.

* EN LOS OVINOS DEL RASTRO

COMPARACION DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS EN LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION PASIVA;
 EN SUEROS UTILIZANDO UN ANTIGENO SOMATICO DE LARVA 1 DE Oestrus ovis, ENTRE UN -
 GRUPO DE BORREGOS DEL RASTRO Y OTRO CONTROL.

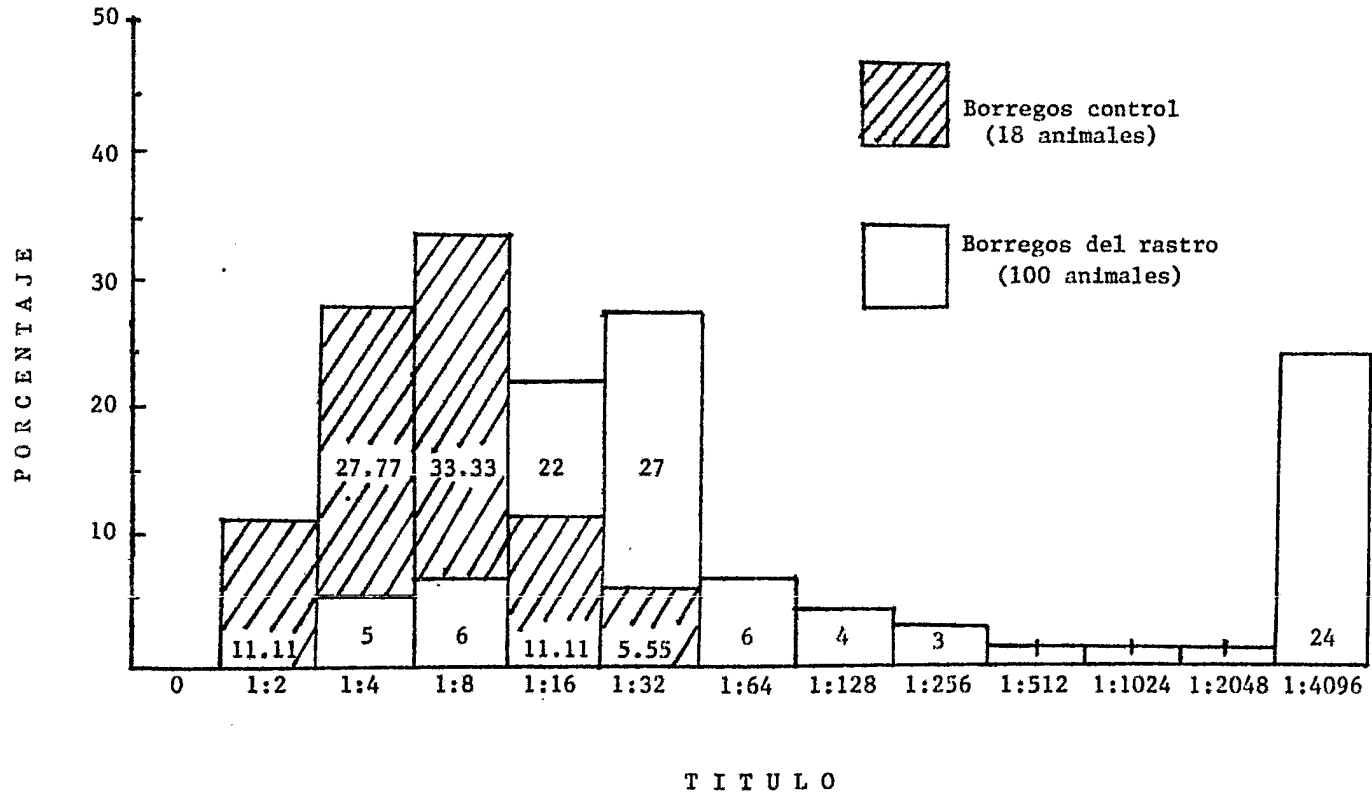


FIGURA 2

Se consideró como positivo un título de 1:64 ó mayor

En los animales que se diagnosticaron positivos, se les realizó un seguimiento por un periodo de 30 días para observar la evolución de la enfermedad, el estado de salud y el comportamiento de los animales.

COMPARACION DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS EN LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION PASIVA

EN SUEROS UTILIZANDO UN ANTIGENO SOMATICO DE LARVA 2 DE Oestrus ovis

ENTRE UN GRUPO DE BORREGOS DEL RASTRO Y OTRO CONTROL

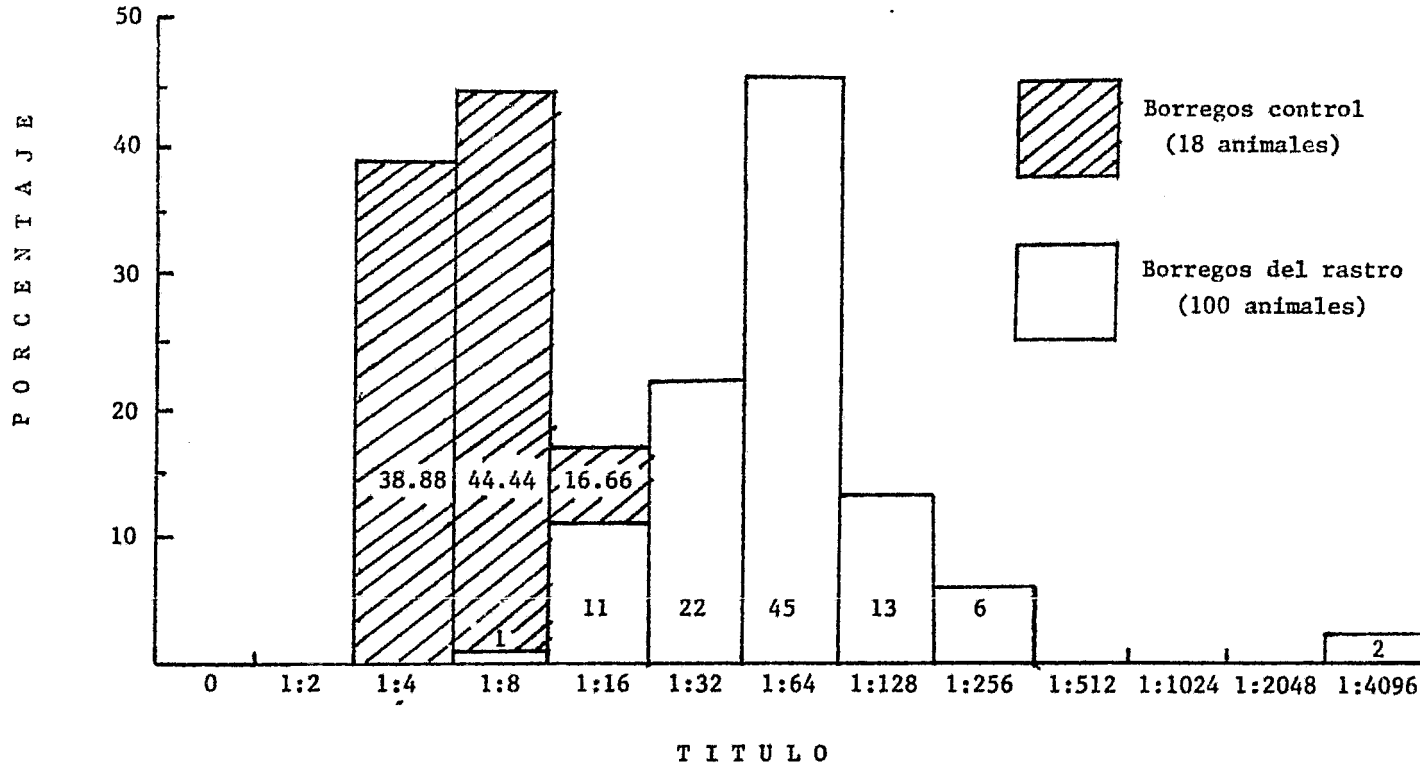
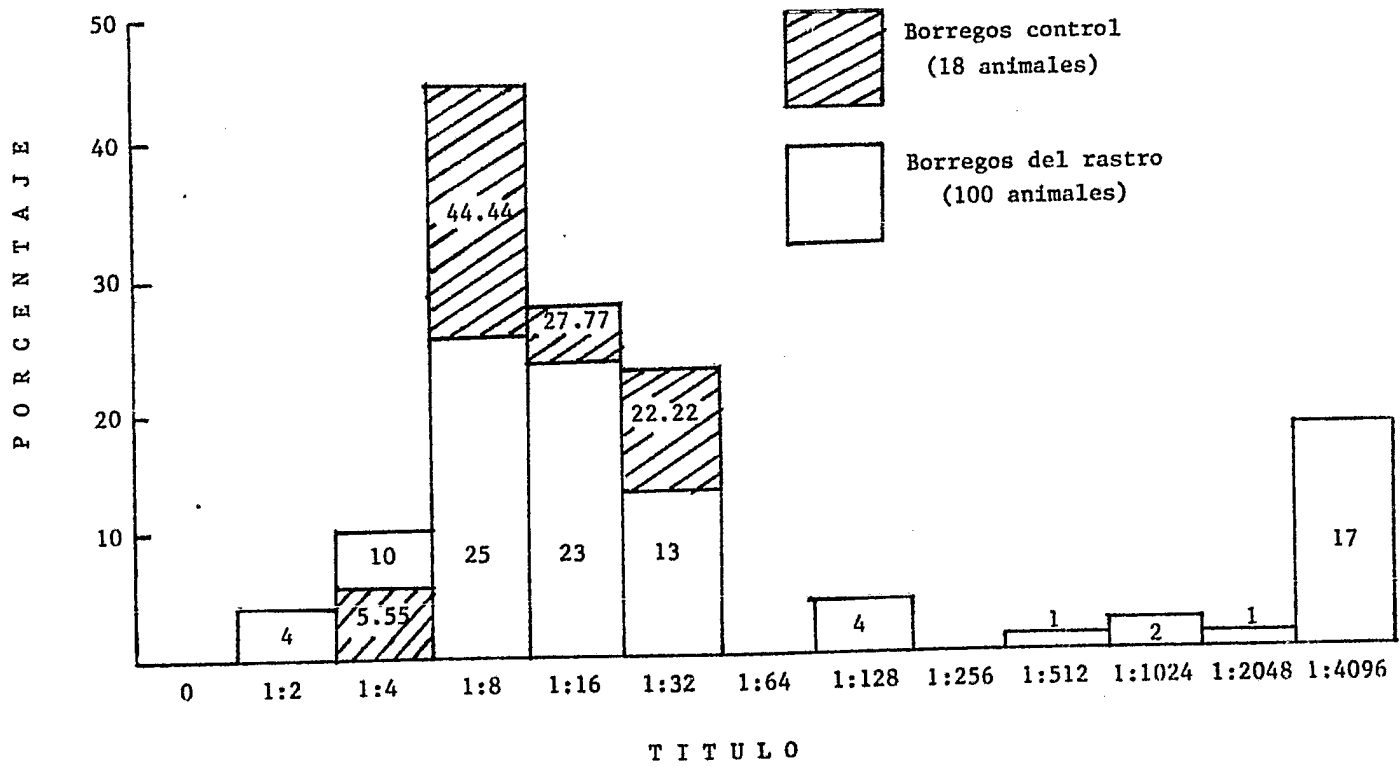


FIGURA 3

Se consideró como positivo un título de 1:32 ó mayor
 De los 88 animales que dieron un título de 1:32 o mayor, se eliminaron 5 animales por no tener plena seguridad de que estaban parasitados- a la necropsia quedando un total de 83 animales.

COMPARACION DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS EN LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION PASIVA
 EN SUEROS UTILIZANDO UN ANTIGENO SOMATICO DE LARVA 3 DE Oestrus ovis
 ENTRE UN GRUPO DE BORREGOS DEL RASTRO Y OTRO CONTROL



Se consideró como positivo un título de 1:64 ó mayor

FIGURA 4

COMPARACION DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS EN LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION PASIVA
 EN SECRECION NASAL UTILIZANDO UN ANTIGENO SOMATICO DE LARVA 1 DE Oestrus ovis,
 ENTRE UN GRUPO DE BORREGOS DEL RASTRO Y OTRO CONTROL

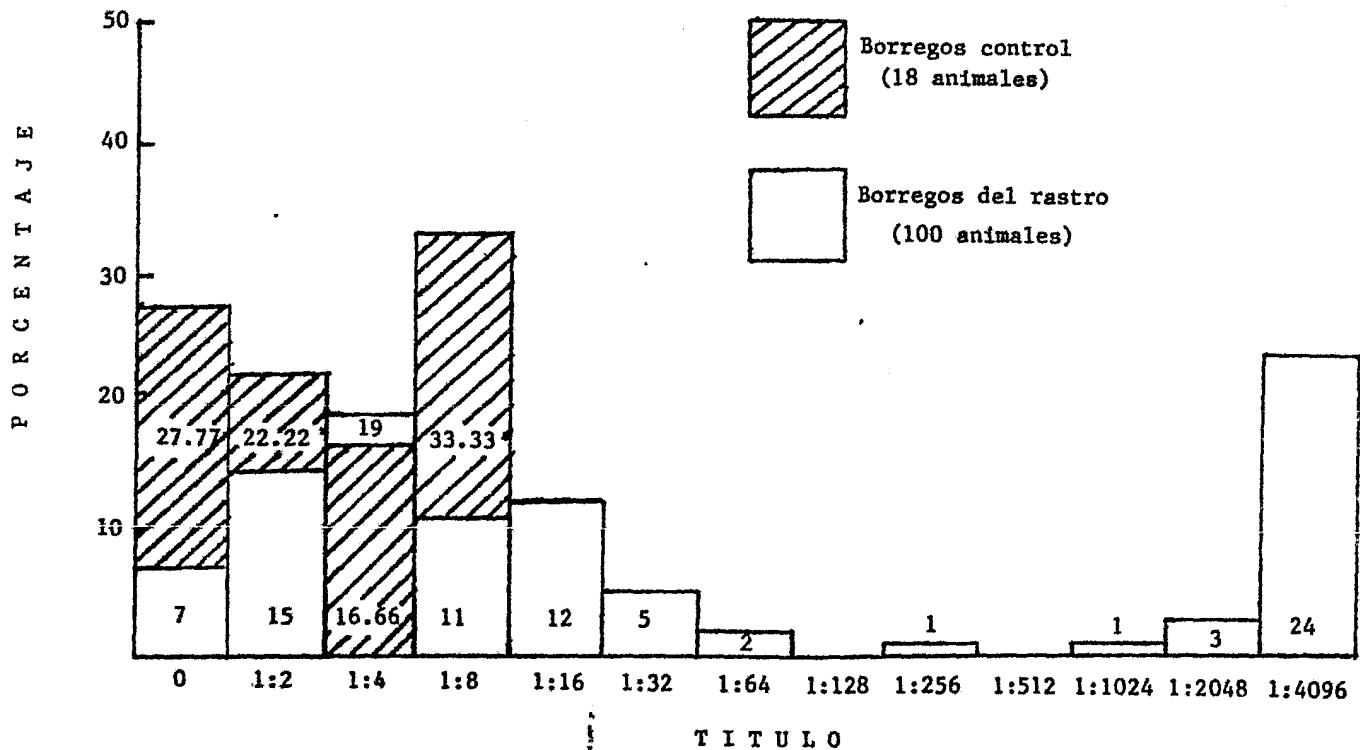


FIGURA 5

Se consideró como positivo un título de 1:16 ó mayor

El presente estudio se realizó en el año de 1964, en el Estado de
 Jalisco, con el fin de determinar la prevalencia de anticuerpos en la secreción
 nasal de los borregos del rastro y de los borregos control.

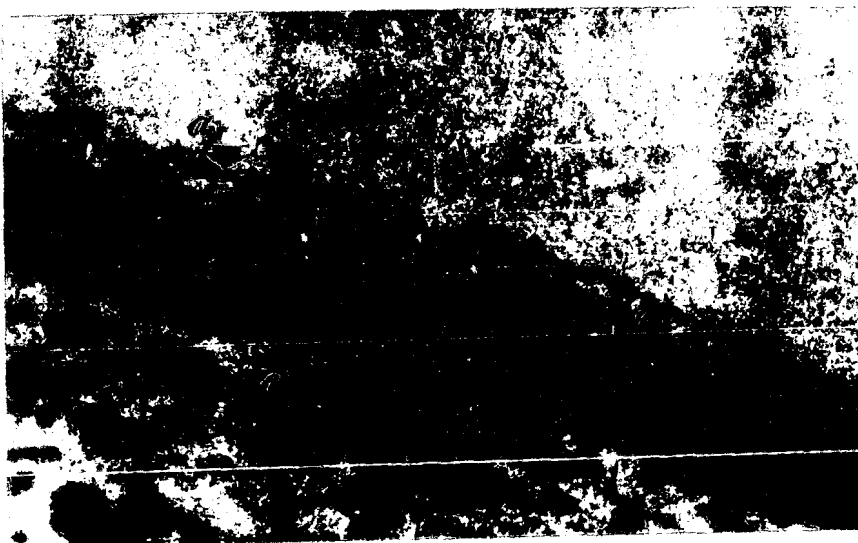


Foto a. (seco fuerte).- Seno nasal normal de ovino, nótese como se observan perfectamente todas sus estructuras, el epitelio pseudoestratificado ciliado (tipo respiratorio); las células mucosas (caliciformes) y el infiltrado normal del corion.



Foto b. (seco fuerte).- Seno nasal parasitado con larvas de Oestrus ovis; nótese la pérdida casi total del epitelio y la gran infiltración de linfocitos y plasmocitos presente en el corion.



Foto 1. Microfotografía (Microscopio electrónico de barrido) de la parte anterior de la larva I de Oestrus ovis mostrando los -- ganchos orales (X 640).

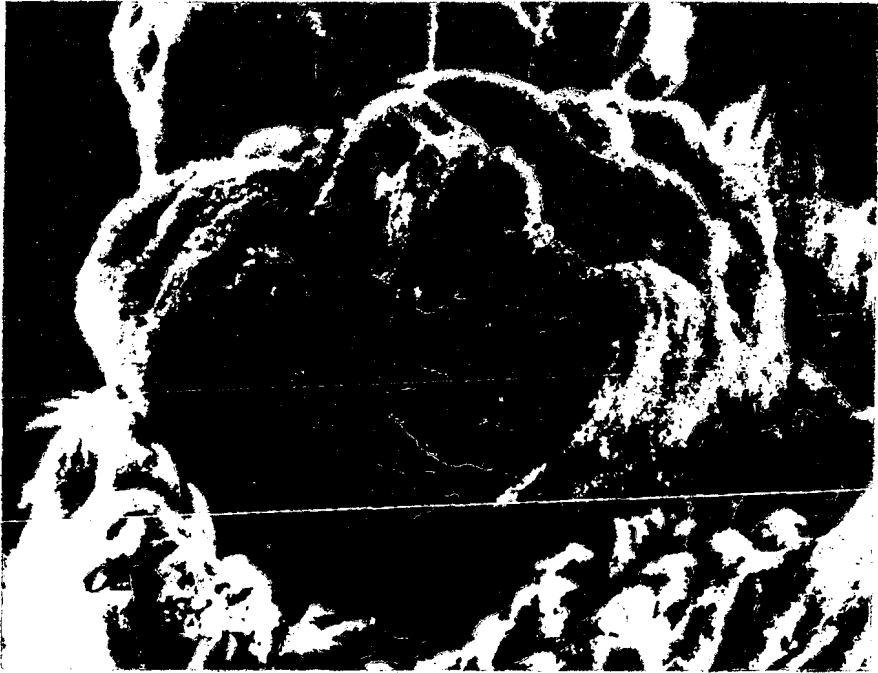


Foto 2. Microfotografía (Microscopio electrónico de barrido) de la parte anterior de la larva 1 de O.ovis, mostrando a) la boca, b) parte de los ganchos orales y c) las espinas.



Foto 3. Microfotografía (Microscopio electrónico de barrido) de la parte ventral de la larva 1 de O. ovis, se aprecian las espinas de los tergitos anteriores (X 40).



Foto 4. Microfotografía (Microscopio electrónico de barrido). Vista ventral de la larva 1 de O. ovis, mostrando las espinas.

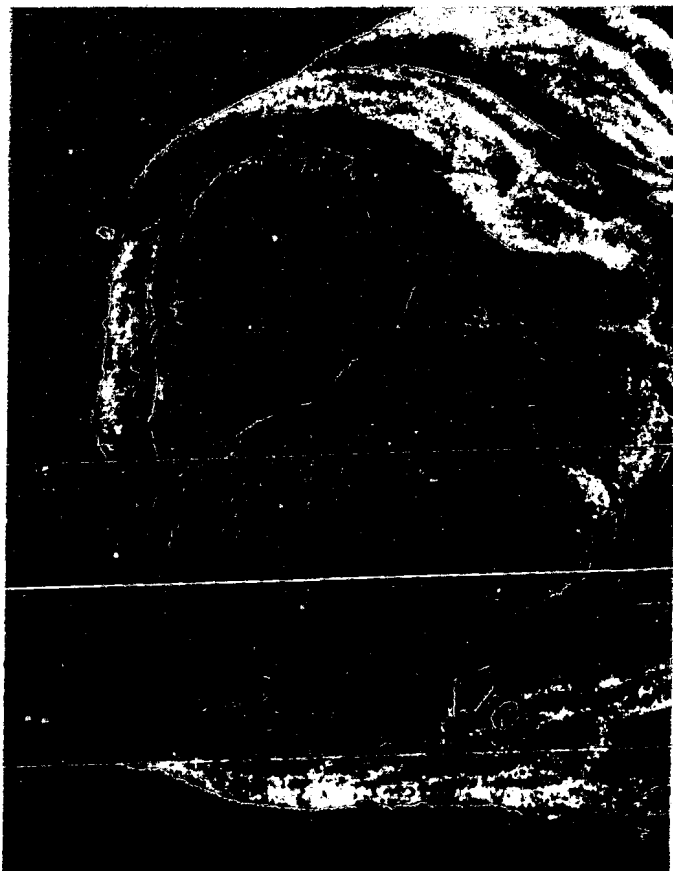


Foto 5. Microfotografía (Microscopio electrónico de barrido) de la parte posterior de la larva 1 de Oestrus ovis. Se aprecian el último segmento abdominal, el estigma posterior derecho donde se observa a) el peritrema, b) el botón marginal y c) la protuberancia anal.

D I S C U S I O N

Al observar los patrones inmunolectroforéticos de los antígenos de larva 2 y larva 3 de Oestrus ovis, con su respectivo antisuero presentaron 12 sistemas antígeno anticuerpo, al comparar estos resultados se observó que concuerdan con los obtenidos con anterioridad (15).

El patrón inmunolectroforético del antígeno somático de larva 1 presentó 4 sistemas antígeno anticuerpo, se pensó que - las pocas bandas de precipitación encontradas se debieron a que el antisuero estuvo muy débil, ya que los conejos inmunizados estaban en muy mal estado; sin embargo, este patrón inmunolectroforético puede servir de base para otros estudios.

La técnica de Microscopio Electrónico de Barrido comparada - con otras técnicas utilizadas, para estudiar larvas (17) tiene como ventaja que se puede observar sus estructuras más definidas y con mayor acercamiento, pudiéndose diferenciar con mayor precisión.

De los 100 borregos del rastro que fueron examinados se en--contró que 88 estaban parasitados, lo que demuestra que la -

oostrosis en nuestro país es un gran problema y que se le debe prestar más atención.

Al observar que la mayoría de los animales del rastro eran criollos nos demuestra que existe poco ganado especializado en la zona.

En el grupo muestreado del rastro hubo 69 hembras y 31 machos, las hembras sacrificadas andaban en su segundo o tercer parto, por lo que se puede deducir, que en esta zona no existe tecnificación en el ganado ovino.

Otros estados patológicos encontrados en los borregos muestreados no parecieron afectar el desarrollo de las pruebas serológicas utilizadas.

Los resultados de la técnica de doble difusión (DD) con sueros (cuadro 1 y 2), nos indican que ésta es bastante específica y que tiene una aceptable sensibilidad, además de ser sencilla y poderse implementar fácilmente en condiciones de campo.

Es de hacer notar que en un estudio sobre el diagnóstico inmunológico de oostrosis en cabras, utilizando la técnica de DD con los antígenos somáticos de los estadios larvarios 2 y

3 de Oestrus ovis, sólo se detectaron 3 de 53 animales parasitados (15).

Esto nos puede llevar a pensar de que la técnica de DD se -- puede adaptar mejor a los ovinos que a los caprinos, sin embargo, se debe investigar más para comprobar esto.

En el presente trabajo no se sabía como se iba a comportar -- el antígeno somático de larva 1 de Oestrus ovis, ya que no -- se había trabajado anteriormente con este antígeno; sin em-- bargo, en la técnica de DD, mostró tener mejor sensibilidad y especificidad comparado con el antígeno de larva 3, pero -- no con el antígeno de larva 2. Esto se puede deber a que -- las larvas 1, cuando las condiciones ambientales no son favo-- rables para su desarrollo, presentan un estado de hipobiosis (4), permaneciendo en el huésped por largos períodos de tiem-- po y así estimulando poco la producción de anticuerpos. Por otro lado, el estadio larvario 3 sólo se encuentra por un pe-- ríodo muy corto de tiempo en el hospedador, lo que hace que probablemente no se genere una buena respuesta inmunológica.

El antígeno somático de larva 2 de Oestrus ovis, demostró -- ser el mejor para diagnosticar la oestrosis en ovinos. Esto se puede deber a que el estadio larvario 2 tenga un meta-- bolismo más dinámico dentro del hospedador en comparación --

con los casos dos estadios (L1, L3), ya que ésta larva necesita crecer y por lo tanto requiere de más nutrientes. Además, la larva produce probablemente antígenos metabólicos -- (productos de excreción y secreción) provocando; por lo tanto, un mayor estímulo antigénico (4).

Al probar la secreción nasal con los antígenos somáticos de los estadios larvarios 1, 2 y 3 de Oestrus ovis, se encontró que sólo dos animales reaccionaron a los tres antígenos; de estos dos animales sólo uno estaba parasitado.

Esta técnica demostró ser poco sensible y específica al probar la secreción nasal de los borregos; sin embargo no se -- puede decir que la prueba sea inadecuada para el diagnóstico de oestrosis en ovinos utilizando secreción nasal, ya que -- fué la primera vez que se hizo; sin embargo de las 100 muestras de secreción nasal, 2 dieron una reacción positiva cuando se probaron con cada uno de los antígenos, lo que nos hace pensar que este trabajo da la pauta para seguir investigando la posibilidad de detectar con mayor efectividad anticuerpos anti-O. ovis con la secreción nasal de ovinos y -- otras especies susceptibles a la oestrosis.

Los resultados de la técnica de hemaglutinación pasiva (HP) con suero (cuadros 1 y 3) nos indican de que los ovinos in--

fectados con el parásito son capaces de montar una respuesta inmune contra Oestrus ovis y que es posible diferenciar animales infectados de animales no infectados, utilizando los antígenos somáticos de larva 1, 2 y 3 del parásito.

Al analizar los resultados se puede confirmar de que el mejor antígeno para probar sueros sospechosos es el antígeno somático de larva 2, ya que comparado con los otros dos antígenos éste tuvo un mejor porcentaje de sensibilidad y una aceptable especificidad (cuadro 1).

El antígeno de larva 1 comparado con el de larva 3, tuvo un mejor porcentaje de sensibilidad, pero menor especificidad (cuadro 1). El principal inconveniente del antígeno de larva 1, es su difícil obtención. Por otro lado, este trabajo apoya la hipótesis propuesta anteriormente (15), la cual indica que el antígeno somático de larva 2 de Oestrus ovis, pertenece a un estadio larvario en el cual muy probablemente haya una mayor respuesta inmune que contra el estadio larvario 3.

Sin embargo, en ese trabajo sólo se utilizó el antígeno de larva 2 para llevar a cabo la técnica de HP.

A pesar de que se observaron características muy semejantes entre los antígenos de larva 2 y larva 3, en las pruebas de inmunolectroforesis (15), podemos sugerir basándonos en los resultados del presente trabajo que la respuesta inmune contra los diferentes estadios es diferente, aunque, sin embargo, los 3 estadios larvarios parecen compartir antígenos comunes.

Al utilizar la técnica de HP con secreción nasal, al principio, se procedió a llevar a cabo la prueba sin descomplementar las muestras, dándonos como resultado títulos de 4096 o mayores con los tres antígenos, por lo que se decidió a descomplementar las muestras. Solamente se pudo diferenciar -- los animales parasitados y los no parasitados con el antígeno de larva 1. Esto se repitió varias veces, obteniéndose -- los mismos resultados.

Posiblemente los títulos tan altos encontrados en HP se deban a las siguientes razones:

1. A que algunos componentes de los antígenos larvarios -- de Oestrus ovis puedan reaccionar en forma inespecífica.
2. Tal vez el método de obtención de las muestras no fue -- el más apropiado, ya que por más que se procuró obtener

las de la manera más estéril posible, estas presentaron restos de estiércol, pastura y tierra; lo que nos hace pensar que exista gran cantidad de contaminantes, así como en la propia secreción nasal que posiblemente presenta aglutininas inespecíficas o anticuerpos contra -- otros antígenos que nos pudieran estar produciendo reacciones cruzadas. Adicionalmente en algunos casos las muestras estaban muy diluidas, o muy concentradas.

Para evitar los títulos tan altos en la prueba de HP cuando se utiliza la secreción nasal, posiblemente sea necesario -- tratarla de alguna manera para evitar las reacciones inespecíficas.

Los resultados obtenidos en este trabajo cumplen con uno de los objetivos propuestos, ya que con el antígeno de larva I se pudieron detectar anticuerpos anti-Oestrus ovis en la secreción nasal de animales infectados. Este hallazgo se apoya en el estudio histológico practicado en la mucosa nasal -- de ovinos parasitados por O. ovis, que muestra una infiltración de linfocitos y células plasmáticas en el corion de la mucosa (foto b).

Cabe hacer notar que fue posible la detección de anticuerpos contra O. ovis en el suero de animales infectados cuando se

utilizó la técnica de DD, obteniéndose una excelente especificidad y una aceptable sensibilidad. Esto no se pudo observar en el trabajo anterior realizado en cabras (15).

También fué posible comparar los títulos obtenidos en la secreción nasal con los del suero de animales parasitados y no parasitados. Se propone que este trabajo dé la pauta para seguir investigando aspectos inmunológicos de oestrosis, como por ejemplo: el establecimiento de un sistema de diagnóstico utilizando secreción nasal de animales infectados con O. ovis y la posibilidad de producir una vacuna contra este parásito.

Por otro lado, de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se sugiere utilizar el antígeno L 2 y una combinación de las pruebas de DD y HP para el diagnóstico serológico en forma experimental de la oestrosis en ovinos, ya que no se pueden recomendar como un sistema de diagnóstico práctico a nivel de campo, puesto que en este trabajo no se evaluaron los costos de estas técnicas.

C O N C L U S I O N E S

1. De los antígenos utilizados, el antígeno L 2, fue el que mejores resultados dió, tanto en DD como en HP (cuadro 1), por lo que se sugiere utilizarlo para llevar a cabo el diagnóstico de oestrosis en ovinos.

2. Se observó que es posible detectar anticuerpos anti O. ovis en la secreción nasal de borregos infectados. Con la técnica de DD y los tres antígenos, solamente se detectaron 2 animales positivos, uno de los cuales era falso positivo. Al utilizar secreción nasal descomplementada con la técnica de HP, se observó que solamente era posible discriminar animales positivos de los negativos cuando se usaba el antígeno L 1; no así el L 2 o el L 3

3. Con base en los resultados obtenidos (cuadro 1), las técnicas de doble difusión en gel (DD) y hemaglutinación pasiva (HP) fueron adecuadas para la detección de anticuerpos anti - O. ovis en el suero de ovinos infectados por el artrópodo.

LITERATURA CITADA

1. Avila C.R.: Penencia número 2 campaña y erradicación - de Oestrus ovis, Tesis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia., U.N.A.M. 1967.
2. Avila C.R.: Control y posible erradicación del Oestrus ovis, Tesis. Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M. 1959.
3. Barriga O.O.: The immunology of parasitic infections, University Park Press, Baltimore, 279-307. 1981.
4. Bautista G. C.R.: Miasis. Curso de actualización sobre zoonosis parasitarias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M. 255-275, 1982.
5. Craig Franklin M.G., Carrol F.M.A.: Parasitología Clínica. Uteha. 1951.
6. Fitch G.S.: Insect pests. Golden Press. New York, - 2nd. edition. 57, 1966.
7. Fundenberg H., Siler D.P., Caldwell J.L., Wells J.L.: Basic and clinical immunology. 3rd. edition. Lange. - Los Altos California, 1980.

8. Garay G.E.: Especificidad y sensibilidad de diferentes pruebas serológicas para el diagnóstico de fasciolosis en ovinos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M. 34-35 1983.
9. Garvez J.S., Cremer, N.E., Sussdorf, D.H.: Methods in immunology. 3rd. edition, W.A. Benjamin, Massachusetts 1977.
10. Horak, I. G.: Parasites of domestic and wild animals in - South Africa. Oestrus ovis in sheep. Onderstepoort.- J. Veterinary Res. 44: 55-65. 1977
11. Horsfall W.R.: Medical Entomology. Arthropods and - - - human disease. Editorial Ronald. 1962
12. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos: Inmunología Veterinaria. Manual de Laboratorio. Ediciones del Patronato de Apoyo a la Investigación Pecuaria en México., A.C. 1981.
13. Metcalf C.I., Funt W.P.: Insectos destructivos e insectos útiles. Cuarta edición, C.E.C.S.A., 1975.
14. Múñiz B.O.: Parasitología Veterinaria. Tercera edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1947

15. Morales, F.: Diagnóstico inmunológico de Oestrus ovis, en caprino, Tesis, Universidad Nacional Autónoma de -- México, Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, 1981.
16. James, M.T.; Harwood, R.F.: Herm's Medical Entomology, 6 th, edition Macmillan Publishing Co. Inc. New York. 278-298, 1969.
17. Le Fichoux Y., Marty P., Denis G.: Un cas d'ophtalmo--myiase externe a Oestrus ovis, Linné, 1758 contractés - sur la plage de Nice. Acta Tropica 38: 461-468, 1981.
18. Petithory, J.; Boulard, C.: Etude comparative des - -- antigenes H. Bovis et H. Lineatum dans le diagnostic -- serologique del L'Hipodermose humaine. Medicine et - - Maladies Infectieuses, 9:393-396, 1979.
19. Porter, P.: Structural and functional characteristics of Immunoglobulins of the comun domestic species, Adv. Vet. Sc. and Comp. Med., 23:1-21, 1979.
20. Quiroz, R.M.: Parasitología y enfermedades parasita- - rias, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. - Ciudad Universitaria, Distrito Federal. 1979'

21. Riou, S.J.: Incidencia de Oestrus ovis en caprinos sacrificados en el Rastro de Ferrería. Tesis, Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M. 1969.
22. Smith, W.D.: The nasal secretion and serum antibody - - response of lambs following vaccination and aerosol - - challenge with parainfluenza 3 virus. Res. Vet. Sci. - 19:56-62, 1975.
23. Soulsby, E.J.L. (editor): Helminths, arthropods and - - protozoa of domesticated animals (Mönnig). 6 th. - - - edition, Williams and Wilkins, Baltimore. 444-445, - 1978.
24. Steelman C.D.: Effects of external and internal - - -- arthropods parasites of domestic livestock production. Rev. of Entomology. 21: 155-178, 1976.
25. Wilson, A.: Patología ovina. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades ovinas. Editorial G.E.A. 1974.