



**UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS-POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LAS ENFERMEDADES PARASITARIAS
DEL TRACTO RESPIRATORIO EN PEQUEÑOS RUMIANTES DEL
DEPARTAMENTO DE BOYACÁ**

Requisito para optar el título de Magister en Ciencias Biológicas

ADRIANA MARIA DIAZ ANAYA

Tunja
Septiembre 2019



**UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS-POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LAS ENFERMEDADES PARASITARIAS
DEL TRACTO RESPIRATORIO EN PEQUEÑOS RUMIANTES DEL
DEPARTAMENTO DE BOYACÁ**

Requisito para optar el título de Magister en Ciencias Biológicas

ADRIANA MARIA DIAZ ANAYA

**JIMMY JOLMAN VARGAS DUARTE
DIRECTOR
Universidad Nacional de Colombia
GRUPO DE CONTROL GENÉTICO EN SALUD ANIMAL**

**MARTIN ORLANDO PULIDO MEDELLIN
CODIRECTOR
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia
GIDIMEVETZ**

Tunja
Septiembre 2019



CERTIFICADO DE ORIGINALIDAD

Jimmy Jolman Vargas Duarte, PhD. en Ciencias Veterinarias, Profesor Asociado, Universidad Nacional de Colombia y Martín Orlando Pulido Medellín, MSc. en Ciencias Biológicas, Docente asociado Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

CERTIFICA:

Que el trabajo de grado realizado bajo nuestra dirección por **Adriana María Díaz Anaya** titulado “EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LAS ENFERMEDADES PARASITARIAS DEL TRACTO RESPIRATORIO EN PEQUEÑOS RUMIANTES DEL DEPARTAMENTO DE BOYACÁ”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al título de **Magíster en Ciencias Biológicas** otorgado por la **Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia**.

Y para que así conste, firmamos la siguiente certificación en Tunja, 4 septiembre de 2019.



Jimmy Jolman Vargas Duarte PhD
Director
Universidad Nacional de Colombia
Grupo De Control Genético En Salud Animal

Martín Orlando Pulido Medellín MSc
Codirector
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia
Gidimevetz



Jimmy J. Vargas Duarte PhD.
Director

Martín O. Pulido Medellín Msc
Codirector



Julio Cesar Giraldo Forero. MSc.
Jurado 1

Andrés M. Gómez Palacio PhD.
Jurado 2



AGRADECIMIENTOS



Tabla de Contenido

CAPITULO I.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. MARCO CONCEPTUAL.....	11
2.1 ETIOLOGÍA DE LAS PARASITOSIS RESPIRATORIAS.....	11
2.2 EPIDEMIOLOGÍA.....	13
2.2.1 Miasis nasal.....	13
2.2.2 Bronquitis verminosa.....	14
2.3 PATOGENIA.....	16
2.3.1. Miasis nasal.....	16
2.3.2. Bronquitis verminosa.....	17
2.4 EFECTOS CLÍNICOS.....	18
2.4.1. Miasis nasal.....	18
2.4.2. Bronquitis verminosa.....	19
2.5 DIAGNÓSTICO.....	20
2.5.1. Miasis nasal.....	20
2.5.2. BRONQUITIS VERMINOSA.....	22
3. ESTADO DEL ARTE.....	25
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	30
6. OBJETIVOS.....	31
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	31
6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	31
7. METODOLOGÍA.....	31
7.1 UBICACION GEOGRÁFICA.....	31
7.2 TAMAÑO DE MUESTRA.....	32
7.3 EVALUACIÓN CLÍNICA DE LOS ANIMALES.....	33
7.4 ENCUESTA.....	33
7.5 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	33
7.5.1 Materia fecal.....	33
7.5.2 Moco nasal.....	34
7.6 TRANSPORTE DE MUESTRAS.....	35



7.7 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	35
7.8 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	36
7.8.1 Protocolo extracción por fenol-cloroformo	36
7.8.2 Amplificación de COI por PCR semi-anidada para identificación de <i>Oestrus ovis</i>	37
7.8.3 Amplificación del ITS-2 para identificación de nemátodos pulmonares	37
7.9 ANÁLISIS DE SECUENCIAS	38
7.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
8. BIBLIOGRAFIA.....	38
9. PRODUCTOS.....	47
10. IMPACTO.....	47
11. ANEXOS	48
CAPITULO II.	53
CAPITULO III.	71
CONCLUSIONES	92
RECOMENDACIONES.....	93



Índice de Figuras

Figura 1. División anatómica de las vías respiratorias en pequeños rumiantes.....	11
Figura 2. Características morfológicas de los nematodos de tracto respiratorio en pequeños rumiantes.....	13
Figura 3 Aparato de Baermann	24
Figura 4. Forma de embalaje para muestras biológicas.....	35



Índice de Tablas

Tabla 1. Inventario ovino-caprino de la provincia Norte de Boyacá.....	31
Tabla 2. Tamaño de muestra de caprinos por municipio.	32
Tabla 3. Tamaño de muestra de ovinos por municipio.	33

Índice de Anexos

Formato 1. Ficha técnica individual para toma de muestra en ovinos y caprinos	48
Formato 2. Ficha técnica de la encuesta epidemiológica.....	49
Formato 3. Consentimiento informado para la toma de muestra de materia fecal en ovinos.....	50
Formato 4. Registro de toma de muestras.....	51
Formato 5. Registro de envío de muestras	52



CAPITULO I.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias de los animales en producción están ampliamente distribuidas en todo el mundo, teniendo distintos impactos tanto en países desarrollados como en vía de desarrollo. Para el caso de los parasitismos, estos se encuentran en cualquier zona, en su mayoría en lugares tropicales y subtropicales donde encuentran las condiciones óptimas para su supervivencia y desarrollo.

En el tracto respiratorio superior se encuentra *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) un importante parásito productor de miasis obligatoria en los ovinos y caprinos con una amplia distribución mundial. La oestrosis es la miasis cavitaria de los senos nasales, paranasales y a veces frontales de los pequeños rumiantes, la característica de los oestridos de presentar espinas a través de todo el cuerpo de las larvas, agrava la acción parasitaria en su paso por los conductos respiratorios anteriores y en algunos casos se pueden presentar con síntomas nerviosos derivados de la localización de larvas en el sistema nervioso central (Matos, Rodríguez Diego, Alfonso, & Olivares, 2013).

Para el caso del tracto respiratorio medio y bajo se producen infecciones conocidas como bronquitis parasitaria o neumonía verminosa en ovinos y caprinos, que son causadas por nematodos de las familias Dictyocaulidae (*Dictyocaulus filaria*) y Protostrongylidae (*Protostrongylus rufescens*, *Spiculocaulus leuckarti*, *Muellerius capillaris*, *Cystocaulus ocreatus* y *Neostrongylus linearis*), los cuales son un grupo de parásitos cosmopolita distribuido bajo la influencia de diferentes factores geográficos y climáticos. Estos nematodos son responsables de pérdidas económicas directas por causa de lesiones pulmonares en rumiantes que pueden ser observadas durante la inspección post-mortem (Panayotova-Pencheva, 2011).

El conocimiento de los agentes parasitarios que originan patologías del tracto respiratorio que se encuentran presentes en una zona geográfica particular, su biología y epidemiología es de vital importancia. De acuerdo a lo anterior, el objetivo del presente trabajo es realizar una aproximación a la epidemiología molecular de las enfermedades parasitarias presentes en el tracto respiratorio de ovinos y caprinos de la provincia Norte del departamento de Boyacá.

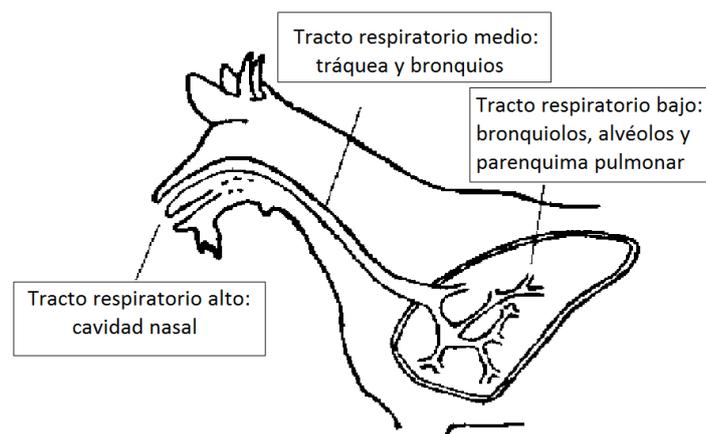


2. MARCO CONCEPTUAL

2.1 ETIOLOGÍA DE LAS PARASITOSIS RESPIRATORIAS

Los pequeños rumiantes hospedan diversos parásitos ubicados en los pulmones que causan enfermedad respiratoria, éstos incluyen *Dictyocaulus filaria* que tiene un ciclo de vida directo, *Protostrongylus rufescens*, *Muellerius capillaris*, *Cystocaulus ocreatus*, *Neostrongylus linearis* y *Spiculocaulus leuckarti*, los cuales tienen ciclo de vida indirecto (Beyene, Nigussie, Ayana, & Abunna, 2013). De los parásitos mencionados el más patógeno es *D. filaria*, mientras que infecciones con *M. capillaris* pueden pasar inadvertidas. También se encuentra *Oestrus ovis*, causante de miasis obligatoria en la cavidad nasal de los ovinos y caprinos.

Para efectos de ubicación anatómica de los parásitos estudiados en las vías respiratorias, se representa gráficamente la siguiente división: tracto respiratorio alto, medio y bajo (Figura 1).



Fuente: Modificado FAO

Figura 1. División anatómica de las vías respiratorias en pequeños rumiantes.

Comenzando por el tracto respiratorio alto se encuentra el estadio larvario del díptero *Oestrus ovis* (Linneo, 1761), causante de miasis cavitaria de los senos nasales, paranasales y a veces frontales de los ovinos y caprinos. También se le conoce con el nombre de “miasis de la nariz”, “rinitis parasitaria”, “enfermedad de la mosca de los senos” y en aquellos casos en los que se presenta con síntomas nerviosos derivados de la localización de larvas en sistema nervioso central se le denomina “falsa modorra” (Matos, Rodríguez, Alfonso, & Olivares, 2013).

Oestrus ovis es una mosca robusta de color marrón grisáceo, de 1 cm de longitud cubierta de pelos cortos, manchas negras en el abdomen y un aparato bucal rudimentario. La larva L1 es filiforme, de color blanco y mide entre 1-3 mm, posee un par de ganchos bucales quitinosos, en forma de garfios y alrededor de 20



espinas terminales distribuidas en dos grupos, la L2 mide entre 2-12 mm también es de color blanco (Cordero Del Campillo & Rojo-Vázquez, 2002).

Las larvas en su última fase (L3) miden 3 cm de largo, de color blanco cuando son jóvenes, luego pasa a color amarillento y finalmente cuando maduran pasan a color marrón claro, morfológicamente presentan una banda transversa en el dorso, bastante ancha y de color negro, en la parte ventral presenta varas filas de espinas fuertes con distribución regular (Urquhart, Armour, Duncan, Dunn, & Jennings, 2001).

En el tracto respiratorio medio se aloja *Dictyocaulus filaria* (Rudolphi, 1809), presente en ganado ovino y caprino. Es un verme blanquecino, delgado y filiforme, en su extremo anterior poseen una cápsula bucal pequeña con 4 labios muy reducidos. Los machos miden 3-8 cm, en la bolsa copuladora de éste, las costillas media y posterolateral están unidas, menos en su extremo. La costilla externo dorsal esta hendida en su base derecha; las espículas son gruesas y con forma de bota que miden de 400-640 μm . Las hembras miden 5-11 cm, la vulva se sitúa hacia la mitad del cuerpo y su extremo posterior es romo. Los huevos elipsoides miden 112-138 X 69-90 μm , éstos tienen una larva desarrollada que eclosiona rápidamente. Las larvas L1 miden 550-580 μm y en el extremo anterior tienen un engrosamiento cuticular llamado botón cefálico que las diferencia de *D. viviparus*, son de color oscuro debido a las reservas nutritivas en forma de gránulos y su extremo posterior es romo (Cordero Del Campillo & Rojo-Vázquez, 2002).

En el tracto respiratorio bajo de los ovinos y caprinos se ubican diversos parásitos dentro de los cuales están *Protostrongylus rufescens* (Leuckart, 1865), el cuál alojado en los bronquiolos es fácilmente identificable por su color marrón y mide de 2-6 cm de longitud. *Muellerius capillaris* (Müller, 1889) se ubica en los alveolos, es una especie diminuta profundamente incrustada en el tejido pulmonar o nódulos reactivos, siendo difícil llegar a obtener ejemplares intactos. También se encuentran otros géneros de menor importancia como *Cystocaulus ocreatus* (Railliet y Henry, 1907), *Neostrongylus linearis* (Marotel, 1913) y *Spiculocaulus leuckarti* (Shults, Orlov y Kutas, 1933), son vermes filiformes de color marrón que miden entre 0,5 a 3 cm de longitud, difíciles de distinguir a simple vista, porque están en medio del parénquima pulmonar. Poseen una bolsa bien desarrollada, espícula y canal espicular, la vulva se sitúa cerca del ano (Kassai, 2002) (Figura



2).

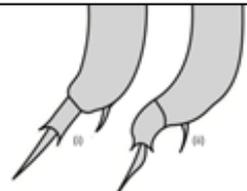
Especie	Morfología extremo caudal L1	Espina presente	Cola de larva compuesta
<i>Dictyocaulus filaria</i>		NO	NO
<i>Protostrongylus rufescens</i>		NO	NO
<i>Muellerius capillaris</i>		SI	NO
<i>Neostongylus linearis</i>		NO	SI
<i>Cystocaulus ocreatus</i>		SI	SI

Figura 2. Características morfológicas de los nematodos de tracto respiratorio en pequeños rumiantes

2.2 EPIDEMIOLOGÍA

2.2.1 Miasis nasal

Oestrus ovis es de distribución mundial, condicionada por factores climáticos, entre los cuales se destaca la humedad y la temperatura, ésta última influye de forma decisiva en el ciclo endógeno y exógeno del parásito. En condiciones experimentales se ha comprobado que las pupas mantenidas a temperatura constante de 34°C mueren a los pocos días, sin embargo, cuando se someten a temperaturas más altas pero de manera no constante, la mortalidad no se ve



afectada tal como sucede con fluctuaciones térmicas entre 21 y 38°C. Los meses de verano proveen mejores condiciones para que la metamorfosis de la mosca se produzca en aproximadamente un mes, mientras que con temperaturas templadas el proceso puede tardar hasta 2 meses y medio. Durante el invierno, el proceso puede detenerse y permanecen como pupas enterradas en diapausa, hasta que vuelvan las temperaturas adecuadas para su desarrollo (Cordero Del Campillo & Rojo-Vázquez, 2002).

Las hembras adultas de *O. ovis* depositan las larvas de primer estado (L1) directamente en las fosas nasales de ovejas y cabras, esta larva coloniza rápidamente la cavidad nasal, septo nasal, cornetes y hueso etmoides. Posteriormente las L1 mudan al segundo estado (L2) y migran a la cavidad de los senos frontales donde mudan al tercer estado (L3). Bajo condiciones favorables las L1 duran entre 10 y 25 días, las L2 de 7 a 15 días y las L3 de 13 a 18 días, sin embargo, la fase de L1 puede prolongarse durante varios meses en tiempo frío. Cuando las larvas han alcanzado su crecimiento máximo, son expulsadas por el estornudo del hospedero sobre el suelo donde siguen su ciclo. La metamorfosis intra-puparial ocurre durante 19-27 días, después de lo cual las moscas emergen. Las hembras llevan un huevo completamente desarrollado y el macho emerge con espermatozoides maduros listos para la fecundación, la incubación de huevos en hembras grávidas tarda unos 12 días, después de lo cual la actividad infectiva de las moscas hembra en los nuevos hospederos comienza (Angulo-Valadez, Ascencio, Jacquiet, Dorchies, & Cepeda-Palacios, 2011).

Para el caso de los segundos estadios (L2), éstos se encuentran en una fase intermedia de crecimiento y demandan una dieta rica en proteínas para mantener su metabolismo. Estas proteínas las obtienen principalmente del moco y seroproteínas a través de enzimas de tipo tripsina, por el contrario, las L3 deben almacenar reservas de energía para las tres fases libres del ciclo de vida (pupariación, emergencia de la mosca, apareamiento y larviposición) (Tabouret, Prevot, Bergeaud, Dorchies, & Jacquiet, 2001).

2.2.2 Bronquitis verminosa

Los miembros de la familia Dictyocaulidae tienen ciclos de vida directos, los adultos viven en la tráquea y bronquios, donde las hembras producen huevos embrionados que eclosionan rápidamente tras su ovoposición (Borji, Azizzadeh, Ebrahimi, & Asadpour, 2012). Las larvas en estado L1 eclosionan en el pulmón o en los bronquios, liberándose con rapidez, éstas son arrastradas mecánicamente por accesos de tos y por el epitelio ciliar de los bronquios hacia la tráquea, llegan al espacio nasofaríngeo y son deglutidas con la secreción mucosa alcanzando el aparato digestivo y desprendiéndose en las heces del hospedero infectado, también pueden ser expulsadas al exterior con el flujo nasal. Bajo condiciones medioambientales favorables, las L1 se desarrollan hasta el estado infectivo L3 en un período de 4 a 6 días. Cuando estas son consumidas por un nuevo hospedero, las larvas L3 migran a través de la pared intestinal a los ganglios linfáticos mesentéricos, allí mudan y pasan a cuarto estadio (L4) para transportarse en los pulmones. Las L4 penetran en los alveolos, mudan y se



convierten en adultos infectivos. El período de prepatencia es de 4 a 5 semanas, su longevidad es de 6 meses y en ocasiones 1 a 2 años (Gasser et al., 2012).

Dictyocaulus filaria es un parásito cosmopolita común en ovejas y cabras. El 90% de las larvas realizan su primera muda entre 21 y 25 °C a las 48 horas y la segunda en 6 a 7 días, alcanzando la etapa infectiva en 19 días a 4-5°C y pueden permanecer activas hasta por 100 días, llegando a sobrevivir durante 48 semanas en heces húmedas a bajas temperaturas, tolerando temperaturas de congelación de varios días. Todos los estadios larvales son sensibles a la luz solar directa y a la desecación, sin embargo, las larvas en estado L3 son más resistentes que las larvas L1 y L2 (Anderson, 2000). Las L3 son poco activas y con frecuencia se encuentran enrolladas en la materia fecal, un ambiente húmedo y frío es el más adecuado para el desarrollo de *D. filaria* ya que la L3 es resistente al frío. Los esporangios del hongo del género *Pilobolus* y escarabajos estercoleros facilitan la propagación de larvas en situaciones favorables, pero bajo condiciones adversas de sequía las larvas pueden inhibirse en los pulmones (Regassa et al., 2010).

Tanto *D. filaria* como *D. viviparus* se encuentran comúnmente en climas húmedos y templados donde los estados infectivos de vida libre pueden sobrevivir y llegar a ser muy patógenos en los animales que se encuentran pastando por primera vez (Panuska, 2006). Aunque estos parásitos son ampliamente distribuidos, los signos clínicos de los animales infectados pueden ser menos evidentes que los signos a causa de otras enfermedades del ganado (Perry & Randolph, 1999). Para el caso de los parásitos pulmonares, pueden resultar en infección de las vías respiratorias medias y bajas, usualmente presentando bronquitis verminosa o neumonía verminosa, siendo en rumiantes la principal causa de bronconeumonía, que ocasionan pérdidas económicas significativas con mortalidad y reducción en la producción (Borji et al., 2012).

La transmisión de protostrongílidos es epidemiológicamente más compleja comparado con *D. filaria*, ya que involucra al hospedero definitivo, el parásito y un hospedero intermediario. El rango del hospedero intermediario de *Protostrongylus rufescens* está restringido a ciertas especies de caracoles que tienen menor prevalencia debido a que su rango geográfico es tan amplio como el de éstos (Borji et al., 2012). Las larvas (L1) de Protostrongílidos son bastante resistentes a la desecación y los estadios en los caracoles están bien protegidos durante condiciones adversas, sin embargo, la humedad se considera un factor determinante en la supervivencia y viabilidad de los caracoles de tierra. Las larvas infectivas probablemente sobreviven en los caracoles durante el tiempo que los caracoles viven y hasta una semana después de la muerte del caracol (Hansen & Perry, 1994).

Las hembras de los Protostrongílidos son ovíparas y depositan sus huevos no segmentados alrededor de los tejidos pulmonar, vascular y nervioso, estos desarrollan en su interior larvas de primer estadio antes de aparecer en las heces. Tienen ciclos de vida indirectos que requieren un caracol terrestre como hospedero intermediario. Las larvas de primera etapa (L1) que se encuentran en las heces infectan a caracoles y babosas al penetrar por la superficie inferior de



estos o al ser ingeridas. El desarrollo de larvas infectivas (L3) en los caracoles tarda aproximadamente 2 semanas y éste llega a infectar al hospedero final por ingestión accidental en sus alimentos. Las larvas liberadas migran por el conducto mesentérico a través de la ruta linfático-vascular hasta alcanzar los pulmones y se convierten en adultos en la luz de los bronquiolos. El período prepatente de *Muellerius* es 6-10 semanas, en *Protostrongylus* es de 5-6 semanas y su longevidad es de 2 a 7 años (Hansen & Perry, 1994).

Muellerius es el género más común, las larvas L1 pueden sobrevivir durante 10 meses a 5°C, en zonas de clima templado y presencia de lluvias invernales casi todas las ovejas son portadoras de este género, la extensa distribución y la alta prevalencia son en parte atribuidas a la amplia gama de hospedadores intermediarios (caracoles y babosas), mientras que *Protostrongylus* posee una gama de hospedadores intermediarios restringida a ciertas especies de caracoles, tiene una prevalencia más baja, aunque su distribución geográfica es igual de amplia (Urquhart, Armour, Duncan, Dunn, & Jennings, 2001).

La transmisión y el mantenimiento de las infecciones pulmonares año tras año dependen de algunos animales infectados que albergan un pequeño número de parásitos adultos en los pulmones durante varios meses y por lo tanto sirven como portadores. Los animales portadores continúan contaminando los pastos, y el ciclo de infección se mantiene en la población en riesgo. Como resultado, el número de larvas infectivas en pastos puede alcanzar niveles que causan brotes de enfermedad clínica. Las larvas de algunas especies de nematodos pulmonares pueden inhibirse en el tejido pulmonar durante períodos de condiciones climáticas adversas (como una estación seca) y luego madurar al comienzo de la estación de lluvias (Hansen & Perry, 1994).

2.3 PATOGENIA

2.3.1. Miasis nasal

La patogenicidad de *O. ovis* es parcialmente inducida por espinas en la cutícula de la larva y ganchos orales, pero principalmente por biomoléculas, es decir, enzimas y antígenos excretados o secretados por la larva sobre la mucosa. La larva migra dentro del hospedero con la ayuda de sus espinas en la cutícula ventral y ganchos bucales, los cuales causan una irritación mecánica de la mucosa. La importancia de estas estructuras es crítica en el primer estado larval, las espinas de la cutícula son numerosas en comparación con las de los estados L2 y L3. Estas espinas y ganchos orales facilitan el agarre larvario, permiten el desplazamiento rápido de las L1 en la mucosa nasal y contribuyen a la aparición de un proceso reactivo de naturaleza catarral (Angulo-Valadez et al., 2011).

Estas reacciones son importantes para la fase de migración y posteriormente en la localización definitiva. Durante el período de transformación de las larvas, aumentan su tamaño y eliminan la exuvia, iniciándose nuevamente en la mucosa un catarro nasal y sinusal de tipo agudo, con abundante secreción de tipo seroso,



seromucoso, mucoso o purulento. De igual forma el crecimiento en las larvas provoca acciones mecánicas de naturaleza obstructiva sobre los orificios nasales, que impiden el drenaje y limpieza de los senos llegando a causar sinusitis crónica purulenta como consecuencia de la acumulación y retención de las secreciones (Cordero Del Campillo & Rojo-Vázquez, 2002).

Las larvas L2 y L3 pierden sus espinas dorsales, lo que indica que éstas no son importantes ya sea para las etapas de desarrollo o para la patogénesis, ya que la severidad observada en las lesiones de la cavidad nasal, senos nasales y a nivel del hueso etmoides, es consecuencia parcialmente de la fuerte actividad trófica del estado L2, pero principalmente por la larva L3. Las biomoléculas excretadas por la glándula salival de la larva comprenden una compleja formación de enzimas necesarias para degradar las proteínas del moco y el plasma para su alimentación y nutrición, de tal manera que cuando el desarrollo larval incrementa, no sólo aumenta la producción de proteínas en productos excretados, sino que aumenta la actividad proteolítica (Angulo-Valadez et al., 2009).

La patogenia se amplifica en la mucosa etmoidal y sinusal cuando L2 y L3 están presentes. Específicamente, las enzimas larvales (principalmente serina y proteasas) son capaces de degradar los componentes de la matriz extracelular (tipo I) y lámina basal del epitelio (tipo IV), albúminas e inmunoglobulinas en fragmentos más fácilmente ingeribles por las larvas. En este sentido, los estudios micro-histológicos han caracterizado los cambios patológicos ultra-estructurales causados por *O. ovis*, ya que esta induce hiperplasia y metaplasia en el epitelio, confirmando un incremento en el número de células epiteliales en la cavidad nasal y sinusal de ovejas infectadas con respecto al número encontrado en ovejas sin infección (Tabouret et al., 2003). La infestación por *O. ovis* puede predisponer a los animales a presentar pleuroneumonía, abscesos en los pulmones y neumonía intersticial (Saleem et al., 2017).

2.3.2. Bronquitis verminosa

Para los parásitos pulmonares el efecto patógeno depende de su ubicación en el tracto respiratorio, el número de larvas infectivas ingeridas y el estado inmune del animal. Durante las primeras etapas de la infección por *Dictyocaulus* (periodo prepatente) los bronquiolos están bloqueados por exudado, que obstruye las vías respiratorias, lo cual puede resultar en colapso del tejido pulmonar distal a la ubicación del bloqueo. Los nematodos adultos (periodo patente) en los bronquios causan bronquitis. La presentación de enfisema, edema pulmonar e infecciones secundarias son complicaciones comunes en los casos más severos. Después de 2 a 3 meses la mayoría de parásitos adultos son expulsados (Hansen & Perry, 1994).

En el intestino, las larvas ejercen acción traumática al atravesar la pared intestinal, aunque esto tiene poca importancia clínica. En los pulmones, las L4 migrantes realizan una acción traumática-irritativa sobre los capilares alveolares. La presencia de L5 y adultos en los bronquiolos origina acción obstructiva y tóxica-inflamatoria, debido a la excreción de productos metabólicos, esto conlleva a una



predisposición a infecciones bacterianas secundarias (Cordero Del Campillo & Rojo-Vázquez, 2002).

Los mecanismos patógenos de *P. rufescens* y *M. capillaris* son similares pero rara vez producen efectos graves. Esto puede deberse en parte a su localización más restringida en los pulmones. Existen dos tipos de alteraciones patológicas, en una de éstas se presentan nódulos de multiplicación con forma de cono, zonas similares a granulomas de diferente tamaño, color y grado de consolidación los cuales contienen nematodos sexualmente activos y acúmulos de larvas, ubicados habitualmente en el lóbulo diafragmático, éstos se pueden observar mediante laminas histológicas (Kassai, 2002).

Otra alteración es la formación de lesiones nodulares, pequeñas y esféricas del tamaño de un alfiler, parece ser la reacción predominante tras la infección con *M. capillaris* éstas son de color gris o marrón oscuro incluso negro en el caso de *Cystocaulus*, se encuentran a menudo sub-pleuralmente en los lóbulos pulmonares caudales, los nódulos contienen vermes minúsculos, así como huevos y larvas que son casi imperceptibles. En la infección de *P. rufescens* hay un área más grande de pulmón afectada, las ramificaciones bronquiales más pequeñas situadas en la superficie pulmonar se llenan de huevos, larvas y restos celulares por la oclusión de los pequeños bronquios a causa de los vermes, la lesión tiene forma cónica con la base en la superficie del pulmón (Urquhart, Armour, Duncan, Dunn, & Jennings, 2001).

2.4 EFECTOS CLÍNICOS

2.4.1. Miasis nasal

La presencia de larvas de *Oestrus ovis* afecta el comportamiento de los ovinos y caprinos, provoca pérdidas de producción, interferencia en la respiración normal debido a que los animales deben respirar por la boca, lo que afecta el pastoreo y la rumia, además del potencial de superinfección bacteriana (Tabouret et al., 2001). Esta infección naso-sinusal local puede inducir signos de enfermedad generalizada incluyendo emaciación la cual puede resultar en la muerte, los signos más constantes son de tipo respiratorio, en los que se destacan rinorrea uni o bilateral desde serosa hasta mucopurulenta, respiración entrecortada con episodios de taquipnea acompañada de ronquidos, estertores y lagrimeo. Además de estos efectos locales, pueden llegar a afectarse los pulmones por la formación de abscesos y neumonía intersticial, debido a que la secreción nasal contiene bacterias y eosinófilos y sus metabolitos activos pueden ser aspirados hacia los pulmones (Dorchies, Durantón, & Jacquiet, 1998).

Resultan sugestivos de infestación por *O. ovis* el ocultamiento de los ollares en el pasto, estornudos, resoplidos forzados y huidas repentinas que llegan a desarrollar los animales como reflejo ante los zumbidos del parásito adulto, además al ser un agente productor de miasis cavitaria de los senos nasales, paranasales y a veces frontales de los ovinos y caprinos, en algunos casos se pueden presentar síntomas nerviosos derivados de la localización de larvas en el



sistema nervioso central, se observa agitación, apatía, contracciones musculares, marcha vacilante y adinamia en menor proporción, en ocasiones los animales giran sobre sí mismos y caen al suelo, razón por la cual también se le conoce a la enfermedad como “falso torneo” (Matos et al., 2013).

2.4.2. Bronquitis verminosa

Entre tanto, los signos clínicos de la infección por nematodos pulmonares pueden oscilar entre una tos moderada, que se exacerba durante el estrés y una tos persistente grave con marcado aumento de las tasas respiratorias acompañadas de dificultad respiratoria. Los animales pueden bajar la cabeza y estirla hacia delante. Las infecciones graves en el ganado van acompañadas de anorexia, depresión, anemia, retraso en el crecimiento y por consiguiente pérdidas en la producción (Hansen & Perry, 1994).

En los animales jóvenes se presenta tos y expectoración con abundante moco que puede tener larvas, huevos o nematodos adultos, pocas semanas post-infección. También se puede observar taquipnea, disnea, anorexia y pérdida de peso relacionado con la importancia de la infección, la evolución depende del número de L3 ingeridas, sobre todo en las primo-infecciones, así como del ritmo de la infección. En la fase aguda, el flujo nasal es muy abundante, de consistencia mucosa al comienzo y luego muco-purulenta formando costras al secarse que obstruyen los orificios nasales. En infecciones intensas se puede observar síntomas de bronconeumonía con respiración acelerada, tos seca y estertores crepitantes; las muertes no son frecuentes debido a la expulsión gradual de adultos, aunque las infecciones mixtas con protostrongílidos y con vermes intestinales determinan el mal estado de los afectados (Cordero Del Campillo & Rojo-Vázquez, 2002).

Las infecciones ovinas con protostrongílidos son comúnmente asintomáticas y esporádicamente pueden resultar con tos, el curso de la infección es crónico y puede desembocar en la curación espontánea, sin embargo, las infecciones fuertes causan disminución del peso en canal, aumento de los niveles de mortalidad, neumonía crónica y disminución de la P_{O_2} que puede resultar en una hipoventilación alveolar. Las diferentes especies de gusanos pulmonares ejercen un efecto patológico sinérgico responsable de la bronconeumonía verminosa comúnmente vista en ovejas y cabras de pastoreo, se puede afirmar que la bronconeumonía asociada a protostrongílidos perjudica fuertemente el intercambio gaseoso y alteran la tasa respiratoria (Berrag & Cabaret, 1996). Zonas extensas de enfisema y bronconeumonía pueden causar manifestaciones clínicas como tos, anorexia, retraso en el crecimiento, depresión y anemia. Las infecciones



mixtas con varias especies son frecuentes (Kassai, 2002).

2.5 DIAGNÓSTICO

2.5.1. Miasis nasal

2.5.1.1 Diagnóstico clínico

Examen clínico: las ovejas infestadas por *Oestrus ovis* muestran en su mayoría, abundante secreción nasal de moco purulento, signo clínico presuntivo que, junto a frecuentes estornudos que sufre el animal, son indicios característicos de parasitismo por *O. ovis*. A su vez, resultan sugestivos de infestación, el ocultamiento de los ollares en el pasto y huidas repentinas que llegan a desarrollar los animales como reflejo ante los zumbidos del parásito adulto (Yacob et al., 2004).

Oestrus ovis tiene grandes limitaciones en el diagnóstico clínico, sin embargo, la asociación de estornudos y un abundante moco purulento en los ollares de un porcentaje elevado de animales, es un indicio muy característico que puede estar acompañado por la presencia de las larvas en los comederos y bebederos (Matos et al., 2013).

Por ser un agente productor de miasis cavitaria de los senos nasales, paranasales y a veces frontales de los ovinos y caprinos, en algunos casos se pueden presentar con síntomas nerviosos derivados de la localización de larvas en el sistema nervioso central. La proximidad a los tejidos del sistema nervioso central se ha considerado que favorece la transmisión de enfermedades causadas por priones (Dorchies et al., 1998).

2.5.1.2 Diagnóstico directo

Identificación de parásitos adultos: el diagnóstico *post mortem* en tracto respiratorio superior se basa en la revisión de la cabeza mediante un corte longitudinal (Imagen 1), se observan larvas de diferentes estadios del insecto parasitando los senos frontales donde migran hacia las cavidades sinusales y se



desarrollan desde el primer hasta el tercer estadio (Kassai, 2002).



Imagen 1. Corte sagital cráneo de cordero, se observan larvas L1 (Izquierda) y larvas L3 (Derecha).

Técnicas moleculares: los métodos de diagnóstico convencional presentan algunas limitaciones, en términos de sensibilidad y especificidad, adicionalmente puede ser necesario demasiado tiempo y dinero. Las herramientas basadas en la identificación de ADN han permitido el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico sensibles y específicos que han encontrado aplicaciones en parasitología. En particular, los métodos que dependen de la amplificación de los ácidos nucleicos pueden superar algunas de las limitaciones de los enfoques tradicionales. La principal ventaja de esta metodología es que permite el estudio del ADN del parásito a partir de cantidades mínimas de material genético, que de otro modo serían insuficientes para el análisis convencional, la técnica usada comúnmente es PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) (Gasser, 2006).

Se han utilizado marcadores moleculares en la identificación de especies, hospedero específico y en la distribución de miembros de familias de dípteros. Entre los marcadores más utilizados se encuentran el gen mitocondrial que codifica la subunidad I de Citocromo C Oxidasa (COI) y el 28S nuclear (rADN), que también proporcionan información útil sobre genética de poblaciones y son usados para análisis filogenéticos (Moreno et al., 2015).

Para la identificación específica, el ADN diana no debe mostrar variación de la secuencia o debe ser menor dentro de una especie y diferir suficientemente la secuencia para permitir la separación entre especies. Por el contrario, con el propósito de identificar variantes poblacionales (subespecies, genotipos o "cepas"), debe existir un grado considerable de variación en la secuencia dentro de una especie. Se ha empleado una serie de regiones diana en los genomas nucleares y mitocondriales para lograr la identificación de parásitos de especies o genotipos sub-específicos, estas incluyen ADN ribosómico nuclear (rADN), ADN mitocondrial (ADNmt) y ADN repetitivo (Gasser, Bott, Chilton, Hunt, & Beveridge,



2008).

2.5.1.3 Diagnóstico indirecto

ELISA: la serología, fundamentalmente mediante inmunoensayos acoplados con enzimas (ELISA), demuestra gran utilidad para estudios epidemiológicos de la afectación por oestridos, incluso, en diversas especies animales aunque se requieren varias semanas post-infestación para que la respuesta inmune sea detectable. Las pruebas de ELISA no están disponibles comercialmente y los estudios que existen se han realizado con técnicas estandarizadas y desarrollados a nivel de laboratorio (Angulo-Valadez et al., 2009).

2.5.2. BRONQUITIS VERMINOSA

2.5.2.1 Diagnóstico clínico

Examen clínico: principalmente se basa en la historia clínica de la enfermedad y la presentación de los síntomas, sin embargo el diagnóstico clínico del síndrome broncopulmonar agudo es difícil ya que se debe considerar el carácter estacional y la intensidad de los síntomas. En animales primo infectados hay tos silbante y edema pulmonar, en el caso de los animales adultos se observa disnea y tos discreta. Los animales jóvenes que salen a pastoreo por primera vez y que presentan tos, disnea, taquipnea, pero no tienen hipertermia, son sospechosos de bronquitis parasitaria, en particular en zonas endémicas (Cordero Del Campillo, M; Rojo-Vázquez, 2002).

Es posible la realización de una exploración de tórax mediante cuatro métodos tradicionales: inspección, en el cual se puede evidenciar un posible ensanchamiento de los espacios intercostales cuando existe enfisema pulmonar alveolar crónico, esto para el caso de los caprinos y ovinos de pelo, debido a la dificultad del examen en ovinos con vellón. La palpación, que permite ver diferencias de temperatura que puedan existir y los ruidos perceptibles, así como zonas dolorosas sobre todo en los espacios intercostales, el aumento de temperatura puede advertir la presencia de pleuritis relacionada con infecciones secundarias por bacterias (Sarmiento, 2001).

Mediante percusión se puede identificar un cambio en los sonidos con significado diagnóstico, ésta se divide en dos tipos: sonora y vertical. En la percusión sonora el sonido que produce y percibe el aire pulmonar se origina mediante el pequeño martillo o percusión digito-digital. Respecto de los sonidos estos deben ser clasificados de acuerdo a la experiencia del examinador, y deben ir de acuerdo a la profundidad de la percusión. Percusión vertical, comienza a lo largo del límite craneal del área pulmonar y avanza luego, siempre en los espacios intercostales, hacia la parte caudal. Sirve para la determinación de las eventuales modificaciones del sonido. La palpación del área pulmonar es de limitado valor debido a que se pueden obtener muy pocos datos, ya que por ser un animal pequeño, los dedos no cabrían en los espacios que quedan entre cada costilla



(González, Berumen, Mayo, & Vera, 2010).

En la auscultación se puede realizar la identificación de ruidos respiratorios, estertores y sibilancias que sugieran la presencia de trasudados, exudados o bronconeumonía. En los rumiantes se estudia un campo pulmonar torácico y otro preescapular. En corderos se puede percibir el área de los pulmones: del borde posterior de la escápula, a la penúltima costilla y hacia el codo (formando un triángulo imaginario) de ambos lados del tórax. El campo de auscultación pulmonar es la misma que la percusión pulmonar. La membrana del estetoscopio debe aplicarse firmemente contra el tórax para disminuir los sonidos del roce causado por la fricción con la capa del animal (piel). Todo el campo pulmonar debe ser cuidadosamente auscultado de la misma forma que es percutida (Sarmiento, 2001).

Imagenología: para apoyar el examen semiológico se tienen otros métodos de diagnóstico como las radiografías de tórax con las cuales se puede descubrir lesiones más pequeñas e imperceptibles a la exploración clínica, sin embargo, es un procedimiento que no puede emplearse en todas partes, y aún más en la práctica rural, sea por la dificultad de traslado de los equipos o por los costos que estos exámenes acarrearán en rebaños enfermos. También se puede mencionar la broncoscopia, con esta se puede visualizar el tracto respiratorio medio y bajo e identificar la presencia de parásitos adultos de *Dictyocaulus* o nódulos formados por protostrongílidos, además de esto se podría realizar lavado broncoalveolar con el fin de obtener parásitos en dicha muestra y así realizar diagnóstico definitivo de nematodos pulmonares.

2.5.2.2 Diagnóstico directo

Técnica De Migración Larvaria De Baermann: a pesar de ser un método antiguo (1917), ésta técnica coproparasitaria es la más utilizada en el diagnóstico de parásitos pulmonares, dada su simplicidad, exactitud y economía. Esta se basa en las propiedades de movilidad, hidrotropismo y termotropismo, así como la incapacidad que tienen los nematodos de nadar en contra de la gravedad. Ya que se buscan larvas vivas se realiza con materia fecal fresca tomada directamente del recto y no se debe añadir preservantes a la muestra. La refrigeración retarda la movilidad de las larvas. El tamaño del aparato a usar, así como la cantidad de heces a utilizar dependen de la finalidad con la cual se haga la técnica, es decir, con fines experimentales se recomienda utilizar mayor cantidad de materia fecal para la recuperación de larvas, en caso de diagnóstico únicamente, se pueden usar 5-15 gr de heces y un aparato menor (Morales & Pino, 2009).

Una vez se ha preparado el aparato de Baermann, se llena el tubo y el embudo con agua tibia, con el objetivo de que las heces queden sumergidas, si la materia fecal es muy líquida se debe colocar varias capas de gasa, luego se deja el aparato a temperatura ambiente durante 24 horas (Figura 4). Transcurrido este tiempo se retira el tubo de ensayo, se deja sedimentar por 30 minutos o se centrifuga a 1200 rpm por un minuto. Posteriormente con una pipeta se extrae una



gota del sedimento y se examina al microscopio a 10x, se puede utilizar una gota de lugol para teñir las larvas. Cualquier infección por pequeña que sea puede ser detectada por medio de esta técnica, también puede realizarse de forma cuantitativa siempre y cuando se pese con exactitud la cantidad de heces a usar (Benavides, 2013; Thienpont, Rochette, & Vanparijs, 1986).



Fuente: Morales y Pino, 1977

Figura 3. Aparato de Baermann

Examinación *post mortem*: para el tracto respiratorio medio y bajo se realiza examen de los pulmones para la colecta de parásitos del genero *Dictyocaulus*. Los pulmones son cuidadosamente disecados, al igual que la tráquea, se realiza incisión en los grandes y pequeños bronquios con la finalidad de recoger la mayor cantidad de parásitos, los vermes adultos se encuentran a la luz de la tráquea, bronquios y bronquiolos. Se procede luego a lavar cuidadosamente con solución fisiológica y el producto de dicho lavado es tamizado. Luego de esto se realizan incisiones profundas y se presiona con las manos el tejido pulmonar, sumergiendo el órgano en una cubeta llena de suero fisiológico, para lograr la expulsión de la mayor cantidad de parásitos en la solución de lavado. Luego de esto los parásitos son recuperados con la ayuda de agujas entomológicas y conservados en alcohol al 70% (Morales & Pino, 2009).

También es posible observar lesiones pulmonares de bronquitis, bronquiolitis catarral purulenta, áreas de consolidación rojiza en los lóbulos caudales, enfisema y atelectasia por obstrucción. Mediante el examen de raspados de epitelio de la tráquea, bronquios y bronquiolos se evidencian huevos y L1. En las fases pre-patentes, las formas inmaduras solo se verán con lupa al examinar el moco, en las fases pos-patentes de las infecciones, es más difícil el diagnóstico porque ya no hay vermes adultos, aunque las áreas pulmonares lesionadas que sobresalen superficialmente en relación con el parénquima normal, lo cual permite sospechar de una infección (Borji et al., 2012).

Debido a la dificultad en la recuperación de formas inmaduras de *Dictyocaulus* y adultos de *Muellerius* y *Protostrongylus*, se cortan pequeños pedazos de pulmón donde se observen lesiones, esto se colocan en un recipiente de vidrio para su



sedimentación con solución salina y se cubre con una gasa teniendo seguridad de sumergirlo, este recipiente se deja en incubadora a 27°C durante 12 horas, luego con una pipeta se traslada el sedimento a una caja de Petri para la identificación de nematodos al estereoscopio (Ueno & Gonçalves, 1998).

Técnicas Moleculares: en los genes nucleares ribosomales y los espaciadores, a menudo hay menos variación de la secuencia entre individuos dentro de una población y entre poblaciones, lo que los hace adecuados como marcadores específicos. Por lo tanto, en el caso de los marcadores genéticos para la identificación específica de nematodos del ganado, el enfoque ha sido el empleo de ADN ribosómico nuclear (ADNr) (Roeber, Jex, & Gasser, 2013). En la última década, los estudios han demostrado consistentemente que el primer espaciador transcrito interno (ITS-1) y el segundo (ITS-2) espaciador transcrito interno del ADNr producen marcadores genéticos confiables para la identificación de una amplia gama de nematodos del orden Strongylida, estos han sido usados con fines diagnósticos, mientras que ADNmt ha sido usado para la caracterización de especies y algunas veces para reconstrucciones filogenéticas (Gasser, 2006).

Las secuencias de genes de ADNr podrían tener un valor diagnóstico limitado (marcadores de especies) porque son menos variables en secuencia (entre especies) que los espaciadores, excepto en los dominios variables (D). Sin embargo, las diferencias interespecíficas en secuencias parciales del gen 28S del nematodo pulmonar de los ovinos *Dictyocaulus filaria* y del nematodo del ciervo *D. eckerti*, sugieren que este gen puede ser también útil para la identificación de algunas especies de estromgilidos de importancia veterinaria (Gouy de Bellocq et al., 2001). También se han detectado diferencias considerables en la secuencia entre *D. filaria* en pequeños rumiantes y *D. viviparus* en bovinos en sitios dentro de los genes del ADNr que son invariantes entre otros nematodos de la familia de los estromgilidos (Chilton, Huby-Chilton, & Gasser, 2003; 2008).

2.5.2.3 Diagnostico indirecto

Serología: los métodos indirectos no han dado en los nematodosis pulmonares los resultados esperados, se han empleado pruebas alérgicas y pruebas serológicas (seroprecipitación, desviación del complemento, hemoaglutinación indirecta, etc.). Actualmente, el ensayo de inmunoenlaces (ELISA) se ha revelado como una técnica de inmunodiagnóstico sensible y específica y está dando buenos resultados para detectar la infección durante la realización de estudios epidemiológicos, sin embargo, se han desarrollado más estudios para *Dictyocaulus viviparus* en terneras, que para *D. filaria* en pequeños rumiantes (Strube, Springer, Schunn, & Forbes, 2017).

3. ESTADO DEL ARTE

Las parasitosis son consideradas como una de las principales causas de pérdidas



económicas en las explotaciones de pequeños rumiantes (Cordero Del Campillo & Rojo-Vázquez, 2002), estas representan el mayor problema en un gran número de sistemas ovinos y caprinos debido a su impacto sobre la producción, ya que ocasiona morbilidad y mortalidad, adicionalmente, genera gastos debido a los tratamientos que deben ser efectuados (Knox, Torres-Acosta, & Aguilar-Caballero, 2006; Domke et al., 2013).

Tanto parasitosis internas como externas causan síntomas que pueden variar según la especie, carga parasitaria y la inmunidad propia del hospedero. A menudo estos pueden ser generales y no específicos, poco concluyentes y solo indicativos de infección parasitaria durante el examen clínico. Los signos más comunes incluyen pérdida de peso corporal, diarrea, pelo áspero, debilidad, anemia, tos; se pueden observar otros signos, dependiendo del órgano que esté involucrado. En muchos casos, las infecciones parasitarias predisponen a otras enfermedades, especialmente en casos de infecciones subclínicas o de larga duración (Bowman, 2011).

En general, es inapropiado establecer qué infección de parásitos podría ser de mayor importancia, ya que esto dependería en gran medida de muchos factores además de los asociados con parásitos internos o externos que afectan a los rumiantes. Sin embargo, es interesante observar que las cabras son consideradas, probablemente, como las especies domésticas de rumiantes más sensibles al parasitismo por los nematodos gastrointestinales, que se caracterizan por un aumento en el conteo de huevos fecales y una mayor carga de nematodos (Fthenakis & Papadopoulos, 2018).

Además, las infecciones parasitarias pueden tener un impacto adverso en otros aspectos de la actividad reproductiva, la menor disponibilidad de energía en el período de concepción perinatal, debido a las infecciones parasitarias, puede conducir a un número reducido de ovulaciones o una mayor tasa de muertes embrionarias, por lo tanto, reduce la tasa de nacimientos. Para el caso de rebaños con animales en malas condiciones durante la temporada de monta, puede reducirse el índice de concepción. Por último, las infecciones parasitarias pueden ser un factor predisponente de la toxemia del embarazo (una enfermedad metabólica grave de las gestantes), lo que lleva a la muerte de animales afectados, el aborto o la muerte perinatal del feto o recién nacido (Fthenakis, Mavrogianni, Gallidis, & Papadopoulos, 2015). Continuando con animales que logran nacer, hallazgos de diferentes estudios proporcionan una clara evidencia de que el parasitismo interno dificulta el crecimiento de los animales más jóvenes que se encuentran infectados. Además, los autores han indicado que los cadáveres de los jóvenes afectados eran más livianos y de baja conformación respecto a los de animales sanos (Arsenos et al., 2009).

Para el caso de *O. ovis* la mosca adulta es larvípara, cuando ésta ataca a las ovejas para depositar sus larvas en la cavidad nasal, parasita de forma crónica a los animales, éstos dejan de alimentarse y se vuelven inquietos, sacuden la cabeza o presionan la nariz contra el suelo o entre otras ovejas. Las miasis perjudican el bienestar de los animales y causan pérdidas económicas notables



en la industria ganadera, tanto en los países en desarrollo como en los países desarrollados. Las larvas de *O. ovis* causan aproximadamente 4.6 kg de pérdida de carne, 200-500g de pérdida de lana y 10% de pérdida de leche por animal, además de baja fertilidad y aborto (AL-Ubeidi, ALani, & Al-kennany, 2017; Bosly, 2018).

Estudios alrededor del mundo demuestran la presencia de *O. ovis* y describen su epidemiología en diferentes zonas geográficas, sin embargo, estos resultados han sido obtenidos *post mortem* mediante la examinación de cabezas de ovinos y caprinos en plantas de beneficio, muy pocos estudios de prevalencia de *O. ovis* se han desarrollado en animales vivos debido a la dificultad de diagnóstico que representa la identificación *in vivo* de este díptero. Se han encontrado prevalencias *post mortem* en ovinos y caprinos del 54% en Grecia (Papadopoulos, Chaligiannis, & Morgan, 2010), 24% Jordania (Abo-Shehada, Batainah, Abuharfeil, & Torgerson, 2003), 38,71% Turquía (Özdal, Tanritanir, Ilhan, & Değer, 2016), 13,1% Irán (Shoorijeh, Tamadon, Negahban, & Behzadi, 2011), las más altas has sido reportadas en España y Etiopia con 91,4% y 91,2% respectivamente (Alcaide, Reina, Frontera, & Navarrete, 2005; Alem, Kumsa, & Degefu, 2010).

Estudios recientes realizados en el 2017 describen la presencia de *O. ovis* en Iraq con una prevalencia *post mortem* de 54.1% (AL-Ubeidi et al., 2017), en el sur de la India se encontraron larvas de *O. ovis* en un 6.3% de las carcasas en la planta de beneficio, siendo significativamente más alta la presencia de éste en ovejas que en cabras (Dhishonin et al., 2017), mientras que en la región norte de este mismo país se encontró una prevalencia elevada de 99.6%, ninguno de los estudios encontró una diferencia entre el sexo de los animales, pero este último si reportó mayor infestación en animales mayores a 1 año (Saleem et al., 2017).

En América se registra un 84% en la Pampa Argentina 81,4% Cuba 50% Brasil (da Silva, Bassetto, & Amarante, 2012), 60,9% Chile (Hidalgo et al., 2015), entre otros países, que demuestran la presencia de *O. ovis* mediante reportes de caso o estudios no publicados.

En España, Moreno et al., 2015, realizaron la caracterización molecular de las secuencias citocromo oxidasa I (COI) y 28S (ADNr) de larvas de *Oestrus* recolectadas de animales domésticos y salvajes, encontraron que *O. ovis* parasita diferentes hospederos pertenecientes al género *Ovis* y *Capra*; así mismo, Sánchez, Caparrós, Ostrowski, Sarasa, & Pérez, 2017, reportaron la presencia de *Oestrus ovis* en un íbice siberiano, una cabra asiática, fue identificada mediante morfología y posterior caracterización molecular mediante el análisis del gen COI.

Grisez-Duranton et al., (2002), realizaron un estudio usando marcadores RAPD, encontrando una alta diversidad genética en un grupo de larvas de un mismo hospedero, lo que podría explicarse por varias hipótesis como el apareamiento múltiple de las hembras, generaciones mixtas, mezcla de larvas de diferentes



orígenes geográficos, mediante selección natural o desvío genético.

En Turquía İpek & Altan, (2017) estudiaron la efectividad de la PCR anidada en el diagnóstico de Oestrosis, obtuvieron una sensibilidad y especificidad del 100% para detectar la presencia del parásito en 184 muestras de moco tomadas de cabezas de ovinos y caprinos sacrificados, a los cuales se les realizó también rinoscopia que arrojó un 100% de sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de oestrosis en cabras y un 81% de sensibilidad con 100% de especificidad en el diagnóstico de ovinos.

Un estudio reciente de identificación y caracterización molecular se realizó en Arabia Saudita, mediante amplificación por PCR del gen COI se identificó *Oestrus ovis* confirmando previos reportes de prevalencia estacional e identificación morfológica de larvas, por lo tanto, este estudio valida la identificación molecular de especies de moscas que causan miasis como una sustitución confiable de la identificación morfológica, ya que es difícil identificar larvas a nivel de especie (Bosly, 2018).

En el tracto respiratorio medio y bajo se encuentran nematodos pulmonares, estos parásitos han sido estudiados en diversos países donde se han encontrado prevalencias variables. En España en un estudio de protostrongílidos, López et al., 2011 encontraron una prevalencia de 97,7% de *Muellerius capillaris* y 5,4% de *Neostrongylus linearis*. En Etiopia se han realizado gran cantidad de investigaciones, en algunas de estas se reporta una prevalencia total de 46%, con 26,5% para *D. filaria* y 50,4% para *M. capillaris* (Terefe, Tafess, Fekadie, & Kebede, 2013), un año más tarde fue encontrada una prevalencia de nematodos pulmonares de 25,69%, se éste valor el 13,63% fue *D. filaria*, 5,57% fue *M. capillaris* y *P. rufescens*, el 6,50% presentaron infecciones mixtas (Adugna, Afera, & Berhe, 2014). Un estudio más reciente mostró 31,2% de prevalencia en ovinos y caprinos, con las especies *D. filaria*, *M. capillaris* y *P. rufescens* (Kassa, Alemneh, & Akeberegn, 2017).

En Irán se encontró infección en ovejas con *D. filaria*, *P. rufescens* e infecciones mixtas con 91.5%, 3.2% y 5.3% respectivamente (Borji et al., 2012). En Algeria se encontró un 22%, con una prevalencia de especies *M. capillaris* 40%, *P. rufescens* 27%, *D. filaria* 28% y 5% de infecciones mixtas (Mokhtaria, Sidi, Ammar, & Aboud, 2014). En Argentina se realizó el primer reporte de *Muellerius capillaris* en 2014 (Suárez et al., 2014), mientras que en Colombia no se tienen registros oficiales de la presencia de nematodos pulmonares en ovinos, sin embargo, en bovinos se tiene una prevalencia reciente de *D. viviparus* de 4.6% (Chaparro et al., 2016).

Técnicas de diagnóstico molecular desarrolladas en los últimos años, han demostrado consistentemente que el primer espaciador interno transcrito (ITS-1) y el segundo (ITS-2) espaciador transcrito interno de ADN ribosómico nuclear contienen marcadores genéticos confiables para la identificación de una amplia gama de nematodos del orden Strongylida (nematodos bursados) incluso llegando a nivel de especie, ya que se ha reportado que la variación intraespecífica en estas



secuencias es bajo (Gasser, 2006).

Un estudio llevado a cabo en Uzbekistan realizó un diagnóstico de las especies de la familia Protostrongylidae presentes en caprinos, debido a que la identificación de larvas en heces y en hospederos intermediarios es casi imposible llegar a un diagnóstico a nivel de especie, por lo tanto es necesario utilizar herramientas moleculares que permitan realizar epidemiología de estos parásitos pulmonares, en éste estudio Kuchboev, Krücken, Ruziev, & von Samson-Himmelstjerna, 2015, encontraron diferencias en las secuencias entre ITS-2 que fueron suficientes para permitir la identificación de cinco especies de protostrongídeos.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los ovinos y caprinos de pastoreo están expuestos a una gran variedad de parásitos como nemátodos gastrointestinales y pulmonares, trematodos, cestodos y agentes causantes de miasis (Tabouret et al., 2003). Los helmintos de rumiantes se encuentran en cualquier lugar del mundo, ya que gran cantidad de ambientes tropicales y subtropicales proveen casi las condiciones perfectas para su desarrollo y supervivencia, llegando a ser causantes de importantes pérdidas económicas (Kassa et al., 2017).

Existen algunos estudios en el departamento de Boyacá acerca de los principales parásitos gastrointestinales que interfieren directamente en la productividad de pequeños rumiantes como es el caso de *Haemonchus* sp, *Eimeria* spp., *Fasciola hepatica*, *Toxocara* spp. y *Strongyloides* spp., entre otros (Díaz, Arias, García, & Pulido, 2014; Pulido, García, Díaz, & Andrade, 2014). De igual forma, se conocen estudios acerca de la dinámica de las parasitosis a lo largo de las etapas reproductivas en ovejas de trópico alto, encontrando un incremento en el conteo de huevos de nemátodos en períodos de parto (Vargas-Duarte et al., 2015). Sin embargo, los estudios realizados y publicados acerca de nematodos pulmonares son limitados a nivel nacional y regional.

Infecciones conocidas como bronquitis parasitaria o neumonía verminosa en ovinos y caprinos, los nematodos pulmonares son un grupo de parásitos cosmopolita distribuido bajo la influencia de diferentes factores geográficos y climáticos (Panayotova-Pencheva, 2011). Estos son responsables de pérdidas económicas directas por causa de lesiones pulmonares en rumiantes que pueden ser observadas durante la inspección post-mortem. Cuando hay infección únicamente en pulmones, solo el órgano es decomisado, pero si la infección ha causado neumonía, emaciación o anemia, entonces toda la carcasa será decomisada (Kouam et al., 2014).

A pesar de que *D. filaria* es el más patógeno, con frecuencia hay infecciones mixtas con varias especies de protostrongídeos, la muerte no es común ya que es un proceso crónico que transcurre con tos, respiración rápida, ruidos pulmonares



y descarga nasal bilateral, además puede ocurrir bronquitis, colapso y edema pulmonar, incluso enfisema (Panuska, 2006). Esta sintomatología se presenta sobre todo en los más jóvenes ya que la prevalencia e intensidad de infección es más elevada, lo que conlleva a pérdidas económicas indirectas por retraso en el crecimiento, índice de conversión desfavorable, disminución en el estado inmunitario posibilitando la acción de otros agentes infecciosos que inciden sobre la salud de los animales y ocasionan una disminución en la producción (Cordero Del Campillo & Rojo-Vázquez, 2002).

Adicionalmente, se encuentra *Oestrus ovis*, mosca cuyas larvas causan miasis en la cavidad nasal de ovinos y caprinos, originando signos clínicos severos y un compromiso en el bienestar animal causado por la mosca adulta, todo esto resulta en disminuciones productivas debido a la interferencia con la respiración normal, rumiación y el posible potencial de superinfección bacteriana (Papadopoulos et al., 2006; Tabouret et al., 2001). Está oestrosis se encuentra presente en las explotaciones de la región y se ha convertido en un problema común de los productores, no obstante, son escasos los reportes y descripciones moleculares de la entidad en la zona neotropical (Pape, Wolff, & Amat, 2014).

Además de los problemas de control de este parásito, existe riesgo zoonótico asociado a la presencia de este, presentándose casos en el mundo de miasis nasofaríngea y oftálmica (Smillie, Gubbi, & Cocks, 2010). Esta es clasificada como oftalmomiasis externa si la larva se presenta en la conjuntiva y oftalmomiasis interna si la larva tiene penetración intraocular. *Oestrus ovis* causa oftalmomiasis externa usualmente en las áreas rurales o donde existe proximidad a los pequeños rumiantes (Fasih, Qaiser, Bokhari, Jamil, & Beg, 2014; Forero, 2011).

A pesar de que estas parasitosis son perjudiciales para la salud, no se conocen para Colombia y el departamento estudios de identificación de los parásitos presentes en vías respiratorias ya que en su mayoría los estudios están enfocados a la prevalencia de nematodos gastrointestinales y sus efectos sobre la producción de los pequeños rumiantes. El conocimiento de los agentes parasitarios que originan patologías del tracto respiratorio, presentes en una zona geográfica particular, su biología y epidemiología es de vital importancia, ya que tienen significativas implicaciones para el control de las parasitosis, particularmente dado el aumento de problemas de resistencia a antihelmínticos en nematodos reportadas en los últimos años (Sargison, 2016). De acuerdo a lo anterior, se plantea realizar una aproximación al estado epidemiológico de las enfermedades parasitarias presentes en el tracto respiratorio de ovinos y caprinos de la provincia Norte del departamento de Boyacá.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el estado epidemiológico de las principales enfermedades parasitarias presentes en el tracto respiratorio de pequeños rumiantes del departamento de Boyacá?



6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

- Describir el estado epidemiológico de las enfermedades parasitarias del tracto respiratorio de pequeños rumiantes de la provincia Norte del departamento de Boyacá y caracterizar molecularmente los agentes causales asociados a la presentación de éstas.

6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar morfológica y molecularmente las especies de parásitos que afectan el tracto respiratorio de pequeños rumiantes.
- Determinar la prevalencia de las infecciones causadas por parásitos del tracto respiratorio de pequeños rumiantes.
- Evaluar algunas de las variables asociadas con la presencia de parásitos del tracto respiratorio en pequeños rumiantes.

7. METODOLOGÍA

7.1 UBICACION GEOGRÁFICA

El departamento de Boyacá está localizado en el centro del país, donde se presentan todos los pisos térmicos con temperaturas desde los 35 °C en Puerto Boyacá, hasta temperatura bajo cero grados, en la Sierra Nevada de Güicán y El Cocuy (Gobernación de Boyacá, 2012). Con base al alto inventario ovino y caprino del departamento y al crecimiento importante que se viene presentando en el departamento, se seleccionaron 6 municipios pertenecientes a la provincia Norte de Boyacá (Tabla 1).

INVENTARIO OVINO-CAPRINO MUNICIPIOS SELECCIONADOS			
MUNICIPIO	CAPRINOS	OVINOS	TOTAL
Soatá	2.900	3.500	6.400
Susacon	3.514	963	4.477
Tipacoque	2.210	400	2.610
Covarachía	3.100	120	3.220
La uvita	2.111	2.700	4.811
Boavita	4.000	489	4.489
Total	17.835	8.172	26.007

Tabla 1. Inventario ovino-caprino de la provincia Norte de Boyacá. Fuente: ICA 2015



7.2 TAMAÑO DE MUESTRA

Se calculó el tamaño de muestra para ovinos y caprinos mediante la siguiente ecuación donde:

$$n = \frac{N \cdot Z_{\alpha}^2 \cdot P \cdot (1 - P)}{e^2 \cdot (N - 1) + Z_{\alpha}^2 \cdot P \cdot (1 - P)}$$

N= 17.835 caprinos y 8.172 ovinos, $Z_{\alpha} = 1,96$ a un nivel de confianza del 95%, $e = 5\%$, margen de error admitido, $P = 50\%$, prevalencia esperada, este valor debido a que en Boyacá no se conocen estudios relacionados de prevalencia para parásitos del tracto respiratorio.

El tamaño de muestra inicialmente calculada para caprinos fue de 377 y para ovinos de 369. De acuerdo a la extensión del municipio y población ovina y caprina se realizó la distribución de las muestras (Tabla 2 y 3). Sin embargo, al momento de la recolección de muestras se encontró una mayor población caprina lo que llevo a tomar **485** muestras en caprinos y **276** ovinos.

MUNICIPIO	Extensión Km ²	CAPRINOS	%	Proporción Animales/Extensión	%	Muestra
Soatá	136	2.900	16,3	21,3	15,3	58
Susacon	191	3.514	19,7	18,4	13,2	50
Tipacoque	73	2.210	12,4	30,3	21,8	82
Covarachía	103	3.100	17,4	30,1	21,6	81
La Uvita	151	2.111	11,8	13,9	10	38
Boavita	159	4.000	22,4	25,1	18	68
Total		17.835		139,1		377

Tabla 2. *Tamaño de muestra de caprinos por municipio.*

MUNICIPIO	Extensión Km ²	OVINOS	%	Proporción Animales/Extensión	%	Muestra
Soatá	136	3.500	42,8	25,7	44	162
Susacon	191	963	11,8	5,1	8,7	32
Tipacoque	73	400	4,9	5,5	9,4	35
Covarachía	103	120	1,5	1,2	2,1	8
La Uvita	151	2.700	33,0	17,8	30,5	112
Boavita	159	489	6,0	3,1	5,3	20
Total		8.172		58,4		369



Tabla 3. *Tamaño de muestra de ovinos por municipio.*

7.3 EVALUACIÓN CLÍNICA DE LOS ANIMALES

Se realizó un examen clínico general a cada uno de los animales, se tomaron constantes fisiológicas y además se efectuó una inspección del sistema nervioso central, sistema digestivo y sistema respiratorio en busca de la posible presencia de secreción nasal, tipo de descarga y ruidos respiratorios compatibles con rinitis y neumonía. Se realizó exploración de las fosas y cavidad nasal con el fin de visualizar la posible presencia de larvas de *Oestrus ovis* (Formato I).

7.4 ENCUESTA

Se aplicó una encuesta epidemiológica a nivel de finca y se diligenció una ficha de tipo descriptivo para cada muestra de materia fecal y moco recolectada con el fin de proponer los posibles factores de riesgo asociados a la infección por parásitos del tracto respiratorio (Formato II).

7.5 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

7.5.1 Materia fecal

Se recolectaron aproximadamente de 15 a 20 gr de materia fecal a 485 caprinos y 276 ovinos directamente del recto utilizando un guante plástico estéril.

Materiales: los elementos de restricción física necesarios fueron un encierro móvil o fijo y lazos para ayudar a sostener a los animales en caso de no contar con un lugar cerrado. Bolsa roja para desechos biológicos, marcador indeleble para identificar las muestras y una tiza marcadora de ganado para identificar los animales que ya habían sido muestreados, formato de toma de muestra (Formato I y II) y formato de consentimiento informado para la toma de muestra (Formato III). Nevera portátil y refrigerantes para la conservación del material recolectado, guantes látex o de nitrilo para el almacenamiento de las muestras coprológicas. Por último diligenciamiento del formato de registro de recolección de muestras de heces (Formato IV).

Método de sujeción: Los ovinos y caprinos fueron manipulados dentro de un encierro móvil o fijo que permitiera llevar a cabo el adecuado procedimiento. El operario o ayudante ubicó el animal adulto entre sus piernas formando un túnel sobre la región torácica del animal y con uno de sus brazos sujetaba el ovino por debajo del cuello. No se requirió sedación para el procedimiento en ningún individuo. En el caso de los animales jóvenes menores de dos meses, el animal fue levantado con los dos brazos, sujetando el cuello con uno de los brazos y los miembros posteriores y el resto del cuerpo con el otro brazo, inmovilizando así el



cordero.

Descripción del procedimiento: Se lubricó con agua destilada un guante de látex, con el dedo índice, se estimuló la mucosa del recto para facilitar la evacuación de las heces, actuando en forma de cucharilla con el dedo índice, se evacuaron las heces de la ampolla rectal de forma suave. Si no se encontraban heces en la ampolla rectal, se repetía el procedimiento 1 a 2 horas después del primer intento. Se colectó alrededor de 15 a 20 gramos de heces. Una vez colectada la muestra, se eliminó todo el aire presente en el guante y se cerró. Con marcador indeleble se rotuló la muestra colectada con la identificación establecida. Se marcó el animal muestreado con una tiza marcadora para ganado, con el objetivo de no repetir el procedimiento sobre los animales ya colectados. Se almacenaron las muestras en una nevera portátil con refrigerantes, durante la colecta y se mantuvieron a 4°C hasta su llegada al laboratorio para procesamiento.

Complicaciones: La posible complicación más frecuente es la irritación de la mucosa de la ampolla rectal y posible sangrado, se tuvo precaución de no realizar este procedimiento en animales menores de 2 semanas de edad.

7.5.2 Moco nasal

Mediante la misma técnica de sujeción del animal, se realizó una exploración de la cavidad nasal y se recolectó una muestra de moco con un hisopo estéril introduciendo este en la región más interna de ambas fosas nasales, luego fue guardado y rotulado en un criovial de 2 ml.

Materiales: los elementos de restricción física necesarios fueron encierro móvil o fijo, contenedor de objetos punzantes o guardián. Bolsa roja para desechos biológicos, marcador indeleble. Formato de toma de muestra y formato de consentimiento informado para la toma de muestra. Nevera portátil y refrigerante. Guantes látex o nitrilo para la toma de muestra de moco nasal, hisopo estéril, crioviales de conservación y Buffer STE.

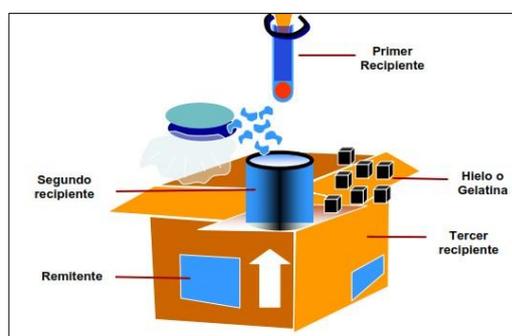
Descripción del procedimiento: se introdujo un hisopo estéril en la región más interna de las fosas nasales realizando un barrido interno, la parte del algodón con la muestra fue guardada en un criovial y se descartó el resto del bastoncillo para poder cerrar el recipiente. Se agregó 500 µl de buffer STE para su preservación. Con marcador permanente se rotuló la muestra colectada con la identificación establecida para cada animal. Se marcó el animal muestreado con una tiza marcadora para ganado, con el objetivo de no repetir el procedimiento sobre los animales ya colectados. Las muestras se almacenaron en una nevera portátil con refrigerantes, durante la colecta, posteriormente las muestras fueron almacenadas en el laboratorio a -20°C hasta su extracción.



7.6 TRANSPORTE DE MUESTRAS

Inmediatamente después de la recolección de las muestras, estas fueron almacenadas en neveras de icopor portátiles a 4°C, hasta el envío a la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia y Universidad Nacional de Colombia.

Se usó un embalaje compuesto por los tres niveles de contención según recomienda la OMS (Figura 4). Un recipiente primario que contenía la muestra y debía ser a prueba de filtraciones y estar etiquetado. Un envase secundario bien cerrado y sellado, a prueba de filtraciones, que encierra y protege al primario y un envase exterior que protegiera el contenido de daños físicos, mientras se encontraban en su transporte hasta el laboratorio. Cada envase preparado para su envío debía estar correctamente marcado y etiquetado e ir acompañado de una copia del Formato de envío y recepción de muestras debidamente diligenciadas (Formato V).



Fuente: ICA 2004

Figura 4. Forma de embalaje para muestras biológicas.

7.7 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Las muestras de materia fecal fueron procesadas mediante la técnica de Baerman modificada con el fin de obtener las larvas de parásitos pulmonares, estas fueron identificadas morfológicamente al microscopio mediante claves taxonómicas (Van Wyk, Cabaret, & Michael, 2004).

Materiales: fueron necesarios embudos plásticos, gasa, agua destilada, cinta de teflón, pipetas Pasteur, tubos falcon 15 ml, centrifuga, láminas portaobjetos, laminillas cubreobjetos, lugol parasitológico, Buffer STE y Tubos eppendorf.

Procedimiento: se tomó un embudo de plástico corriente y se fijó a un tubo falcon de fondo cónico de 15 ml, en la unión se utilizó cinta de teflón para evitar pérdida de agua. Se usaron entre 15 y 20 grs. de heces frescas tomadas directamente del



recto y se envolvieron en varias capas de gasa. Se llenó el sistema con agua destilada a una temperatura no superior a 40 °C y durante un lapso de 12 a 24 horas se dejó en reposo para que se llevara a cabo la migración de las formas larvianas presentes. Con cuidado se separó el embudo y el tubo de ensayo, este se llevó a centrifugación a 1500 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y con una pipeta pasteur se tomó 1ml del sedimento restante. Se colocó sobre una lámina 2 gotas de dicho sedimento y con una gota de lugol se realizó tinción de las larvas, luego se cubrió con una laminilla. Se realizó identificación de larvas en el microscópico usando objetivo de 4x y 10x. Las muestras positivas fueron conservadas con 500 µl de buffer STE y almacenadas en el laboratorio a -20°C hasta su extracción.

7.8 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Se llevó a cabo la extracción de ADN genómico a las muestras de moco contenidas en los hisopos, de igual forma a los sedimentos positivos a larvas de nematodos del tracto respiratorio que fueron obtenidas por la técnica de Baerman. La extracción se realizó mediante Fenol-Cloroformo según lo descrito por Bloor, Ibáñez, & Vilorio-Lagares, 2015.

7.8.1 Protocolo extracción por fenol-cloroformo

- El material de análisis fue transferido a un tubo plástico eppendorf de 1.5 ml.
- La digestión de las muestras se llevó a cabo empleando 500 µL solución de tampón STE (NaCl 0,1M; Tris-HCl 0,05 M pH 7,6; EDTA 1 mM pH 8,0 y SDS 10%) y 20 µL de proteinasa K (20 mg/ml) (Ambion, ThermoFisher, Cat. No. AM2548) durante toda la noche en agitación constante a 55°C.
- Posteriormente fueron agitadas las muestras en vórtex durante 15 segundos y llevadas a centrifugar a 14000 rpm durante 30 seg.
- Transferir 500 µL del lisado a un nuevo tubo eppendorf previamente marcado y esterilizado.
- Se agregó Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico 25:24:1 (ThermoFisher, Cat. 15593031), agitar suavemente.
- Las muestras se llevaron a centrifugación a 14000 rpm durante 10 min.
- Con ayuda de una micropipeta se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo marcado y esterilizado, se le agregó 400 µL Cloroformo-Alcohol Isoamílico 24:1 (Sigma Aldrich, Cat.C0549) y mezclar por inversión.
- Se llevaron a centrifugación a 14000 rpm durante 10 min.
- Posteriormente con ayuda de una micropipeta se recuperó el sobrenadante de cada muestra, se adicionó 30 µL acetato de sodio 5M (Sigma Aldrich Cat. 127-09-3) y 750 µL de etanol grado molecular al 100% que se encuentra almacenado a -20°C (Merck-Millipore, Cat. 108543).
- Las muestras fueron llevadas a -20°C durante 2 horas.
- Posteriormente fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 10 min.
- Se retiró el sobrenadante obtenido y se agregó etanol al 70% que se



encuentra a -20°C , se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante 10 min. Se repite este procedimiento.

- Se elimina el exceso de etanol y el ADN obtenido se deja secar a temperatura ambiente toda la noche.
- Se re suspendieron las muestras en 50 μL buffer TE 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0), se incubó una hora en baño maría a 55°C y posteriormente toda la noche a 4°C .
- Los extraídos fueron preservados en congelación a -20°C hasta su empleo.

7.8.2 Amplificación de COI por PCR semi-anidada para identificación de *Oestrus ovis*

Para las condiciones de amplificación en la PCR se seleccionaron los cebadores y condiciones reportadas para identificación de dípteros en la PCR externa UEA7 (5'-TACAGTTGGAATAGACGTTGATAC-3') y UEA10 (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3'), para la PCR semi-anidada UEA9 (5'-GTAAACCTAACATTTTTCTCAACA-3') y UEA10 (Ipek & Altan, 2017). Para la PCR externa y semi-anidada se empleó 50 μL como volumen final de reacción que contenía 50-60 ng de ADN genómico, 1X de buffer de reacción (20mM Tris-HCl pH 8; 50 mM KCl), 2,5 mM MgCl_2 , 0,2 mM de dNTPs y 0.3 μM de cada primer y 1.25 U de Taq polimerasa (Thermo Scientific Cat. EP0402). Las condiciones de ciclado la PCR externa fueron: una denaturación inicial de 94°C por 3 min y 40 ciclos de 94°C por 1 min, alineamiento a temperatura 52°C por 1 min, extensión a 72°C durante 1 min y una extensión final a 72°C por 7 min. Las condiciones de ciclado de la PCR semi-anidada fueron: una denaturación inicial de 94°C por 3 min y 40 ciclos de 94°C por 1 min, alineamiento a temperatura 55°C por 1 min, extensión a 72°C durante 1 min y una extensión final a 72°C por 7 min.

Los productos amplificados fueron observados en geles de agarosa al 2.5% en TBE 0,5X (100 mM Tris, 90 mM Borato, 2,5mM EDTA; pH 8,0) teñidos con SYBR Safe (ThermoFisher, Cat. S33102). Los geles fueron corridos durante 40 min a 80 V y los productos visualizados en un transiluminador (Safe Imager™ 2.0 Blue Light Transilluminator), los tamaños obtenidos en los amplificados fueron establecidos mediante comparación con un patrón de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific, Cat. 15628019). Los productos amplificados fueron purificados con el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery y posteriormente enviados al servicio de Secuenciación y Análisis Genético de la Universidad Nacional de Colombia (SSIGMOL).

7.8.3 Amplificación del ITS-2 para identificación de nemátodos pulmonares

Para las condiciones de amplificación en la PCR convencional se seleccionaron los cebadores NC1-F (5'-ACGTCTGGTTCAGGGTTGTT-3') y NC2-R (5'-TTAGTTTCTTTTCTCCGCT-3') (Gasser, Chilton, Hoste, & Beveridge, 1993). Para la amplificación por PCR se empleó 15 μL como volumen final de reacción que contenía 50-60 ng de ADN genómico, 1X de buffer de reacción (20mM Tris-HCl pH 8; 50 mM KCl), 2,0 mM MgCl_2 , 0,2 mM de dNTPs y 0.5 μM de cada primer



a evaluar y 1.25 U de Taq polimerasa (Thermo Scientific Cat. EP0402). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: una denaturación inicial de 95°C por 5 min y 35 ciclos de 95°C por 45 seg, alineamiento a temperatura 50°C por 45 seg, extensión a 72°C durante 30 seg y una extensión final a 72°C por 7 min.

Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 2.5% en TBE 0,5X (100 mM Tris, 90 mM Borato, 2,5mM EDTA; pH 8,0) teñidos con SYBR Safe (ThermoFisher, Cat. S33102). Los geles fueron corridos durante 40 min a 80 V y los productos visualizados en un transiluminador (Safe Imager™ 2.0 Blue Light Transilluminator), los tamaños obtenidos en los amplificados fueron establecidos mediante comparación con un patrón de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific, Cat. 15628019). Los productos amplificados fueron purificados con el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery y posteriormente enviados al servicio de Secuenciación y Análisis Genético de la Universidad Nacional de Colombia (SSIGMOL).

7.9 ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Las secuencias de COI e ITS-2 obtenidas de las diferentes muestras fueron ajustadas y posteriormente alineadas utilizando el software BIOEDIT. Para la comparación e identificación de la identidad taxonómica se utilizó la herramienta BLASTn con la información presente en las bases de datos de GenBank (poner la dirección electrónica del blastn). Con el objetivo de comparar las secuencias obtenidas con secuencias de referencia obtenidas del GenBank, se construyó un dendrograma de distancias genéticas mediante al algoritmo NJ usando el programa Mega 7.

7.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La determinación de las prevalencias de acuerdo a cada parásito observado, se llevaron a cabo mediante estadística descriptiva. Por otra parte, la asociación entre las variables de la encuesta epidemiológica y la parasitosis, fueron evaluadas mediante la prueba de Chi cuadrado (análisis univariado) y aquellas variables que presentaron asociación significativa fueron analizadas mediante regresión logística (análisis multivariado). El procesamiento de la información, se realizó mediante software estadístico Epidat 4.1.

8. BIBLIOGRAFIA

- Abo-Shehada, M. N., Batainah, T., Abuharfeil, N., & Torgerson, P. R. (2003). Oestrus ovis larval myiasis among goats in northern Jordan. *Preventive Veterinary Medicine*, 59(1–2), 13–19. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00058-8](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00058-8)
- Aduгна, M., Afera, B., & Berhe, N. (2014). Prevalence of ovine lungworms in and around Wukro, Tigray Region, Ethiopia. *Global Veterinaria*, 12(4), 474–478. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2014.12.04.8322>
- Ahaduzzaman, M. (2019). The global and regional prevalence of oestrosis in



- sheep and goats: a systematic review of articles and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, 12(1), 346. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3597-2>
- Ahmadi, N., Rakhshandehroo, E., & Khadivimanesh, V. (2018). Cystocaulus ocreatus (Nematoda: Protostrongylidae) as an ovine lungworm: Molecular diagnosis and histopathological aspects. *Small Ruminant Research*, 169(August), 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.08.019>
- AL-Ubeidi, N., ALani, A., & Al-kennany E. (2017). DETECTION OF NASAL BOT FLY LARVAE IN SLAUGHTERED SHEEP OF NINEVAH GOVERNORATE – IRAQ. *Bas.J.Vet.Res.*, 16(2), 240–247.
- Alcaide, M., Reina, D., Frontera, E., & Navarrete, I. (2005). Epidemiology of Oestrus ovis (Linneo, 1761) infestation in goats in Spain. *Veterinary Parasitology*, 130(3–4), 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.03.022>
- Alem, F., Kumsa, B., & Degefu, H. (2010). Oestrus ovis larval myiasis among sheep and goats in Central Oromia, Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 42(4), 697–703. <https://doi.org/10.1007/s11250-009-9477-6>
- Alemu, S., Leykun, E. G., Ayelet, G., & Zeleke, A. (2006). Study on small ruminant lungworms in northeastern Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, 142(3–4), 330–335. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.008>
- Anderson, R. C. (2000). *Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission (2nd edn)*. *Parasitology Today* (Vol. 16). [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01712-9](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01712-9)
- Angulo-Valadez, C. E., Ascencio, F., Jacquiet, P., Dorchies, P., & Cepeda-Palacios, R. (2011). Sheep and goat immune responses to nose bot infestation: A review. *Medical and Veterinary Entomology*, 25(2), 117–125. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00911.x>
- Angulo-Valadez, C. E., Cepeda-Palacios, R., Ascencio, F., Jacquiet, P., Dorchies, P., Ramírez-Orduña, J. M., & López, M. A. (2009). IgG antibody response against salivary gland antigens from Oestrus ovis L. larvae (Diptera: Oestridae) in experimentally and naturally infected goats. *Veterinary Parasitology*, 161(3–4), 356–359. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.01.027>
- Arsenos, G., Fortomaris, P., Papadopoulos, E., Sotiraki, S., Stamataris, C., & Zygoiannis, D. (2009). Growth and meat quality of kids of indigenous Greek goats (Capra prisca) as influenced by dietary protein and gastrointestinal nematode challenge. *Meat Science*, 82(3), 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.01.028>
- Bauer, C., Steng, G., Prevot, F., & Dorchies, P. (2002). Seroprevalence of Oestrus ovis infection in sheep in southwestern Germany. *Veterinary Parasitology*, 110(1–2), 137–143. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00317-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00317-5)
- Benavides, E. (2013). *Técnicas para el diagnóstico de endoparásitos de importancia veterinaria* (Primera). Bogotá, Colombia: Universidad de la Salle.
- Berrag, B., & Cabaret, J. (1996). Impaired pulmonary gas exchange in ewes naturally infected by small lungworms. *International Journal for Parasitology*, 26(12), 1397–1400.
- Beyene, D., Nigussie, S., Ayana, D., & Abunna, F. (2013). The prevalence of



- lungworms in naturally infected sheep of ambo district, oromia, Ethiopia. *Global Veterinaria*, 10(1), 93–98.
<https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2013.10.1.71184>
- Bloor, P., Ibáñez, C., & Vilorio-Lagares, T. A. (2015). Mitochondrial DNA analysis reveals hidden genetic diversity in captive populations of the threatened American crocodile (*Crocodylus acutus*) in Colombia. *Ecology and Evolution*, 5(1), 130–140. <https://doi.org/10.1002/ece3.1307>
- Borji, H., Azizzadeh, M., Ebrahimi, M., & Asadpour, M. (2012). Study on small ruminant lungworms and associated risk factors in northeastern Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(11), 853–856.
[https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60159-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60159-X)
- Bosly, H. (2018). Molecular identification studies on *Oestrus ovis* L. (Diptera: Oestridae) larvae infested sheep in jazan region, Saudi Arabia. *Indian Journal of Animal Research*, 52(1), 105–110.
<https://doi.org/10.18805/ijar.v0iOF.8487>
- Bowman, D. (2011). *Georgies Parasitología para veterinarios*. ESPAÑA: ELSEVIER ESPAÑA.
- Chaparro, J. J., Ramírez, N. F., Villar, D., Fernandez, J. A., Londoño, J., Arbeláez, C., ... Olivera, M. (2016). Survey of gastrointestinal parasites, liver flukes and lungworm in feces from dairy cattle in the high tropics of Antioquia, Colombia. *Parasite Epidemiology and Control*, 1(2), 124–130.
<https://doi.org/10.1016/j.parepi.2016.05.001>
- Chilton, N. B. (2004). The use of nuclear ribosomal DNA markers for the identification of bursate nematodes (order Strongylida) and for the diagnosis of infections. *Animal Health Research Reviews*, 5(2), 173–187.
<https://doi.org/10.1079/ahr200497>
- Chilton, N. B., Huby-Chilton, F., & Gasser, R. B. (2003). First complete large subunit ribosomal RNA sequence and secondary structure for a parasitic nematode: Phylogenetic and diagnostic implications. *Molecular and Cellular Probes*, 17(1), 33–39. [https://doi.org/10.1016/S0890-8508\(02\)00107-X](https://doi.org/10.1016/S0890-8508(02)00107-X)
- Choque-fernández, C., Loza-murguía, M., VINO-nina, N., & Coria-conde, L. (2017). *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) un importante ectoparásito en ovinos de cuatro cantones del municipio de Sorata provincia Larecaja, departamento de La Paz *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) an important ectoparasite in sheep of four cantons of the. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 4(1), 3–12.
- Cordero Del Campillo, M; Rojo-Vázquez, F. (2002). *Parasitología Veterinaria* (Tercera Ed). Madrid, España: Mc Graw-Hill Interamericana.
- Couppié, P., Roussel, M., Rabarison, P., Sockeel, M., Sainte-Marie, D., Marty, C., & Carme, B. (2005). Nosocomial nasal myiasis owing to *Cochliomyia hominivorax*: A case in French Guiana. *International Journal of Dermatology*, 44(4), 302–303. Retrieved from
<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord%7B%7Dfrom=export%7B%7Ddid=L40542146%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4632.2004.02547.x>
- da Silva, B. F., Bassetto, C. C., & do Amarante, A. F. T. (2012). Epidemiology of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) in sheep in Botucatu, State of São Paulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of*



- Veterinary Parasitology: Órgão Oficial Do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 21(4), 386–390. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23295819>
- Dhishonin, S. M., Babu, R. N., Ramani, R., Porteen, K., Rao, V. A., Abraham, R. J. J., ... Govind, V. (2017). A Survey of Disease Conditions in Sheep and Goats Slaughtered at Coimbatore District Slaughter House , Tamil Nadu , India, 6(10), 3692–3699.
- Díaz Anaya, A. M., Arias González, H., García Corredor, D. J., & Pulido Medellín, M. O. (2014). Estimacion de los valores de hematocrito y hemoglobina en presencia de *Haemonchus* sp, en ovinos de Oicata , Colombia. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV.*, 55(1), 18–24. Retrieved from <http://www.scielo.org.ve/pdf/rfvcv/v55n1/art04.pdf>
- Domke, A. V. M., Chartier, C., Gjerde, B., Leine, N., Vatn, S., & Stuen, S. (2013). Prevalence of gastrointestinal helminths, lungworms and liver fluke in sheep and goats in Norway. *Veterinary Parasitology*, 194(1), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.023>
- Dorchies, P., Duranton, C., & Jacquiet, P. (1998). Pathophysiology of *Oestrus ovis* infection in sheep and goats: a review. *Veterinary Record*, 142(18), 487–489. <https://doi.org/10.1136/vr.142.18.487>
- Fasih, N., Qaiser, K. N., Bokhari, S. A., Jamil, B., & Beg, M. A. (2014). Human ophthalmomyiasis externa caused by the sheep botfly *Oestrus ovis*: a case report from Karachi, Pakistan. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(10), 835–837. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C901>
- Fentahun, S., Abebe, R., Melkamu, S., & Asrat, M. (2016). Study on lungworm infection in small ruminants : Prevalence and risk factors in and around Gondar. *International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry*, 1(2), 47–52.
- Forero, E. G. (2011). Miasis en salud pública y salud pública veterinaria. *Una Salud. Revista Sapuvet de Salud Publica*, 2(45), 95–132. Retrieved from <http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/us/article/viewFile/146/91>
- Fthenakis, G. C., Mavrogianni, V. S., Gallidis, E., & Papadopoulos, E. (2015). Veterinary Parasitology Interactions between parasitic infections and reproductive efficiency in sheep. *Veterinary Parasitology*, 208(1–2), 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.017>
- Fthenakis, G. C., & Papadopoulos, E. (2018). Impact of parasitism in goat production. *Small Ruminant Research*, 163(March 2017), 21–23. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.04.001>
- Gasser, R. B. (2006). Molecular tools - Advances, opportunities and prospects. *Veterinary Parasitology*, 136(2), 69–89. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.12.002>
- Gasser, R. B., Bott, N. J., Chilton, N. B., Hunt, P., & Beveridge, I. (2008). Toward practical, DNA-based diagnostic methods for parasitic nematodes of livestock - Bionomic and biotechnological implications. *Biotechnology Advances*, 26(4), 325–334. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.03.003>
- Gasser, R. B., Chilton, N. B., Hoste, H., & Beveridge, I. (1993). Rapid sequencing of rDNA from single parasitic helminths. *Nucleic Acids Research*, 21(10), 2525–2526.
- Gasser, R. B., Jabbar, A., Mohandas, N., Höglund, J., Hall, R. S., Littlewood, D.



- T. J., & Jex, A. R. (2012). Assessment of the genetic relationship between *Dictyocaulus* species from *Bos taurus* and *Cervus elaphus* using complete mitochondrial genomic datasets. *Parasites & Vectors*, 5(1), 241. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-241>
- González, A., Berumen, A., Mayo, E., & Vera, G. (2010). *Diagnóstico Clínico del Ovino*. Retrieved from <http://www.archivos.ujat.mx/2011/difusion/libros/9.pdf>
- Gouy de Bellocq, J., Ferté, H., Depaquit, J., Justine, J. L., Tillier, a, & Durette-Desset, M. C. (2001). Phylogeny of the Trichostrongylina (Nematoda) inferred from 28S rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19(3), 430–442. <https://doi.org/10.1006/mpev.2001.0925>
- Grisez-Duranton, C., Dorchies, P., Jourdane, J., & Durand, P. (2002). Genetic structure of *Oestrus ovis* populations in sheep and goats. *Veterinary Parasitology*, 104, 167–173.
- Haji, M., Tilahun, A., Teshale, A., & Engedaw, D. (2016). Study on Lungworm and Associated Risk Factors of Small Ruminants in Hitosa Woreda, Ethiopia. *Global Veterinaria*, 17(4), 303–309. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2016.17.04.104162>
- Hansen, J., & Perry, B. (1994). *The epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of ruminants*. Nairobi, Kenya: International Laboratory for Research on Animal Diseases. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=1996/XF/XF96009.xml;XF9652615>
- Hidalgo, A., Palma, H., Oberg, C., Fonseca-Salamanca, F., Hidalgo, A., Palma, H., ... Fonseca-Salamanca, F. (2015). *Oestrus ovis* infection of grazing sheep during summer in southern Chile. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(6), 497–500. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000600002>
- İpek, D. N. S., & Altan, S. (2017a). Use of semi-nested PCR and rhinoscopy for the diagnosis of oestrosis. *Small Ruminant Research*, 150, 76–79. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.03.006>
- İpek, D. N. S., & Altan, S. (2017b). Use of semi-nested PCR and rhinoscopy for the diagnosis of oestrosis. *Small Ruminant Research*, 150, 76–79. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.03.006>
- Kafle, P., Lejeune, M., Verocai, G. G., Hoberg, E. P., & Kutz, S. J. (2015). Morphological and morphometric differentiation of dorsal-spined first stage larvae of lungworms (Nematoda: Protostrongylidae) infecting muskoxen (*Ovibos moschatus*) in the central Canadian Arctic. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(3), 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.05.003>
- Kassa, T., Alemneh, T., & Akebergn, D. (2017). Small Ruminant Lungworms : Parasite detection , identification and prevalence estimation in Three Districts of South Wollo , Ethiopia. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2, 15–22.
- Kassai, T. (2002). *Helminthologia Veterinaria*. ESPAÑA: Acribia S.A.
- Knox, M. R., Torres-Acosta, J. F. J., & Aguilar-Caballero, A. J. (2006). Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 139(4), 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.026>
- Kouam, M. K., Diakou, A., Kantzoura, V., Feidas, H., Theodoropoulou, H., & Theodoropoulos, G. (2014). An analysis of seroprevalence and risk factors



- for parasitic infections of economic importance in small ruminants in Greece. *Veterinary Journal*, 202(1), 146–152.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.07.011>
- Kuchboev, Abdurakhim E, Krücken, J., Ruziev, B. H., & von Samson-Himmelstjerna, G. (2015). Molecular phylogeny and diagnosis of species of the family Protostrongylidae from caprine hosts in Uzbekistan. *Parasitol Res*, 114(4), 1355–1364. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4313-6>
- Kuchboev, Abdurakhim Ergashevich, & Hoberg, E. P. (2011). Morphological and ultrastructural changes in tissues of intermediate and definitive hosts infected by Protostrongylidae. *Turkish Journal of Zoology*, 35(1), 1–7.
<https://doi.org/10.3906/zoo-0903-8>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- López, C. M., Fernández, G., Viña, M., Cienfuegos, S., Panadero, R., Vázquez, L., ... Morrondo, P. (2011). Protostrongylid infection in meat sheep from Northwestern Spain: Prevalence and risk factors. *Veterinary Parasitology*, 178(1–2), 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.038>
- López, C. M., Fernández, G., Viña, M., Cienfuegos, S., Panadero, R., Vázquez, L., ... Morrondo, P. (2011). Veterinary Parasitology Protostrongylid infection in meat sheep from Northwestern Spain : Prevalence and risk factors. *Veterinary Parasitology*, 178, 108–114.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.038>
- Matos Moya, V., Rodríguez, D., Alfonso, P., Pérez, J. M., & Olivares, J. (2012). Morfometría de larvas de *Oestrus ovis* (Diptera : Oestridae) de ovinos , en Cuba. *Rev. Salud Anim*, 34(3), 184–187.
- Matos, V., Rodríguez Diego, J. G., Alfonso, P., & Olivares, J. L. (2013). *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae): un importante ectoparásito de los ovinos en Cuba. *Revista de Salud Animal*, 35(2), 79–88.
- Moges, N., Bogale, B., & Chanie, M. (2011). *Dictyocaulus filaria* and *Muellerius capillaris* are important lungworm parasites of sheep in Wogera district, northern Ethiopia. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*, 3(6), 465–468. Retrieved from <http://maxwellsci.com/print/ijava/v3-465-468.pdf>
- Mokhtaria, K., Sidi, S., Ammar, M., & Aboud, B. (2014). Lungworm Infections in Sheep Slaughtered in Tiaret Abattoir (Algeria). *Global Veterinaria*, 13(4), 530–533. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2014.13.04.85207>
- Morales, G., & Pino, L. A. (2009). *Nematodos parásitos de los rumiantes domésticos en Venezuela, diagnóstico y control* (Primera). Caracas, Venezuela: Laboratorio de diagnóstico veterinario Alíani.
- Moreno, V., Romero-Fernández, I., Marchal, J. A., Beltrán, M., Granados, J. E., Habela, M. A., ... Sánchez, A. (2015). Molecular characterization of bot flies, *Oestrus* spp., (Diptera, Oestridae), from domestic and wild Bovidae hosts. *Veterinary Parasitology*, 212(3–4), 473–477.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.002>
- Negm-Eldin, M., Elmawdy, R., & Hanan, G. (2015). *Oestrus ovis* larval infestation among sheep and goats of Green Mountain areas in Libya. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 2(4), 382.



- <https://doi.org/10.5455/javar.2015.b105>
- Ortega-Muñoz, G., Luzuriaga-Neira, N., Salazar-Silva, R., & Rodríguez-Hidalgo, R. (2019). Oestrus ovis in Ecuador: Importance in the Andean sheep farming. *Veterinary World*, 12(4), 522–526.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.522-526>
- Otranto, D., Traversa, D., Guida, B., Tarsitano, E., Fiorente, P., & Stevens, J. R. (2003). Molecular characterization of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene of Oestridae species causing obligate myiasis. *Medical and Veterinary Entomology*, 17(3), 307–315. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2003.00442.x>
- Otranto, Domenico, & Stevens, J. R. (2002). Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. *International Journal for Parasitology*, 32, 1345–1360. <https://doi.org/papers://B79588E5-2CC1-4C57-804E-28592FC88A1E/Paper/p5937>
- Özdal, N., Tanritanir, P., İlhan, F., & Değer, S. (2016). The prevalence of ovine oestrosis (*Oestrus ovis* Linnaeus, 1761, Diptera: Oestridae) and risk factors in Eastern Turkey. *Veterinarski Arhiv*, 86(3), 323–333.
- Panayotova-Pencheva, M. S. (2011). Species composition and morphology of protostrongylids (Nematoda: Protostrongylidae) in ruminants from Bulgaria. *Parasitology Research*, 109(4), 1015–1020. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2337-0>
- Panuska, C. (2006). Lungworms of Ruminants. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 22(3), 583–593.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2006.06.002>
- Papadopoulos, E., Prevot, F., Diakou, A., & Dorchie, P. (2006). Comparison of infection rates of *Oestrus ovis* between sheep and goats kept in mixed flocks. *Veterinary Parasitology*, 138(3–4), 382–385.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.02.023>
- Papadopoulos, Elias, Chaligiannis, I., & Morgan, E. R. (2010). Epidemiology of *Oestrus ovis* L. (Diptera: Oestridae) larvae in sheep and goats in Greece. *Small Ruminant Research*, 89(1), 51–56.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.004>
- Pape T, Wolff M, A. E. (2014). Los califóridos, éstridos, rinofóridos y sarcófagidos (Diptera: Calliphoridae, Oestridae, Rhinophoridae, Sarcophagidae) de Colombia. *Biota Colombiana*, 5(2), 201–208.
- Perry, B. D., & Randolph, T. F. (1999). Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals. *Veterinary Parasitology*, 84(3–4), 145–168.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00040-0)
- Powers, T. O., Todd, T. C., Burnell, A. M., Murray, P. C., Fleming, C. C., Szalanski, A. L., ... Harris, T. S. (1997). The rDNA Internal Transcribed Spacer Region as a Taxonomic Marker for Nematodes. *Journal of Nematology*, 29(4), 441–450. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19274180>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2619808>
- Pulido medellín, M. O., García corredor, D., Díaz anaya, A., & Andrade becerra, R. (2014). Pesquisa de parásitos gastrointestinales en pequeñas explotaciones ovinas. *Rev. Salud Anim.*, 36(1), 65–69. Retrieved from



- <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v36n1/rsa12114.pdf>
- Regassa, A., Toyeb, M., Abebe, R., Megersa, B., Mekibib, B., Mekuria, S., ... Abunna, F. (2010). Lungworm infection in small ruminants: Prevalence and associated risk factors in Dessie and Kombolcha districts, northeastern Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, 169(1–2), 144–148.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.010>
- Roeber, F., Jex, A. R., & Gasser, R. B. (2013). Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1135–1152.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.008>
- Saleem, T., Katoch, R., Yadav, A., Mir, I. A., Godara, R., & Ahamed, I. (2017). Prevalence of ovine oestrosis in Plain and Kandi areas of Jammu, North India, 6(2), 1117–1122.
- Sánchez, A., Caparrós, N., Ostrowski, S., Sarasa, M., & Pérez, J. M. (2017). Oestrosis in Asiatic ibex (*Capra sibirica*): a case report and molecular characterization of larvae. *Veterinary Parasitology*, 236, 55–57.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.003>
- Sargison, N. D. (2016). Keys to solving health problems in small ruminants: Anthelmintic resistance as a threat to sustainable nematode control. *Small Ruminant Research*, 142, 11–15.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.02.021>
- Sarmiento, R. (2001). *Semiología clínica veterinaria*. (UDCA, Ed.) (Primera). Bogotá, Colombia.
- Shite, A., Admassu, B., & Yenew, A. (2015). Bovine Dictyocaulosis: A Review. *European Journal of Biological Sciences*, 7(3), 125–131.
<https://doi.org/10.5829/idosi.ejbs.2015.7.03.9515>
- Shoorijeh, J. S., Tamadon, a., Negahban, S., & Behzadi, M. a. (2011). Učestalost kukca Oestrus ovis u koza u Shirazu u Južnom Iranu. *Veterinarski Arhiv*, 81(1), 43–49. Retrieved from http://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=99466
- Smillie, I., Gubbi, P. K. S., & Cocks, H. C. (2010). Nasal and ophthalmomyiasis: Case report. *Journal of Laryngology and Otology*, 124(8).
<https://doi.org/10.1017/S0022215109992714>
- Strube, C., Springer, A., Schunn, A. M., & Forbes, A. B. (2017). Serological lessons from the bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus*: Antibody titre development is independent of the infection dose and reinfection shortens seropositivity. *Veterinary Parasitology*, 242(March), 47–53.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.023>
- Suarez, V., Bertoni, E., Micheloud, J., Cafrune, M., Viñabal, A., Quiroga Roger, J., & Bassanetti, A. (2014). First record of *Muellerius capillaris* (Nematoda, Protostrongylidae) in northwestern Argentina. *Helminthologia*, 51(4), 288–292. <https://doi.org/10.2478/s11687-014-0243-6>
- Tabouret, G., Prevot, F., Bergeaud, J. P., Dorchies, P., & Jacquiet, P. (2001). *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae): Sheep humoral immune response to purified excreted/secreted salivary gland 28 kDa antigen complex from second and third instar larvae. *Veterinary Parasitology*, 101(1), 53–66.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00501-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00501-5)
- Tabouret Guillaume, Lacroux Caroline, Andreoletti Olivier, Bergeaud Jean Paul,



- Hailu-Tolosa Yacob, Hoste Hervé, Prevot Françoise, Grisez Christelle, Dorchies Philippe, J. P. (2003). Cellular and humoral local immune responses in sheep experimentally infected with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). *Veterinary Research*, 34, 231–241. <https://doi.org/10.1051/vetres>
- Tai, R., Marsh, M. A., Rao, R., Kurniali, P. C., DiNino, E., & Meharg, J. V. (2011). Nasal myiasis caused by *cochliomyia hominivorax* in the United States: A case report. *American Journal of Infectious Diseases*, 7(4), 107–109. <https://doi.org/10.3844/ajidsp.2011.107.109>
- Terefe, Y., Tafess, K., Fekadie, G., & Kebede, N. (2013). Prevalence of lungworm infection in small ruminants in North Gondar zone , Amhara National Regional State , 5(April), 40–45. <https://doi.org/10.5897/JPVB20>
- Thienpont, D., Rochette, F., & Vanparijs, O. (1986). *Dignóstico de lashelminthiasis por medio del examen coprológico* (Segunda). Beerse, Bélgica: Janssen Research Foundtion.
- Ueno, H., & Gonçalves, P. C. (1998). Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminante. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:manual+para+diagnostico+das+helmintoses+de+ruminantes#0>
- URQUHART, G. ., ARMOUR, J., DUNCAN, J. ., DUNN, A. ., & JENNINGS, F. . (2001). *Parasitología veterinaria* (Segunda Ed). ESPAÑA: ED. ACRIBIA.
- Van Wyk, J. A., Cabaret, J., & Michael, L. M. (2004). Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. *Veterinary Parasitology*, 119(4), 277–306. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.11.012>
- Vargas-Duarte, J. J., Lozano-Márquez, H., Grajales-Lombana, H. A., Manrique-Perdomo, C., Martínez-Bello, D. A., Saegerman, C., ... Kirschvink, N. (2015). Effect of Moxidectin Treatment at Parturition on Gastrointestinal Parasite Infections in Ewes Raised under Tropical Andes High Altitude Conditions. *Veterinary Medicine International*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/932080>
- Vasconcelos, T. C., Macêdo, J. T. S. A., Silva, A., Silva, M. M. N., Bittencourt, T. C. C., Santos, M. V. B., ... Pedrosa, P. M. O. (2016). Oestrose: uma parasitose emergente em pequenos ruminantes no Nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36(10), 925–929. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2016001000001>
- Verschave, S. H., Charlier, J., Rose, H., Claerebout, E., & Morgan, E. R. (2016). Cattle and Nematodes Under Global Change: Transmission Models as an Ally. *Trends in Parasitology*, 32(9), 724–738. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.018>
- Yacob, H. T., Jacquiet, P., Prevot, F., Bergeaud, J. P., Bleuart, C., Dorchies, P., & Hoste, H. (2004). Examination of the migration of first instar larvæ of the parasite *Oestrus ovis* (Linne 1761) [Diptera: Oestridæ] in the upper respiratory tract of artificially infected lambs and daily measurements of the kinetics of blood eosinophilia and mucosal inflammat. *Veterinary Parasitology*, 126(3), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.06.026>
- Zhang, D., & Hewltl, G. M. (1997). Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Molecular Biology*, 6(2), 143–150.



9. PRODUCTOS

Producto resultado de actividades de generación de nuevo conocimiento

Nombre del artículo	Autores	Revista	Estado de avance
Estudio coproparasitológico en ovinos al pastoreo en Boyacá, Colombia	Adriana María Díaz-Anaya, Ginette Isabel Chavarro-Tulcán, Martín Orlando Pulido-Medellín, Diego García-Corredor, Julio Cesar Vargas-Avella	Revista Salud Animal Vol 39, No 1: 1-8; 2017 ISSN: 2224-4697	PUBLICADO
Identificación molecular de <i>Oestrus ovis</i> (diptera:oestridae) en pequeños rumiantes de Boyaca, Colombia	Adriana María Díaz Anaya, Jimmy Jolman Vargas Duarte, Martín Orlando Pulido Medellín	Small ruminant research ISSN: 09214488	EN PREPARACION
Epidemiología de nematodos pulmonares en pequeños rumiantes de Boyacá, Colombia	Adriana María Díaz Anaya, Jimmy Jolman Vargas Duarte, Martín Orlando Pulido Medellín	Small ruminant research ISSN: 20908113, 20420048	EN PREPARACION

Producto resultado de actividades de Apropiación Social

Nombre de la ponencia	Autores	Evento	Modalidad
Parasitosis del tracto respiratorio y su impacto en la productividad ovino-caprina del departamento de Boyacá, Colombia	Adriana María Díaz Anaya, Jimmy Jolman Vargas Duarte, Martín Orlando Pulido Medellín	V Simposio Internacional de Producción Animal, 28 al 31 de Mayo de 2018, Centro de Convenciones Simón Bolívar de Guayaquil, Ecuador.	ORAL

10. IMPACTO



Aplicación del Conocimiento	La descripción morfológica y molecular de los géneros y especies de parásitos causantes de enfermedades respiratorias tiene una aplicación muy importante, ya que con este conocimiento inicial se parte hacia el diseño de técnicas diagnósticas de estos parásitos que permitirán una formulación adecuada de esquemas sanitarios.
Sector Beneficiado	Social <input checked="" type="checkbox"/> Económico __ Empresarial __ Educativo __ Ambiental __ Comunidad Científica <input checked="" type="checkbox"/>
Personas, Comunidades Entidades Beneficiadas	<p>Se beneficiarán directamente 55 productores ovinos-caprinos donde se realizaron los muestreos para el proyecto, sin embargo los resultados será aplicables para conocer la situación epidemiológica de los parásitos de tracto respiratorio que afecta a todos los productores de pequeños rumiantes de la provincia Norte de Boyacá, esta socialización de los resultados se hará a través de las asociaciones existentes en cada municipio.</p> <p>Se beneficiará la comunidad científica del país pues con esta investigación se podrá presentar una actualización sobre el estado de estas parasitosis en pequeños rumiantes, los cuales permitirán establecer esquemas sanitarios adecuados, además de aplicar mecanismos de control y prevención de estas parasitosis.</p>

11. ANEXOS

Formato 1. Ficha técnica individual para toma de muestra en ovinos y caprinos

Fecha de muestreo _____ DD/MM/YY

ID del ovino _____; Edad en meses _____

Sexo: Hembra ; Macho

Estado hembra: Lactante ; Vacía ; Cargada

1. Raza _____

3. Condición corporal: 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 Peso: _____ kg

4. Temperatura: _____ FC: _____ FR: _____

5. Coloración de mucosas: Normal (rosada) ; Congestionada (Roja) ; Pálida ; Cianótica ; Ictérica

6. Tiempo de llenado capilar: _____ segundos

7. Hidratación por pliegue cutáneo _____%

Sistema digestivo

8. Presencia de diarrea: Si ; No ; Score: 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5

Sistema respiratorio

9. Presencia descarga nasal: Si ; No ; Score: 1 ; 2 ; 3 ; Unilateral ; Bilateral

10. Tipo de descarga: Mucosa Serosa Sanguinolenta Mucosanguinolenta Purulenta

11. Ruidos respiratorios: Estornudos Resoplidos Ronquidos Estertores

Sistema nervioso central

12. Comportamiento: Normal Depresión Excitación

13. Desplazamiento: Normal Anormal Describa la alteración: _____

MUESTRA



Heces

14. Consistencias de las heces: Normal ; Semiblanda ; Blanda ; Muy blanda ; líquida
15. Color de la muestra: Verde Oscuro ; Verde claro ; Verde amarillo ; crema ;
16. Presencia de moco: Si ; No
17. Presencia de sangre: Si ; No

Moco Nasal

18. Color de la muestra: Transparente ; Crema ; Verde Oscuro ; Verde claro ; Verde amarillo
19. Presencia de sangre: Si ; No

Formato 2. Ficha técnica de la encuesta epidemiológica

Fecha de encuesta _____ DD/MM/YY

Nombre del encuestador: _____

IDENTIFICACIÓN DEL PREDIO

ID de la finca _____; Municipio/vereda _____

Propietario _____; No teléfono _____

Altitud (msnm) _____

ÁREAS Y USOS

1. Área de la finca en hectáreas < 50 ; 50 – 100 ; 100- 150 ; 150 -200 ; > 200
2. Número de hectáreas empleado para uso agrícola 0 ; < 1 ; 1-3 ; 3-5 ; >5
3. Cultivos alternos Papa ; Yuca ; Cítricos ; Frutales ; Otros _____
4. Número de hectáreas empleadas para uso pecuario < 50 ; 50 – 100 ; 100- 150 ; 150 -200 ; > 200
5. Fuentes de agua Caños/quebradas ; Acueducto ; Jagüey ; Puntillo ; Pozo ; Otros _____
6. Especies animales presentes en el predio: Equinos ; Bovinos ; Ovinos ; Caprinos ; Bufalinos ; Caninos/felinos ; Porcinos ; Aves ; otras _____
7. Contacto ovinos-caprinos Si ; No
8. Compra de animales nuevos últimos 5 años Si ; No

INVENTARIO ANIMAL

9. Número de ovinos adultos: _____

Macho reproductor ____; Hembras vacías ____; Hembras gestantes ____; Hembras lactantes /cría

____; Corderos pre-destete ____; Corderos post-destete < 9 meses ____.

10. Número de caprinos adultos: _____

Macho reproductor ____; Hembras vacías ____; Hembras gestantes ____; Hembras lactantes /cría

____; Corderos pre-destete ____; Corderos post-destete < 9 meses ____.

ALIMENTACION Y NUTRICION

11. Maneja los animales en Pastoreo extensivo , P. rotacional , P. con suplementación Semi-estabulación , Estabulación , Estaca Otra _____

12. En la nutrición de los neonatos se emplea: Leche , Lactoreemplazador , Otros _____



13. Para la nutrición de los animales adultos emplea: Forraje fresco , Ensilaje , Henolaje , Heno , Concentrado , Otros _____
14. Suministra sal mineralizada a los ovinos/caprinos: Si ; No Cantidad aproximada _____grs.
- Fertiliza praderas con estiércol Si ; No

SANIDAD

15. Esquila: Si ; No
16. Arregla pezuñas: Si ; No
17. Tratamientos previos: antibióticos ; Antiparasitarios ; Otros _____
18. ¿Cuenta con un programa de vacunación establecido? Si ; No
19. ¿Qué vacunas aplica? _____
20. ¿Cuenta con un programa de desparasitación establecido? Si ; No
21. ¿Qué productos contra parásitos internos utiliza? _____
22. ¿Tiene problemas con ectoparásitos? Si ; No
23. ¿Qué productos contra parásitos externos utiliza? _____
24. ¿Ha observado la presencia de moluscos/caracoles en los potreros? Si ; No
25. ¿Qué estrategias de control de moluscos ha empleado? _____
26. ¿Se ha presentado problemas con *Oestrus ovis* en la finca? Si ; No
27. ¿Qué productos utiliza contra *Oestrus ovis*? _____

Formato 3. Consentimiento informado para la toma de muestra de materia fecal en ovinos

Estimado señor / señora:

Las muestras de materia fecal son sencillas de recolectar e implican riesgo mínimo para el animal, para el médico veterinario que toma la muestra y para las personas que le ayudan a sostenerlo. La muestra será tomada por un médico veterinario con experiencia, quien realizará el procedimiento sólo una vez con las medidas de cuidado necesarias para la salud de sus animales. La muestra de materia fecal será de aproximadamente 20 gramos, lo cual no representará ningún riesgo para la salud de los animales, pero les puede causar incomodidad o irritación leve durante unos minutos. De la misma manera se tomará muestra de moco nasal mediante un hisopo estéril, esta no representa riesgo ni dolor para el animal, el cual se sujetará apropiadamente para evitar accidentes durante la toma de la muestra, en los que el animal se golpee o golpee a una de las personas que está ayudando a tomar la muestra.

La toma de las muestras y los exámenes de laboratorio no tendrán costo. Toda la información que usted nos proporcione será guardada en forma confidencial y será manejada únicamente por el grupo de investigadores del proyecto, sólo el personal a cargo y el Comité de Ética que lo supervisará podrá tener acceso a sus datos personales y a los datos de sus animales. Si los resultados de este estudio son publicados, ni usted, ni el predio, ni los animales serán identificados por el nombre. La información obtenida podrá ayudar en el futuro a mejorar el control y la prevención de enfermedades parasitarias que afectan a los ovinos y caprinos en Colombia, por esta razón le solicitamos toda su colaboración.

Autorización para uso de las muestras y datos obtenidos



Se le solicita su autorización para que las muestras y datos obtenidos de sus animales puedan ser utilizados en otros estudios y laboratorios, previa Aprobación del Comité de Bioética para investigación en animales, para realizar estos estudios.

Aceptación

La Resolución 008430 del Ministerio de Salud Nacional exige consignar su nombre como propietario o responsable de los animales, su firma o huella digital y su identificación personal. Exige también la firma de dos testigos con su nombre, dirección, fecha, firma y parentesco con el propietario de los animales. El médico veterinario debe firmar y consignar sus datos de identificación personal, lugar y fecha de obtención del consentimiento.

Yo _____ identificado con cédula de Ciudadanía Número _____ de _____, acepto voluntariamente que algunos de los animales de mi propiedad o bajo mi cargo sean incluidos dentro del muestreo para la identificación de parásitos causantes de enfermedades respiratorias que afectan a los ovinos y caprinos, a cooperar suministrando la información requerida y permitiendo que se tome una muestra de materia fecal de 20 gramos y una muestra de moco nasal a cada uno de los animales seleccionados. Así mismo declaro que he tenido oportunidad a preguntar y que las inquietudes que he tenido, me han sido resueltas y que soy consciente de los riesgos que puede acarrear el proceso de toma de muestra en mis animales por lo que exoneraría al proyecto en caso de cualquier eventualidad.

Propietario/responsable de los animales		Huella	Testigo 1		Huella
Firma			Firma		
Nombre			Nombre		
Número de Cédula			Número de Cédula		
Dirección			Dirección		
Número telefónico			Número telefónico		

Lugar: _____ Fecha: _____

Nombre y firma de los investigadores responsables de la investigación:

Director General		Coordinador General	
Firma		Firma	
Nombre		Nombre	
Número de Cédula		Número de Cédula	
Dirección		Dirección	
Número telefónico		Número telefónico	

Formato 4. Registro de toma de muestras

FORMATO DE REGISTRO DE TOMA DE MUESTRA FECAL Y MOCO NASAL			
NOMBRE DE LA		VEREDA:	
MUNICIPIO:		TELEFONO:	
FECHA:		CÓDIGO ID	



CAPITULO II.

IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE *Oestrus ovis* (Diptera:Oestridae) EN PEQUEÑOS RUMIANTES DE BOYACÁ, COLOMBIA

Adriana María Díaz Anaya, Martín Orlando Pulido Medellín, Jimmy Jolman Vargas Duarte

RESUMEN

Oestrosis es una miasis nasal de ovinos y caprinos causada por las larvas de la mosca *Oestrus ovis* que puede provocar signos clínicos graves y ocasionar graves pérdidas económicas. Se realizó identificación de ADN de dípteros en muestras de moco nasal usando la prueba de PCR semi-anidada mediante la amplificación de la región del gen COI usando los cebadores UEA7, UAE9-UAE10. Fue detectado ADN de dípteros en el 1,5% de los caprinos (3/196) y 3,5% de los ovinos (6/171) el cual fue compatible con *Oestrus ovis*, y fue detectado (2/761) ADN compatible con *Cochliomyia hominivorax*. El 2,8% de animales positivos fueron machos y el 2,4% hembras, la infección predominó en animales jóvenes < 1 año con un 4,9% de prevalencia, seguido de los animales de 1 a 3 años con 2% y animales de 3-5 años con 1,1%, animales mayores de 5 años no presentaron positividad. Por lo tanto, se logró establecer la presencia del díptero en ovinos y caprinos de los municipios de La Uvita y Susacón mediante identificación molecular de *O. ovis* en animales vivos como una alternativa al diagnóstico del parásito que se realiza convencionalmente de forma *post-mortem*.

PALABRAS CLAVE: PCR anidada, *Oestrus ovis*, COI, identificación genética, eco-epidemiología.

1. Introduccion

Oestrus ovis (Linneo, 1761), es un agente cosmopolita causante de miasis cavitaria de los senos nasales, paranasales y a veces frontales de los ovinos y caprinos, también conocida como “miasis de la nariz”, “rinitis parasitaria”, “enfermedad de la mosca de los senos” y en aquellos casos en los que se presenta con síntomas nerviosos derivados de la localización de larvas en sistema nervioso central se le denomina “falsa modorra” (Matos, Rodríguez, Alfonso, & Olivares, 2013). Para el caso de *O. ovis*, la mosca adulta es vivípara y ataca a las ovejas para depositar sus larvas en los ollares y la cavidad nasal, parasitando de forma crónica a los animales, los cuales dejan de alimentarse, se tornan inquietos, sacuden la cabeza, presionan la nariz contra el suelo o entre otras ovejas. Las miasis perjudican el bienestar de los animales y causan pérdidas económicas notables en la industria ganadera, tanto para países en vía de desarrollo como en países desarrollados. Las larvas de *O. ovis* causan aproximadamente 4.6 kg de pérdida de carne, 200-500g de pérdida de lana y 10% de pérdida de leche por



animal, además de baja fertilidad y aborto (AL-Ubeidi, ALani, & Al-kennany, 2017; Bosly, 2018).

Se han realizado estudios alrededor del mundo que describen la epidemiología de *O. ovis* en diferentes zonas geográficas y su prevalencia. En ovinos y caprinos, la prevalencia es muy variable y oscila entre el 13,1% y 94,4% (Papadopoulos, Chaligiannis, & Morgan, 2010; Abo-Shehada, Batainah, Abuharfeil, & Torgerson, 2003; Özdal, Tanritanir, Ilhan, & Değer, 2016; Shoorijeh, Tamadon, Negahban, & Behzadi, 2011; Alcaide, Reina, Frontera, & Navarrete, 2005; Alem, Kumsa, & Degefu, 2010). Sin embargo, estos datos han sido obtenidos post mortem mediante la valoración de cabezas de ovinos y caprinos en plantas de beneficio; muy pocos estudios de prevalencia de *O. ovis* se han desarrollado en animales vivos debido a la dificultad de diagnóstico que representa la identificación “*in vivo*” de las larvas de este díptero.

El diagnóstico de *O. ovis* en ovejas y cabras se basa en los signos clínicos, cambios patológicos y la identificación de larvas en la cavidad nasal de los animales a nivel de necropsia (Vasconcelos et al., 2016). También existen algunos estudios de diagnóstico serológico, que presentan gran utilidad aunque se requieren varias semanas post-infestación para que la respuesta inmune sea detectable (Bauer, Steng, Prevot, & Dorchies, 2002). Se han utilizado en estudios de identificación y caracterización de miasis causadas por moscas de las familias Oestridae varios marcadores genéticos de ADN ribosómico como 16S rRNA, 28S rRNA así como de ADN mitocondrial como el gen citocromo oxidasa COI, COII y 12S mtDNA (Otranto & Stevens, 2002; Otranto et al., 2003).

La PCR semi-anidada es un método bien establecido y altamente sensible utilizado para detectar los agentes de enfermedades parasitarias. Estudios recientes de identificación y caracterización molecular se han realizado en Arabia Saudita y Turquía, mediante amplificación por PCR de la subunidad del gen COI, se identificó *O. ovis* confirmando previos reportes de prevalencia estacional e identificación morfológica de larvas, este estudio valida la identificación molecular de especies de moscas que causan miasis como una sustitución confiable de la identificación morfológica, ya que es difícil identificar larvas a nivel de especie (Bosly, 2018). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue estandarizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación parcial del gen COI como una herramienta de diagnóstico para identificar *O. ovis* en ovinos y caprinos de Boyacá, Colombia y establecer su distribución

2. Materiales y Métodos

2.1 Población de estudio

Se seleccionaron 6 municipios: Susacón, Soatá, Tipacoque, Covarachía, Boavita y La Uvita, pertenecientes a la provincia Norte del departamento de Boyacá. A partir del inventario ovino-caprino existente para los 6 municipios se tomó un total de 17.835 caprinos y 8.172 ovinos. Para calcular el tamaño de muestra se tomaron los valores de $Z_{\alpha} = 1,96$ a un nivel de confianza del 95%, $e = 5\%$, margen de error admitido y $P = 59\%$ prevalencia esperada, este valor debido a que en Boyacá no



se conocen estudios relacionados de prevalencia de *O. ovis*. Se realizó un muestreo aleatorio estratificado, donde la muestra calculada para caprinos fue de **196** y de ovinos **171**, para un total de 376 animales incluidos en el estudio.

2.2 Identificación morfológica de larvas *O. ovis*

Larvas de *O. ovis* pertenecientes a familia: Oestridae fueron recolectadas de la cavidad nasal de una oveja infestada proveniente de una finca ubicada en municipio de La Uvita, Boyacá (6°18'43.8"N; 72°33'41.0"O). Las larvas colectadas fueron preservadas en etanol al 90% para ser incluidas como control positivo en los estudios moleculares. Se realizó identificación morfométrica de las larvas encontradas empleando claves taxonómicas que describen su morfología en cada uno de los estadios (Matos, Rodríguez, Alfonso, Pérez, & Olivares, 2012; Matos, Rodríguez, Alfonso, & Olivares, 2013).

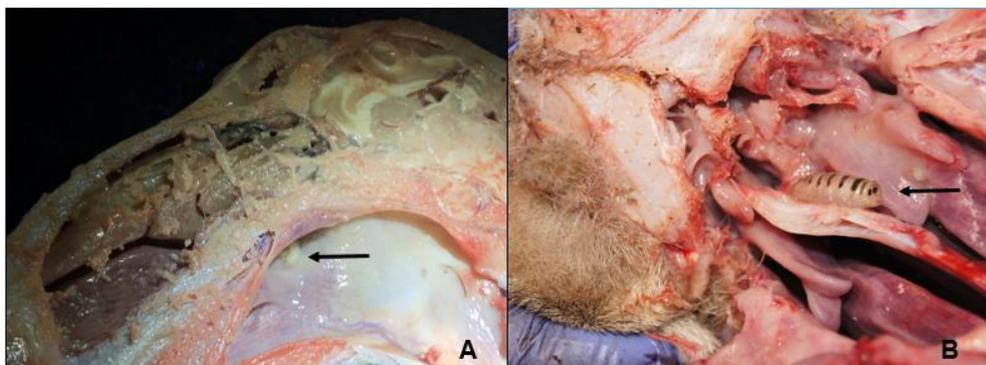


Figura 1. Recuperación de larvas de *Oestrus ovis* ubicadas en cavidad nasal, durante necropsia de un ovino. A) Larva de segundo estadio (L2); B) Larva de tercer estadio (L3).

2.3 Encuesta epidemiológica

Al momento de la recolección de muestras, se tomaron datos de especie, edad, sexo, raza, condición corporal y estado reproductivo de las hembras. Se aplicó una encuesta epidemiológica a nivel de finca acerca del tipo de alimentación, tipo de alojamiento y estado sanitario, con el fin de proponer los posibles factores de riesgo asociados a la infección por *O. ovis*.

2.4 Evaluación clínica de los animales

Se realizó un examen clínico general a cada uno de los animales, se tomaron constantes fisiológicas como frecuencia cardíaca, respiratoria, temperatura corporal y coloración de mucosas. Además, se efectuó una inspección del sistema nervioso central para identificar posibles cambios en el comportamiento y desplazamiento, sistema digestivo por posible presencia de diarrea y sistema respiratorio, en busca de la posible presencia de secreción nasal, tipo de descarga y ruidos respiratorios compatibles con rinitis y neumonía.

2.5 Recolección de muestras de moco



Para los análisis moleculares, se colectaron muestras de moco nasal de la región más interna del meato nasal ventral y meato nasal común de ovinos y caprinos, utilizando hisopos de algodón estériles. Las muestras fueron rotuladas y almacenadas en crioviales de 2ml, se le adicionó 200 μ l de buffer de conservación STE (EDTA 100mmol, Tris 100mmol, SDS 10%) para su preservación a una temperatura de -20°C hasta su extracción.

2.6 Extracción de ADN

A cada uno de los crioviales que contenía el hisopo se le agregó 500 μ L solución de tampón STE y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente, se adicionó 20 μ L de proteinasa K (20 mg/ml) y las muestras fueron dejadas durante toda la noche en agitación constante a 55°C . Luego se retiraron los hisopos de los tubos, se centrifugaron a 14000 rpm durante 30 segundos. El hisopo fue removido del tubo y se transfirieron 500 μ L del lisado a un nuevo tubo eppendorf, para realizar extracción del ADN usando el protocolo de fenol cloroformo descrito por Bloor, Ibáñez, & Vilorio-Lagares, (2015). Se agregó una cantidad de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico 25:24:1 y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se agregó 400 μ L del Cloroformo-Alcohol Isoamílico 24:1 y se llevaron a centrifugación a 14000 rpm durante 10 min. Posteriormente con ayuda de una micropipeta se recuperó el sobrenadante de cada muestra, se adicionó 30 μ L acetato de sodio 5M (Sigma Aldrich) y 750 μ L de etanol grado molecular al 100% que se encuentra almacenado a -20°C . Las muestras fueron llevadas a -20°C durante 2 horas. Posteriormente se realizaron lavados con etanol al 70%. Se descarta el exceso de etanol y el ADN obtenido se deja secar a temperatura ambiente toda la noche. Las muestras se re suspendieron en 50 μ L buffer TE 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) y almacenadas a -20°C hasta su uso.

2.7 Amplificación por PCR y secuencia de nucleótidos del gen COI

Todos los ADN extraídos se sometieron a un protocolo de PCR semi-anidada para amplificación de un fragmento hipervariable (~300 pb) en el gen COI de *Oestrus*, este codifica desde la región del bucle externo 4 (E4) al extremo carboxi terminal (-COOH) (İpek & Altan, 2017b). Para la primera ronda de PCR se seleccionaron los cebadores y condiciones reportadas para identificación de dípteros UEA7 (5'-TACAGTTGGAATAGACGTTGATAC-3') y UEA10 (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3'). La reacción de PCR empleó un volumen total de 50 μ L, conteniendo 50-60 ng de ADN genómico, 1X de buffer de reacción (20mM Tris-HCl pH 8; 50 mM KCl), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs y 0.3 μ M de cada primer a evaluar y 1.25 U de Taq polimerasa (Thermo Scientific Cat. EP0402). Las condiciones de la PCR para la primera ronda usando los primers UEA7 y UEA10 fueron las siguientes: una denaturación inicial de 94°C por 3 min y 40 ciclos de 94°C por 1 min, alineamiento a temperatura 52°C por 1 min, extensión a 72°C durante 1 min y una extensión final a 72°C por 7 min.

Para la segunda ronda de PCR se usó el cebador UEA9 (5'-GTAAACCTAACATTTTTCTCAACA-3') y UEA10 (5'-



TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3'), los productos de la primera ronda fueron diluidos 1:20 y usados como molde. Las condiciones de la PCR fueron las mismas de la primera ronda a excepción de la temperatura de alineamiento que fue a 55°C. El ADN genómico de las larvas del tercer estadio y los hisopos de animales negativos a *O. ovis* se incluyeron en todas las reacciones de PCR, como controles positivos y negativos, respectivamente.

Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 2.5% en TBE 0,5X (100 mM Tris, 90 mM Borato, 2,5mM EDTA; pH 8,0) teñidos con SYBR Safe (ThermoFisher, Cat. S33102). Los geles fueron corridos durante 40 min a 80 V y los productos visualizados en un transiluminador (Safe Imager™ 2.0 Blue Light Transilluminator), los tamaños obtenidos en los amplificados fueron establecidos mediante comparación con un patrón de peso molecular de 1Kb (Thermo Scientific, Cat. 15628019). Los productos amplificados fueron purificados con el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery y posteriormente enviados al servicio de Secuenciación y Análisis Genético de la Universidad Nacional de Colombia (SSIGMOL). El análisis de la secuencia de nucleótidos se realizó por alineación BLAST usando la base de datos de información del Centro Nacional de Biotecnología (NCBI).

2.8 Manejo y análisis de datos epidemiológicos

Los datos de los animales positivos y la información sobre los factores de riesgo se recopilaron y registraron como base de datos. Se realizó un análisis de tipo descriptivo y un test de Chi-cuadrado mediante el uso del software estadístico Epidat 4.1. Se aplicó una regresión logística multivariado, para analizar la asociación entre la prevalencia de *O. ovis* y los posibles factores de riesgo, el grado de asociación se determinó usando Odds Ratio. En todos los casos se usó un nivel confianza de 95% y un nivel de significancia de 0.05.

2.9 Análisis de secuencias

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron editadas manualmente en el programa *Biological Science Alignment Editor* (Bioedit®, Carlsbad, California, USA) y alineadas con la ayuda del software *Molecular Evolutionary Genetic Analysis 7* (MEGA 7®, DNASTar Inc., Madison, Wisconsin, USA), posteriormente se construyó un dendrograma de distancias mediante el algoritmo *neighbor-joining* y el algoritmo *bootstarp test* para generar 1000 réplicas de alineamientos a partir de la original (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016).

3. Resultados

3.1 Identificación genética

El ADN de *O. ovis* fue detectado en el 1,5% de los caprinos (3/196) y 3,5% de los ovinos (6/171). El 2,8% de animales positivos fueron machos y el 2,4% hembras, la infección predominó en animales jóvenes < 1 año con un 4,9% de prevalencia,



seguido de los animales de 1 a 3 años con 2% y animales de 3-5 años con 1,1%, animales mayores de 5 años no presentaron positividad. La mayoría no manifestaron signos clínicos de oestrosis, dos ovinos presentaron descarga nasal bilateral de tipo mucoso espeso acompañado de estornudos. De las 55 fincas incluidas en el estudio el 9,1% (5/55) tuvieron al menos un individuo positivo para *O. ovis*. De los seis municipios incluidos en el estudio se encontró la presencia del parásito en La Uvita y Susacón.

3.2 Análisis moleculares

La PCR semi-anidada produjo amplificadores de ~250 pb en las muestras que resultaron positivas, consistente con la región COI previamente descrita para ser amplificada por los iniciadores UAE9-UAE10 en *O. ovis* (Figura 1). La secuencia del fragmento amplificado mostró la disposición del genoma típica de la secuencia de *O. ovis*, las secuencias obtenidas para este trabajo fueron 100% similares a la secuencia de *O. ovis* respectiva en GenBank (acceso KY563713).

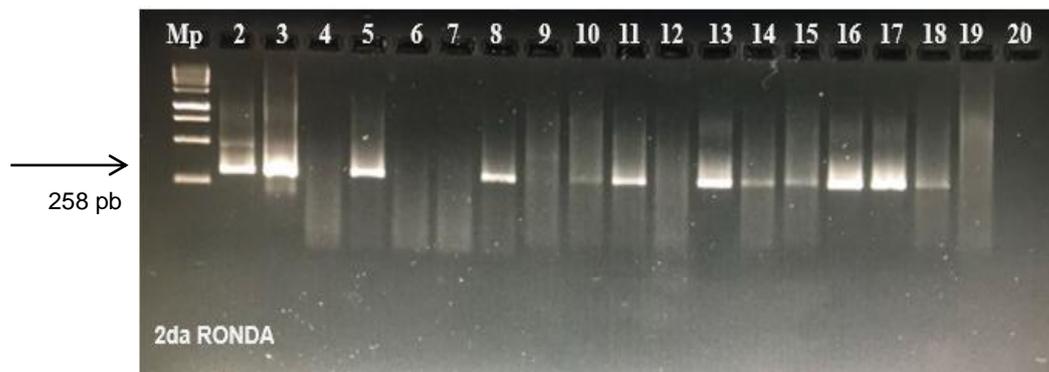


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 2.5% de los productos amplificados en la PCR semi-anidada. Línea Mp, marcador 1 kb; línea 2 Control positivo *Oestrus ovis*; línea 3,5,8,10,11,13-16 muestras positivas; línea 4,6,7,9,12,19 muestras negativas; línea 20 control negativo.

El dendrograma mostró las relaciones entre las secuencias de las larvas de *O. ovis* y otros miembros de la familia Oestridae publicados en GenBank (Figura 3). La identidad de la secuencia de nucleótidos que codifican para el gen COI que fueron analizadas contra las secuencias recuperadas de GenBank provenientes de otras partes del mundo fue de 99,3%. El dendrograma demostró que las secuencias obtenidas para *O. ovis* en Colombia se agruparon con cepas de insectos provenientes de Italia, España, Turquía y Kyrgyzstan, Asia. Adicionalmente, en las muestras de moco nasal dos individuos se encontraron secuencias con una similitud de 99,61% a *Cochliomyia hominivorax* (FM867783) reportada para Chigorodó, Colombia.

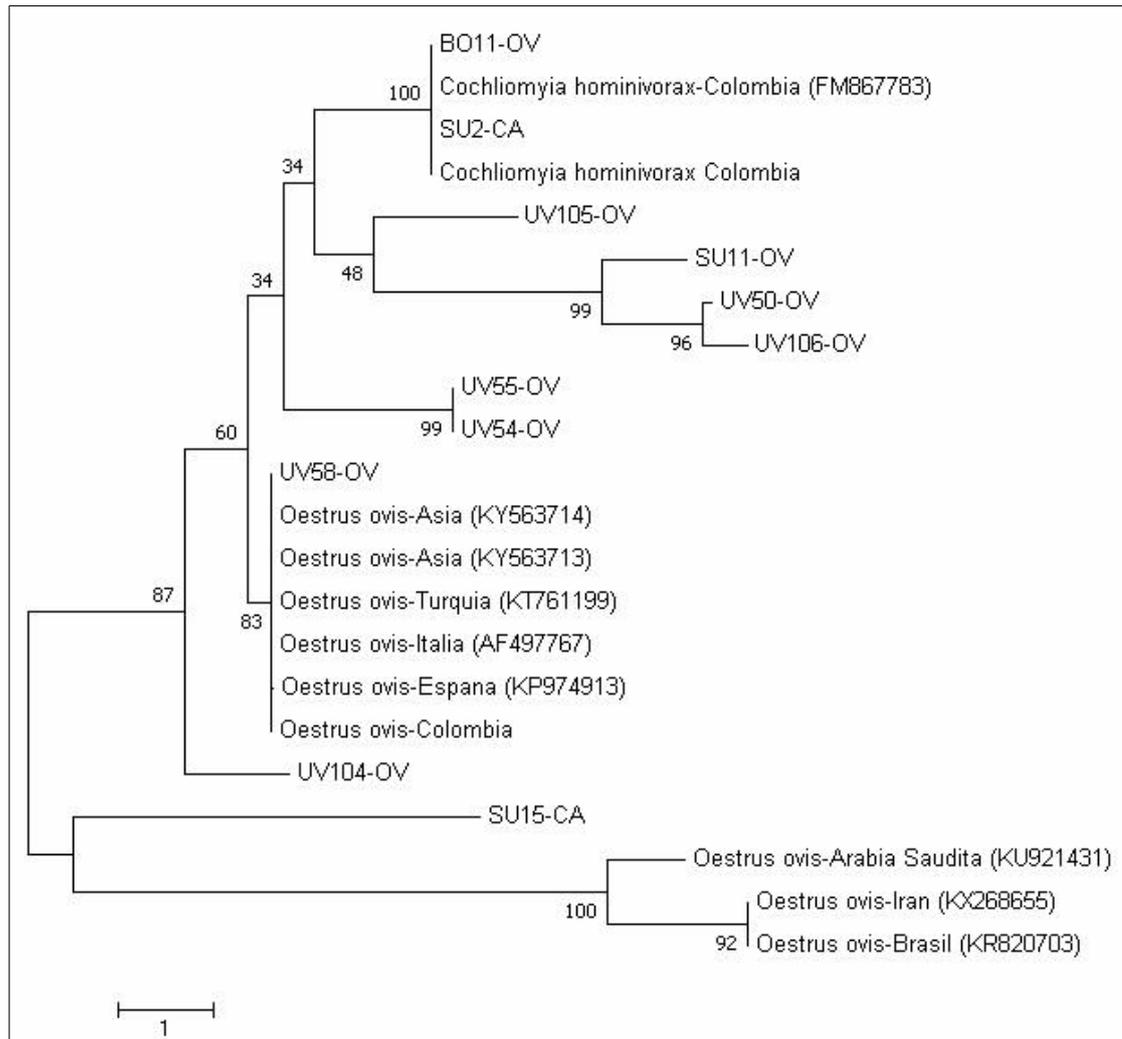


Figura 3. Dendrograma de secuencias del gen COI que representan las relaciones de *O. ovis* y *C. hominivorax* comparadas con secuencias recuperadas del GenBank.

4. Discusión

4.1 Prevalencia y factores de riesgo

Estudios de prevalencia se han llevado a cabo en el mundo, sin embargo, han sido realizados *post mortem* en planta de beneficio, por lo cual la mayoría de estos no proveen información local relacionada con el origen geográfico de los animales que permita profundizar en el conocimiento de la eco-epidemiología de éste díptero. La mayor presentación oestrosis se evidenció en ovinos, lo cual concuerda con estudios realizados en diferentes países donde la tasa de prevalencia en ovinos es mayor que en caprinos (Negm-Eldin, Elmadawy, & Hanan, 2015). Lo anterior puede deberse a diferencias entre las cepas presentes en caprinos las cuales podrían tener una menor distribución y prevalencia en comparación con las cepas de tipo ovino, las cuales están pobremente adaptadas



a parasitar los caprinos, además que el comportamiento que estos últimos han desarrollado les da una ventaja protectora sobre los ovinos (Dorchies et al., 1998).

La edad de los animales se consideró un factor muy importante en este estudio, encontrando mayor presencia en el grupo de animales menores a un año, lo cual concuerda con estudios donde han evidenciado prevalencias más altas en animales jóvenes que adultos (Alem et al., 2010). Tal es el caso de La Paz, Bolivia, donde se encontró la mayor prevalencia en animales para los grupos de edades de 1 a 2 años, seguido del grupo de 2 a 4 y la menor prevalencia para el grupo de animales mayores a 4 años (Choque-fernández, Loza-murguía, Vino-nina, & Coria-conde, 2017). Para esta investigación, se encontró que los animales mayores a 5 años tienen un factor de protección a la infección por oestrosis (OR=0, $p < 0,003$). Sin embargo, las ovejas y las cabras de todas las edades se ven afectadas por *O. ovis* y la prevalencia aumenta con la edad en ambas (Papadopoulos et al., 2010).

El hecho de encontrar la presencia de *O. ovis* en los municipios de La Uvita y Susacón, y no en los otros cuatro municipios, se encuentra estrechamente relacionado con las condiciones agro-ecológicas que se dan por las variaciones de altitud, humedad y temperatura, que va a determinar de forma directa la supervivencia de *O. ovis*, que puede diferir de un par de semanas a varios meses en diferentes regiones geográficas basado en las condiciones climáticas y ambientales (Ahaduzzaman, 2019). Un estudio anterior informó que las moscas se activaron cuando las temperaturas ambientales fueron superiores a 12-18°C y las larvas mostraron movimiento rápido y alimentación dinámica a 19-22°C, sin embargo, un estudio realizado en Ecuador, encontró que la mayoría de los animales infestados provienen de tierras altas, donde las temperaturas y las radiaciones solares son diferentes a las de las regiones templadas, lo representa junto con este trabajo una evidencia importante de oestrosis en ambientes por encima de los 2.500 msnm en la región Andina de Suramérica (Ortega-Muñoz, Luzuriaga-Neira, Salazar-Silva, & Rodríguez-Hidalgo, 2019).

4.2 Resultados moleculares

El diagnóstico *in vivo* de *O. ovis* es difícil de realizar debido a que algunos de los síntomas son similares a otras infecciones respiratorias, motivo por el cual únicamente en condiciones *post mortem* es posible realizar un diagnóstico definitivo de este díptero, muchas veces de forma accidental una vez los animales han sido sacrificados para su consumo (Dhishonin et al., 2017). También se han realizado investigaciones con métodos de diagnóstico serológico mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, ELISA (Papadopoulos et al., 2006), pero aún son experimentales pues representan un desafío ya que los anticuerpos IgG se pueden detectar únicamente 2 a 4 semanas luego de infecciones repetidas por *O. ovis*, sin embargo, animales infectados con larvas en estadio L1 o con un número pequeño, llegan a alcanzar umbrales mínimos de IgG entre 6 y 9 semanas post infección (Angulo-Valadez et al., 2009).



Por lo anterior, métodos alternativos de diagnóstico directo más sensibles y específicos que permitan una identificación *in vivo* de los animales han sido desarrollados. La prueba de PCR semi-anidada ha sido descrita para la identificación de animales infectados con dípteros de la familia Oestridae, ya que la caracterización molecular es el método más preciso para identificar especímenes de larvas de *Oestrus* (Otranto et al., 2003). Un estudio reciente realizó diagnóstico de oestrosis mediante el uso de esta técnica ya que provee alta sensibilidad y especificidad (İpek & Altan, 2017b). Basados en estos resultados previos, se logró estandarizar las condiciones específicas para el diagnóstico de este díptero, logrando realizar por primera vez la detección molecular de *O. ovis* en Colombia mediante la amplificación del gen COI.

El uso del gen mitocondrial que codifica COI ha demostrado ser particularmente adecuado como marcador molecular para la diferenciación taxonómica y la realización de estudios evolutivos y filogenéticos de insectos, ya que las regiones del gen COI evolucionan a diferentes velocidades (Otranto & Stevens, 2002). Esta porción mencionada presenta regiones conservadas y variables, con un rango diferente de tasas de mutación, estudios sobre este gen han revelado heterogeneidad en las secuencias y variabilidad de nucleótidos (Zhang & Hewitl, 1997).

Se pudo evidenciar durante el alineamiento de secuencias diferencias nucleotídicas incluso entre las secuencias provenientes de animales positivos de la misma región. Se observó que la secuencia de *O. ovis* usada como control presentó similitud con secuencias del GenBank provenientes de España (KP974913), Italia (AF497767), Turquía (KY563714) y Kyrgyzstan, Asia (KY563714; KY563713), junto con una muestra de ovino proveniente de La Uvita, agrupándose en un mismo clado. Las secuencias provenientes de Irán (KX268655), Brasil (KR820703) y Arabia Saudita (KU921431) se alejaron de la secuencia control, pero si se mantuvo una muestra de caprino proveniente del municipio de Susacón dentro de este clado. El resto de muestras positivas a *O. ovis* presentaron agrupación por especie, en un clado se observaron las muestras positivas en ovinos y en otro muestras positivas a caprinos, lo que concuerda con algunas investigaciones acerca de una circulación de cepas diferentes del díptero entre ovinos y caprinos de la misma región (Dorchies et al., 1998).

Por otro lado, las secuencias que reportaron similitud con *Cochliomyia hominivorax* proveniente de Chigorodó, Colombia (FM867783), a la luz de la construcción del dendograma se confirmó que estas muestras tenían la presencia del díptero al quedar agrupadas junto con el control positivo utilizado y la secuencia de GenBank en un mismo clado. Estos resultados representan un hallazgo interesante ya que *C. hominivorax* es responsable de causar miasis principalmente de tejidos o mucosas lesionadas, bordes de heridas o alrededor de orificios naturales que tengan alguna lesión. Existen dos reportes de caso acerca de *C. hominivorax* causando miasis nasal nosocomial en un paciente hospitalizado de Guyana francesa (Couppié et al., 2005) y otro paciente en Estados Unidos (Tai et al., 2011), sin embargo, no se encuentran registros de este díptero parasitando la cavidad nasal de ovinos y caprinos, por lo cual



representaría el primer reporte en el país acerca de la presencia accidental de *C. hominivorax* en cavidad nasal de pequeños rumiantes.

La PCR semi-anidada descrita en este trabajo tiene un enfoque novedoso y prometedor para el diagnóstico de oestrosis *ante mortem* de ovinos y caprinos, ya que permitiría futuros estudios epidemiológicos de campo con la realización del diagnóstico en animales vivos de este parásito, además, esta técnica permite la diferenciación de la oestrosis de otras enfermedades respiratorias de ovejas y cabras con síntomas clínicos similares. Sin embargo, por diversos factores como el estadio, la ubicación y el número de larvas infectando los animales, podría influir en la cantidad de ADN que deja el parásito en su recorrido desde los ollares hasta senos nasales y paranasales llegando a ser un posible problema en la toma de muestra de moco y posteriormente en el diagnóstico, considerándose un motivo para que esta prueba pueda llegar a presentar baja sensibilidad; por lo anterior el método diagnóstico más confiable siempre será la examinación *post mortem* de la cavidad nasal para visualización macroscópica de larvas de *O. ovis*.

Referencias

- Abo-Shehada, M. N., Batainah, T., Abuharfeil, N., & Torgerson, P. R. (2003). Oestrus ovis larval myiasis among goats in northern Jordan. *Preventive Veterinary Medicine*, 59(1–2), 13–19. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00058-8](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00058-8)
- Adugna, M., Afera, B., & Berhe, N. (2014). Prevalence of ovine lungworms in and around Wukro, Tigray Region, Ethiopia. *Global Veterinaria*, 12(4), 474–478. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2014.12.04.8322>
- Ahaduzzaman, M. (2019). The global and regional prevalence of oestrosis in sheep and goats: a systematic review of articles and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, 12(1), 346. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3597-2>
- Ahmadi, N., Rakhshandehroo, E., & Khadivimanesh, V. (2018). Cystocaulus ocreatus (Nematoda: Protostrongylidae) as an ovine lungworm: Molecular diagnosis and histopathological aspects. *Small Ruminant Research*, 169(August), 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.08.019>
- AL-Ubeidi, N., ALani, A., & Al-kennany E. (2017). Detection of nasal bot fly larvae in slaughtered sheep of Ninevah governorate – Iraq. *Bas.J. Vet. Res.*, 16(2), 240–247.
- Alcaide, M., Reina, D., Frontera, E., & Navarrete, I. (2005). Epidemiology of Oestrus ovis (Linneo, 1761) infestation in goats in Spain. *Veterinary Parasitology*, 130(3–4), 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.03.022>
- Alem, F., Kumsa, B., & Degefu, H. (2010). Oestrus ovis larval myiasis among sheep and goats in Central Oromia, Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 42(4), 697–703. <https://doi.org/10.1007/s11250-009-9477-6>
- Alemu, S., Leykun, E. G., Ayelet, G., & Zeleke, A. (2006). Study on small ruminant lungworms in northeastern Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, 142(3–4), 330–335. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.008>
- Anderson, R. C. (2000). *Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development*



- and Transmission (2nd edn). Parasitology Today* (Vol. 16).
[https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01712-9](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01712-9)
- Angulo-Valadez, C. E., Ascencio, F., Jacquiet, P., Dorchies, P., & Cepeda-Palacios, R. (2011). Sheep and goat immune responses to nose bot infestation: A review. *Medical and Veterinary Entomology*, 25(2), 117–125.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00911.x>
- Angulo-Valadez, C. E., Cepeda-Palacios, R., Ascencio, F., Jacquiet, P., Dorchies, P., Ramírez-Orduña, J. M., & López, M. A. (2009). IgG antibody response against salivary gland antigens from *Oestrus ovis* L. larvae (Diptera: Oestridae) in experimentally and naturally infected goats. *Veterinary Parasitology*, 161(3–4), 356–359.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.01.027>
- Arsenos, G., Fortomaris, P., Papadopoulos, E., Sotiraki, S., Stamataris, C., & Zygoiannis, D. (2009). Growth and meat quality of kids of indigenous Greek goats (*Capra prisca*) as influenced by dietary protein and gastrointestinal nematode challenge. *Meat Science*, 82(3), 317–323.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.01.028>
- Bauer, C., Steng, G., Prevot, F., & Dorchies, P. (2002). Seroprevalence of *Oestrus ovis* infection in sheep in southwestern Germany. *Veterinary Parasitology*, 110(1–2), 137–143. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00317-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00317-5)
- Benavides, E. (2013). *Técnicas para el diagnóstico de endoparásitos de importancia veterinaria* (Primera). Bogotá, Colombia: Universidad de la Salle.
- Berrag, B., & Cabaret, J. (1996). Impaired pulmonary gas exchange in ewes naturally infected by small lungworms. *International Journal for Parasitology*, 26(12), 1397–1400.
- Beyene, D., Nigussie, S., Ayana, D., & Abunna, F. (2013). The prevalence of lungworms in naturally infected sheep of ambo district, oromia, Ethiopia. *Global Veterinaria*, 10(1), 93–98.
<https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2013.10.1.71184>
- Bloor, P., Ibáñez, C., & Viloria-Lagares, T. A. (2015). Mitochondrial DNA analysis reveals hidden genetic diversity in captive populations of the threatened American crocodile (*Crocodylus acutus*) in Colombia. *Ecology and Evolution*, 5(1), 130–140. <https://doi.org/10.1002/ece3.1307>
- Borji, H., Azizzadeh, M., Ebrahimi, M., & Asadpour, M. (2012). Study on small ruminant lungworms and associated risk factors in northeastern Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(11), 853–856.
[https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60159-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60159-X)
- Bosly, H. (2018). Molecular identification studies on *Oestrus ovis* L. (Diptera: Oestridae) larvae infested sheep in jazan region, Saudi Arabia. *Indian Journal of Animal Research*, 52(1), 105–110.
<https://doi.org/10.18805/ijar.v0iOF.8487>
- Bowman, D. (2011). *Georgies Parasitología para veterinarios*. ESPAÑA: ELSEVIER ESPAÑA.
- Chaparro, J. J., Ramírez, N. F., Villar, D., Fernandez, J. A., Londoño, J., Arbeláez, C., ... Olivera, M. (2016). Survey of gastrointestinal parasites, liver flukes and lungworm in feces from dairy cattle in the high tropics of



- Antioquia, Colombia. *Parasite Epidemiology and Control*, 1(2), 124–130.
<https://doi.org/10.1016/j.parepi.2016.05.001>
- Chilton, N. B. (2004). The use of nuclear ribosomal DNA markers for the identification of bursate nematodes (order Strongylida) and for the diagnosis of infections. *Animal Health Research Reviews*, 5(2), 173–187.
<https://doi.org/10.1079/ahr200497>
- Chilton, N. B., Huby-Chilton, F., & Gasser, R. B. (2003). First complete large subunit ribosomal RNA sequence and secondary structure for a parasitic nematode: Phylogenetic and diagnostic implications. *Molecular and Cellular Probes*, 17(1), 33–39. [https://doi.org/10.1016/S0890-8508\(02\)00107-X](https://doi.org/10.1016/S0890-8508(02)00107-X)
- Choque-fernández, C., Loza-murguía, M., VINO-nina, N., & Coria-conde, L. (2017). Oestrus ovis (Diptera : Oestridae) un importante ectoparásito en ovinos de cuatro cantones del municipio de Sorata provincia Larecaja, departamento de La Paz Oestrus ovis (Diptera : Oestridae) an important ectoparasite in sheep of four cantons of the. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 4(1), 3–12.
- Cordero Del Campillo, M; Rojo-Vázquez, F. (2002). *Parasitología Veterinaria* (Tercera Ed). Madrid, España: Mc Graw-Hill Interamericana.
- Couppié, P., Roussel, M., Rabarison, P., Sockeel, M., Sainte-Marie, D., Marty, C., & Carme, B. (2005). Nosocomial nasal myiasis owing to Cochliomyia hominivorax: A case in French Guiana. *International Journal of Dermatology*, 44(4), 302–303. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord%7B%7Dfrom=export%7B%7Ddid=L40542146%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4632.2004.02547.x>
- da Silva, B. F., Bassetto, C. C., & do Amarante, A. F. T. (2012). Epidemiology of Oestrus ovis (Diptera: Oestridae) in sheep in Botucatu, State of São Paulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology : Órgão Oficial Do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 21(4), 386–390. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23295819>
- Dhishonin, S. M., Babu, R. N., Ramani, R., Porteen, K., Rao, V. A., Abraham, R. J. J., ... Govind, V. (2017). A Survey of Disease Conditions in Sheep and Goats Slaughtered at Coimbatore District Slaughter House, Tamil Nadu, India, 6(10), 3692–3699.
- Díaz Anaya, A. M., Arias González, H., García Corredor, D. J., & Pulido Medellín, M. O. (2014). Estimación de los valores de hematocrito y hemoglobina en presencia de Haemonchus sp, en ovinos de Oicata, Colombia. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV.*, 55(1), 18–24. Retrieved from <http://www.scielo.org.ve/pdf/rfvc/v55n1/art04.pdf>
- Domke, A. V. M., Chartier, C., Gjerde, B., Leine, N., Vatn, S., & Stuen, S. (2013). Prevalence of gastrointestinal helminths, lungworms and liver fluke in sheep and goats in Norway. *Veterinary Parasitology*, 194(1), 40–48.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.023>
- Dorchies, P., Durantón, C., & Jacquiet, P. (1998). Pathophysiology of Oestrus ovis infection in sheep and goats: a review. *Veterinary Record*, 142(18), 487–489. <https://doi.org/10.1136/vr.142.18.487>
- Fasih, N., Qaiser, K. N., Bokhari, S. A., Jamil, B., & Beg, M. A. (2014). Human



- ophthalmomyiasis externa caused by the sheep botfly *Oestrus ovis*: a case report from Karachi, Pakistan. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(10), 835–837. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C901>
- Fentahun, S., Abebe, R., Melkamu, S., & Asrat, M. (2016). Study on lungworm infection in small ruminants : Prevalence and risk factors in and around Gondar. *International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry*, 1(2), 47–52.
- Forero, E. G. (2011). Miasis en salud pública y salud pública veterinaria. *Una Salud. Revista Sapuvet de Salud Publica*, 2(45), 95–132. Retrieved from <http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/us/article/viewFile/146/91>
- Fthenakis, G. C., Mavrogianni, V. S., Gallidis, E., & Papadopoulos, E. (2015). Veterinary Parasitology Interactions between parasitic infections and reproductive efficiency in sheep. *Veterinary Parasitology*, 208(1–2), 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.017>
- Fthenakis, G. C., & Papadopoulos, E. (2018). Impact of parasitism in goat production. *Small Ruminant Research*, 163(March 2017), 21–23. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.04.001>
- Gasser, R. B. (2006). Molecular tools - Advances, opportunities and prospects. *Veterinary Parasitology*, 136(2), 69–89. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.12.002>
- Gasser, R. B., Bott, N. J., Chilton, N. B., Hunt, P., & Beveridge, I. (2008). Toward practical, DNA-based diagnostic methods for parasitic nematodes of livestock - Bionomic and biotechnological implications. *Biotechnology Advances*, 26(4), 325–334. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.03.003>
- Gasser, R. B., Chilton, N. B., Hoste, H., & Beveridge, I. (1993). Rapid sequencing of rDNA from single parasitic helminths. *Nucleic Acids Research*, 21(10), 2525–2526.
- Gasser, R. B., Jabbar, A., Mohandas, N., Höglund, J., Hall, R. S., Littlewood, D. T. J., & Jex, A. R. (2012). Assessment of the genetic relationship between *Dictyocaulus* species from *Bos taurus* and *Cervus elaphus* using complete mitochondrial genomic datasets. *Parasites & Vectors*, 5(1), 241. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-241>
- González, A., Berumen, A., Mayo, E., & Vera, G. (2010). *Diagnóstico Clínico del Ovino*. Retrieved from <http://www.archivos.ujat.mx/2011/difusion/libros/9.pdf>
- Gouÿ de Bellocq, J., Ferté, H., Depaquit, J., Justine, J. L., Tillier, a, & Durette-Desset, M. C. (2001). Phylogeny of the Trichostrongylina (Nematoda) inferred from 28S rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19(3), 430–442. <https://doi.org/10.1006/mpev.2001.0925>
- Grisez-Duranton, C., Dorchies, P., Jourdane, J., & Durand, P. (2002). Genetic structure of *Oestrus ovis* populations in sheep and goats. *Veterinary Parasitology*, 104, 167–173.
- Haji, M., Tilahun, A., Teshale, A., & Engedaw, D. (2016). Study on Lungworm and Associated Risk Factors of Small Ruminants in Hitosa Woreda, Ethiopia. *Global Veterinaria*, 17(4), 303–309. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2016.17.04.104162>
- Hansen, J., & Perry, B. (1994). *The epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of ruminants*. Nairobi, Kenya: International Laboratory for Research on Animal Diseases. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris->



- search/search/display.do?f=1996/XF/XF96009.xml;XF9652615
- Hidalgo, A., Palma, H., Oberg, C., Fonseca-Salamanca, F., Hidalgo, A., Palma, H., ... Fonseca-Salamanca, F. (2015). Oestrus ovis infection of grazing sheep during summer in southern Chile. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(6), 497–500. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000600002>
- İpek, D. N. S., & Altan, S. (2017a). Use of semi-nested PCR and rhinoscopy for the diagnosis of oestrosis. *Small Ruminant Research*, 150, 76–79. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.03.006>
- İpek, D. N. S., & Altan, S. (2017b). Use of semi-nested PCR and rhinoscopy for the diagnosis of oestrosis. *Small Ruminant Research*, 150, 76–79. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.03.006>
- Kafle, P., Lejeune, M., Verocai, G. G., Hoberg, E. P., & Kutz, S. J. (2015). Morphological and morphometric differentiation of dorsal-spined first stage larvae of lungworms (Nematoda: Protostrongylidae) infecting muskoxen (*Ovibos moschatus*) in the central Canadian Arctic. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(3), 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.05.003>
- Kassa, T., Alemneh, T., & Akeberegn, D. (2017). Small Ruminant Lungworms : Parasite detection , identification and prevalence estimation in Three Districts of South Wollo , Ethiopia. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2, 15–22.
- Kassai, T. (2002). *Helmintologia Veterinaria*. ESPAÑA: Acribia S.A.
- Knox, M. R., Torres-Acosta, J. F. J., & Aguilar-Caballero, A. J. (2006). Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 139(4), 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.026>
- Kouam, M. K., Diakou, A., Kantzoura, V., Feidas, H., Theodoropoulou, H., & Theodoropoulos, G. (2014). An analysis of seroprevalence and risk factors for parasitic infections of economic importance in small ruminants in Greece. *Veterinary Journal*, 202(1), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.07.011>
- Kuchboev, Abdurakhim E, Krücken, J., Ruziev, B. H., & von Samson-Himmelstjerna, G. (2015). Molecular phylogeny and diagnosis of species of the family Protostrongylidae from caprine hosts in Uzbekistan. *Parasitol Res*, 114(4), 1355–1364. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4313-6>
- Kuchboev, Abdurakhim Ergashevich, & Hoberg, E. P. (2011). Morphological and ultrastructural changes in tissues of intermediate and definitive hosts infected by Protostrongylidae. *Turkish Journal of Zoology*, 35(1), 1–7. <https://doi.org/10.3906/zoo-0903-8>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- López, C. M., Fernández, G., Viña, M., Cienfuegos, S., Panadero, R., Vázquez, L., ... Morrondo, P. (2011). Protostrongylid infection in meat sheep from Northwestern Spain: Prevalence and risk factors. *Veterinary Parasitology*, 178(1–2), 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.038>
- López, C. M., Fernández, G., Viña, M., Cienfuegos, S., Panadero, R., Vázquez, L., ... Morrondo, P. (2011). Veterinary Parasitology Protostrongylid infection



- in meat sheep from Northwestern Spain : Prevalence and risk factors. *Veterinary Parasitology*, 178, 108–114.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.038>
- Matos Moya, V., Rodríguez, D., Alfonso, P., Pérez, J. M., & Olivares, J. (2012). Morfometría de larvas de *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) de ovinos, en Cuba. *Rev. Salud Anim*, 34(3), 184–187.
- Matos, V., Rodríguez Diego, J. G., Alfonso, P., & Olivares, J. L. (2013). *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae): un importante ectoparásito de los ovinos en Cuba. *Revista de Salud Animal*, 35(2), 79–88.
- Moges, N., Bogale, B., & Chanie, M. (2011). *Dictyocaulus filaria* and *Muellerius capillaris* are important lungworm parasites of sheep in Wogera district, northern Ethiopia. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*, 3(6), 465–468. Retrieved from <http://maxwellsci.com/print/ijava/v3-465-468.pdf>
- Mokhtaria, K., Sidi, S., Ammar, M., & Aboud, B. (2014). Lungworm Infections in Sheep Slaughtered in Tiaret Abattoir (Algeria). *Global Veterinaria*, 13(4), 530–533. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2014.13.04.85207>
- Morales, G., & Pino, L. A. (2009). *Nematodos parásitos de los rumiantes domésticos en Venezuela, diagnóstico y control* (Primera). Caracas, Venezuela: Laboratorio de diagnóstico veterinario Aliani.
- Moreno, V., Romero-Fernández, I., Marchal, J. A., Beltrán, M., Granados, J. E., Habela, M. A., ... Sánchez, A. (2015). Molecular characterization of bot flies, *Oestrus* spp., (Diptera, Oestridae), from domestic and wild Bovidae hosts. *Veterinary Parasitology*, 212(3–4), 473–477.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.002>
- Negm-Eldin, M., Elmaway, R., & Hanan, G. (2015). *Oestrus ovis* larval infestation among sheep and goats of Green Mountain areas in Libya. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 2(4), 382.
<https://doi.org/10.5455/javar.2015.b105>
- Ortega-Muñoz, G., Luzuriaga-Neira, N., Salazar-Silva, R., & Rodríguez-Hidalgo, R. (2019). *Oestrus ovis* in Ecuador: Importance in the Andean sheep farming. *Veterinary World*, 12(4), 522–526.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.522-526>
- Otranto, D., Traversa, D., Guida, B., Tarsitano, E., Fiorente, P., & Stevens, J. R. (2003). Molecular characterization of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene of Oestridae species causing obligate myiasis. *Medical and Veterinary Entomology*, 17(3), 307–315. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2003.00442.x>
- Otranto, Domenico, & Stevens, J. R. (2002). Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. *International Journal for Parasitology*, 32, 1345–1360. <https://doi.org/papers://B79588E5-2CC1-4C57-804E-28592FC88A1E/Paper/p5937>
- Özdal, N., Tanritanir, P., İlhan, F., & Değer, S. (2016). The prevalence of ovine oestrosis (*Oestrus ovis* Linnaeus, 1761, Diptera: Oestridae) and risk factors in Eastern Turkey. *Veterinarski Arhiv*, 86(3), 323–333.
- Panayotova-Pencheva, M. S. (2011). Species composition and morphology of protostrongylids (Nematoda: Protostrongylidae) in ruminants from Bulgaria. *Parasitology Research*, 109(4), 1015–1020. <https://doi.org/10.1007/s00436->



011-2337-0

- Panuska, C. (2006). Lungworms of Ruminants. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 22(3), 583–593.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2006.06.002>
- Papadopoulos, E., Prevot, F., Diakou, A., & Dorchies, P. (2006). Comparison of infection rates of *Oestrus ovis* between sheep and goats kept in mixed flocks. *Veterinary Parasitology*, 138(3–4), 382–385.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.02.023>
- Papadopoulos, Elias, Chaligiannis, I., & Morgan, E. R. (2010). Epidemiology of *Oestrus ovis* L. (Diptera: Oestridae) larvae in sheep and goats in Greece. *Small Ruminant Research*, 89(1), 51–56.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.004>
- Pape T, Wolff M, A. E. (2014). Los califóridos, éstridos, rinofóridos y sarcófagidos (Diptera: Calliphoridae, Oestridae, Rhinophoridae, Sarcophagidae) de Colombia. *Biota Colombiana*, 5(2), 201–208.
- Perry, B. D., & Randolph, T. F. (1999). Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals. *Veterinary Parasitology*, 84(3–4), 145–168.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00040-0)
- Powers, T. O., Todd, T. C., Burnell, A. M., Murray, P. C., Fleming, C. C., Szalanski, A. L., ... Harris, T. S. (1997). The rDNA Internal Transcribed Spacer Region as a Taxonomic Marker for Nematodes. *Journal of Nematology*, 29(4), 441–450. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19274180>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2619808>
- Pulido medellín, M. O., García corredor, D., Díaz anaya, A., & Andrade becerra, R. (2014). Pesquisa de parásitos gastrointestinales en pequeñas explotaciones ovinas. *Rev. Salud Anim.*, 36(1), 65–69. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v36n1/rsa12114.pdf>
- Regassa, A., Toyeb, M., Abebe, R., Megersa, B., Mekibib, B., Mekuria, S., ... Abunna, F. (2010). Lungworm infection in small ruminants: Prevalence and associated risk factors in Dessie and Kombolcha districts, northeastern Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, 169(1–2), 144–148.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.010>
- Roeber, F., Jex, A. R., & Gasser, R. B. (2013). Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1135–1152.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.008>
- Saleem, T., Katoch, R., Yadav, A., Mir, I. A., Godara, R., & Ahamed, I. (2017). Prevalence of ovine oestrosis in Plain and Kandi areas of Jammu, North India, 6(2), 1117–1122.
- Sánchez, A., Caparrós, N., Ostrowski, S., Sarasa, M., & Pérez, J. M. (2017). Oestrosis in Asiatic ibex (*Capra sibirica*): a case report and molecular characterization of larvae. *Veterinary Parasitology*, 236, 55–57.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.003>
- Sargison, N. D. (2016). Keys to solving health problems in small ruminants: Anthelmintic resistance as a threat to sustainable nematode control. *Small Ruminant Research*, 142, 11–15.



- <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.02.021>
- Sarmiento, R. (2001). *Semiología clínica veterinaria*. (UDCA, Ed.) (Primera). Bogotá, Colombia.
- Shite, A., Admassu, B., & Yenew, A. (2015). Bovine Dictyocaulosis: A Review. *European Journal of Biological Sciences*, 7(3), 125–131. <https://doi.org/10.5829/idosi.ejbs.2015.7.03.9515>
- Shoorijeh, J. S., Tamadon, a., Negahban, S., & Behzadi, M. a. (2011). Učestalost kukca Oestrus ovis u koza u Shirazu u Južnom Iranu. *Veterinarski Arhiv*, 81(1), 43–49. Retrieved from http://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=99466
- Smillie, I., Gubbi, P. K. S., & Cocks, H. C. (2010). Nasal and ophthalmomyiasis: Case report. *Journal of Laryngology and Otology*, 124(8). <https://doi.org/10.1017/S0022215109992714>
- Strube, C., Springer, A., Schunn, A. M., & Forbes, A. B. (2017). Serological lessons from the bovine lungworm Dictyocaulus viviparus: Antibody titre development is independent of the infection dose and reinfection shortens seropositivity. *Veterinary Parasitology*, 242(March), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.023>
- Suarez, V., Bertoni, E., Micheloud, J., Cafrune, M., Viñabal, A., Quiroga Roger, J., & Bassanetti, A. (2014). First record of Muellerius capillaris (Nematoda, Protostrongylidae) in northwestern Argentina. *Helminthologia*, 51(4), 288–292. <https://doi.org/10.2478/s11687-014-0243-6>
- Tabouret, G., Prevot, F., Bergeaud, J. P., Dorchies, P., & Jacquiet, P. (2001). Oestrus ovis (Diptera: Oestridae): Sheep humoral immune response to purified excreted/secreted salivary gland 28 kDa antigen complex from second and third instar larvae. *Veterinary Parasitology*, 101(1), 53–66. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00501-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00501-5)
- Tabouret Guillaume, Lacroux Caroline, Andreoletti Olivier, Bergeaud Jean Paul, Hailu-Tolosa Yacob, Hoste Hervé, Prevot Françoise, Grisez Christelle, Dorchies Philippe, J. P. (2003). Cellular and humoral local immune responses in sheep experimentally infected with Oestrus ovis (Diptera: Oestridae). *Veterinary Research*, 34, 231–241. <https://doi.org/10.1051/vetres>
- Tai, R., Marsh, M. A., Rao, R., Kurniali, P. C., DiNino, E., & Meharg, J. V. (2011). Nasal myiasis caused by Cochliomyia hominivorax in the United States: A case report. *American Journal of Infectious Diseases*, 7(4), 107–109. <https://doi.org/10.3844/ajidsp.2011.107.109>
- Terefe, Y., Tafess, K., Fekadie, G., & Kebede, N. (2013). Prevalence of lungworm infection in small ruminants in North Gondar zone, Amhara National Regional State, 5(April), 40–45. <https://doi.org/10.5897/JPVB20>
- Thienpont, D., Rochette, F., & Vanparijs, O. (1986). *Dignóstico de lashelminthiasis por medio del examen coprológico* (Segunda). Beerse, Bélgica: Janssen Research Foundtion.
- Ueno, H., & Gonçalves, P. C. (1998). Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminante. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:manual+para+diagnostico+das+helmintoses+de+ruminantes#0>
- URQUHART, G. ., ARMOUR, J., DUNCAN, J. ., DUNN, A. ., & JENNINGS, F. . (2001). *Parasitología veterinaria* (Segunda Ed). ESPAÑA: ED. ACRIBIA.



- Van Wyk, J. A., Cabaret, J., & Michael, L. M. (2004). Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. *Veterinary Parasitology*, 119(4), 277–306. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.11.012>
- Vargas-Duarte, J. J., Lozano-Márquez, H., Grajales-Lombana, H. A., Manrique-Perdomo, C., Martínez-Bello, D. A., Saegerman, C., ... Kirschvink, N. (2015). Effect of Moxidectin Treatment at Parturition on Gastrointestinal Parasite Infections in Ewes Raised under Tropical Andes High Altitude Conditions. *Veterinary Medicine International*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/932080>
- Vasconcelos, T. C., Macêdo, J. T. S. A., Silva, A., Silva, M. M. N., Bittencourt, T. C. C., Santos, M. V. B., ... Pedrosa, P. M. O. (2016). Oestrose: uma parasitose emergente em pequenos ruminantes no Nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36(10), 925–929. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2016001000001>
- Verschave, S. H., Charlier, J., Rose, H., Claerebout, E., & Morgan, E. R. (2016). Cattle and Nematodes Under Global Change: Transmission Models as an Ally. *Trends in Parasitology*, 32(9), 724–738. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.018>
- Yacob, H. T., Jacquiet, P., Prevot, F., Bergeaud, J. P., Bleuart, C., Dorchies, P., & Hoste, H. (2004). Examination of the migration of first instar larvae of the parasite *Oestrus ovis* (Linne 1761) [Diptera: Oestridæ] in the upper respiratory tract of artificially infected lambs and daily measurements of the kinetics of blood eosinophilia and mucosal inflammation. *Veterinary Parasitology*, 126(3), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.06.026>
- Zhang, D., & Hewlitt, G. M. (1997). Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Molecular Biology*, 6(2), 143–150.



CAPITULO III.

PREVALENCIA Y FACTORES DE RIESGO EN LA INFECCION POR NEMATODOS PULMONARES EN PEQUEÑOS RUMIANTES DE BOYACÁ, COLOMBIA

Adriana María Díaz Anaya, Martín Orlando Pulido Medellín, Jimmy Jolman Vargas Duarte

RESUMEN

Un estudio de tipo transversal se llevó a cabo con el fin de determinar las especies presentes de nematodos pulmonares y su prevalencia en ovinos y caprinos en seis municipios de la provincia norte del departamento de Boyacá. Se realizó examen fecal por medio de la técnica de Baerman a un total de 761 animales, 485 caprinos y 276 ovinos. Se encontró una prevalencia general de 4,7%, dentro de la cual se identificaron tres especies de nematodos pulmonares: *Dictyocaulus filaria*, *Muellerius capillaris* y *Protostrongylus rufescens*. De estos, la mayor prevalencia se presentó para *P. rufescens* (50%) y *M. capillaris* (44,6%), no se presentó mono infección encontrando *D. filaria* asociado a *M. capillaris* en un 3,8%. Se encontraron como factores de riesgo la edad de 3 a 5 años (OR=9,07; 95% IC= 2,65- 31,03), la raza criolla (OR=2,33; 95% IC= 1,9- 2,75) y animales cuya alimentación se basaba en forraje fresco (OR=12,21; 95% IC= 2,62- 56,84). La variable cuarentena de animales nuevos se encontró como factor de protección (OR=0,27; 95% IC= 0,08- 0,97) de los animales a las infecciones por nematodos pulmonares. Este estudio se considera el primer reporte en el país para *M. capillaris* y *P. rufescens*, los cuales afectan la productividad de pequeños rumiantes y requieren de mayor estudio para su control y prevención.

PALABRAS CLAVE: nematodos pulmonares, prevalencia, ovinos, caprinos, factores de riesgo.

1. Introducción

Las bronquitis y neumonías en pequeños rumiantes son problemas médicos importantes en todos los grupos etáreos y pueden ser generadas por múltiples causas dentro de las cuales se incluyen agentes bacterianos, virales, clamidias, mycoplasmas y parásitos localizados tanto en el tracto respiratorio alto como bajo. (Berrag & Cabaret, 1996).

Dentro de agentes parasitarios, los nematodos son el grupo más importante que afectan a los ovinos, caprinos y rumiantes de vida silvestre, se encuentran a nivel bronquial y pulmonar, éstos incluyen: *Dictyocaulus filaria* el cual tiene un ciclo de vida directo y afecta bronquios y pulmones, *Protostrongylus rufescens*, *Muellerius capillaris*, *Cystocaulus ocreatus*, *Neoststrongylus linearis* y *Spiculocaulus leuckarti*, todas ellas especies reportadas en diferentes lugares del mundo, los cuales tienen ciclo de vida indirecto y se localizan en el parénquima pulmonar (Beyene et al., 2013). Adicionalmente, algunos nematodos gastrointestinales pueden migrar por



el tejido pulmonar y general alteraciones respiratorias. La presencia de cualquiera de éstos géneros conlleva a pérdidas económicas directas e indirectas por retraso en el crecimiento, índice de conversión desfavorable y disminución en el estado inmunitario facilitando la colonización con otros agentes infecciosos que inciden sobre la salud de los animales y ocasionan una disminución en la producción (Shite, Admassu, & Yenew, 2015).

Estudios desarrollados en países de Europa y África, han reportado prevalencias entre 22% y 97,7% en casos de infección por *D. filaria* y varios géneros de la familia *Protostrongylidae* (López et al., 2011; Terefe et al., 2013; Adugna et al., 2014; Kassa, Alemneh, & Akeberegn, 2017; Mokhtaria et al., 2014). En Argentina se realizó el primer reporte de *M. capillaris* en 2014 (Suarez et al., 2014), mientras que en Colombia no se tienen registros oficiales de la presencia de nematodos pulmonares en ovinos, sin embargo, en bovinos se reporta una prevalencia reciente de *D. viviparus* de 4.6% (Chaparro et al., 2016).

A pesar que *D. filaria* se considera el nematodo pulmonar más patógeno, con frecuencia su presencia está acompañada de otras especies de protostrongílidos. La morbilidad de estas infecciones es baja, ya que generan procesos crónicos que transcurre con tos, respiración rápida, aumento de los sonidos bronquiales, estertores y/o sibilancias y descarga nasal bilateral (Panuska, 2006). Además pueden causar bronquitis, bronquiolitis, neumonía, colapso, edema e incluso enfisema pulmonar, que hacen a los animales más susceptibles a infecciones virales y bacterianas secundarias (Ahmadi, Rakhshandehroo, & Khadivimanesh, 2018). Cuando hay infección únicamente en los pulmones, sólo el órgano es decomisado, pero si la infección ha causado neumonía, emaciación o anemia, entonces toda la carcasa será decomisada (Kouam et al., 2014). La infestación con *D. filaria*, *M. capillaris* y *P. rufescens* se observa principalmente en corderos de 4 a 6 meses de edad, pero las ovejas de todas las edades son susceptibles a la infestación de gusanos pulmonares (Fentahun, Abebe, Melkamu, & Asrat, 2016).

Dentro de los protostrongílidos, *M. capillaris* es el género más común en ovinos y caprinos, pero su infestación raramente produce signos clínicos. Las larvas L1 pueden sobrevivir durante 10 meses a 5°C en zonas de clima templado y en presencia de lluvias invernales casi todas las ovejas son portadoras de este género. La extensa distribución y la alta prevalencia son en parte atribuidas a la amplia gama de hospedadores intermediarios (caracoles y babosas) (Abdurakhim Ergashevich Kuchboev & Hoberg, 2011), mientras que *P. rufescens* tiene una patogenicidad intermedia y su transmisión es epidemiológicamente más compleja comparado con *D. filaria*, ya que involucra al hospedero, el parásito y un hospedero intermediario restringido a ciertas especies de caracoles (Borji et al., 2012).

La transmisión y el mantenimiento de las infecciones pulmonares año tras año dependen de algunos animales infectados que albergan un pequeño número de parásitos adultos en los pulmones durante varios meses y por lo tanto sirven como portadores. Los animales portadores continúan contaminando los pastos, y el ciclo



de infección se mantiene en la población en riesgo (Shite et al., 2015). Como resultado, el número de larvas infectivas en pastos puede alcanzar niveles que causan brotes de enfermedad clínica. Las larvas de algunas especies de nematodos pulmonares pueden inhibirse en el tejido pulmonar durante períodos de condiciones climáticas adversas, como una estación seca, y luego madurar al comienzo de la estación de lluvias (Hansen & Perry, 1994).

A pesar que estas parasitosis son perjudiciales para la sanidad, no se conocen estudios de identificación de los parásitos presentes en vías respiratorias ya que en su mayoría los estudios están enfocados a la prevalencia de nematodos gastrointestinales y sus efectos sobre la producción de los pequeños rumiantes. El estudio de los agentes parasitarios que originan patologías del tracto respiratorio y su prevalencia es de vital importancia para conocer el comportamiento epidemiológico, distribución de éstos en una zona geográfica particular, su biología y factores de riesgo asociados a su presentación, debido a que tienen importantes implicaciones que aportan al control de las parasitosis y prevención en la disminución de pérdidas productivas y económicas (Verschave, Charlier, Rose, Claerebout, & Morgan, 2016). De acuerdo a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue conocer la prevalencia y los factores de riesgo por nematodos presentes en el tracto respiratorio de ovinos y caprinos de la provincia Norte del departamento de Boyacá.

2. Materiales y métodos

2.1 Población de estudio

Se seleccionaron 6 municipios: Susacón, Soatá, Tipacoque, Covarachía, Boavita y La Uvita, pertenecientes a la provincia Norte del departamento de Boyacá (Figura 1). En el área se desarrollan cultivos mixtos y sistemas de producción ganadera a pequeña y mediana escala, representando un componente alternativo del sistema agrícola tradicional. Las principales tierras de pastoreo para los pequeños rumiantes están al margen del bosque, cumbre de montañas, tierras pedregosas e infértiles y bordes de carretera.

A partir del inventario ovino-caprino existente para los 6 municipios se tomó un total de 17.835 caprinos y 8.172 ovinos. Para calcular el tamaño de muestra se tomaron los valores de $Z_{\alpha} = 1,96$ a un nivel de confianza del 95%, $e = 5\%$, margen de error admitido y $P = 50\%$ prevalencia esperada, este valor debido a que en Boyacá no se conocen estudios relacionados de prevalencia para parásitos del tracto respiratorio. Se realizó un muestreo aleatorio estratificado, donde la muestra calculada para caprinos fue de **485** y de ovinos **276**, para un total de 761 animales incluidos en el estudio.



Figura 1. Mapa de los municipios de la provincia norte del departamento de Boyacá, Colombia.

2.2 Encuesta epidemiológica

Al momento de la recolección de muestras, se tomaron datos de especie, edad, sexo, raza, condición corporal y estado reproductivo de las hembras. Se aplicó una encuesta epidemiológica a nivel de finca acerca del tipo de alimentación, tipo de alojamiento y estado sanitario, con el fin de proponer los posibles factores de riesgo asociados a la infección por parásitos del tracto respiratorio.

2.3 Evaluación clínica de los animales

Se realizó un examen clínico general a cada uno de los animales, se tomaron constantes fisiológicas como frecuencia cardiaca, respiratoria, temperatura corporal y coloración de mucosas. Además, se efectuó una inspección del sistema nervioso central para identificar posibles cambios en el comportamiento y desplazamiento, sistema digestivo por posible presencia de diarrea y sistema respiratorio, en busca de la posible presencia de secreción nasal, tipo de descarga y ruidos respiratorios compatibles con rinitis y neumonía.

2.4 Toma y procesamiento de las muestras

Se recolectó muestra de materia fecal directamente del recto de los animales seleccionados mediante el uso de guantes de látex. Además, se realizó una exploración de la cavidad nasal con el fin de recolectar muestra de moco. Se tomó un hisopo estéril y se introdujo en la región más interna de ambas fosas nasales, luego fue almacenado en un criovial de 2 ml y se le adicionó buffer STE para su conservación. Inmediatamente después de la recolección de las muestras, estas fueron almacenadas en neveras de icopor portátiles a 4^o C, hasta el envío al laboratorio de Parasitología de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Posteriormente, para las muestras de materia fecal se usó la técnica



de Baerman modificada con el fin de obtener las larvas de parásitos pulmonares de primer estadio (L1), estas fueron identificadas morfológicamente al microscopio mediante claves taxonómicas establecidas por Van Wyk, Cabaret, & Michael (2004).

2.5 Extracción de ADN, amplificación y secuenciación ITS-2

Se usaron como controles positivos parásitos adultos de *Haemonchus contortus*, *Dictyocaulus viviparus*, *Cystocaulus ocreatus* y *Dictyocaulus filaria* (estos últimos provenientes de la Universidad de Lisboa). Los especímenes fueron retirados de etanol y se procedió a usar el protocolo de extracción de fenol cloroformo de igual forma se aplicó para la extracción de ADN de los hisopados nasales (Bloor et al., 2015). Una región del gen ITS-2 rADN fue amplificada usando el conjunto de primers específicos NC1F (5'-ACGTCTGGTTTTTCAGGGTTTTGTTTTTTT-3') y NC2R (5'-TTAGTTTTCTTTTCCTCCGCT-3') (Gasser et al., 1993). La reacción de PCR fue ajustada a un volumen final de 15 μ L, incluyendo 50-60 ng de ADN genómico, 1X de buffer de reacción (20mM Tris-HCl pH 8; 50 mM KCl), 2,0 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs y 0.5 μ M de cada primer a evaluar y 1.25 U de Taq polimerasa (Thermo Scientific Cat. EP0402). Las muestras fueron cicladas en un termociclador Axygen® MaxyGene™ II Thermal Cycler. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: denaturación inicial de 95°C por 5 min y 35 ciclos de 95°C por 45 seg, alineamiento a 50°C por 45 seg, extensión a 72°C durante 30 seg y una extensión final a 72°C por 7 min.

Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 2.5% en TBE 0,5X (100 mM Tris, 90 mM Borato, 2,5mM EDTA; pH 8,0) teñidos con SYBR Safe (ThermoFisher, Cat. S33102). Los geles fueron corridos durante 40 min a 80 V y los productos visualizados en un transiluminador (Safe Imager™ 2.0 Blue Light Transilluminator), los tamaños obtenidos en los amplificados fueron establecidos mediante comparación con un patrón de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific, Cat. 15628019).

2.6 Análisis de secuencias

Los productos amplificados fueron purificados con el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery y posteriormente enviados al servicio de Secuenciación y Análisis Genético de la Universidad Nacional de Colombia (SSIGMOL). Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron editadas manualmente en el programa *Biological Science Alignment Editor* (Bioedit®, Carlsbad, California, USA) y posteriormente se realizó análisis de similaridad en BLAST.

2.7 Manejo y análisis de datos

Los datos de las pruebas coprológicas y la información sobre los factores de riesgo se recopilaron y registraron como base de datos. Se realizó un análisis de tipo descriptivo y un test de Chi-cuadrado mediante el uso del software estadístico



Epidat 4.1. Continuando con esto, se aplicó una regresión logística multivariable, para analizar la asociación entre la prevalencia de nematodos pulmonares y los posibles factores de riesgo, el grado de asociación se determinó usando Odds Ratio. En todos los casos se usó un nivel confianza de 95% y un nivel de significancia de 0.05.

3. Resultados

3.1 Población de estudio

La proporción de individuos de los seis municipios de la provincia norte de Boyacá incluidos en el estudio se distribuyó de la siguiente manera: Soatá con el 28,9%, La Uvita 19,8%, Susacón 18%, Boavita 11,6%, Tipacoque 11% y Covarachia con el 10,6%. De la población incluida en el estudio, la especie con mayor presentación fue la caprina con el 63,9% mientras que la ovina con el 36,1%; del total de individuos el 82,4% fueron hembras y un 17,6% machos.

Las hembras se encontraban en diferentes estados reproductivos, el 42,9% se encontraban vacías, seguido del 33,2% cargadas y el 23,9% lactantes. Las razas predominantes para caprinos fueron la criolla con el 86,4%, seguida de alpina y nubiana con 7,42% y 5,77%, respectivamente. Para ovinos la raza criolla también fue la de mayor participación en el estudio con 56,16%, seguida de raza camura y mora con 27,9% y 7,8% respectivamente. Los animales menores de un año presentaron la mayor participación con 43,2% del total de individuos del estudio, 34% animales entre 1 y 3 años, 18% animales entre 3 y 5 años y el 4,6% mayor a 5 años.

3.2 Examinación coprológica

El análisis descriptivo mostró una prevalencia de 4,7% (36/761) para nematodos pulmonares en los ovinos y caprinos de los diferentes municipios examinados mediante la técnica de Baerman modificada. Se presenta distribución de caprinos y ovinos positivos a nematodos pulmonares según características de raza, edad, sexo y estado reproductivo en las Figura 2 y 3, respectivamente. En los ovinos se obtuvo una presencia de 3,6% (10/276) y en caprinos de 5,3% (26/485).

La proporción de infección por *M. capillaris* fue de 42,4%, *P. rufescens* 50% e infecciones mixtas por *D. filaria* + *M. capillaris* 3,8% y *P. rufescens* + *M. capillaris* 3,8% para caprinos; para ovinos se encontró *M. capillaris* 50% y *P. rufescens* 50%, para esta especie no se presentaron infecciones mixtas. En este estudio no se presentó mono infección por *D. filaria*. La mayor infección fue causada por *P. rufescens* (50%) y *M. capillaris* (44,6%) y una menor proporción causada infecciones mixtas (2,7%) (Tabla 1).

Tabla 1. Prevalencia de infección por parásitos pulmonares en pequeños rumiantes estratificada por la proporción de la infección causada por cada parásito.



Especie	No. positivos	<i>M. capillaris</i>		<i>P. rufescens</i>		<i>D. filaria</i> + <i>M. capillaris</i>		<i>P. rufescens</i> + <i>M. capillaris</i>	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Caprinos	26	11	42,4	13	50	1	3,8	1	3,8
Ovinos	10	5	50	5	50	0	0	0	0
Total	36	16	44,6	18	50	1	2,7	1	2,7

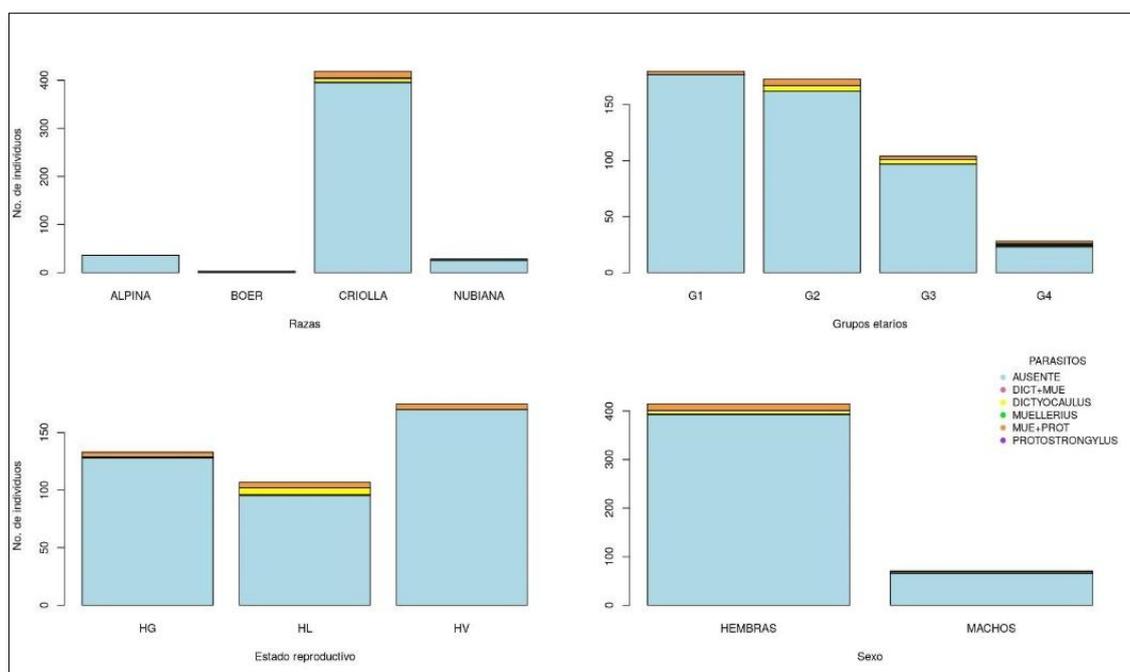


Figura 2. Distribución de caprinos positivos a nematodos pulmonares según características de raza, edad, sexo y estado reproductivo.

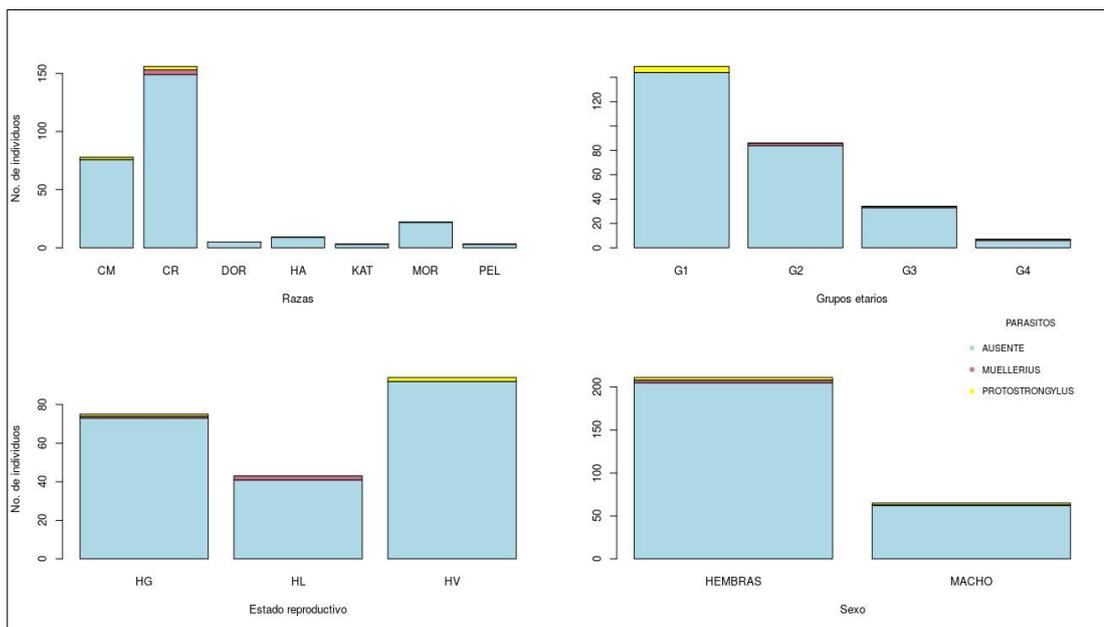


Figura 3. Distribución de ovinos positivos a nematodos pulmonares según características de raza, edad, sexo y estado reproductivo.

3.3 Evaluación clínica de los animales

Se encontró que el 53,2% (405/761) de los animales presentaban descarga nasal, esta se clasificó según características físicas en secreción de tipo serosa 30,4% (232/761), seromucosa 14% (106/761), mucosa espesa 5,5% (42/761) y mucopurulenta 0,5% (4/761). El 2,62% (20/761) de los animales presentó ruidos respiratorios entre estornudos, ronquidos y estertores pulmonares. En la evaluación a sistema nervioso central se encontró que un individuo presentó depresión y desplazamiento anormal con marcha tambaleante.

3.4 Análisis de factores de riesgo

Las variables tomadas en cuenta como posibles factores de riesgo fueron edad, sexo, raza, tipo de pastoreo, tipo de nutrición, suministro de sal, fertilización con heces, cuarentena, desparasitación y presencia de moluscos o caracoles en las praderas. Se encontró una significancia estadística ($P < 0.05$) entre las diferentes categorías de edad, la raza, el tipo de nutrición y la cuarentena en los animales (Tabla 2). Se halló como factores de riesgo la edad de 3 a 5 años (OR=9,07; 95% IC= 2,65- 31,03), la raza criolla (OR=2,33; 95% IC= 1,9- 2,75) y animales cuya alimentación se basó en forraje fresco (OR=12,21; 95% IC= 2,62- 56,84). La variable cuarentena de animales nuevos se encontró como factor de protección (OR=0,27; 95% IC= 0,08- 0,97) de los animales a las infecciones por nematodos pulmonares.

Tabla 2. Análisis de regresión logística de varios factores de riesgo asociados con la presencia de parásitos pulmonares.



Factor de riesgo	Categoría	No muestreados	No (%) positivos	OR Ajustado 95% IC	P valor
Edad	3-5 años	138	8 (5,8)	9,07 (2,65- 31,03)	0,0000
Raza	Criolla	575	31(5,4)	2,33 (1,9- 2,75)	0,001
Nutrición	Forraje fresco	448	17(3,8)	12,21 (2,62-56,84)	0,001
Cuarentena	Si	257	7(2,7)	0,27(0,08- 0,97)	0,046

3.5 Hallazgos moleculares

Se detectaron secuencias de ADN del gen ITS-2 para los especímenes adultos usados como controles positivos. Se obtuvo secuencias de 280pb, un primer BLAST mostró un porcentaje de identidad del 97,45% a *H. contortus* y secuencias de 420pb con un porcentaje de identidad del 96,85% a *C. ocreatus*. No se lograron amplificar secuencias de la región ITS-2 para los individuos adultos de *D. filaria* y *D. viviparus* que fueron usados como controles.

4. Discusión

4.1 Prevalencia

Tres especies de nematodos pulmonares fueron identificadas en ovinos y caprinos de la provincia norte de Boyacá, *D. filaria*, *M. capillaris* y *P. rufescens*. Estos hallazgos concuerdan con otros trabajos que describen éstas especies como las más importantes y de mayor distribución en pequeños rumiantes (Adugna et al., 2014). Este estudio se considera el primer reporte en el país para *M. capillaris* y *P. rufescens*, ya que *D. filaria* ha sido previamente reportado en estudios desarrollados a pequeña escala. Se encontró una prevalencia general del 4,7% de nematodos pulmonares, siendo significativamente baja con respecto a prevalencias reportadas a nivel mundial. Se puede considerar el caso de Etiopía, donde se ha desarrollado una parte importante de los trabajos existentes en el mundo acerca de la infección por nematodos pulmonares en pequeños rumiantes, las prevalencias reportadas se encuentran desde el 25,6% hasta el 67,7% (Alemu, Leykun, Ayelet, & Zeleke, 2006; Moges, Bogale, & Chanie, 2011).

Prevalencias más bajas han sido encontradas en el noroeste de España, Irán y Algeria, con valores del 11,6%, 10,8% y 22%, respectivamente (Borji et al., 2012; López, Fernández, Viña, Cienfuegos, Panadero, Vázquez, Díaz, Pato, Lago, Dacal, Díez-Baños, et al., 2011; Mokhtaria et al., 2014). La gran variación en estos valores puede deberse al método de diagnóstico utilizado, ya que algunos de estos estudios fueron realizados mediante examinación post-mortem, lo cual permite mayores hallazgos parasitológicos y por lo tanto aumento en las prevalencias de nematodos pulmonares con respecto al diagnóstico por examinación coprológica.

Además, puede estar asociado al estado nutricional, nivel de inmunidad, sistema de explotación, lluvia, humedad, temperatura y altitud que pueden variar en las diferentes zonas geográficas entre los lugares de estudio, lo que permite que haya una diferencia significativa en los valores de prevalencia, para el caso de Colombia y específicamente el departamento de Boyacá, se tienen condiciones



medioambientales adecuadas para completar los ciclos biológicos y permitir la supervivencia de huéspedes intermediarios como caracoles y babosas, que son vitales en el ciclo de vida de los protostrongílidos (Borji et al., 2012).

Se encontró que la prevalencia de nematodos fue más alta en caprinos (5,3%) que en ovinos (3,6%), lo cual concuerda con estudios realizados por Fentahun et al., (2016) y Domke et al., (2013). Cuando se revisan los hábitos alimenticios de cada especie, se encuentra que las cabras recorren mayores distancias en busca de diversidad forrajera para su alimentación, lo que hace que estén menos expuestas a los nematodos que se encuentran contaminando las praderas. Sin embargo, por el deterioro de estas debido a la expansión de actividades agrícolas y la deforestación, estos se han visto obligados a cambiar sus hábitos y pastar junto con los ovinos, llevándolos a presentar la misma exposición a la infección, solo que con baja resistencia respecto a los ovinos que han adquirido una memoria inmunológica por el constante contacto en las pasturas con estos parásitos (Haji, Tilahun, Teshale, & Engedaw, 2016).

La prevalencia de los protostrongílidos *M. capillaris* (44,6%) y *P. rufescens* (50%) fue significativamente mayor que *D. filaria*, lo cual puede deberse a la gran fecundidad de estos nematodos y al hecho de es evidente la existencia de una distribución importante de los hospederos intermediarios que están transmitiendo de manera efectiva estos parásitos. Al parecer la infección por *D. filaria* en los ovinos del departamento no parece ser un serio problema como lo confirma la baja prevalencia tanto en animales jóvenes como adultos, sin embargo, la presencia de este nematodo guarda especial importancia en la contaminación de las pasturas ya que las cabras actúan como portadores de infección para las ovejas susceptibles que pastan en compañía (Regassa et al., 2010).

4.2 Factores de riesgo

El resultado del estudio actual reveló que la edad representa un factor de riesgo para la presentación de nematodos pulmonares, es decir los animales ente 3 y 5 años tienen 9 veces mayor riesgo de presentar estos parásitos (OR=9,07; 95% IC= 2,65- 31,03), esto se debe a que a mayor edad mayor prevalencia principalmente de protostrongílidos como *M. capillaris*, ya que las infecciones por éste nematodo tienden a ser acumulativas en el tiempo, por lo cual los animales mayores pueden presentar signos clínicos como tos y retraso en el crecimiento debido a las fuertes infecciones (Regassa et al., 2010).

Se encontró que los animales de raza criolla tienen 2,3 veces más probabilidad de presentar infección por nemátodos pulmonares (OR=2,33; 95% IC= 1,9- 2,75), lo anterior es posible a que existe un número significativamente mayor de animales de raza criolla con respecto a razas puras en la región. De igual forma los animales que consumen forraje fresco tienen 12,2 veces más probabilidad de infectarse (OR=12,21; 95% IC= 2,62- 56,84), esto debido al contacto con pasturas infectadas donde se encuentra el parásito van a adquirirlo con mayor facilidad, además animales que se encuentran durante todo el año en pastoreo, están expuestos a las variaciones meteorológicas que causan disminución de alimento y posteriormente una afectación en el estado nutricional de los animales (Terefe et al., 2013).



Por otra parte, se encontró que el uso de cuarentena como práctica sanitaria representa un factor de protección a la infección por nematodos pulmonares (OR=0,27; 95% IC= 0,08- 0,97), debido a que zonas de cuarentena definidas en una explotación ayuda a evitar la propagación no solo de agentes parasitarios sino también infecciosos de animales enfermos a sanos, incluso evita una posible transmisión al hombre en caso de existir agentes zoonóticos.

4.3 Hallazgos moleculares

Los estudios de sistemática y diagnóstico molecular de nemátodos pulmonares en pequeños rumiantes son escasos ya que tradicionalmente el diagnóstico es realizado únicamente mediante examinación coprológica usando la técnica de Baerman para identificación de estadios L1 o en su defecto mediante inspección post-mortem (Mokhtaria et al., 2014). La diferenciación de las especies de larvas de los parásitos pulmonares es difícil, particularmente en aquellas que tienen espina dorsal y puede presentarse una considerable similitud morfológica entre especies pulmonares, además de la contaminación que puede existir con nematodos gastrointestinales que han eclosionado durante el montaje de la técnica (Kafle, Lejeune, Verocai, Hoberg, & Kutz, 2015).

Por lo anterior, en busca de estandarizar una técnica de diagnóstico molecular se utilizaron iniciadores que amplifiquen secuencias de rADN de la región espaciadora transcrita interna nuclear 2 (ITS-2) reportados previamente en la literatura como marcadores genéticos utilizados en la construcción de árboles filogenéticos, estimación de estructuras en genética poblacional, evaluación de procesos evolutivos y determinación de identidades taxonómicas (Powers et al., 1997; Ahmadi et al., 2018).

La secuencia de ADN del gen ITS-2 fue detectada en parásitos adultos de *H. contortus* y *C. ocreatus*, así mismo, en muestras de hisopados nasales de ovinos y caprinos que fueron positivos en la examinación coprológica por la prueba de Baerman, sin embargo, de estas últimas no se logró obtener una confirmación por secuenciación del género de nematodo pulmonar involucrado en la infección. No se obtuvo la amplificación de *D. filaria* y *D. viviparus* posiblemente por una degradación del ADN ya que estos especímenes provenían de colecciones parasitológicas que mantenían una manipulación constante y presentaban un tiempo de almacenamiento avanzado, adicionalmente no se logró obtener parásitos adultos de *M. capillaris* debido a que forma nódulos subpleurales grisáceos que oscilan entre menos de 1 mm y varios centímetros de diámetro, generalmente ubicados en la parte dorsal de los lóbulos diafragmáticos, pudiendo estar calcificados y aumentando la dificultad en su aislamiento (Panuska, 2006), por lo tanto no se estandarizó la prueba de PCR con este nematodo de tal forma que se pudieran confirmar los hallazgos positivos que se tuvieron por examinación coprológica.

No se llevaron a cabo pruebas de PCR en los sedimentos positivos obtenidos mediante la técnica de Baerman ya que en estos se presentaba contaminación con otros nematodos de tipo intestinal que eclosionaron durante el montaje de la técnica; también debido a que los datos disponibles sobre el alcance de la variación genética intraespecífica en la secuencia ITS entre nemátodos de



diferentes poblaciones es limitada. Varios estudios han detectado una variación geográfica reducida o nula en la secuencia ITS para algunas especies aunque estos datos a menudo están basados en pequeños tamaños de muestra, por lo tanto el uso de este material hubiera dificultado el diagnóstico de nemátodos pulmonares ya que estos marcadores ITS no siempre se pueden utilizar para distinguir entre todos los nematodos bursados (Chilton, 2004).

Por lo anterior, no fue posible realizar un análisis que permitiera calcular distancias genéticas entre las secuencias de los individuos adultos utilizados para la estandarización de la PCR y las muestras de hisopados nasales que fueron positivas a nematodos pulmonares. A partir de esto, se puede evidenciar la importancia de realizar estudios complementarios que integren identificación morfológica y a su vez técnicas con enfoques moleculares posiblemente partiendo del diseño de iniciadores específicos para nematodos de tipo pulmonar que permitan realizar el diagnóstico y la descripción sistemática de los nematodos pulmonares, de tal forma que se pueda proporcionar información importante sobre la diversidad de estos parásitos en la región.

Referencias

- Abo-Shehada, M. N., Batainah, T., Abuharfeil, N., & Torgerson, P. R. (2003). Oestrus ovis larval myiasis among goats in northern Jordan. *Preventive Veterinary Medicine*, 59(1–2), 13–19. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00058-8](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00058-8)
- Adugna, M., Afera, B., & Berhe, N. (2014). Prevalence of ovine lungworms in and around Wukro, Tigray Region, Ethiopia. *Global Veterinaria*, 12(4), 474–478. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2014.12.04.8322>
- Ahaduzzaman, M. (2019). The global and regional prevalence of oestrosis in sheep and goats: a systematic review of articles and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, 12(1), 346. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3597-2>
- Ahmadi, N., Rakhshandehroo, E., & Khadivimanesh, V. (2018). Cystocaulus ocreatus (Nematoda: Protostrongylidae) as an ovine lungworm: Molecular diagnosis and histopathological aspects. *Small Ruminant Research*, 169(August), 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.08.019>
- AL-Ubeidi, N., ALani, A., & Al-kennany E. (2017). DETECTION OF NASAL BOT FLY LARVAE IN SLAUGHTERED SHEEP OF NINEVAH GOVERNORATE – IRAQ. *Bas.J.Vet.Res.*, 16(2), 240–247.
- Alcaide, M., Reina, D., Frontera, E., & Navarrete, I. (2005). Epidemiology of Oestrus ovis (Linneo, 1761) infestation in goats in Spain. *Veterinary Parasitology*, 130(3–4), 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.03.022>
- Alem, F., Kumsa, B., & Degefu, H. (2010). Oestrus ovis larval myiasis among sheep and goats in Central Oromia, Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 42(4), 697–703. <https://doi.org/10.1007/s11250-009-9477-6>



- Alemu, S., Leykun, E. G., Ayelet, G., & Zeleke, A. (2006). Study on small ruminant lungworms in northeastern Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, 142(3–4), 330–335. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.008>
- Anderson, R. C. (2000). *Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission (2nd edn)*. *Parasitology Today* (Vol. 16). [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01712-9](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01712-9)
- Angulo-Valadez, C. E., Ascencio, F., Jacquiet, P., Dorchies, P., & Cepeda-Palacios, R. (2011). Sheep and goat immune responses to nose bot infestation: A review. *Medical and Veterinary Entomology*, 25(2), 117–125. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00911.x>
- Angulo-Valadez, C. E., Cepeda-Palacios, R., Ascencio, F., Jacquiet, P., Dorchies, P., Ramírez-Orduña, J. M., & López, M. A. (2009). IgG antibody response against salivary gland antigens from *Oestrus ovis* L. larvae (Diptera: Oestridae) in experimentally and naturally infected goats. *Veterinary Parasitology*, 161(3–4), 356–359. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.01.027>
- Arsenos, G., Fortomaris, P., Papadopoulos, E., Sotiraki, S., Stamataris, C., & Zygoiannis, D. (2009). Growth and meat quality of kids of indigenous Greek goats (*Capra prisca*) as influenced by dietary protein and gastrointestinal nematode challenge. *Meat Science*, 82(3), 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.01.028>
- Bauer, C., Steng, G., Prevot, F., & Dorchies, P. (2002). Seroprevalence of *Oestrus ovis* infection in sheep in southwestern Germany. *Veterinary Parasitology*, 110(1–2), 137–143. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00317-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00317-5)
- Benavides, E. (2013). *Técnicas para el diagnóstico de endoparásitos de importancia veterinaria* (Primera). Bogotá, Colombia: Universidad de la Salle.
- Berrag, B., & Cabaret, J. (1996). Impaired pulmonary gas exchange in ewes naturally infected by small lungworms. *International Journal for Parasitology*, 26(12), 1397–1400.
- Beyene, D., Nigussie, S., Ayana, D., & Abunna, F. (2013). The prevalence of lungworms in naturally infected sheep of ambo district, oromia, Ethiopia. *Global Veterinaria*, 10(1), 93–98. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2013.10.1.71184>
- Bloor, P., Ibáñez, C., & Vilorio-Lagares, T. A. (2015). Mitochondrial DNA analysis reveals hidden genetic diversity in captive populations of the threatened American crocodile (*Crocodylus acutus*) in Colombia. *Ecology and Evolution*, 5(1), 130–140. <https://doi.org/10.1002/ece3.1307>
- Borji, H., Azizzadeh, M., Ebrahimi, M., & Asadpour, M. (2012). Study on small ruminant lungworms and associated risk factors in northeastern Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(11), 853–856.



[https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60159-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60159-X)

- Bosly, H. (2018). Molecular identification studies on *Oestrus ovis* L. (Diptera: Oestridae) larvae infested sheep in jazan region, Saudi Arabia. *Indian Journal of Animal Research*, 52(1), 105–110.
<https://doi.org/10.18805/ijar.v0i0F.8487>
- Bowman, D. (2011). *Georgies Parasitologia para veterinarios*. ESPAÑA: ELSEVIER ESPAÑA.
- Chaparro, J. J., Ramírez, N. F., Villar, D., Fernandez, J. A., Londoño, J., Arbeláez, C., ... Olivera, M. (2016). Survey of gastrointestinal parasites, liver flukes and lungworm in feces from dairy cattle in the high tropics of Antioquia, Colombia. *Parasite Epidemiology and Control*, 1(2), 124–130.
<https://doi.org/10.1016/j.parepi.2016.05.001>
- Chilton, N. B. (2004). The use of nuclear ribosomal DNA markers for the identification of bursate nematodes (order Strongylida) and for the diagnosis of infections. *Animal Health Research Reviews*, 5(2), 173–187.
<https://doi.org/10.1079/ahr200497>
- Chilton, N. B., Hubby-Chilton, F., & Gasser, R. B. (2003). First complete large subunit ribosomal RNA sequence and secondary structure for a parasitic nematode: Phylogenetic and diagnostic implications. *Molecular and Cellular Probes*, 17(1), 33–39. [https://doi.org/10.1016/S0890-8508\(02\)00107-X](https://doi.org/10.1016/S0890-8508(02)00107-X)
- Choque-fernández, C., Loza-murguía, M., VINO-nina, N., & Coria-conde, L. (2017). *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) un importante ectoparásito en ovinos de cuatro cantones del municipio de Sorata provincia Larecaja, departamento de La Paz *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) an important ectoparasite in sheep of four cantons of the. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 4(1), 3–12.
- Cordero Del Campillo, M; Rojo-Vázquez, F. (2002). *Parasitología Veterinaria* (Tercera Ed). Madrid, España: Mc Graw-Hill Interamericana.
- Couppié, P., Roussel, M., Rabarison, P., Sockeel, M., Sainte-Marie, D., Marty, C., & Carme, B. (2005). Nosocomial nasal myiasis owing to *Cochliomyia hominivorax*: A case in French Guiana. *International Journal of Dermatology*, 44(4), 302–303. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord%7B%7Dfrom=export%7B%7Ddid=L40542146%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4632.2004.02547.x>
- da Silva, B. F., Bassetto, C. C., & do Amarante, A. F. T. (2012). Epidemiology of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) in sheep in Botucatu, State of São Paulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Órgão Oficial Do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 21(4), 386–390. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23295819>
- Dhishonin, S. M., Babu, R. N., Ramani, R., Porteen, K., Rao, V. A., Abraham, R.



- J. J., ... Govind, V. (2017). A Survey of Disease Conditions in Sheep and Goats Slaughtered at Coimbatore District Slaughter House , Tamil Nadu , India, 6(10), 3692–3699.
- Díaz Anaya, A. M., Arias González, H., García Corredor, D. J., & Pulido Medellín, M. O. (2014). Estimacion de los valores de hematocrito y hemoglobina en presencia de *Haemonchus* sp, en ovinos de Oicata , Colombia. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV.*, 55(1), 18–24. Retrieved from <http://www.scielo.org.ve/pdf/rfvc/v55n1/art04.pdf>
- Domke, A. V. M., Chartier, C., Gjerde, B., Leine, N., Vatn, S., & Stuen, S. (2013). Prevalence of gastrointestinal helminths, lungworms and liver fluke in sheep and goats in Norway. *Veterinary Parasitology*, 194(1), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.023>
- Dorchies, P., Duranton, C., & Jacquiet, P. (1998). Pathophysiology of *Oestrus ovis* infection in sheep and goats: a review. *Veterinary Record*, 142(18), 487–489. <https://doi.org/10.1136/vr.142.18.487>
- Fasih, N., Qaiser, K. N., Bokhari, S. A., Jamil, B., & Beg, M. A. (2014). Human ophthalmomyiasis externa caused by the sheep botfly *Oestrus ovis*: a case report from Karachi, Pakistan. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(10), 835–837. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C901>
- Fentahun, S., Abebe, R., Melkamu, S., & Asrat, M. (2016). Study on lungworm infection in small ruminants : Prevalence and risk factors in and around Gondar. *International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry*, 1(2), 47–52.
- Forero, E. G. (2011). Miasis en salud pública y salud pública veterinaria. *Una Salud. Revista Sapuvet de Salud Publica*, 2(45), 95–132. Retrieved from <http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/us/article/viewFile/146/91>
- Fthenakis, G. C., Mavrogianni, V. S., Gallidis, E., & Papadopoulos, E. (2015). Veterinary Parasitology Interactions between parasitic infections and reproductive efficiency in sheep. *Veterinary Parasitology*, 208(1–2), 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.017>
- Fthenakis, G. C., & Papadopoulos, E. (2018). Impact of parasitism in goat production. *Small Ruminant Research*, 163(March 2017), 21–23. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.04.001>
- Gasser, R. B. (2006). Molecular tools - Advances, opportunities and prospects. *Veterinary Parasitology*, 136(2), 69–89. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.12.002>
- Gasser, R. B., Bott, N. J., Chilton, N. B., Hunt, P., & Beveridge, I. (2008). Toward practical, DNA-based diagnostic methods for parasitic nematodes of livestock - Bionomic and biotechnological implications. *Biotechnology Advances*, 26(4), 325–334. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.03.003>
- Gasser, R. B., Chilton, N. B., Hoste, H., & Beveridge, I. (1993). Rapid sequencing of rDNA from single parasitic helminths. *Nucleic Acids Research*, 21(10),



2525–2526.

- Gasser, R. B., Jabbar, A., Mohandas, N., Höglund, J., Hall, R. S., Littlewood, D. T. J., & Jex, A. R. (2012). Assessment of the genetic relationship between *Dictyocaulus* species from *Bos taurus* and *Cervus elaphus* using complete mitochondrial genomic datasets. *Parasites & Vectors*, 5(1), 241. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-241>
- González, A., Berumen, A., Mayo, E., & Vera, G. (2010). *Diagnóstico Clínico del Ovino*. Retrieved from <http://www.archivos.ujat.mx/2011/difusion/libros/9.pdf>
- Gouÿ de Bellocq, J., Ferté, H., Depaquit, J., Justine, J. L., Tillier, a, & Durette-Desset, M. C. (2001). Phylogeny of the Trichostrongylina (Nematoda) inferred from 28S rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19(3), 430–442. <https://doi.org/10.1006/mpev.2001.0925>
- Grisez-Duranton, C., Dorchies, P., Jourdane, J., & Durand, P. (2002). Genetic structure of *Oestrus ovis* populations in sheep and goats. *Veterinary Parasitology*, 104, 167–173.
- Haji, M., Tilahun, A., Teshale, A., & Engedaw, D. (2016). Study on Lungworm and Associated Risk Factors of Small Ruminants in Hitosa Woreda, Ethiopia. *Global Veterinaria*, 17(4), 303–309. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2016.17.04.104162>
- Hansen, J., & Perry, B. (1994). *The epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of ruminants*. Nairobi, Kenya: International Laboratory for Research on Animal Diseases. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=1996/XF/XF96009.xml;XF9652615>
- Hidalgo, A., Palma, H., Oberg, C., Fonseca-Salamanca, F., Hidalgo, A., Palma, H., ... Fonseca-Salamanca, F. (2015). *Oestrus ovis* infection of grazing sheep during summer in southern Chile. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(6), 497–500. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000600002>
- İpek, D. N. S., & Altan, S. (2017a). Use of semi-nested PCR and rhinoscopy for the diagnosis of oestrosis. *Small Ruminant Research*, 150, 76–79. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.03.006>
- İpek, D. N. S., & Altan, S. (2017b). Use of semi-nested PCR and rhinoscopy for the diagnosis of oestrosis. *Small Ruminant Research*, 150, 76–79. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.03.006>
- Kafle, P., Lejeune, M., Verocai, G. G., Hoberg, E. P., & Kutz, S. J. (2015). Morphological and morphometric differentiation of dorsal-spined first stage larvae of lungworms (Nematoda: Protostrongylidae) infecting muskoxen (*Ovibos moschatus*) in the central Canadian Arctic. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(3), 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.05.003>
- Kassa, T., Alemneh, T., & Akeberegn, D. (2017). Small Ruminant Lungworms : Parasite detection , identification and prevalence estimation in Three Districts of South Wollo , Ethiopia. *Journal of Animal Science and Veterinary*



Medicine, 2, 15–22.

- Kassai, T. (2002). *Helminthologia Veterinaria*. ESPAÑA: Acribia S.A.
- Knox, M. R., Torres-Acosta, J. F. J., & Aguilar-Caballero, A. J. (2006). Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 139(4), 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.026>
- Kouam, M. K., Diakou, A., Kantzoura, V., Feidas, H., Theodoropoulou, H., & Theodoropoulos, G. (2014). An analysis of seroprevalence and risk factors for parasitic infections of economic importance in small ruminants in Greece. *Veterinary Journal*, 202(1), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.07.011>
- Kuchboev, Abdurakhim E, Krücken, J., Ruziev, B. H., & von Samson-Himmelstjerna, G. (2015). Molecular phylogeny and diagnosis of species of the family Protostrongylidae from caprine hosts in Uzbekistan. *Parasitol Res*, 114(4), 1355–1364. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4313-6>
- Kuchboev, Abdurakhim Ergashevich, & Hoberg, E. P. (2011). Morphological and ultrastructural changes in tissues of intermediate and definitive hosts infected by Protostrongylidae. *Turkish Journal of Zoology*, 35(1), 1–7. <https://doi.org/10.3906/zoo-0903-8>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- López, C. M., Fernández, G., Viña, M., Cienfuegos, S., Panadero, R., Vázquez, L., ... Morrondo, P. (2011). Protostrongylid infection in meat sheep from Northwestern Spain: Prevalence and risk factors. *Veterinary Parasitology*, 178(1–2), 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.038>
- López, C. M., Fernández, G., Viña, M., Cienfuegos, S., Panadero, R., Vázquez, L., ... Morrondo, P. (2011). Veterinary Parasitology Protostrongylid infection in meat sheep from Northwestern Spain : Prevalence and risk factors. *Veterinary Parasitology*, 178, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.038>
- Matos Moya, V., Rodríguez, D., Alfonso, P., Pérez, J. M., & Olivares, J. (2012). Morfometría de larvas de *Oestrus ovis* (Diptera : Oestridae) de ovinos , en Cuba. *Rev. Salud Anim*, 34(3), 184–187.
- Matos, V., Rodríguez Diego, J. G., Alfonso, P., & Olivares, J. L. (2013). *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae): un importante ectoparásito de los ovinos en Cuba. *Revista de Salud Animal*, 35(2), 79–88.
- Moges, N., Bogale, B., & Chanie, M. (2011). *Dictyocaulus filaria* and *Muellerius capillaris* are important lungworm parasites of sheep in Wogera district, northern Ethiopia. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*, 3(6), 465–468. Retrieved from <http://maxwellsci.com/print/ijava/v3-465-468.pdf>



- Mokhtaria, K., Sidi, S., Ammar, M., & Aboud, B. (2014). Lungworm Infections in Sheep Slaughtered in Tiaret Abattoir (Algeria). *Global Veterinaria*, 13(4), 530–533. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2014.13.04.85207>
- Morales, G., & Pino, L. A. (2009). *Nematodos parásitos de los rumiantes domésticos en Venezuela, diagnóstico y control* (Primera). Caracas, Venezuela: Laboratorio de diagnóstico veterinario Alíani.
- Moreno, V., Romero-Fernández, I., Marchal, J. A., Beltrán, M., Granados, J. E., Habela, M. A., ... Sánchez, A. (2015). Molecular characterization of bot flies, *Oestrus* spp., (Diptera, Oestridae), from domestic and wild Bovidae hosts. *Veterinary Parasitology*, 212(3–4), 473–477. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.002>
- Negm-Eldin, M., Elmadawy, R., & Hanan, G. (2015). *Oestrus ovis* larval infestation among sheep and goats of Green Mountain areas in Libya. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 2(4), 382. <https://doi.org/10.5455/javar.2015.b105>
- Ortega-Muñoz, G., Luzuriaga-Neira, N., Salazar-Silva, R., & Rodríguez-Hidalgo, R. (2019). *Oestrus ovis* in Ecuador: Importance in the Andean sheep farming. *Veterinary World*, 12(4), 522–526. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.522-526>
- Otranto, D, Traversa, D., Guida, B., Tarsitano, E., Fiorente, P., & Stevens, J. R. (2003). Molecular characterization of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene of *Oestridae* species causing obligate myiasis. *Medical and Veterinary Entomology*, 17(3), 307–315. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2003.00442.x>
- Otranto, Domenico, & Stevens, J. R. (2002). Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. *International Journal for Parasitology*, 32, 1345–1360. <https://doi.org/papers://B79588E5-2CC1-4C57-804E-28592FC88A1E/Paper/p5937>
- Özdal, N., Tanritanir, P., İlhan, F., & Değer, S. (2016). The prevalence of ovine oestrosis (*Oestrus ovis* Linnaeus, 1761, Diptera: Oestridae) and risk factors in Eastern Turkey. *Veterinarski Arhiv*, 86(3), 323–333.
- Panayotova-Pencheva, M. S. (2011). Species composition and morphology of protostrongylids (Nematoda: Protostrongylidae) in ruminants from Bulgaria. *Parasitology Research*, 109(4), 1015–1020. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2337-0>
- Panuska, C. (2006). Lungworms of Ruminants. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 22(3), 583–593. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2006.06.002>
- Papadopoulos, E., Prevot, F., Diakou, A., & Dorchies, P. (2006). Comparison of infection rates of *Oestrus ovis* between sheep and goats kept in mixed flocks. *Veterinary Parasitology*, 138(3–4), 382–385. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.02.023>



- Papadopoulos, Elias, Chaligiannis, I., & Morgan, E. R. (2010). Epidemiology of *Oestrus ovis* L. (Diptera: Oestridae) larvae in sheep and goats in Greece. *Small Ruminant Research*, 89(1), 51–56.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.004>
- Pape T, Wolff M, A. E. (2014). Los califóridos, éstridos, rinofóridos y sarcófagidos (Diptera: Calliphoridae, Oestridae, Rhinophoridae, Sarcophagidae) de Colombia. *Biota Colombiana*, 5(2), 201–208.
- Perry, B. D., & Randolph, T. F. (1999). Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals. *Veterinary Parasitology*, 84(3–4), 145–168.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00040-0)
- Powers, T. O., Todd, T. C., Burnell, A. M., Murray, P. C., Fleming, C. C., Szalanski, A. L., ... Harris, T. S. (1997). The rDNA Internal Transcribed Spacer Region as a Taxonomic Marker for Nematodes. *Journal of Nematology*, 29(4), 441–450. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19274180>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2619808>
- Pulido medellín, M. O., García corredor, D., Díaz anaya, A., & Andrade becerra, R. (2014). Pesquisa de parásitos gastrointestinales en pequeñas explotaciones ovinas. *Rev. Salud Anim.*, 36(1), 65–69. Retrieved from
<http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v36n1/rsa12114.pdf>
- Regassa, A., Toyeb, M., Abebe, R., Megersa, B., Mekibib, B., Mekuria, S., ... Abunna, F. (2010). Lungworm infection in small ruminants: Prevalence and associated risk factors in Dessie and Kombolcha districts, northeastern Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, 169(1–2), 144–148.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.010>
- Roeber, F., Jex, A. R., & Gasser, R. B. (2013). Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1135–1152.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.008>
- Saleem, T., Katoch, R., Yadav, A., Mir, I. A., Godara, R., & Ahamed, I. (2017). Prevalence of ovine oestrosis in Plain and Kandi areas of Jammu, North India, 6(2), 1117–1122.
- Sánchez, A., Caparrós, N., Ostrowski, S., Sarasa, M., & Pérez, J. M. (2017). Oestrosis in Asiatic ibex (*Capra sibirica*): a case report and molecular characterization of larvae. *Veterinary Parasitology*, 236, 55–57.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.003>
- Sargison, N. D. (2016). Keys to solving health problems in small ruminants: Anthelmintic resistance as a threat to sustainable nematode control. *Small Ruminant Research*, 142, 11–15.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.02.021>
- Sarmiento, R. (2001). *Semiologia clinica veterinaria*. (UDCA, Ed.) (Primera).



Bogotá, Colombia.

- Shite, A., Admassu, B., & Yenew, A. (2015). Bovine Dictyocaulosis: A Review. *European Journal of Biological Sciences*, 7(3), 125–131. <https://doi.org/10.5829/idosi.ejbs.2015.7.03.9515>
- Shoorijeh, J. S., Tamadon, a., Negahban, S., & Behzadi, M. a. (2011). Učestalost kukca Oestrus ovis u koza u Shirazu u Južnom Iranu. *Veterinarski Arhiv*, 81(1), 43–49. Retrieved from http://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=99466
- Smillie, I., Gubbi, P. K. S., & Cocks, H. C. (2010). Nasal and ophthalmomyiasis: Case report. *Journal of Laryngology and Otology*, 124(8). <https://doi.org/10.1017/S0022215109992714>
- Strube, C., Springer, A., Schunn, A. M., & Forbes, A. B. (2017). Serological lessons from the bovine lungworm Dictyocaulus viviparus: Antibody titre development is independent of the infection dose and reinfection shortens seropositivity. *Veterinary Parasitology*, 242(March), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.023>
- Suarez, V., Bertoni, E., Micheloud, J., Cafrune, M., Viñabal, A., Quiroga Roger, J., & Bassanetti, A. (2014). First record of Muellerius capillaris (Nematoda, Protostrongylidae) in northwestern Argentina. *Helminthologia*, 51(4), 288–292. <https://doi.org/10.2478/s11687-014-0243-6>
- Tabouret, G., Prevot, F., Bergeaud, J. P., Dorchie, P., & Jacquiet, P. (2001). Oestrus ovis (Diptera: Oestridae): Sheep humoral immune response to purified excreted/secreted salivary gland 28 kDa antigen complex from second and third instar larvae. *Veterinary Parasitology*, 101(1), 53–66. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00501-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00501-5)
- Tabouret Guillaume, Lacroux Caroline, Andreoletti Olivier, Bergeaud Jean Paul, Hailu-Tolosa Yacob, Hoste Hervé, Prevot Françoise, Grisez Christelle, Dorchie Philippe, J. P. (2003). Cellular and humoral local immune responses in sheep experimentally infected with Oestrus ovis (Diptera: Oestridae). *Veterinary Research*, 34, 231–241. <https://doi.org/10.1051/vetres>
- Tai, R., Marsh, M. A., Rao, R., Kurniali, P. C., DiNino, E., & Meharg, J. V. (2011). Nasal myiasis caused by Cochliomyia hominivorax in the United States: A case report. *American Journal of Infectious Diseases*, 7(4), 107–109. <https://doi.org/10.3844/ajidsp.2011.107.109>
- Terefe, Y., Tafess, K., Fekadie, G., & Kebede, N. (2013). Prevalence of lungworm infection in small ruminants in North Gondar zone, Amhara National Regional State, 5(April), 40–45. <https://doi.org/10.5897/JPVB20>
- Thienpont, D., Rochette, F., & Vanparijs, O. (1986). *Dignóstico de lashelminthiasis por medio del examen coprológico* (Segunda). Beerse, Bélgica: Janssen Research Foundtion.
- Ueno, H., & Gonçalves, P. C. (1998). Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminante. Retrieved from



<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:manual+para+diagnostico+das+helminthoses+de+ruminantes#0>

- URQUHART, G. ., ARMOUR, J., DUNCAN, J. ., DUNN, A. ., & JENNINGS, F. . (2001). *Parasitología veterinaria* (Segunda Ed). ESPAÑA: ED. ACRIBIA.
- Van Wyk, J. A., Cabaret, J., & Michael, L. M. (2004). Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. *Veterinary Parasitology*, 119(4), 277–306. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.11.012>
- Vargas-Duarte, J. J., Lozano-Márquez, H., Grajales-Lombana, H. A., Manrique-Perdomo, C., Martínez-Bello, D. A., Saegerman, C., ... Kirschvink, N. (2015). Effect of Moxidectin Treatment at Peripartum on Gastrointestinal Parasite Infections in Ewes Raised under Tropical Andes High Altitude Conditions. *Veterinary Medicine International*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/932080>
- Vasconcelos, T. C., Macêdo, J. T. S. A., Silva, A., Silva, M. M. N., Bittencourt, T. C. C., Santos, M. V. B., ... Pedrosa, P. M. O. (2016). Oestrose: uma parasitose emergente em pequenos ruminantes no Nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36(10), 925–929. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2016001000001>
- Verschave, S. H., Charlier, J., Rose, H., Claerebout, E., & Morgan, E. R. (2016). Cattle and Nematodes Under Global Change: Transmission Models as an Ally. *Trends in Parasitology*, 32(9), 724–738. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.018>
- Yacob, H. T., Jacquiet, P., Prevot, F., Bergeaud, J. P., Bleuart, C., Dorchies, P., & Hoste, H. (2004). Examination of the migration of first instar larvæ of the parasite *Æstrus ovis* (Linne 1761) [Diptera: *Æstridæ*] in the upper respiratory tract of artificially infected lambs and daily measurements of the kinetics of blood eosinophilia and mucosal inflammat. *Veterinary Parasitology*, 126(3), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.06.026>
- Zhang, D., & Hewltl, G. M. (1997). Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrialCOI primers in insects. *Insect Molecular Biology*, 6(2), 143–150.



CONCLUSIONES

- Se encontró una prevalencia general de nematodos pulmonares de 4,7% identificándose tres especies de nematodos pulmonares en ovinos y caprinos de la provincia norte de Boyacá, *Dictyocaulus filaria*, *Muellerius capillaris* y *Protostrongylus rufescens*.
- Se logró identificar secuencia de ADN del gen ITS-2 en parásitos pulmonares adultos y muestras de moco nasal, estas secuencias servirán para afianzar los conocimientos e investigaciones en identificación molecular de estos parásitos las cuales son reducidas a nivel mundial.
- La técnica de PCR para identificación molecular es una herramienta de diagnóstico que podría permitir la diferenciación de nematodos pulmonares a nivel de género y especie a partir del conocimiento específicos de las secuencias.

- Se realizó por primera vez la detección molecular de *Oestrus ovis* en Colombia mediante la amplificación de gen de COI,
- Se encontraron secuencias de ADN compatibles con *C. hominivorax*, cuyas larvas de este díptero son responsables de causar miasis principalmente de tejidos o mucosas lesionadas, sin embargo se hallaron en moco nasal de pequeños rumiantes.
- El uso de herramientas moleculares de diagnóstico para *Oestrus ovis* puede proveer información relacionada con el origen geográfico de los animales con el fin de poder profundizar en el conocimiento de la eco-epidemiología de éste díptero.
- Se evidenciaron diferencias nucleotídicas incluso entre las secuencias provenientes de animales positivos de la misma región. Se observó en las muestras positivas a *O. ovis* una agrupación por especie, en un clado se observaron las muestras positivas en ovinos y en otras muestras positivas a caprinos, lo que concuerda con algunas investigaciones acerca de una circulación de cepas diferentes del díptero ente ovinos y caprinos de la misma región.



RECOMENDACIONES

- Es necesario la realización de mayores análisis de secuencias de ADN de nematodos pulmonares con el fin de diseñar primers específicos para diagnóstico por género de éstos.
- Se requieren más investigaciones de tipo molecular en *Dictyocaulus filaria* el cual afecta únicamente a pequeños rumiantes, ya que la mayoría de estudios se han enfocado en *Dictyocaulus viviparus* que afecta a ganado bovino.
- Debido al hallazgo de *Muellerius capillaris* y *Protostrongylus rufescens* en la población ovino-caprina del departamento, es necesario estudiar los hospederos intermediarios como caracoles y babosas, así mismo sus condiciones ecológicas que permiten que estén presentes en el ambiente.
- Se recomiendan mayores estudios de diagnóstico in vivo de *Oestrus ovis* que involucren la identificación y confirmación post mortem de infestación por larvas del díptero con el fin de mejorar pruebas de identificación y caracterización de tipo molecular en este parásito.