



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS  
EXPERIMENTALES  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
ANIMAL, BIOLOGÍA VEGETAL Y  
ECOLOGÍA**

**TESIS DOCTORAL  
BIOLOGÍA DE *Oestrus sp.* (Diptera:  
Oestridae) PARÁSITO DE LA CABRA  
MONTÉS DEL PARQUE NATURAL DE  
SIERRA NEVADA**

**PRESENTADA POR:  
VIRGINIA MORENO MARTÍNEZ**

**DIRIGIDA POR:  
DR. D. ANTONIO SÁNCHEZ BACA  
DR. D. JESÚS M<sup>a</sup> PÉREZ JIMÉNEZ  
DR. D. FRANCISCO J. ESTEBAN RUÍZ**

**JAÉN, 8 DE FEBRERO DE 2016**

**ISBN 978-84-16819-57-7**





**UNIVERSIDAD DE JAÉN**

**FACULTAD DE CIENCIA EXPERIMENTALES  
BIOLOGÍA ANIMAL, BIOLOGÍA VEGETAL Y  
ECOLOGÍA**

**TESIS DOCTORAL**



**BIOLOGÍA DE *Oestrus sp.* (Diptera: Oestridae)  
PARÁSITO DE LA CABRA MONTÉS DEL PARQUE  
NATURAL DE SIERRA NEVADA**



**PRESENTADA POR:  
VIRGINIA MORENO MARTÍNEZ**

**DIRIGIDA POR:  
ANTONIO SÁNCHEZ BACA    JESÚS M<sup>a</sup> PÉREZ JIMÉNEZ  
FRANCISCO J. ESTEBAN RUÍZ**

**JAÉN, FEBRERO 2016**

**ISBN**



**Tesis Doctoral**  
**La presente tesis doctoral titulada:**

**BIOLOGÍA DE *Oestrus sp.* (Diptera: Oestridae)  
PARÁSITO DE LA CABRA MONTÉS DEL PARQUE  
NATURAL DE SIERRA NEVADA**

**Ha sido realizada por Virginia Moreno Martínez para aspirar al  
título de Doctor, bajo nuestra dirección en los departamentos de  
Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología y Biología  
Experimental de la Universidad de Jaén (España).**



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**

**Revisado el texto, estamos conformes con su presentación para  
su defensa y evaluación.**

**Jaén a 10 diciembre de 2015**

**Dr. Antonio Sánchez Baca Dr. Jesús M<sup>a</sup> Pérez Jiménez Dr. Francisco J. Esteban Ruíz**



**Este estudio ha sido financiado por el Instituto Nacional de Agricultura, Investigación y Tecnología de Alimentos (INIA), Madrid (proyecto: FAU2008-00010-00-00) y por la Universidad de Jaén (proyecto: RFC/PP2008/UJA\_68\_16\_22). Esta actividad es parcialmente compatible con el Plan Andaluz de Investigación Científica (PAI) (grupos de investigación RNM-118 y BIO-220).**

**Las actividades de investigación incluidas en este trabajo compilan las leyes andaluzas y españolas con respecto a la experimentación animal y el bienestar.**



Para mis tres promesas:

A mi hijo, prometí cuidarte y a veces eres tú el que me cobijas.  
A mi marido, por prometerte un siempre y un lazo en un cordel amarillo.  
A mi ángel de la guarda, donde quiera que estés, promesa cumplida.



## AGRADECIMIENTOS

La Tesis Doctoral, se convierte para los doctorandos en toda una experiencia vital que trasciende más allá de los límites del laboratorio. En mi caso, se ha convertido en mi mochila personal durante muchos años. Años en los que han pasado cosas y cambios alucinantes a mí alrededor y ella iba pegada a mi espalda adaptándose a cada una de las situaciones. Durante este periodo tiempo, muchas son las personas que de una forma u otra han contribuido a que este proyecto sea una realidad y quiero agradecer todo lo que me han aportado.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores, los doctores D. Francisco José Esteban Ruíz, D. Jesús M<sup>º</sup> Pérez Jiménez y a D. Antonio Sánchez Baca, todo el esfuerzo y tiempo que han dedicado a este trabajo. Ellos, me han enseñado a disfrutar la biología, me han guiado en todo momento y me han demostrado que con tesón es posible conseguir hacer un buen trabajo.

Gracias también a D. Ismael Romero-Fernández y Dr. D. Juan A Marchal (Departamento de Biología Experimental; Universidad de Jaén); Dr. D. Miguel A Habela (Departamento de Parasitología y Enfermedades Parásitas, Universidad de Extremadura); Dr. D. Amin Tamadon (Division of Animal Health Management, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran) por su inestimable ayuda en la realización de la parte experimental del estudio.

Gracias a la Dra. D<sup>ª</sup>. María Sol Arias (Departamento de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela); Dr. D. Adolfo Paz-Silva, Dra. D<sup>ª</sup>. Rita Sánchez-Andrade, Dra. D<sup>ª</sup>. Patrocinio Morrondo, Dr. D. Pablo Díez-Baños (Grupo Biología de las Especies Cinegéticas y Plagas); Dr. D. Mathieu Sarasa (Federation Nationale des Chasseurs, Issy les Moulineaux Cedex, France) por su ayuda y colaboración en todo momento.

Por otro lado, no puede faltar mi agradecimiento a los doctores D. Juan Navas y D. José M Quesada (Departamento de Matemáticas, Universidad de Jaén) y a la Dra.

D<sup>a</sup>.Nieves Vélez de Mendizábal (Division of Clinical Pharmacology, Department of Medicine, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, USA) por brindarme su ayuda.

Estoy en deuda con el personal técnico del Espacio Natural de Sierra Nevada sobre todo, D. J Navarro, D<sup>a</sup>. MC Pérez, D. A Rodríguez, D. M Alguacil y D. J García por su ayuda en el campo y el trabajo de laboratorio; a D. P Prieto y D. F Martínez (Sierras de Cazorla, Segura y Las Villas Parque Natural; el Dr. D. C Paredes y el Dr. D. MA Miranda (Universidad de las Islas Baleares); el Dr. D. L León, Dr. D. C Martínez y el Dr. D. J Ortiz (Universidad de Murcia) por su colaboración en la obtención de muestras para este estudio.

Gracias al Dr. D. JE Granados (Parque Nacional de Sierra Nevada); Dr. D. G Calabuig (Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC), Grupo de Investigación en Ecología de la Biodiversidad y Conservación); D<sup>a</sup>. G Moço (Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Jaén); y al Dr. D. E Serrano (Universitat Autònoma de Barcelona) por sus valiosos consejos durante mi formación doctoral.

Gracias a mi amiga y compañera Idoia por tus correcciones y por hacer más llevaderas mis peleas con el inglés, que sepas que puedes vencer a 100 dragones si te lo propones.

Como en todo trabajo que supone tiempo y esfuerzo he necesitado muchas dosis de motivación, estas, venían de la mano de amigas y familia. A mis amigas, gracias a todas por vuestro ánimo incondicional y por mostrarme tanto cariño. A mi familia, quiero agradeceros la paciencia, el apoyo, la confianza y el amor que me habéis dado, porque sin vosotros hace tiempo lo hubiera dejado. Especialmente quiero recordar a mi abuelo por acompañarme durante toda esta etapa académica y marcharse a punto de finalizar sin entender muy bien porqué su nieta quería ser doctora. A todos, un millón de gracias.

Entre todas las personas a las que quiero, de forma generalizada, siempre había una pregunta que era... " ¿Y las moscas para cuándo?" y la respuesta a todos ellos es.... " PARA YA!!".

# ÍNDICE

Resumen .....	3
Abstract. ....	5
<b>Capítulo 1. Introducción General .....</b>	<b>9</b>
Miasis .....	9
Clasificación de la miasis .....	10
<i>Oestrus ovis</i> y <i>Oestrus caucasicus</i> .....	11
Morfología de las especies de oéstridos.....	12
Ciclo biológico.....	15
Especificidad .....	18
Epidemiología de <i>Oestrus ovis</i> .....	20
Manifestaciones clínicas.....	21
Respuesta del hospedador frente al parásito .....	22
Profilaxis, Tratamiento y Control .....	23
Profilaxis .....	24
Tratamiento .....	25
Control .....	26
Aplicación de la Dinámica de Sistemas .....	27
Elementos y Estructura de un modelo de dinámica de sistemas .....	28
Análisis molecular .....	29
Genes diana .....	29
<b>Capítulo 2. Objetivos .....</b>	<b>35</b>
<b>Capítulo 3. Descripción de las larvas LIII.....</b>	<b>39</b>
Características morfológicas de larva III de <i>Oestrus ovis</i> .....	39
Características morfológicas de larva III de <i>Oestrus sp.</i> .....	41
<b>Capítulo 4. Cultivo in vitro de las larvas III .....</b>	<b>43</b>
<b>Capítulo 5. Modelo de Dinámica de Sistemas de <i>Oestrus sp.</i> .....</b>	<b>53</b>
<b>Capítulo 6. Caracterización Molecular de <i>Oestrus sp.</i> .....</b>	<b>67</b>
<b>Capítulo 7. Resumen Resultados y Discusión .....</b>	<b>79</b>
Cultivo en el laboratorio de larvas de <i>Oestrus sp.</i> .....	79
Simulación del ciclo biológico de <i>Oestrus sp.</i> .....	82
Identificación molecular de las larvas de <i>Oestrus sp.</i> .....	84
<b>Capítulo 8. Conclusiones .....</b>	<b>91</b>
<b>Capítulo 9. Bibliografía .....</b>	<b>95</b>



# RESUMEN



## RESUMEN

Los oéstridos (Diptera: Oestridae) son parásitos obligados que permanecen durante semanas o meses en el tracto nasofaríngeo, estómago, órganos internos y tejidos subcutáneos de sus hospedadores.

Existe un gran desconocimiento sobre diversos aspectos del ciclo biológico y de la demografía de estos parásitos. El objeto de este trabajo es el estudio de una especie de díptero que causa miasis en la Cabra Montés del Parque Natural de Sierra Nevada. La monitorización de las poblaciones de este parásito resulta tremendamente compleja y requiere un enorme esfuerzo, particularmente por que infecta a una especie silvestre. A esto hay que añadir el problema de la identificación de las larvas en función de los caracteres morfológicos. Así, en base a caracteres morfológicos se ha descrito que la especie que parasita a la Cabra Montés es una especie diferente a *Oestrus ovis*, habiéndose propuesto que podría tratarse de la especie *O. caucasicus*.

En este trabajo realizamos tres aproximaciones al estudio de la especie que causa miasis en la Cabra Montés: a) se realizó un cultivo de larvas LIII en el laboratorio para determinar algunos aspectos relativos a su desarrollo; b) hemos desarrollado un modelo de Dinámica de Sistemas para predecir el comportamiento de su ciclo de vida; y c) hemos realizado un análisis molecular de dos marcadores (COI y 28S rDNA) para determinar si las larvas que parasitan a la Cabra Montés son o no de la especie *Oestrus ovis*.

Gracias a este estudio hemos podido cuantificar parámetros como el éxito de eclosión de adultos, cómo afecta el peso en el proceso de pupación, la duración de la fase pupal y la longevidad de los adultos en condiciones de laboratorio. Con estos datos hemos simulado el ciclo biológico mediante Dinámica de Sistemas con un modelo, que se ajusta bien a los datos conocidos de esta especie, que nos ha permitido determinar la producción mínima de larvas del primer estadio para poder establecer una población periódica así como el número de generaciones anuales de estos parásitos. El análisis de los marcadores moleculares, citocromo oxidasa I (COI) y 28S rDNA, confirman que las larvas que parasitan a la Cabra Montés del Parque

Natural de Sierra Nevada son de una especie del género *Oestrus* diferente de la especie *O. ovis*.

## ABSTRACT

The oestrid flies (Diptera: Oestridae) are obligate parasites that persist for weeks or months in nasopharyngeal tract, stomach, subcutaneous tissues and internal organs of their hosts.

There are several unknown aspects related to the life cycle and the demographics of these parasites. The aim of this work is the study of the botflies that causes myiasis in the *Iberian ibex* from the *Sierra Nevada* Natural Park (Spain). The research on the parasite's population is extremely complex and requires an enormous effort, specially because it infects wild species. In addition, it might be included the larvae identification problem based on morphological characters. Thus, according to morphological characters it is stated that the species that parasitizes the *Iberian ibex* from the *Sierra Nevada* Natural Park (Spain) is different a species of *Oestrus ovis*, and it has been proposed to be the species *O. caucasicus*.

On this work we make three approaches to the study of the species that causes myiasis in the *Iberian ibex*: a) a larvae LIII culture was conducted in the laboratory to determine some aspects related to its development; b) we have developed a model of dynamics system to predict the behavior of their life cycle; c) we have performed a molecular analysis of two molecular markers (COI and 28S rDNA) to determine whether larvae that parasitize the *Iberian ibex* belong or not to the *Oestrus ovis* species.

Through this research, we were able to quantify in laboratory biological parameters conditions such as adult hatching success, how weight affects larvae in the pupation process, the duration of the pupal stage and adult longevity. According to the obtained and other available data we have simulated the biological cycle using the dynamics system with a model that fits the known date of this species. It has allowed us to determine the minimum production of first stage larvae to establish a stable population and also the number of annual generations of these parasites. The molecular markers analysis, cytochrome oxidase I (COI) and 28S rDNA, confirm that the

larvae that parasitize the *Iberian ibex* of *Sierra Nevada* Natural Park are a species from the genus *Oestrus* different from the *Oestrus ovis* species.

# **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**



## CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

- **Miasis:**

La miasis (del griego “mya”: mosca) es un proceso de infestación de cualquier órgano de un hospedador vertebrado vivo por larvas de dípteros. El término fue definido por Hope en 1840, y posteriormente actualizado por Zumpt en 1965. Este último autor lo define como “infestación de animales vertebrados y humanos con larvas de dípteros las cuales, por lo menos durante un cierto periodo de tiempo, se alimentan de tejidos vivos y muertos del hospedador, líquidos corporales o alimentos ingeridos” (Colwell et al., 2006).

Entre estas parasitosis, destacan las de tipo cavitario (oestrosis) y cutáneo (hipodermosis), y suponen un auténtico problema debido entre otros factores a su cercanía al ambiente antropozoógeno (Leclercq, 1969), con enormes pérdidas económicas en la industria ganadera de países desarrollados y en desarrollo (Otranto y Stevens, 2002), y bajo determinadas condiciones, se han llegado a encontrar en ojos, nariz y oídos de humanos (Hennessy et al., 1977; Gregory et al., 2004; Hemmersbach-Miller et al., 2007).

Los dípteros productores de miasis se incluyen en el orden Díptera, son conocidos como mosquitos, tábanos y moscas. Este orden incluye unas 90.000 especies (Teskey, 1981). Y dentro de este, la familia Oestridae se divide a su vez en cuatro subfamilias: Hypodermatinae, Cuterebrinae, Gasterophilinae y Oestrinae (Otranto y Stevens, 2002), esta última contiene 28 géneros con aproximadamente 151 especies diferentes. Dentro del género *Oestrus* se incluyen las siguientes especies: *O. variolosus* Loew, *O. bassoni* Zumpt, *O. caucasicus* Grunin, *O. aureoargentatus* Rodhain y Bequaert y *O. ovis* (Tabla I). Todas las larvas de las especies de oéstridos son parásitas y causan miasis (Cowell et al., 2006).

Tabla I. Clasificación taxonómica de las especies del Género *Oestrus* (Diptera: Oestridae) (Integrated Taxonomic Information System ([http:// www.itis.gov](http://www.itis.gov)))

Reino:	Animal
Filo:	Artropoda
Subfilo:	Hexapoda
Clase:	Insecta
▪ Subclase:	Pterigota
▪ Infraclase:	Neoptera
Orden:	Diptera
▪ Suborden:	Braquicera
▪ Infraorden:	Muscomorfa
Familia:	Oestridae
▪ Subfamilia:	Oestrinae
Género:	<i>Oestrus</i>
Especie:	<b><i>Oestrus aureoargentatus</i></b> <b><i>Oestrus bassoni</i></b> <b><i>Oestrus caucasicus</i></b> <b><i>Oestrus ovis</i></b> <b><i>Oestrus variolosus</i></b>

### Clasificación de la miasis:

Las miasis producidas por oéstridos pueden clasificarse atendiendo a diferentes aspectos como son el rango de especificidad, el punto de vista clínico, las especies implicadas, el proceso de invasión y en función del tejido invadido (Zumpt, 1965). Desde el punto de vista clínico las miasis subdividen en:

1. Miasis dérmicas o subdérmicas: producidas por larvas parásitas obligadas que causan perforaciones o forúnculos de la piel o aprovechan heridas preexistentes en la misma en las cuales se alimentan. Las subfamilias de oéstridos involucradas son Hypodermatinae y Cuterebrinae.

2. Miasis intestinales: causadas por larvas que invaden el tracto digestivo, libres o unidas a las paredes, provocando hemorragias y traumatismos. La subfamilia de oéstridos involucrada es Gasterophilinae.
3. Miasis nasofaríngeas: producidas por larvas de especies parásitas obligadas que infectan las cavidades de la boca, nariz y en algunos casos los ojos, causando miasis traumáticas en mamíferos, aves y anfibios. La subfamilia de oéstridos involucrada es Oestrinae.

- ***Oestrus ovis* y *Oestrus caucasicus*:**

*Oestrus ovis* parasita ovejas y cabras domésticas en todo el mundo. Además, se han registrado miasis cavitarias producidas por este díptero en el íbice asiático (*Capra ibex sibirica*), argali (*Ovis ammon*), carnero de las Rocosas (*O. canadensis*) y muflón europeo (*O. aries*) (Grunin, 1957; Capelle, 1966; Wetzel y Bauristhene, 1970; Moreno et al., 1999). También puede afectar al íbice nubiano (*C. i. nubiana*) y al arruí (*Ammotragus lervia*) (Howard, 1980).

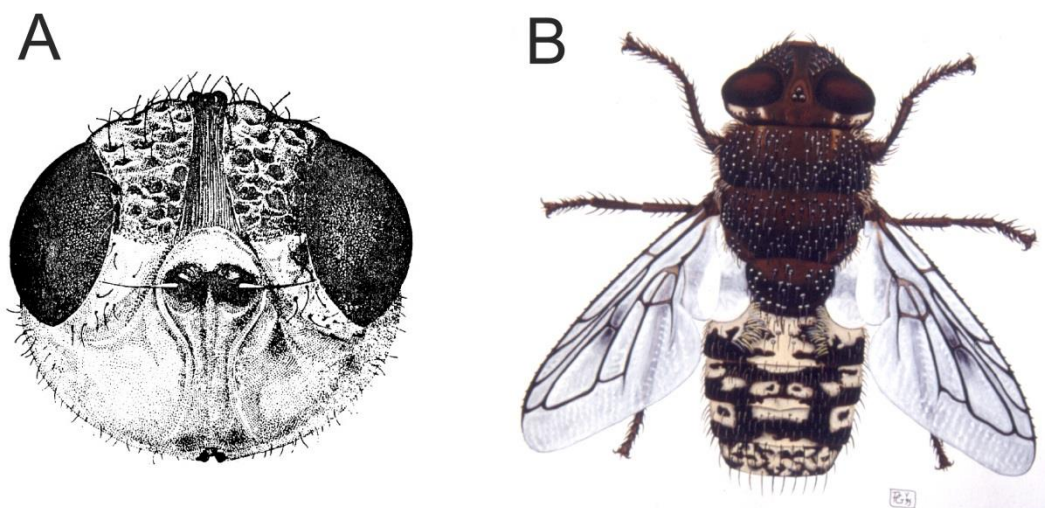
En Eurasia, *Oestrus caucasicus* hace lo propio con el tur del Cáucaso (*Capra cylindricornis*) y el íbice asiático (*Capra sibirica*) (Grunin, 1957; Minar et al., 1985). En 1996 se describió, en base a caracteres morfológicos, que una especie similar a *O. ovis*, posiblemente *O. caucasicus*, infectaba a la Cabra Montés (*C. pyrenaica*) (Pérez et al., 1996). Ambas especies, *O. ovis* y *O. caucasicus*, son morfológicamente parecidas (Grunin, 1957; Zumpt, 1965; Guitton et al., 2001) (Figura 2B y Figura 3) y la identificación de larvas de ciertos estadios (como el primero y el segundo) resulta particularmente complicada (Wetzel y Bauristhene, 1970). Por otra parte, parece que existen notables similitudes entre *O. ovis* y la especie que infectaría a la Cabra Montés (*Oestrus sp.*), en cuanto a su ciclo biológico. Así pues, está aún por determinar si la especie que infecta a la Cabra Montés del Parque Natural de Sierra Nevada es una variante de *O. ovis*, una especie diferente, en cuyo caso podría ser *O. caucasicus* o tal vez una nueva especie.

Las especies *O. ovis* y *O. caucasicus*, son parásitas larvíparas de las cavidades nasales y senos craneales de ovejas y cabras (Zumpt, 1965; Dorchies et al., 2000; Alcaide et al., 2002 y 2005). En los países de clima cálido y seco, estas especies

productoras de miasis dañan seriamente a los rumiantes, produciendo dificultad respiratoria. Algunas ovejas y cabras desarrollan la respiración a través de la boca que interfiere con su función como rumiantes. Como consecuencia de esta infección nasosinusal local se producen abscesos pulmonares (Dorchies et al., 1993) y enfermedades que pueden producir la muerte (Allen y Bunch, 1982).

- **Morfología de las especies de oéstridos:**

Los adultos del género *Oestrus* son moscas de tamaño medio y de coloración generalmente oscura, fácilmente identificables de los pertenecientes a otros géneros en base a diferentes características de la cabeza (principalmente la parte frontal), antenas, venación alar y abdomen (Figura 1). Una característica importante es la ausencia o fuerte reducción del aparato bucal debido a que los individuos adultos no se alimentan.



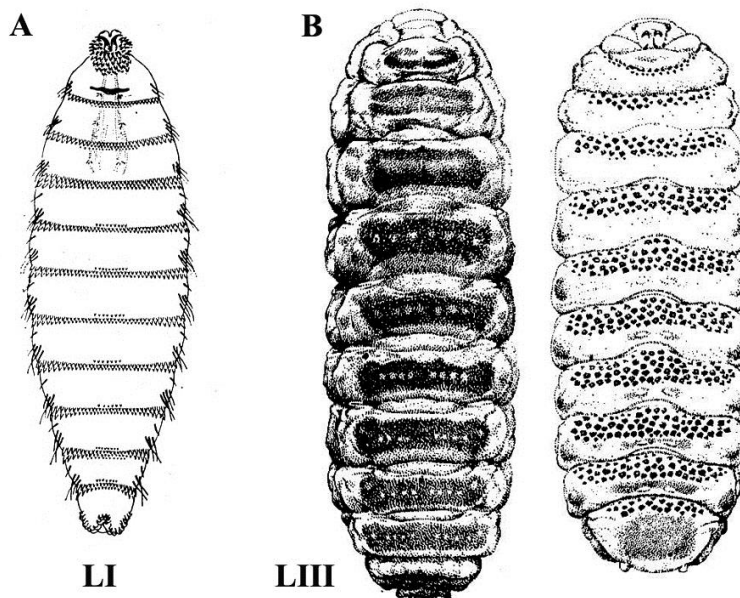
**Figura 1. A)** Vista frontal de la cabeza de un adulto de *Oestrus ovis* (Zumpt, 1965); **B)** vista dorsal de un adulto de *Oestrus caucasicus* (Dibujo: Pablo Guerrero).

Por el contrario, las larvas son más parecidas morfológicamente entre sí que a las de otros géneros de oéstridos (Zumpt, 1965; Wetzel y Bauristhene, 1970; Colwell et al., 2006).

Antes de llegar al estado adulto, estas especies pasan por tres estadios larvarios (LI, LII y LIII) en los que destacan las siguientes características morfológicas:

Larva I (LI) (Figura 2A): están pobladas de unas filas transversales de espículas pequeñas. Dos ganchos bucales fuertes y curvados, breves expansiones laterales en los segmentos torácicos y en los primeros abdominales, y por transparencia se aprecia el sistema traqueal de la larva. En dos protuberancias cercanas a la cavidad peritremal se pueden encontrar 20-25 espinas recurvadas terminales. Longitud corporal de 1 a 3 mm.

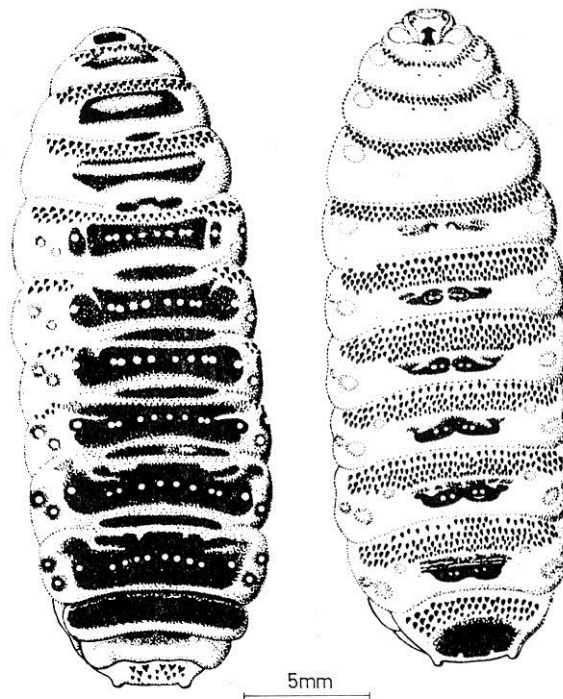
Larva II (LII): Presenta pocas espículas dorsales en el segundo segmento, ventralmente con espículas mazudas y con uno o dos ápices. Peritremos posteriores circulares, multiperforados y dejando un canal central que es el botón peritremal o ecdisial. Longitud corporal 1,5 a 12 mm.



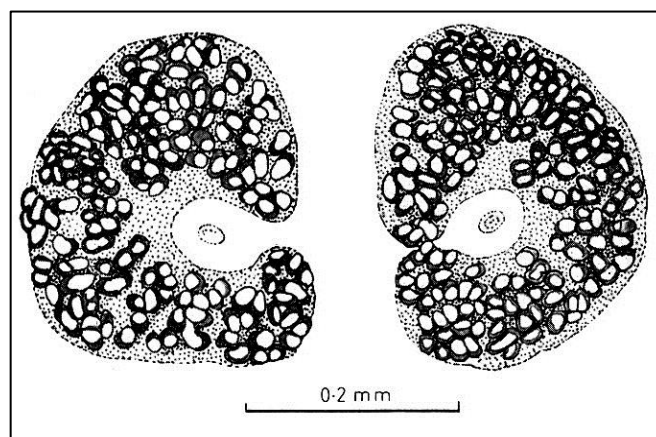
**Figura 2.** Larvas de *Oestrus ovis*: **A)** Larva de primer estadio de (vista ventral); **B)** Larva de tercer estadio vista dorsal (izquierda) y ventral (derecha) (tomado de Zumpt, 1965).

Larva III (LIII) (Figura 2B y Figura 3): de color amarillo cuando son jóvenes y blanquecino cuando son maduras. Dorsalmente posee bandas quitinosas anchas en todos los segmentos que están desnudos de espículas, a excepción de unas pocas en el segundo segmento, ventralmente presentan numerosas y potentes espículas corporales dispuestas en varias filas por segmento. Peritremos posteriores multiperforados y circulares, dejando en medio un canal que presenta el botón

peritremal o ecdisial (Figura 4). Longitud corporal por encima de los 20 mm (Zumpt,1965).



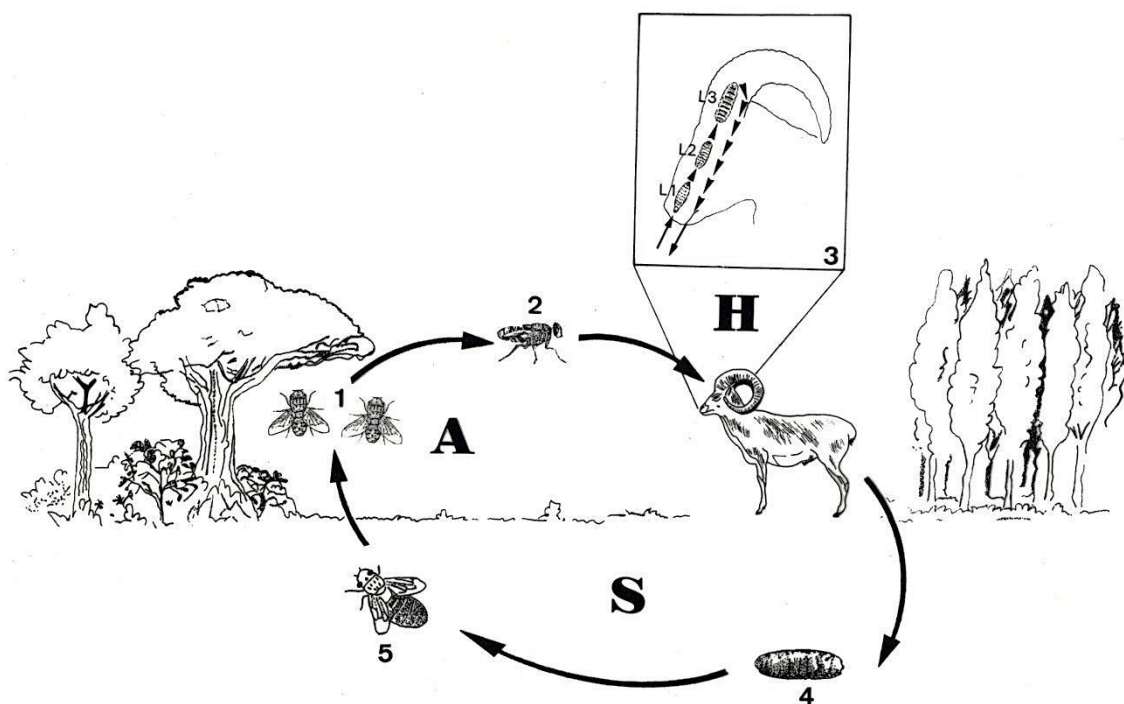
**Figura 3.** Larvas de *Oestrus caucasicus* vista dorsal (izquierda) y ventral (derecha) (tomado de Zumpt, 1965).



**Figura 4.** Peritremos posteriores, desde los que se inicia el sistema traqueal, de la larva de segundo estadio de *Oestrus ovis* (tomado de Zumpt, 1965).

- **Ciclo biológico:**

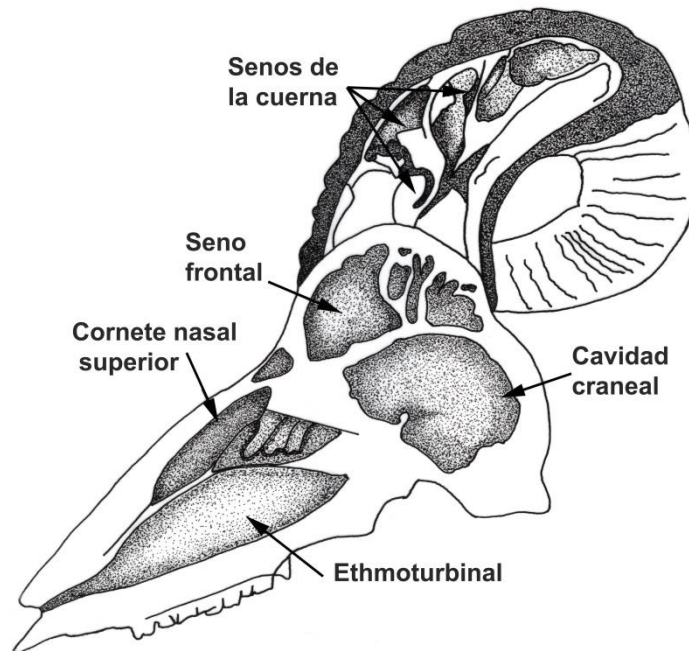
Las hembras de estas especies son larvíparas, es decir no depositan huevos, sino larvas que ya han eclosionado. Las hembras grávidas depositan las larvas L1 cerca de la boca y la nariz del hospedador y éstas penetran en las cavidades nasofaríngeas, senos frontales y senos de los cuernos y completan su desarrollo hasta la fase de larva LIII, en este momento son expulsadas al exterior, se entierran y finalizan su metamorfosis. Podemos decir por tanto, que el ciclo biológico de estos parásitos se divide en tres fases: fase hospedador, fase suelo y fase aérea (Figura 5).



**Figura 5.** Representación del ciclo biológico de *O. ovis*. Fase hospedador (H), fase suelo (S) y fase aérea (A).

**Fase hospedador:** Según se ha comprobado mediante la disección de hembras grávidas de *O. ovis*, éstas presentan un potencial de puesta cifrado en 500 larvas, aunque cada larviposición (acercamiento y ataque al hospedador) no suele superar las 30-50 larvas (Cobbett y Mitchell, 1941; Zumpt, 1965). Las hembras depositan las larvas L1 cerca de la boca y la nariz del hospedador y éstas penetran activamente en las cavidades nasofaríngeas, senos frontales y senos de los cuernos del hospedador (Figura 6). La función de las larvas es la de nutrirse, básicamente de moco secretado

por la membrana de la mucosa, para poder desarrollarse y madurar hasta la fase de larva LIII post-alimentaria (Scholl et al., 1990).



**Figura 6.** Áreas del cráneo del hospedador donde se localizan las larvas.

Las localizaciones preferenciales de las larvas LI suelen ser el cornete nasal inferior, la cavidad nasal y los cornetes ethmoidales superiores. Tras la primera muda larvaria, se sucede el estadio larvario LII, en este caso la larva migra preferentemente a los cornetes nasales superiores, la ethmoturbinalia y los senos frontales. Tras la segunda muda larvaria, la larva LIII suele estar situada preferentemente en senos nasales, frontales, maxilares y corneales, donde se alimenta de sangre, mucus y mucosa del hospedador (Ruiz-Martínez et al., 1992, 1997; Pérez et al., 1996; Dorchies y Alzien, 1997).

Una vez que las larvas de tercer estadio maduran y alcanzan un peso mínimo migran desde su localización hasta las fosas nasales. Esta etapa se conoce con el nombre crawl-off y durante la misma las larvas no se alimentan ya que han hecho acopio de los nutrientes necesarios para la pupación y toda la vida adulta. En este recorrido será normal encontrar larvas en claro proceso de pupación y no está completamente demostrado si todas las larvas finalmente salen al exterior a través de las narinas o con las excretas. Posiblemente también cuando el número de larvas LIII es

alto, estas no pueden quedarse en las cavidades nasales debido a su gran tamaño y tienen que ser expelidas (Nguyen et al., 1999).

Dependiendo de las condiciones climáticas (principalmente de la temperatura) las fases larvarias (LI a LIII) pueden durar desde unos 20 días hasta varios meses (Dorchies et al., 1999; Tabouret et al., 2001). Así, aunque no se puede precisar la duración total del desarrollo de la fase larvaria dentro del hospedador, podríamos estimar que duraría aproximadamente un mes para las puestas de primavera-verano y varios meses para aquellas que se hicieron en otoño-invierno (Dorchies et al., 1999). Así como ejemplo, el desarrollo postembrionario de *O. ovis* puede durar entre 23-25 días hasta 11 meses. Dependiendo de la época del año y la climatología del lugar en que se encuentren. Además, según Zumpt (1965), hay una diapausa (periodo de detención del desarrollo o inactividad) y pocas de las larvas LIII se desarrollan simultáneamente, la razón es probablemente la limitación de espacio.

**Fase suelo:** las larvas post-alimentarias “crawl-off” caen al suelo y buscan los lugares propicios para la pupación a una determinada profundidad. Perforan un canal perpendicular y se inmovilizan en el sustrato comenzando el proceso de pupación, el cual se inicia con la esclerotización de la cutícula larvaria para formar el puparium (la cutícula quitinizada y endurecida) (Jagannath et al., 1989). Este proceso depende de la estructura y la naturaleza del sustrato.

Cuando las condiciones ambientales son adversas, las pupas de *Oestrus* pasan también por una diapausa o conocida también como hipobiosis. Los principales inductores de la diapausa son factores climáticos como el fotoperíodo y la temperatura ambiental. Desde el punto de vista biológico, la diapausa es una adaptación que permite la supervivencia del parásito (Caracappa et al., 2000).

**Fase aérea:** se inicia tras la emergencia desde el puparium del imago o individuo adulto, que primero se ocupará de trepar a cualquier objeto lejos del suelo y después de estirar las alas y esperar unas horas para que se endurezcan (Teskey, 1981). En zonas de inviernos suaves y cálidos, los adultos están activos todo el año, mientras que las zonas de inviernos fríos, desaparecen durante el otoño e invierno (Cobbett y Michell, 1941). En países asiáticos, se conocen dos periodos de actividad de los adultos: el primero entre mayo y junio, y el segundo entre septiembre y octubre (Grunin, 1957). En zonas tropicales la actividad adulta puede registrarse todo el año y

en latitudes subtropicales se extenderá desde septiembre a mayo (Unsworth, 1949; Pandey, 1989).

Los adultos tienen piezas bucales rudimentarias o carecen completamente de ellas y por tanto no se alimentan, viviendo de las reservas acumuladas durante el desarrollo larvario (James, 1947), se dedican exclusivamente a reproducirse y perpetuar la especie (Dorchies et al., 1998). No se tiene mucha información sobre la biología de los adultos (no se han estudiado en el campo, ni se han desarrollado métodos de trapeo) y especialmente poco se conoce de la biología de su reproducción, pero es muy probable que, como en otros dípteros, los machos establezcan territorios y estaciones de vigilancia, en los cuales acechan el paso de una hembra y tras la persecución, la cópula se produce en el suelo, tal y como se ha observado en cultivos de laboratorio (Jagannath et al., 1989; Tabouret, 2001). Se piensa que los adultos son abundantes en aquellos lugares donde se produce la vida de su hospedador y es probable que lo sean por tanto en determinadas zonas de pastoreo.

- **Especificidad:**

A nivel mundial, son cuatro las subfamilias con carácter parásito las que afectan a los ungulados: Hypodermatinae, Cuterebrinae, Gasterophilinae y Oestrinae (Tabla II). Las larvas de hipoderma son parásitos dérmicos de artiodáctilos, lagomorfos y roedores (Zumpt, 1965; Kettle, 1990), las de cuterebra son parásitos obligados de roedores y lagomorfos además pueden invadir en ocasiones al hombre, gatos, perros y conejos domésticos (Acha y Szyfres, 2003), mientras que los gasterofilidos parasitan a caballos y otros équidos (Soulsby, 1982) y los oéstridos, se desarrollan principalmente en las cavidades nasofaríngeas de hospedadores perisodáctilos, artiodáctilos y lagomorfos.

En general no parece haber una especificidad parásito-hospedador dado que por ejemplo *O. ovis* parasita ovejas y cabras domésticas, al íbice asiático, al argali, al carnero de las Rocosas, al muflón europeo, al íbice nubiano y al arruí (Grunin, 1957; Capelle, 1966; Wetzel y Bauristhene, 1970; Moreno et al., 1999; Howard, 1980). Es más, las hembras grávidas de *Oestrus* no se consideran estrictamente específicas respecto a sus hospedadores hasta el punto de que los animales domésticos se

consideran como reservorios y la principal fuente de infestación para la fauna silvestre (Colwell, 2001). Por otra parte, *O. caucasicus* parasita al tur del Cáucaso y al íbice asiático (Grunin, 1957; Minar et al., 1985).

Se han descrito infecciones oportunistas en humanos por especies de oéstridos. Así, en un paciente infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en el Reino Unido se ha descrito miasis nasal en la que se observaron larvas del tercer estadio de *O. ovis* (Lucientes et al., 1997). En Irán, los informes sobre miasis en humanos revelan que el 97% de los casos descritos eran hombres que vivían en zonas rurales en estrecho contacto con ovejas y cabras, los síntomas siempre aparecieron repentinamente detectando la presencia de cuerpos extraños en la garganta (Masoodi y Hosseini, 2003). Más recientemente se ha descrito un caso en la ciudad de Florencia no asociado a zonas rurales o al pastoreo (Zammarchi et al., 2014).

Por otra parte, aunque no parece haber una especificidad parásito-hospedador si hay que destacar la relación en cuanto a coevolución de estos dípteros y sus hospedadores, donde cada especie de díptero se desarrolla en sitios anatómicos específicos de sus hospedadores como por ejemplo: la nariz, el estómago o la piel (Mullen y Durden, 2009).

Tabla II. Relación taxonómica de oestridos productores de miasis en la Península Ibérica y sus hospedadores (Tomada de Ruiz- Martínez y Chiroso Ríos, 1994)

Subfamilia	GÉNEROS	HOSPEDADORES
Cuterebrinae	<i>Cuterebra</i>	Mamíferos, Humanos
	<i>Dermatobia</i>	
Hypodermatinae	<i>Hypoderma</i>	Mamíferos, Humanos
Gasterophilinae	<i>Gasterophilus</i>	Mamíferos, Humanos
	<i>Gyrostigma</i>	
<b>Oestrinae</b>	<b><i>Oestrus</i></b>	Mamíferos, Humanos
	<i>Pharyngomya</i>	

- **Epidemiología de *O. ovis*:**

Los parásitos causantes de oestrosis tienen un origen netamente Paleártico, pero su presencia está generalizada en todos los rincones del mundo donde se produzca ganado ovino y caprino (Zumpt, 1965).

Se pueden apreciar diferencias respecto a variables epidemiológicas como prevalencia e intensidad de parasitación en función de las especies implicadas, el sexo y edad del hospedador o los factores climatológicos. La prevalencia de infección por oestridos en ganado no tratado y vertebrados silvestres es similar y varía normalmente entre el 75 y el 100% (Anderson, 2006).

En cuanto a preferencias de acogida por hospedadores, si comparamos cargas y tasas de infestación de la especie *O. ovis* entre el ganado caprino y ovino sí parece haber diferencias significativas en cuanto a la carga parasitaria siendo los porcentajes más elevados en ovejas que en cabras (Dorchies et al., 1999 y 2000; Alcaide et al., 2003 y 2005; Papadopoulos et al., 2006). Además, los datos parecen indicar que la prevalencia, es decir, el número de hospedadores infectados dividido por el número de hospedadores examinados para dicha especie, y la carga parasitaria dependen de la edad del hospedador, cuanto más joven es el animal más parasitación, posiblemente debido al menor desarrollado del sistema inmunológico y de las estrategias de defensivas (Carracappa, 2000).

En relación a los factores climatológicos, las larvas de *O. ovis* cesan el desarrollo durante la diapausa (hipobiosis), durante este tiempo los animales se ven infectados exclusivamente por larvas LI. Así, por ejemplo en el Pirineo francés toda la carga larvaria en los animales desde septiembre a febrero es por larvas LI (Yilma y Dorchies, 1991). En Sicilia, al no tener hipobiosis, la distribución larvaria es estable a lo largo de todo el año, exceptuando los meses de octubre a diciembre en la que los primeros estadios larvarios resultarían menos numerosos debido probablemente a un desarrollo más lento por parte de las larvas. La misma situación se establecería en Túnez, donde hay del 37% al 69% de larvas LI todo el año sin hipobiosis (Caracappa et al., 2000). En la región del sur de Francia las larvas LI y LII de *O. ovis* están presentes todo el año, aunque el número de larvas del segundo estadio disminuye durante los meses de septiembre a febrero, debido a una acumulación de larvas LI durante los meses de más

frio. En el caso de las larvas LIII, estas están presentes durante todo el año, indicando un ciclo continuo del parásito (Kilani et al., 1986).

La relación entre las larvas y el hospedador está regulada por el grado de acogida en cuanto a la respuesta inmune del hospedador y la respuesta de las larvas frente a la reacción inmune de este (Otranto y Stevens, 2002). Dentro de esta respuesta, las larvas desarrollan estrategias biológicas, fisiológicas y bioquímicas. Por ejemplo en el caso de la alimentación larvaria, las enzimas proteolíticas de los productos secretados-excretados se degradan en pequeños fragmentos (Tabouret et al., 2003a) y estos son succionados para que tenga lugar la digestión y la absorción de los nutrientes. El colágeno, también se degrada gracias a las proteasas secretadas-excretadas sobre la mucosa que reviste la cavidad nasal (Frugère et al., 2000). Cuando la metamorfosis larvaria avanza, también lo hace la producción de proteínas, incrementándose la actividad proteolítica (Tabouret, 2001).

En la actualidad la investigación epidemiológica está enfocada para llevar a cabo un manejo y control integrado de plagas y enfermedades donde se ponen en práctica técnicas que permiten una mayor aproximación al problema. Una de las medidas de diagnóstico para las miasis cavitarias es la detección de anticuerpos específicos producidos por las proteínas segregadas por las glándulas salivares de las larvas de *O. ovis* (Mot, 2012; Angulo-Valdez et al., 2008) que parecen estar relacionadas con la nutrición larvaria y la inmunomodulación del hospedador, dentro de estas prácticas, destacan las pruebas de ELISA (Colwell y Baron, 1990; Arias et al., 2014a y b) la inmunodifusión y la hemaglutinación (Bautista et al., 1988). Las proteínas de los productos secretados-excretados por las larvas parecen ser la mejor fuente de antígenos en las pruebas de ELISA (Alcaide et al., 2005a; Suárez et al., 2005). De este modo, son posibles encuestas seroepidemiológicas, que junto con las necropsias craneales pueden aportar información relevante sobre la epidemiología de estas parasitosis.

- **Manifestaciones clínicas:**

Los signos más evidentes en el ganado caprino y ovino cuando están infectados por larvas de *Oestrus* son los estornudos frecuentes y las abundantes secreciones

nasales que pueden ser mucosa, mucopurulenta de color verde o amarillo, o sanguinolenta (Butterfield, 1900; Dorchies et al., 1992). A menudo se asocia con síntomas como la rinitis, sinusitis, que pueden causar infecciones locales que inducen enfermedades más generalizadas, demacrando al animal y en ocasiones puede llegar a causar la muerte. A veces, los animales muy parasitados pueden presentar síntomas neurológicos, incluyendo ataxia, vértigo, nistagmo, amaurosis y epistaxis o hemorragia nasal. La obstrucción nasal producida por la oestrosis hace la respiración dificultosa para el animal que se ve forzado a respirar por la boca lo que interfiere con la alimentación y el rumiado (Dorchies et al., 2006).

Los hospedadores presentan enfermedades asociadas como neumonía intersticial, abscesos en los pulmones, pleuroneumonía entre otras, posiblemente como consecuencia de la inhalación de pus de los senos nasales (Dorchies et al., 1993). Puede ser también que estas patologías estén asociadas al estímulo antigénico que ocasionan las larvas de *O. ovis* en las cavidades nasosinuales del hospedador (Dorchies et al., 2006).

Se ha pensado durante mucho tiempo que la patogenicidad de *O. ovis* era debida a los traumas mecánicos producidos por los ganchos y espinas de las larvas, sin embargo parecen estar más relacionada con la actividad proteolítica de los productos excretados-secretados por las larvas, junto con un fenómeno de hipersensibilidad (Dorchies et al., 2006; Angulo-Valadez., 2009).

### *Respuesta del hospedador frente al parásito:*

Una primera respuesta defensiva por parte del hospedador es evitar la larviposición por parte de los oestridos en sus zonas sensibles mediante comportamientos anti moscas. Así, un comportamiento defensivo de los rebaños de ovino frente a *O. ovis* consiste en permanecer agrupados, bajar la cabeza y situar el hocico y los labios lo más cerca posible del suelo lo que dificulta la larviposición (Cepeda-Palacios y Scholl, 2000).

Una vez producida la infestación se producen estornudos con objeto de eliminar las larvas de los orificios. Una vez las larvas están alojadas se produce otro tipo de respuesta que está asociada a la irritación mecánica producida por las espinas que presentan las larvas en la cutícula durante el desplazamiento y por las enzimas y

---

antígenos que secretan-excretan las larvas sobre la mucosa del hospedador (Frugère et al., 2000; Tabouret et al., 2001a). Los antígenos junto con la irritación mecánica inducen la respuesta inmune del hospedador que puede ser de dos tipos a nivel celular y a nivel humoral (Innocenti et al., 1995; 1997; Tabouret et al., 2001; Dorchies et al., 2000).

a) Respuesta Inmune a nivel celular:

- Mastocitos: los mastocitos liberan un gran número de moléculas proinflamatorias en los tejidos (Piliponsky et al., 2002). Nguyen et al., 1996 encontraron el doble de mastocitos en el septo, cornetes y senos frontales de ovejas infectadas por *O. ovis* comparado con las ovejas sanas.
- Eosinófilos: migran a través de la sangre a la superficie de la mucosa donde ocurre la infección (Roitt et al., 2002). Los patrones de reclutamiento son similares para mastocitos y eosinófilos aumentando su número en ovejas infectadas (Yacob et al., 2002; 2004a y b).

b) Respuesta Inmune a nivel humoral:

La respuesta del hospedador frente a la infección de estas parasitosis se centra en la producción de inmunoglobulinas parásito-específicas. Las IgG, IgA e IgM sistémicas y las IgA e IgG locales (Ichlmann y Hiepe, 1985; Bautista-Garfias et al., 1988; Tabouret et al., 2003b; Suárez et al., 2005).

En estudios de ovejas infectadas por larvas de *O. ovis* se observa que estos hospedadores poseen anticuerpos IgG e IgA específicos contra *O. ovis* en su moco nasal (Tabouret et al., 2003b), la producción de IgG local se ha asociado a la infección, no así la producción de IgA. Los estudios realizados por Innocenti et al., 1994 indican que de todos los tejidos de las larvas de *O. ovis* analizados los de las glándulas salivares son los más eficaces induciendo la producción de anticuerpos específicos en ovejas.

- **Profilaxis, tratamiento y control :**

El tratamiento y la prevención de la oestrosis cuentan actualmente con herramientas y tácticas útiles. No obstante, hoy día sigue suponiendo una fuente de

cuantiosas pérdidas económicas. Se conocen diversos antiparasitarios para la lucha contra estos dípteros productores de miasis. Sin embargo, nos enfrentamos con el inconveniente de que la mayoría de los casos a tratar son poblaciones abiertas, lo que plantea problemas con el seguimiento del tratamiento, con el esfuerzo en la dosificación, para la evaluación de la eficacia e incluso con efectos ambientales indeseables (Wobeser, 1994; Bookhout, 1994; Soriguer et al., 1994). Todo ello, hace que sea necesario un cuidadoso planteamiento del diseño integrado de tratamiento y control.

El conocimiento del ciclo biológico de esta especie es esencial, tanto para la correcta aplicación del tratamiento como para una adecuada profilaxis de la enfermedad.

### Profilaxis:

En este tipo de parásitos es muy complicado establecer un conjunto de medidas profilácticas.

No parece viable realizar exámenes necroscópicos, ni naringoscópicos para evaluar la prevalencia e incidencia de la enfermedad (Ruíz- Martínez et al., 1992) y por tanto es necesario establecer programas basados en su conocimiento. Actualmente contamos con la posibilidad de desarrollar y aplicar seroencuestas en sectores de población lo suficientemente representativos (Bautista et al., 1982, 1988; Alcaide et al., 2005; Angulo-Valadez et al., 2010). Estas podrían suponer una vía adecuada para detectar las necesidades profilácticas y zonificar epidemiológicamente su efecto.

En procesos y planes plurianuales, una de las medidas profilácticas que se emplean es la aplicación de baños repelentes con insecticidas organoclorados y organofosforados permitidos.

El estudio de la inmunidad desarrollada por ovinos frente a las larvas LI de *O. ovis* está abriendo nuevos caminos de profilaxis de la enfermedad (Bautista et al., 1988; Marchenko y Marchenko, 1989; Durantón et al., 1996). Este tipo de información puede proporcionar un conocimiento más detallado de la cronobiología de *O. ovis*, para identificar los períodos de riesgo más importantes y establecer el mejor momento para administrar un tratamiento preventivo (Suárez et al., 2005).

Con la misma finalidad preventiva se utilizan técnicas de ELISA que se han aplicado a suero agrupado o muestras de leche para la vigilancia epidemiológica en Hypodermátidos (Boulard et al., 1996) estas mismas técnicas se emplean para identificar los factores de riesgo y controlar los periodos favorables del desarrollo de *O. ovis* (Alcaide et al., 2005).

### Tratamiento:

Los intentos de control y regulación de estas parasitosis, se han centrado principalmente en los tratamientos aplicados a los hospedadores que afectan a los estadios larvarios (Biggs et al., 1998). Desde la llegada de los insecticidas sistémicos organofosforados en la década de 1960 se ha generalizado el uso de las lactonas macrocíclicas (Otranto y Colwell, 2008), gracias a los altos niveles de eficacia contra las fases larvarias de los oestridos que afectan al ganado, estas son más sensibles que los adultos a la moxidectina (Duranton y Dorchies, 1997; Scholl et al., 2006; Roncalli., 2006). Sin embargo, no hay estudios basados en el tratamiento para el estado adulto de estos parásitos.

Los efectos perseguidos con la aplicación de antiparásitos contra las miasis cavitarias pueden ser:

- Inducir una elevada mortalidad larvaria, que posteriormente serán desalojadas de la cavidad nasal.
- Reducir las tasas de prevalencia e incidencia (número de nuevos casos de esta parasitosis en una población).
- Reducir la patogenicidad del proceso, amortiguando en lo posible el período agudo del curso de la enfermedad o evitar fases crónicas de la misma.

Los tratamientos más utilizados son los insecticidas organoclorados, organofosforados y lactonas macrolíticas ya sean aplicados directamente en la cavidad nasal o como baños preventivos.

Entre este grupo de antiparásitos se han ensayado: el tetracloetileno aplicado a conductos nasales, obteniéndose unos excelentes resultados, aunque las intoxicaciones desaconsejaron su empleo (DuToit y Fiedler, 1956); el neguvon (triclorfon) es otro insecticida de elevada eficacia que se aplica vía subcutánea y la ventaja que ofrece es que no se han descrito intoxicaciones en los casos estudiados

---

(Lora et al., 1966); la rafoxanide (ranide) por vía oral o subcutánea se ha utilizado con una eficacia del 82,8% y 93,6% respectivamente (Schindler et al., 1986; Sanyal et al., 1986). Entre otros antiparasitarios testados destaca el closantel que suministrado vía oral a dosis única alcanza una efectividad del 98%, además se ha demostrado la persistencia plasmática del closantel, lo que permite una reducción de la incidencia de las oestrosis en un 75% (Dorchies et al., 1989).

Las experiencias con lactonas macrocíclicas como la ivermectina (Drummond, 1985; Rugg et al., 1997), vía sistémica, han demostrado una eficacia bastante elevada, a un coste mínimo, siendo junto con la doramectina y la moxidectina de uso generalizado (Dorchies et al., 1996 y 2001; Puccini et al., 1994). La eficacia de estos fármacos alcanza el 99% de mortalidad para los tres estadios larvarios y el periodo de protección está estimado en unos 20-30 días. En los últimos tiempos, se ha probado la administración de antiparasitarios por vía *pour on* con eprinomectina con una eficacia del 97 al 100% de efectividad (Hoste et al., 2004; Habela et al., 2006).

### Control:

Los baños profilácticos con insecticidas, aplicados en las épocas favorables (marzo-mayo como primer periodo y septiembre-octubre como segundo) para prevenir la acción de los adultos reproductores y la correcta aplicación de antiparasitarios, al menos tres veces al año, destinados a combatir las fases larvarias. El tratamiento y control en aquellas épocas en que las larvas LI se encuentran en las cavidades nasales del hospedador supone evitar al animal molestias y patologías mayores. La elevada mortalidad en estas larvas LI (100%) provocada por distintos fármacos asegura su supresión y el tratamiento y control en aquellas épocas en que las larvas LII y LIII se hayan ya alojadas en senos frontales, maxilares o corneales.

Los baños profilácticos se pueden acompañar además del uso de insecticidas vía intra-nasal (aerosol), que a largo plazo no dejan residuos en carnes y leche, y se asegura un mejor control de la infestación (Innocenti et al., 1995).

- **APLICACIÓN DE LA DINÁMICA DE SISTEMAS:**

En el área de la Entomología y, concretamente, en lo referente a los dípteros, carecemos de información detallada sobre todos los aspectos relacionados con su ciclo biológico por estos motivos en ocasiones se recurren a las aproximaciones a través de modelos matemáticos para poder entender mejor el comportamiento de estos parásitos.

La modelización de sistemas y la simulación son cada vez más empleados en diversos campos de la Biología, Ecología, Ciencias Veterinarias, Medicina, etc., a pesar de que su elaboración puede llegar a ser relativamente compleja encontramos diversos antecedentes de modelización a partir de datos obtenidos experimentalmente, aunque prácticamente circunscritos a las familias Calliphoridae y Muscidae, algunos de estos estudios se han centrado en la elaboración de tablas de vida, las cuales permiten obtener interesantes parámetros demográficos, como la tasa neta reproductora ( $R_0$ ), el tiempo de generación o la tasa instantánea de crecimiento y predecir la estructura futura de la población bajo estudio (Chi, 1988; 1997; Chi y Liu, 1985; Gabre et al., 2005).

Un sistema se entiende como una unidad cuyos elementos interactúan entre sí, ya que continuamente se afectan unos a otros, de modo que operan hacia una meta común. Es algo que se percibe como una identidad que lo distingue de lo que la rodea y es capaz de mantener esa identidad a lo largo del tiempo y bajo entornos cambiantes (Aracil y Gordillo, 1997). Un modelo de Dinámica de Sistemas es un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden. El esfuerzo del método se centra precisamente en servir de intermediario entre el mundo real y la representación matemática del mismo, que el ordenador va a utilizar para calcular las evoluciones temporales que consideremos de interés. Estas ecuaciones pueden ser escritas automáticamente por el ordenador si se dispone del programa adecuado. Existen programas de simulación específicos de dinámica de sistemas, como pueden ser Vensim, Ithink o Stella.

Teniendo en cuenta que las tasas de desarrollo y de supervivencia de los insectos están determinadas por factores ambientales como la temperatura, no nos debe extrañar que la mayoría de modelos de poblaciones de insectos intenten

extrapolar cuantitativamente la tasa de incremento poblacional a partir de datos climatológicos disponibles (Atzeni et al., 1994; Wall et al., 2000). Uno de los métodos más frecuentemente utilizado incluye el cálculo de los grados-día, que asume que la tasa de desarrollo es directamente proporcional a la temperatura por encima de un umbral mínimo, la temperatura basal, y por debajo de dicho umbral no se produce desarrollo (Moon, 1983; Preuss, 1983).

El control de un díptero parásito como es *Lucilia sericata*, también se ha abordado mediante la ayuda de la modelización y de la simulación, desarrollando modelos tanto determinísticos (que asumen que no hay variabilidad entre los individuos) como estocásticos (que asumen cierta variabilidad entre individuos y entre cohortes) (Fenton y Wall, 1997; Fenton et al., 1997; 1998a, b; French y Morgan, 1996; Wall et al., 1992; 1993a, b). También, en el contexto del manejo integrado de plagas de insectos, se ha guiado la monitorización de poblaciones utilizando modelos lineales generalizados mixtos (Candy, 2000).

Entre los escasos trabajos relacionados con la modelización de ciclos biológicos en oéstridos, cabe destacar el de Biggs et al., 1998 quienes aplicando los grados-día al desarrollo y/o supervivencia de las distintas fases del parásito: adulto, larva y pupa, junto con una monitorización intensiva de la prevalencia e intensidad de las larvas de *O. ovis* que afectan al ganado ovino de Namibia, pretendieron predecir los períodos críticos en los que se producían el mayor número de ataques (larviposiciones) a los hospedadores con objeto de diseñar estrategias de prevención y control.

### Elementos y estructura de un modelo de dinámica de sistemas

Los diagramas causales, o grafos orientados, relacionan los distintos elementos del sistema o variables así como sus variaciones interdependientes (Aracil y Gordillo, 1997) (Figura 7).

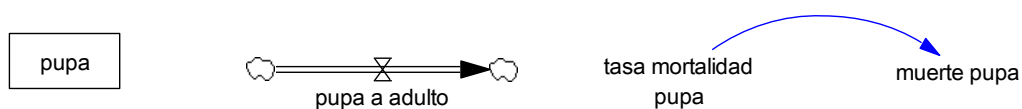


**Figura 7.** Dependencia causal entre las variables.

El diagrama de flujos, también llamado de diagrama de Forrester, consta de tres elementos principales:

- **Niveles:** son las variables de estado del sistema y los valores que toman determinan la situación en la que se encuentra el mismo.
- **Flujos:** se utilizan para relacionar entre sí los distintos niveles o variables de estado del sistema.
- **Variables auxiliares:** son variables que ayudan a definir las variables de flujo, haciendo el modelo más comprensible y manejable (Figura 8).

Todas las relaciones entre las variables deben de estar cuantificadas y la forma más frecuente de establecer la relación entre las mismas es mediante una expresión analítica.



**Figura 8.** De izquierda a derecha: nivel, flujo y variables auxiliares de un diagrama de flujos.

## • Análisis molecular :

### Genes diana

La utilización de marcadores moleculares está siendo una herramienta de mucha utilidad en el estudio de la parasitología humana y animal (Azeredo-Espin y Lessinger, 2006) gracias a la información específica contenida en la molécula de ADN.

Las técnicas basadas en el análisis del ADN en general, y del ADN mitocondrial en particular, presentan numerosas ventajas sobre la identificación de dípteros cuando las especies objeto de estudio están dañadas o es complicada su clasificación morfológica (Wells et al., 2001; Malgorn y Coquoz, 1999), esta herramienta facilita la identificación taxonómica en cualquier etapa del insecto.

Los marcadores moleculares frecuentemente utilizados en la filogenia de insectos suelen ser fragmentos de genes mitocondriales (mtDNA) o genes nucleares. Los genes nucleares, mitocondriales y las regiones intergénicas acumulan mutaciones

en el transcurso del tiempo a diferentes velocidades, dependiendo de la función y modo de herencia.

El análisis de ADN mitocondrial ha sido ampliamente utilizado para investigaciones de diagnóstico, taxonomía y evolución dentro de las poblaciones de animales, particularmente en poblaciones de insectos, convirtiéndose en una herramienta muy valiosa desde el punto de vista veterinario y dentro de la entomología forense (Sperling et al., 1994; Wells y Sperling, 2001).

En el caso de esta última, resulta de gran ayuda poder determinar por ejemplo si los cuerpos se han movido o interferido, este tipo de conocimientos se aplica en investigaciones criminales (Catts y Goff, 1992; Benecke, 2008) o el cálculo de la edad de las larvas que permite la determinación de un mínimo intervalo post-mortem (Easton y Smith, 1970; Marchenko, 2001; Erzinclioglu, 1983; Leclercq, 1999; Goff, 1992).

Estos marcadores (mtDNA y rDNA) han contribuido a la diferenciación entre las especies y al desarrollo de estudios evolutivos y de agentes etiológicos y epidemiológicos (Nirmala et al., 2001; Otranto y Stevens, 2002; Singh et al., 2010).

Son varios los genes o regiones del mtDNA que se pueden utilizar como marcadores moleculares como el citocromo B, citocromo Oxidasa I y II, región control (D-loop) entre otros. El gen de la Citocromo oxidasa I (COI), se ha propuesto a nivel mundial como un buen marcador (Wallman y Donnellan, 2001; Zehner et al., 2004; Harvey y Dadour, 2003). Su tamaño (~1500 pb) y la presencia de regiones altamente conservadas y variables con un rango diferente de las tasas de mutaciones hacen que este marcador sea una buena elección que permite diferenciar y establecer claramente las relaciones filogenéticas entre especies próximas (Lunt et al., 1996). Para este marcador se han desarrollado un conjunto de 10 cebadores para PCR que cubren las zonas conservadas del gen la citocromo oxidasa I que son ampliamente utilizados en los análisis moleculares de insectos (Zhang y Hewitt, 1997; Otranto et al., 2003a).

Los genes de ADN ribosómico, que constituyen una familia de DNA moderadamente repetitivo, también han demostrado ser herramientas útiles para la identificación de cepas y/o especies de parásitos. Los rDNA constan de varias unidades repetidas en tándem que contienen los espaciadores y los genes para los RNAs ribosómicos 18S, 5.8S y 28S (Stevens y Wall, 2001., 2003; Otranto y Stevens, 2006).

Según lo expuesto, los marcadores genéticos son la elección lógica en el intento de diseñar herramientas de identificación para mejorar por ejemplo la resolución filogenética dentro y fuera de órdenes de insectos (Stephen et al., 2008). Así, dentro del estudio de estas parasitosis, Otranto et al., (2003b) realizaron estudios de larvas pertenecientes a las cuatro subfamilias de Oestridae (Cuterebrinae, Gasterophilinae, Hypodermatinae y Oestrinae) para determinar la divergencia intra-específica e inter-específica, y establecer claramente las relación filogenética entre las especies analizadas y las cuatro subfamilias.

Lunt et al., 1996 llevaron a cabo un análisis comparativo del gen mitocondrial para la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI) en nueve especies de insectos, entre ellos ortópteros (saltamontes y una langosta), dípteros (moscas de la fruta, mosquitos y mosca azul) e himenópteros (abeja) demostrando que las diferentes regiones de la COI evolucionan a un ritmo diferente. Otros investigadores han empleado este marcador para evaluar tasas de evolución en insectos pertenecientes a los órdenes, Orthoptera (Harrison et al., 1987; Zhang et al., 1995; Lunt et al., 1996), Diptera (Nigro et al., 1991; Spicer, 1995; Lunt et al., 1996), Hymenoptera (Lunt et al., 1996), Lepidoptera (Brown et al., 1994; Landry et al., 1999) y Arachnida (Zhang y Hewitt, 1996).

Esta disciplina de diagnóstico molecular ha abierto nuevas vías de estudio dentro de las diferentes especies de dípteros para el estudio de su taxonomía y filogenia (Cameron et al., 2007; Shao y Barker, 2007). Sin embargo, los datos moleculares de especies de la familia Oestridae siguen siendo muy escasos.



## **CAPÍTULO 2. OBJETIVOS**



## CAPITULO 2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta el gran desconocimiento que existen en relación con aspectos como la biología, la ecología y comportamiento de los dípteros causantes de miasis, sobre todo en los referente a su desarrollo y a su ciclo biológico, y de las grandes similitudes morfológicas y biológicas entre *Oestrus ovis*, una especie de amplia distribución y que parasita a diversas especies de ungulados, y *Oestrus sp.* que parasita a la Cabra Montés del Parque Natural de Sierra Nevada, los objetivos propuestos en este trabajo son:

**1.-** Estudiar en *Oestrus sp.* el proceso de pupación y emergencia de imagos en condiciones de laboratorio. En concreto analizaremos el éxito de eclosión, los efectos de peso y del sexo sobre la supervivencia de las pupas, la duración de la formación del puparium, duración de la fase pupa y la longevidad de los adultos.

**2.-** Modelizar mediante Dinámica de Sistemas el ciclo biológico de *Oestrus sp.* utilizando datos de campo y de laboratorio de ambas especies (*O. ovis* y *Oestrus sp.*, asumiendo su similitud) con objeto de obtener una visión estructurada del proceso y sus aspectos más críticos. Determinar qué umbral mínimo de individuos permite mantener una dinámica estable de la población y el número de generaciones anuales del parásito.

**3.-** Determinar mediante marcadores moleculares si la especie que parasita a Cabra Montés (*Capra pyrenaica*) en el Parque Natural de Sierra Nevada (*Oestrus sp.*) es una especie distinta de *O. ovis*. Además este análisis nos dará información de si *Oestrus sp.* infecta a otros ungulados de diferentes poblaciones.



**CAPÍTULO 3. DESCRIPCIÓN DE LAS  
LARVAS LIII**



## CAPITULO 3. DESCRIPCIÓN DE LAS LARVAS LIII

Se realizaron necropsias a cabras domésticas, silvestres, muflones y ovejas. Las larvas extraídas, objeto de estudio, se identificaron siguiendo sus características morfológicas, la mayoría de las veces resultaba difícil debido al mal estado de conservación y al gran parecido entre ellas.

Para la identificación morfológica se utilizaron las claves entomológicas “Morphology, Biology and Pathogenesis of Myiasis-Producing Flies 175-180pp” de Zumpt (1956), en estas se describen las principales características tanto de los estadios larvarios como del adulto. Las principales características se centran en la ausencia o presencia de espículas o el número de filas de estas que se pueden encontrar en un determinado segmento.

En nuestro estudio morfológico hemos observado dos tipos de larvas diferentes: una las procedentes de las necropsias de cabra doméstica, oveja y muflón que las identificamos como *O. ovis* y otra la procedente de Cabra Montés como *Oestrus sp.*

- **Características morfológicas de Larva III de *Oestrus ovis***

La larva del tercer estadio de *O. ovis* (Figura 9) es de color amarillo con bandas oscuras, presenta un tamaño variable entre 20mm y 22mm y compuesta por 12 segmentos. En la parte anterior se sitúa el pseudocefalon que comprende los dos primeros segmentos. En el primero de ellos se encuentran los ganchos bucales y los lóbulos antenales.

Dorsalmente presenta bandas transversales fuertemente pigmentadas que van aumentando de intensidad desde la parte anterior a la caudal. Otra de las características visibles en todos los segmentos es la ausencia de espículas haciéndose visibles el último segmento alrededor de la protuberancia anal.

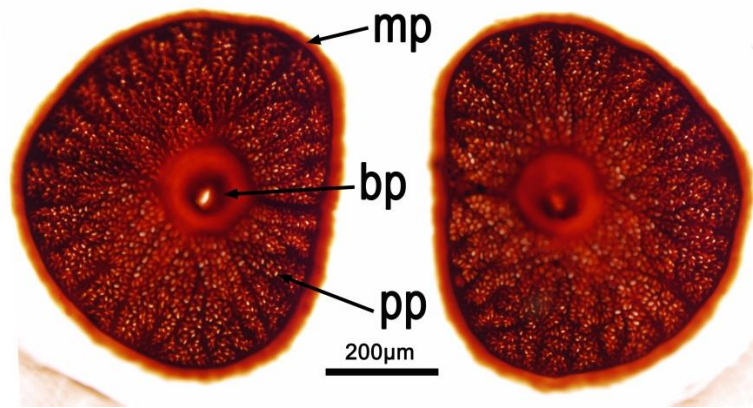
Ventralmente el segmento II presenta espinas irregulares y poco numerosas, a partir del tercer segmento empiezan a ser más regulares y se distribuyen formando

filas de espinas dispuestas transversalmente en grupos de dos hasta cinco por segmento.

Los peritremos se sitúan en el último segmento. Están formados por dos estructuras redondas enfrentadas con una separación entre ellas, presentan una membrana peritremal gruesa y muy pigmentada, los botones peritremales enfrentados y situados en el plano ecuatorial de cada peritremo, el interior se presenta con numerosos poros distribuidos en lóbulos bien diferenciados (Figura 10).



**Figura 9:** Larva LIII de *Oestrus ovis* visión dorsal (izquierda) y ventral (derecha).



**Figura 10:** Peritremos posteriores de la Larva LIII de *Oestrus ovis*. **mp:** membrana peritremal; **pp:** poro peritremal; **bp:** botón peritremal.

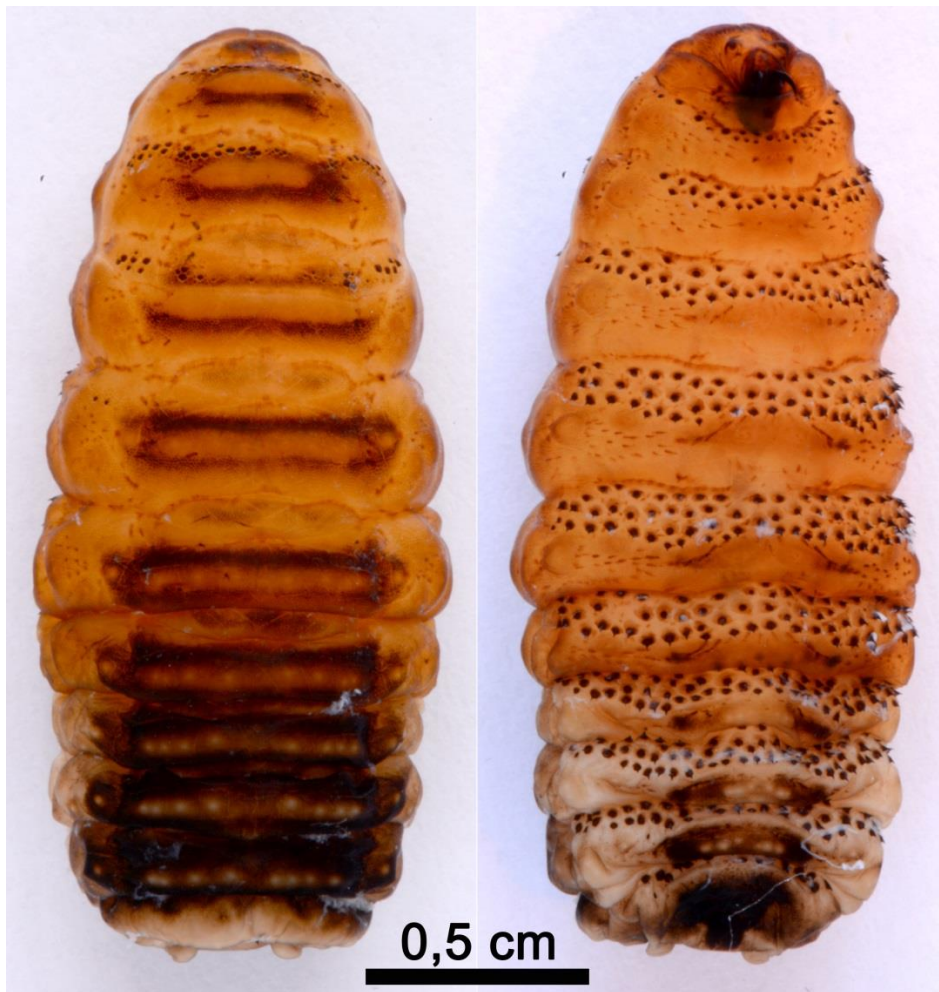
- **Características morfológicas de Larva III de *Oestrus sp*:**

Las larvas del tercer estadio (Figura 11) que parasita a la Cabra Montés son de color amarillento con bandas oscuras, presenta un tamaño que oscila entre 20mm y 22mm y están compuestas por 12 segmentos. En la parte anterior se sitúa el pseudocefalon que comprende los dos primeros segmentos. En el primero de ellos se encuentran los ganchos bucales y los lóbulos antenales.

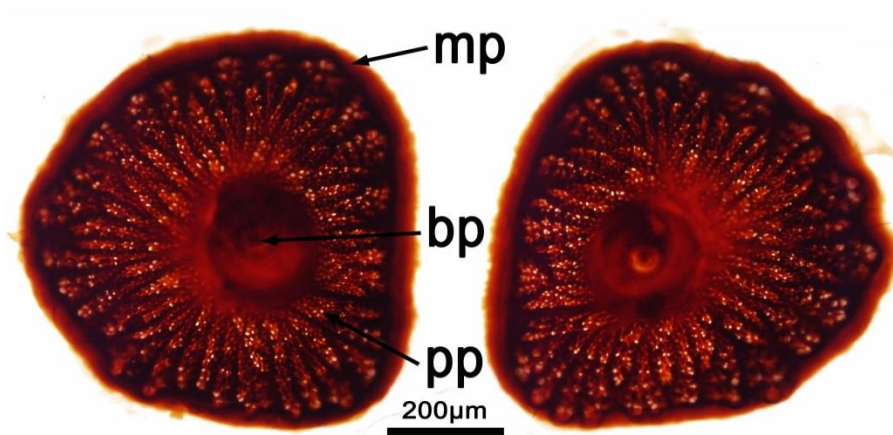
Dorsalmente se observan bandas oscuras transversales a lo largo de todos los segmentos. Presentan espículas en grupos irregulares de dos a tres filas en los segmentos tres y cuatro, en el quinto segmento las espinas se presentan en dos grupos laterales. El resto de segmentos carecen de espículas excepto el último que presenta espinas en la protuberancia anal.

Ventralmente se observan espinas irregulares en el segmento III y IV después de estos empiezan a ser más regulares y numerosas hasta llegar al último. Las espículas se distribuyen formando filas de espinas dispuestas transversalmente en grupos de dos hasta cinco por segmento hasta llegar al segmento número XII.

Los peritremos se sitúan en el último segmento. Están formados por dos estructuras redondas enfrentadas con una separación entre ellas, presentan una membrana peritremal gruesa y muy pigmentada, los botones peritremales enfrentados y situados en el plano ecuatorial desplazados hacia la izquierda del centro de cada peritremo, el interior se presenta con numerosos poros distribuidos en lóbulos bien diferenciados (Figura 12).



**Figura 11:** Larva LIII de *Oestrus sp.* visión dorsal (izquierda) y ventral (derecha).



**Figura 12:** Peritremos posteriores de la Larva LIII de *Oestrus sp.* **mp:** membrana peritremal; **pp:** poro peritremal; **bp:** botón peritremal.

**CAPÍTULO 4. CULTIVO IN VITRO  
DE LAS LARVAS LIII**



Se realizó un cultivo con larvas III procedentes de las necropsias de las cabezas de la Cabra Montés del Parque Natural de Sierra Nevada con el fin de poder observar el proceso de pupación y emergencia de imagos. Comprobar cómo afecta la temperatura y poder cuantificar la duración de la formación del puparium, la duración de la fase pupa y la longevidad de los adultos en condiciones de laboratorio.



# IN VITRO REARING *OESTRUS CAUCASICUS* THIRD-INSTAR LARVAE AND PUPAE (DIPTERA: OESTRIDAE) FROM NATURALLY-INFESTED IBERIAN IBEX, *CAPRA PYRENAICA* (ARTIODACTYLA: BOVIDAE)

PÉREZ J.M.\*, GRANADOS J.E.\*\*, MORENO V.\*, CALABUIG G.\*\*\*, MOÇO G.\* & SERRANO E.\*\*\*\*\*

## Summary:

Third-instar *Oestrus caucasicus* larvae ( $n = 236$ ) obtained from Iberian ibex, *Capra pyrenaica*, were reared in a laboratory to obtain adult flies. They were maintained at a temperature of  $21.9 \pm 2.7^\circ\text{C}$  and a relative humidity of  $38.9 \pm 8.0\%$ . In all, 78 imagos emerged (33.1%), with a sex-ratio at emergence not differing significantly from 1:1; 25 larvae did not complete pupariation. A total of 14 adult flies (17.9% of the adults obtained) showed malformations, mainly in their wings. The pupariation period lasted around 30 hours and the pupal stage lasted on average  $29.8 \pm 6.8$  days. The success of pupation in both sexes was mainly determined by the weight of the larvae. Sexual dimorphism, with higher weights in females, was evident in third-instar larvae, pupae and adults. The mean longevity of adult flies was  $224.8 \pm 91.4$  hours and males generally survived for longer than the females.

**KEY WORDS :** *Capra pyrenaica*, Diptera, Oestridae, *Oestrus caucasicus*, culture, biology, pupation, demography.

**Résumé :** CULTURE *IN VITRO* DE LARVES ET NYMPHES D'*OESTRUS CAUCASICUS* (DIPTERA : OESTRIDAE) PROVENANT DE BOUQUETINS IBÉRIQUES *CAPRA PYRENAICA* (ARTIODACTYLA : BOVIDAE) NATURELLEMENT INFESTÉS

Des larves de troisième stade d'*Oestrus caucasicus* ( $n = 236$ ) provenant de bouquetins ibériques (*Capra pyrenaica*) ont été élevées en laboratoire afin d'obtenir des adultes. Elles ont été maintenues à une température de  $21,9 \pm 2,7^\circ\text{C}$  et une humidité relative de  $38,9 \pm 8,0\%$ . 25 larves n'ont pas présenté de nymphose complète, 78 imagos ont achevé leur émergence (33,1 %) avec un sex-ratio ne différant pas significativement de 1:1. 14 mouches adultes (17,9 % des adultes obtenus) ont présenté des malformations, principalement au niveau des ailes. La durée de la pupariation se situe autour de 30 heures et le stade nymphal dure en moyenne  $29,8 \pm 6,8$  jours. Le succès de la nymphose dans les deux sexes est surtout en relation avec le poids des larves. Le dimorphisme sexuel, qui correspond à un poids plus important des femelles, est marqué pour les larves du troisième stade, les nymphes et les adultes. La longévité moyenne des mouches atteint  $224,8 \pm 91,4$  heures et apparaît supérieure chez les mâles.

**MOTS CLÉS :** *Capra pyrenaica*, Diptera, Oestridae, *Oestrus caucasicus*, culture, biologie, nymphose, démographie.

Larvae of Oestrinae (Diptera: Oestridae) frequently produce cavitary myiasis (nasopharyngeal cavities and frontal sinuses) in perissodactylan and artiodactylan mammals. The sheep bot fly, *Oestrus ovis*, parasitizes sheep and goats worldwide and has been reported from the Asiatic ibex (*Capra ibex sibirica*), argali (*Ovis ammon*), bighorn sheep (*O. canadensis*) and European mouflon (*O. aries*) (Grunin, 1957; Capelle, 1966; Wetzel & Bauristhene, 1970; Moreno *et*

*al.*, 1999). According to Howard (1980) it may also occur in the Nubian ibex (*C. i. nubiana*) and aoudad (*Ammotragus lervia*). Third-instar *Oestrus caucasicus* larvae were discovered in the skull of a Caucasian tur, *C. cylindricornis* and, afterwards, larvae collected from the same host and an Asiatic ibex from central Asia were reared to adults and then described (Grunin, 1957). Later, *O. caucasicus* was found to parasitize Asiatic ibex in Mongolia (Minar *et al.*, 1985) and Iberian ibex (*C. pyrenaica*) in southern Spain (Pérez *et al.*, 1996). As part of a detailed SEM study of different stages in the development of *O. caucasicus*, first- and second-instar larvae have been recently described by Guitton *et al.* (2001), who point out the differential or specific features of this parasite, in addition to important synapomorphies shared with *O. ovis*. Gravid *Oestrus* females are not strictly host specific and so domestic animals could be considered as the main source of infestation for wildlife (Colwell, 2001).

Because adult oestrid flies have rudimentary and non-functional mouthparts and thus do not feed, their larvae must accumulate all the energy reserves they will

\* Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas, E-23071, Jaén, Spain.

\*\* Parque Nacional de Sierra Nevada, Carretera Antigua de Sierra Nevada, Km 7,5, E-18071, Pinos Genil, Granada, Spain.

\*\*\* Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC), CSIC-UCLM-JCCM, Grupo de Investigación en Ecología de la Biodiversidad y Conservación, Ronda de Toledo s/n, E-13005 Ciudad Real, Spain.

\*\*\*\* Current address: Équipe Écologie des Populations, Laboratoire de Comportement et Écologie de la Faune Sauvage, INRA, Chemin de Borde-Rouge-Auzeville, BP 52627, 31326, Castanet-Tolosan Cedex, France.

Correspondence: Jesús M. Pérez.

Tel.: +34 953 212520 – Fax: +34 953 211873.

E-mail: jperez@ujaen.es

need during the pupal and adult stages. Therefore, larval weight acquires special relevance, particularly for females, which after becoming gravid must seek hosts and carry out larviposition to complete their life-cycles (Zumpt, 1965; Wood, 1987; Kettle, 1990; Cepeda-Palacios *et al.*, 1999). During *Oestrus ovis* larval growth the highest weight increases occur during the early L<sub>3</sub> phase (Cepeda-Palacios *et al.*, 1999), when larvae acquire about 45 % of their average mature weight. Cepeda-Palacios *et al.* (2000) obtained a critical weight of 0.28 g at which mature *Oestrus ovis* larvae become adult flies and also reported sex differences in mature larval weight. These authors predicted a 38 % mean reduction in adult populations of this oestrid if mature larval weight is reduced by 40 %.

The pupal development of this species has also been studied in the laboratory. Rogers & Knapp (1973) found no influence of relative humidity on the number of adults emerging from pupae, although temperature did greatly influence pupae survival. They obtained *O. ovis* adults within a temperature range of 16-32°C. At a constant temperature of 16°C, pupae developed but adults did not emerge. Also, temperatures over 32°C proved fatal for pupae development. Similar results were obtained by Breev *et al.* (1980), who obtained adult emergence within a range of 17-34°C and, in addition, reported that development in female *O. ovis* took significantly longer (30.4 ± 0.5 days for males and 32.3 ± 0.8 days for females). Within the above-mentioned temperature range, these authors obtained high mortality rates; however, minimum mortality rates (41.7 %) occurred when pupae were reared at 20°C.

Aside from scattered data on the prevalence and intensity of *O. caucasicus* parasitism in *Capra pyrenaica*, very little is known about the biology, behaviour or basic demographic parameters of this parasite. The main goal of our study were: a) to characterize the pupal stage of this oestrid in terms of duration and weight dynamics; b) to explore the effects of weight and sex on pupae survival; c) to measure eclosion success, the sex-ratio of emergent imagos, and adult longevity under laboratory conditions; and d) to analyze sexual dimorphism in terms of weight at different phases of pupation. All of these parameters will be very useful in improving our knowledge of the epizootiology of this kind of myiasis.

## MATERIALS AND METHODS

### LARVAE COLLECTION AND EXPERIMENTAL CONDITIONS

Heavily pigmented mature *Oestrus caucasicus* third-instar larvae (L<sub>3</sub>) (n = 236) were collected from the head and horn cavities of 71 Iberian ibexes from the Sierra Nevada mountain range in sou-

Variable	Minimum	Maximum	Mean ± SD
Temperature (° C)	13	30	21.9 ± 2.7
Temperature (minimum)	10	32	19.5 ± 3.1
Temperature (maximum)	18	33	23.9 ± 2.9
Relative humidity (%)	24	62	38.9 ± 8.0
Relative humidity (minimum)	20	56	33.5 ± 7.1
Relative humidity (maximum)	29	70	44.2 ± 8.8

Table I. – Temperature and relative humidity (a total of 227 daily records with minimum and maximum values) at which larvae were reared.

thern Spain (36° 55'-37° 10' N, 2° 34'-3° 40' W), as described in Pérez *et al.* (1996). These animals were randomly removed for management purposes or selectively shot when controlling outbreaks of sarcoptic mange. According to the degree of spiracular and integumental pigmentation, the physiological age of larvae corresponds to L<sub>3</sub>-D<sub>5</sub> (Cepeda Palacios *et al.*, 1999).

The larvae were weighed (to the nearest 0.0001 g) and then transferred to plastic vials containing sawdust as a substrate and reared under laboratory conditions (temperature: 21.9 ± 2.7°C; relative humidity: 38.9 ± 8.0 %) (Table I). Room temperature (current, maximum and minimum) and relative humidity (current, maximum and minimum) were recorded daily throughout the whole experimental period. The larvae were checked every day to assess pupal formation and the duration of this process. If pupae formed, the weights of each pupa were recorded 10 (P<sub>10</sub>) and 20 days (P<sub>20</sub>) after formation on the same scale. The date of adult emergence and their sex and weight were also recorded. After emerging adult flies were individually marked and kept in the laboratory to measure their longevity and observe their mating behaviour. Pupae leading to the emergence of an adult fly without evident anomalies were classified as 'perfect', while those not producing imagos or producing abnormal flies were classified as "unviable". Pupae which did not produce imagos were necropsied to confirm their death.

Pupariation is taken to be the time elapsing from the collection of larvae to the formation of the puparium; the terms "pupation" or "pupal phase" are applied to the insect from the formation of the puparium to the moment of adult emergence (Rogers & Knapp, 1973).

### STATISTICAL ANALYSES

The effect of larval weight on pupation success and sexual dimorphism were analysed by means of a Student's *t* test. The influence of sex and viability ("perfect" versus "unviable") on imago weight was analysed by a two-way ANOVA. The time elapsing before the formation of the pupa was compared between perfect and unviable pupae using a Mann-Whitney test. The

Stage	Females					Males					T-Student	P-value
	Mean	SD	Min	Max	CV (%)	Mean	SD	Min	Max	CV (%)		
Larva III	648.29	103.51	411.00	874.23	15.96	569.23	137.45	285.70	821.70	24.14	2.613	0.011
Pupa (10 days)	441.25	54.12	338.80	532.60	12.26	397.87	58.46	280.10	526.40	14.69	3.101	0.03
Pupa (20 days)	393.79	52.76	293.00	519.90	13.39	358.41	48.99	251.90	473.70	13.66	2.803	0.07
Adult	109.76	37.09	40.50	174.40	33.79	81.61	25.22	38.90	127.80	30.09	3.588	0.001

Table II. – Dynamics of weight (in mg) of pupae producing male (n = 35) and female (n = 41) adults.

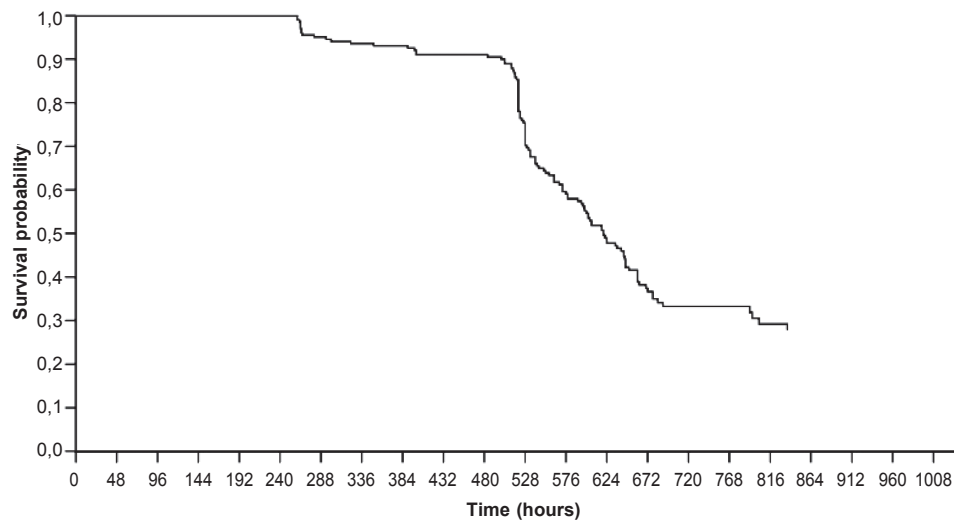


Fig. 1. – Survival curve during *Oestrus* metamorphosis controlled by time-dependent covariables LW and  $P_{10}$ .

influence of pupal weight on the emergence of the imago was analysed by a MANOVA test, with  $P_{10}$  and  $P_{20}$  as dependent variables and “perfect” and “unviable” as factors. The possible differences between male and female flies in terms of time spent in the pupal phase were checked by a Mann-Whitney test. We also used Mann-Whitney and Chi-square tests to analyse sexual differences in longevity and to assess deviations from a 1:1 sex ratio, respectively. A survival analysis (Cox regression) was used for modelling survival based upon the values of given covariates (weight and sex in the case of our study) (Therneau & Grambsch, 2000). Given that it decreased during pupal development (Table II), weight was transformed into a time-dependent covariate in the following way: if time is < than five days, use  $L_3$  weight; if it is > than five days and  $\leq$  than 10 days, use  $P_{10}$  weight; and, finally, use  $P_{20}$  weight if time is > than 10 days.

Data analyses were performed with the aid of the programme SPSS 12.0 (SPSS Inc, 2003) and the null hypothesis was rejected at a  $< 0.05$ .

## RESULTS

Of the 236 larvae reared, a total of 78 adult flies (33.1 %) were obtained: 41 females, 35 males and two specimens from which data regarding

sex were not available (sex-ratio = 1.17, not significantly different from a female: male sex ratio of 1:1,  $\chi^2 = 0.636$ ; 1 df;  $p = 0.425$ ). The remaining individuals died during the different developmental phases (Fig. 1). Larvae producing males took  $31.5 \pm 13.4$  hours to form the puparium and those producing females did so in  $30.0 \pm 17.2$  hours (no significant differences were found:  $U = 597$ ,  $p = 0.207$ , Mann-Whitney test). Mature third-instar larvae weighed, on average,  $594.8 \pm 129.8$  mg (range: 241.5-874.3 mg). Larval weights fitted a normal distribution. 25 larvae (10.6 %) did not form a puparium, 147 (62.3 %) did not complete pupation (that is, no adult emerged,  $n = 133$ , or produced abnormal imagos,  $n = 14$ ) and only in 64 cases (27.1 %; 34 males and 30 females) did adults without evident abnormalities emerge (Table III). Of the 14 abnormal imagos, 13 showed vestigial wings (one of them had its legs

Pupation development	N	Mean weight (mg)	Standard deviation
No pupa produced	25	556.5	160.5
No eclosion reached	133	605.5	109.2
Adult with malformations	14	604.0	91.8
Perfect	64	611.6	129.9

Table III. – Larval weights in relation to success of pupation and production of imagos.

stuck to the inner wall of the puparium and another had a malformation in its abdominal tergites) and the other emerged with its right wing stuck to the puparium.

The success of pupation and adult emergence were influenced by larval weight, since the larvae that produced imagos were significantly heavier than those which did not complete pupation and/or produced unviable flies ( $T = -3.289$ , 231 df,  $p = 0.002$ , T-Student test) (Table II, Fig. 2). Larval and pupal survival depended on the minimum weight obtained and its dynamics according to time (Wald = 0.09, 1 df,  $p = 0.03$ , Cox regression), but was independent of sex (Wald = 0.112, 1 df,  $p = 0.738$ , Cox regression). The most critical period appears to be the last ten days of pupal development, when survival probability is reduced by 60 %. The duration of the pupal stage reached a mean value of  $714.0 \pm 163.7$  hours, or  $29.8 \pm 6.8$  days. No significant differences were found between sexes ( $U = 495$ ,  $p = 0.823$ , Mann-Whitney test), or between perfect and unviable adults ( $U = 2886$ ,  $p = 0.182$ , Mann-Whitney test). As expected, pupal development involved weight losses of up to 85 % of the weight of the post-feeding larvae (Table II).

At room temperature adult males survived  $233.4 \pm 83.0$  hours ( $n = 16$ ; range: 102-462); however, females survived a significantly shorter period of  $219.5 \pm 97.6$  hours ( $n = 26$ ; range: 27-433) (Pearson's chi square test = 5.704; 1 df;  $p = 0.017$ ). Adult females weighed on average nearly 38 % more than males (Table II). Mating behaviour was recorded only once, involving the adults marked as O-94 (male) and O-95 (female).

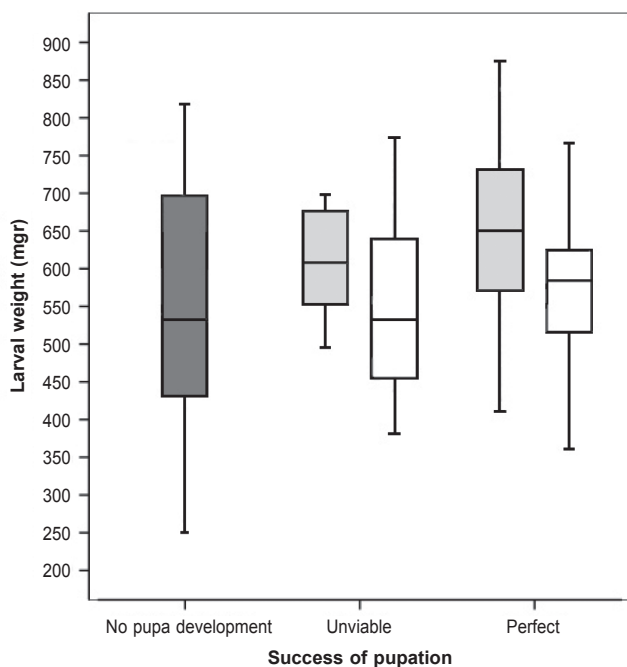


Fig. 2. – Relation between larval weight and success of pupation. Grey boxes: females; white boxes: males.

## DISCUSSION

The percentage of adult flies that emerged was smaller than that reported by other authors for *Hypoderma lineatum* (72 %) and *H. bovis* (55 %) at 20° C. These rates increased up to 86 % and 77 %, respectively, when larvae were reared at 15-25° C and 14-26° C/16-24° C (Pfadt *et al.*, 1975). Rogers & Knapp (1973) obtained 42.8 % adult emergence after rearing *Oestrus ovis* larvae at 16° C-32° C. Breev *et al.* (1980) obtained a hatch rate of 35 % in *Oestrus ovis* adults after rearing larvae at 29.6° C and mortality rates higher than ours when temperature exceeded 34° C. Temperature has a strong influence on pupal development and within the range at which pupation can be achieved, 17-34° C for *O. ovis* (Breev *et al.*, 1980), it appears to be inversely related to the percentage of adults emerging.

In our study, the pupariation period was longer than that obtained by Cepeda-Palacios & Scholl (2000) when reared *Oestrus ovis* at temperatures ranging from 16 to 32° C: 12 hours in heavily pigmented larvae and 22 hours in slightly pigmented larvae. The pupal period of the sheep bot fly can range from 12 to 52 days depending on environmental conditions such as temperature, as reported by Breev *et al.* (1980). The mean value obtained in our study was within this range and very similar to that given by these authors for a temperature of 19.9° C:  $30.4 \pm 0.5$  days; nevertheless, our findings were higher than those given by both Cepeda-Palacios & Scholl (2000) and Cepeda-Palacios *et al.* (2001), who reported that males emerged after 22 days and females after 23 days, and by Rogers and Knapp (1973), who recorded a mean value of  $20.1 \pm 3.3$  days for *Oestrus ovis*, possibly because of a lower mean rearing temperature. The pupal period of cattle grubs averaged 21.7 days in *Hypoderma lineatum* and 28.8 days in *H. bovis* (Pfadt *et al.*, 1975) and was shown to increase as temperature decreased. According to Biggs *et al.* (1998), an extended pupation time may prevent the emergence of adults under adverse climatic conditions. This phenomenon may be considered as an alternative strategy to the overwintering of first-instar larvae and as an external hypobiotic period as well (Tabouret *et al.*, 2001).

Weight decrease from the moment of larvae collection to adult emergence can be considered as a good example of the maximum use of body reserves. After intestinal evacuation, the cuticle of *Oestrus ovis* still loses water during the process of sclerotization and phenolic tanning. Glycogen is also mobilised during the process of metamorphosis (Wigglesworth, 1984; Cepeda-Palacios & Scholl, 2000). Although females were heavier than males during all of the developmental stages studied (all  $p$ -values < 0.05,  $t$ -Student

test) (Table II), maximum sexual dimorphism was reached in imagos (male weight/female weight = 0.74), followed by L<sub>3</sub> weight (0.87) and, finally, by pupal weight (0.9 for P<sub>10</sub> and P<sub>20</sub>). It is also remarkable that weight variability was greater in L<sub>3</sub> and imagos (CV = 20.05 % and 31.94 %, respectively) than in pupae (CV = 13.47 % for P<sub>10</sub> and CV = 13.52 % for P<sub>20</sub>). Regarding larval and adult weight, sexual dimorphism has also been reported in *Hypoderma tarandi* and *Cephenemyia trompe* (Nilssen, 1997).

The longevity of the adult flies obtained was short, not reaching 10 days (9.4 ± 3.8 days), but was similar to that obtained by Biggs *et al.* (1998) in *Oestrus ovis* (mean longevity = 7.7 days). Rogers & Knapp (1973) recorded a mean adult *O. ovis* survival rate in the laboratory of 15.9 ± 6.0 days. Biggs *et al.* (1998) found that both *O. ovis* adult males and females have similar energy reserves (near 27 kJ/g). If adult *O. caucasicus* show a similar pattern, then the activities of host seeking and larviposition by females will explain their shorter longevity.

Rogers & Knapp (1973) estimated that mortality during immature (larval) stages of *O. ovis* in wild populations ranged from 90.2 to 99.1 %. If the wild population of *O. caucasicus* has a similar mortality rate and we add the rate obtained in the laboratory for the pupal stage, then we can estimate that only about a 0.3-3 % of larvae produced by gravid females will become adult flies. *Oestrus ovis* females lay about 500 eggs (Kettle, 1990). For demographic calculations we must take into account a relatively low mean intensity (25.4 ± 27.3 larvae/host) along with a high mean prevalence (74 %) and at least two generations per year (Pérez *et al.*, 1996) within the context of a host population of around 15,000 ibexes (Granados *et al.*, unpublished data).

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the staff of the Sierra Nevada Natural Park for helping our research and, above all, J. Navarro, M.C. Pérez, A. Rodríguez, M. Alguacil and J. García for their help in field and laboratory work. Comments from Prof. Ph. Dorchie (École Nationale Vétérinaire, Toulouse) helped to improve an earlier version of this manuscript; the translation into French was kindly done by Dr G. Gonzalez (INRA, Toulouse). This study was supported by an agreement between Jaén University and the Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. We also wish to dedicate this work to the memory of our colleague and friend, Dr Isidoro Ruiz-Martínez, whose idea it was. Emmanuel Serrano has a postdoctoral grant (EX2005-1354) from the Secretaría de Estado de Universidades e Investigación of the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain), Gisela Moço has a Ph.D. fellowship (SFRH/

BD/10546/2002) from the Fundação para a Ciência e Tecnologia of the Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (Portugal) and Gustau Calabuig is supported by a pre-doctoral grant from the Junta de Comunidades de Castilla la Mancha (Spain). The research activities of the authors are also partially supported by the Plan Andaluz de Investigación, Junta de Andalucía (RNM-118).

## REFERENCES

- BIGGS H.C., McCLAIN E., MULLER G.L., ANTHONISSEN M. & HARE K.M. A prediction model for strike in the sheep nasal fly, *Oestrus ovis*, in Namibia. *Preventive Veterinary Medicine*, 1998, 33, 267-282.
- BREEV K.A., ZAGRETDINOV R.G. & MINÁR J. Influence of constant and variable temperatures on pupal development of the sheep bot fly (*Oestrus ovis* L.). *Folia Parasitologica*, 1980, 27, 359-365.
- CAPELLE K.J. The occurrence of *Oestrus ovis* L. (Diptera: Oestridae) in the bighorn sheep from Wyoming and Montana. *Journal of Parasitology*, 1966, 52, 618-621.
- CEPEDA-PALACIOS R., ÁVILA A., RAMÍREZ-ORDUÑA R. & DORCHIES P. Estimation of the growth patterns of *Oestrus ovis* L. larvae hosted by goats in Baja California Sur, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 1999, 86, 119-126.
- CEPEDA-PALACIOS R., FRUGÈRE S. & DORCHIES P. Expected effects of reducing *Oestrus ovis* L. mature larval weight on adult populations. *Veterinary Parasitology*, 2000, 90, 239-246.
- CEPEDA-PALACIOS R., MONROY A., MENDOZA M.A. & SCHOLL P.J. Testicular maturation in the sheep bot fly *Oestrus ovis*. *Medical and Veterinary Entomology*, 2001, 15, 275-280.
- CEPEDA-PALACIOS R. & SCHOLL P.J. Intra-puparial development in *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). *Journal of Medical Entomology*, 2000, 37, 239-245.
- COLWELL D.D. Bot flies and warble flies (Order Diptera: Family Oestridae), in: Parasitic diseases of wild mammals, 2<sup>nd</sup> edition. Samuel W.M., Pybus M.J. & Kocan A.A. (eds), Manson Publishing / The Veterinary Press, London, 2001, 46-71.
- GRUNIN K.Y. Nasal Botflies (Oestridae). Fauna USSR, Insecta: Diptera 19, No 3. Academy of Sciences of the USSR, Moscow, 1957 [In Russian].
- GUITTON C., PÉREZ J.M. & DORCHIES P. Scanning electron microscopy of larval instars and imago of *Oestrus caucasicus* (Grunin, 1948) (Diptera: Oestridae). *Parasite*, 2001, 8, 155-160.
- HOWARD G.W. Second stage larvae of nasal botflies (Oestridae) from African antelopes. *Systematic Entomology*, 1980, 5, 167-177.
- KETTLE D.S. Medical and veterinary entomology. CAB International, Wallingford, 1990.
- MINAR J., LOBACHEV S., KIEFER M. & BAZARDORH D. New findings of warble flies (Hypodermatidae, Oestridae) of wild animals in Mongolia. *Folia Parasitologica*, 1985, 32, 89-91.

- MORENO V., PÉREZ J.M., MORENO P.A., GRANADOS J.E., RUIZ-MARTÍNEZ I., SORIGUER R.C. & DE SIMÓN M.A. Oestrid myiasis in European mouflon from Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 1999, 35, 78-81.
- NILSSEN A.C. Factors affecting size, longevity and fecundity in the reindeer oestrid flies *Hypoderma tarandi* (L.) and *Cephenemyia trompe* (Modèer). *Ecological Entomology*, 1997, 22, 294-304.
- PÉREZ J.M., GRANADOS J.E., SORIGUER R.C. & RUIZ I. Prevalence and seasonality of *Oestrus caucasicus* Grunin, 1948 (Diptera: Oestridae) parasitizing the Spanish ibex, *Capra pyrenaica* (Mammalia: Artiodactyla). *The Journal of Parasitology*, 1996, 82, 233-236.
- PFADT R.E., LLOYD J.E. & SHARAFI G. Pupal development of cattle grubs at constant and alternating temperatures. *Journal of Economic Entomology*, 1975, 68, 325-328.
- ROGERS C.E. & KNAPP F.W. Bionomics of the sheep bot fly, *Oestrus ovis*. *Environmental Entomology*, 1973, 2, 11-23.
- SPSS Inc. SPSS 12.0 for Windows. Chicago, 2003.
- TABOURET G., JACQUIET P., SCHOLL P. & DORCHIES P. *Oestrus ovis* in sheep: relative third-instar populations, risks of infection and parasitic control. *Veterinary Research*, 2001, 32, 525-531.
- THERNEAU T. & GRAMBSCH P. Modelling survival data: extending the Cox model. Springer-Verlag, New York, 2000.
- WETZEL H. & BAURISTHENE E. The identity of the third larval stage of *Oestrus ovis* Linnaeus (1758) (Diptera: Oestridae). *Zoologischer Anzeiger*, 1970, 184, 87-94.
- WIGGLESWORTH V.B. Insect physiology. 8<sup>th</sup> Edition. Chapman and Hall, London-New York, 1984.
- WOOD D.M. Oestridae, *in*: Nearctic Diptera, Monograph No 28, Volume 2. McAlpine J.F. (ed), Agriculture Canada, Ottawa, 1987, 1147-1158.
- ZUMPT F. Myiasis in man and animals in the Old World. Butterworths, London, 1965.

Reçu le 24 mai 2006

Accepté le 18 septembre 2006

# **CAPÍTULO 5. MODELO DE DINÁMICA DE SISTEMAS**



Modelizamos el ciclo de vida de *Oestrus sp.* utilizando la Dinámica de Sistemas como herramienta. Para esta simulación recurrimos a los datos aportados por la bibliografía y los que nos proporciona nuestro estudio de laboratorio. De esta manera simulamos lo que puede ocurrir en la naturaleza y podemos ver como el modelo es muy sensible a cambios mínimos y determinar los aspectos más críticos y predecir el número de generaciones anuales de este tipo de dípteros.



## A system dynamics model of the population dynamics of *Oestrus* sp. (Diptera: Oestridae) infesting Iberian ibex, *Capra pyrenaica*

J. M. PÉREZ<sup>1\*</sup>, V. MORENO<sup>1</sup>, J. NAVAS<sup>2</sup>, N. VÉLEZ DE MENDIZÁBAL<sup>3</sup>, J. M. QUESADA<sup>2</sup>, & F. J. ESTEBAN<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal and Plant Biology, and Ecology, University of Jaén, Jaén, Spain, <sup>2</sup>Department of Mathematics, Jaén University, Jaén, Spain, <sup>3</sup>Division of Clinical Pharmacology, Department of Medicine, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN, USA, and <sup>4</sup>Systems Biology Unit, Department of Experimental Biology, University of Jaén, Jaén, Spain

(Received 2 July 2015; accepted 21 October 2015)

### Abstract

We modelled the population biology of *Oestrus* sp. parasitising the Iberian ibex (*Capra pyrenaica*), using a system dynamics approach. Levels included in the model were as follows: first-instar larvae, third-instar larvae, pupae and resilient pupae. The values used for flows and auxiliary variables were obtained from the scientific literature, including research on both *Oestrus ovis* and *O. sp.*; we assumed that these two species are closely related, both morphologically and from a biological point of view. Simulations provided by our model allowed us to estimate the minimum monthly production of first-instar larvae and thus to establish periodic population dynamics, together with predictions for the number of larval generations. The model predicted 3–4 larval generations per year. The model proved to be very sensitive to minimal changes in a number of variables, especially the first-instar larval production rate. Despite its limitations, this methodology could be a versatile tool for studying the population dynamics of this kind of parasites, and for simulating the effects of control programmes.

**Keywords:** Population biology, modelling, system dynamics, *Oestrus* sp., Oestridae

### Introduction

Oestrids (Diptera: Oestridae) are obligate parasites that remain for weeks or months in the naso-pharyngeal tract, frontal and horn sinuses (*Oestrus* spp.) (Figure 1), stomach (*Gasterophilus* spp.), inner organs or subcutaneous tissues (*Hypoderma* spp.) of their respective hosts. They cause important economic losses in livestock in both developing and developed countries (Otranto & Stevens 2002), and under certain conditions can also infect humans (Anderson 2006b).

Beyond the mechanical damage caused by *Oestrus ovis* Linnaeus, 1758 larvae in host mucosae, other alterations may appear, including dilatations, degenerative changes and squamous metaplasia in nasal passages, as well as leukocyte infiltration – mainly eosinophils – or submucosal edema (Jagannath et al. 1989). Chronic sinusitis, probably due to secondary infections associated to these myiasis, has often been reported in bighorn sheep (*Ovis canadensis* Shaw,

1804) and may affect host crania and even cause death (Allen & Bunch 1982).

*Oestrus ovis* parasitises livestock (mainly sheep) the world over and has also been reported in bighorn sheep, European mouflon (*Ovis aries* Linnaeus, 1758), argali (*Ovis ammon* (Linnaeus, 1758)), Alpine ibex (*Capra ibex ibex* Linnaeus, 1758), Asiatic ibex (*Capra sibirica* (Pallas, 1776)) and white-tailed deer (*Odocoileus virginianus* (Zimmermann, 1780)) (Grunin 1957; Capelle 1966; Wetzel & Bauristhene 1970; Moreno et al. 1999; Colwell et al. 2006). In Eurasia *Oestrus caucasicus* Grunin, 1948 is known to parasitise the Kuban tur (*Capra caucasica* Gldenstaedt and Pallas, 1783), the Asiatic ibex, and also was reported infesting the Iberian ibex (*Capra pyrenaica* Schinz, 1838) (Grunin 1957; Minar et al. 1985; Pérez et al. 1996). Recent molecular studies based on Cytochrome Oxidase I

\*Correspondence: Jesús M. Pérez, Department of Animal and Plant Biology, and Ecology, University of Jaén, Jaén, Spain. Tel: +34 953 212520. Fax: +34 953 211873. Email: [jperez@ujaen.es](mailto:jperez@ujaen.es)

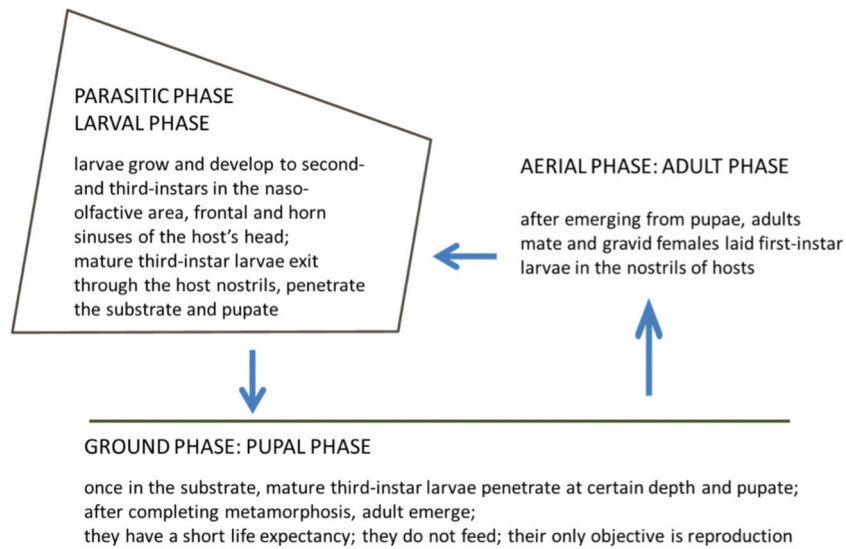


Figure 1. The life cycle of *Oestrus* sp.

(COI) and 28S rDNA sequences confirmed that the species infesting Iberian ibex is other than *O. ovis* (Moreno et al. *in press*). Nevertheless, since we have not yet obtained and genetically characterised larvae from Kuban tur, Daghestan tur (*Capra cylindricornis* (Blyth, 1841)) and Asiatic ibex, we cannot conclude that the species infesting Iberian ibex is *O. caucasicus* or, even, a new species. For this reason, hereafter, we call it *Oestrus* sp. Regarding morphological and biological features, this latter parasite species is very similar to *O. ovis* (Grinin 1957; Zumpt 1965; Colwell 2001; Guitton et al. 2001; Pérez et al. 2006).

Monitoring populations of these parasites when working on infected wild hosts is a difficult, time-consuming task. Several non-invasive methods are available for diagnosing oestrosis in wild hosts, such as Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Arias et al. 2014), pharyngeal endoscopy (Oksanen et al. 1992) or computed tomography (Fidalgo et al. 2015). Nevertheless, for epidemiological studies and a proper identification of the parasite species involved, larvae are usually obtained after necropsy (invasive method). In addition, pupae develop in the substrate at a certain depth and the behaviour of adult flies makes it extremely difficult to observe them *in vivo*, taking into account that the life cycle of the species involved in our study occurs in high mountain habitats. Therefore, our knowledge of the life cycle and demographic patterns of oestrids infesting wild hosts is scarce and fragmented, to the point that most of their demographic parameters are still unknown.

System dynamics (SD) modelling is a methodology used for simulating and analysing the behaviour

of complex models (Aracil & Gordillo 1997). SD acts as an intermediate stage between reality and its mathematical representation and can be used to predict by means of simulations important temporal variations (Martín-García 2003). From a mathematical point of view, a SD model consists of a set of first-order ordinary differential equations. Under the circumstances described above, models or simulations may help to obtain a structured vision of the infestation process and its critical aspects, and provide possible approaches for managing these infections. Within this context, the basic goal of a model is to understand how the different variables involved keep the system in a balanced stationary state, and how the system will react if a variable is modified.

There are some antecedents in the literature regarding the modelling population dynamics of Diptera using data obtained experimentally, although most refer to the Calliphoridae and Muscidae families. Some of these studies have been focused on constructing life tables that allow important demographic parameters such as the net reproductive rate ( $R_0$ ), the generation time and the instantaneous growth rate to be derived, and to predict the future structure of the studied population (Chi & Liu 1985; Chi 1988, 1997; Gabre et al. 2005).

Given that insect developmental and survival rates are determined by environmental factors such as temperature, it is not surprising that most insect population models try to quantitatively extrapolate a rate of population increase using available climate data (Atzeni et al. 1994; Wall et al. 2000). However, it must be taken into account that these models

usually include the calculation of degree-days under the assumption that above a minimum threshold (basal temperature) developmental rates are directly proportional to temperature, and that beyond this threshold development does not occur (Moon 1983; Preuss KP 1983).

Nevertheless, the control of the common green bottle fly, *Lucilia sericata* (Meigen, 1826), has been approached with the help of both deterministic (assuming no inter-individual variability) and stochastic models, which assume a certain degree of variability between individuals and cohorts (Wall et al. 1992, 1993a,b; French & Morgan 1996; Fenton & Wall 1997; Fenton et al. 1997, 1998a,b). Within the context of integrated insect-pest management, the monitoring of insect populations has also been performed by using mixed generalised lineal models (Candy 2000).

Little life cycle modelling has been carried out in oestrid research. In order to predict critical periods with the greatest numbers of attacks on hosts (larvipositions) and to design preventive and control strategies, the degree-days and the monitoring of the prevalence and intensity of oestrosis in sheep caused by *O. ovis* from Namibia have been used to address the question of development and/or survival of different parasite stages (adult, larva and pupa) (Biggs et al. 1998). On the other hand, recent work has reported a life table for an *O. ovis* population and predicted a rate of population growth of 1.25 per generation, under natural conditions (Cepeda-Palacios et al. 2011).

In our study, the life cycle of *Oestrus* sp. infesting Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) is modelled using a SD approach. Given the similarity of this species to *O. ovis*, we integrated available information for both species from larvae (parasitic phase), pupae and adult flies (free-living phases). The goal of our study is to estimate the minimum number of first-instar larvae produced by gravid females which is needed to maintain stable (periodic) population dynamics, assuming high rates of larval and pupal mortality. This information, after being validated empirically, could become crucial within control programmes for this parasitosis.

## Material and methods

### *Elements and structure of the system dynamics model*

In SD, a flow diagram (or Forrester's diagram) consists of three main elements: (i) *levels*, the state variables of the system with their respective values in each situation as the difference between input and

output flows; (ii) *flows*, used to establish the relationship between the different levels; and (iii) *auxiliary variables*, which integrate information channels between levels and flows and help to define the flow variables, thereby making the model more manageable and easier to understand. Our model includes four levels: L1 (first-instar larvae), L3 (third-instar larvae), pupae and resilient pupae; eight flows: new L1, L1 death, from L1 to L3, L3 death, from L3 to pupae, pupae death, resilience and unmeeting; and 20 auxiliary variables: larviposition, L1 death rate, L1 number, delay 1, control cycle L1 to L3, delay control cycle L1 to L3, time L1 to L3, L3 death rate, L3 number, control cycle L3 to pupae, delay 2, delay control cycle L3 to pupae, time L3 to pupae, pupae number, pupae death rate, delay 3, resilient time, control cycle pupae to resilient pupae, unmeeting rate, and offspring potential. From these auxiliary variables, larviposition (that is, the rate at which gravid females laid first-instar larvae within the host nostrils) is one of the most important with regards to the population dynamics of this fly, taking into account the very short life expectancy of adults.

Values assigned to the relationships between levels and auxiliary variables of the model were obtained from the literature. Adult life expectancy was considered as the mean obtained for males and females:  $0.31 \pm 0.13$  months (Pérez et al. 2006). The biotic potential for *Oestrus* sp. gravid females was considered to be the same as previously described for *O. ovis* (500 larvae), but, taking into account that only 30–50 larvae are laid in each larviposition (Cobbett & Mitchell 1941; Zumpt 1965), we included the auxiliary variable “Larviposition”, which was parameterised after making the model periodic. In addition, we have taken into account two larval instars (L1 and L3) in order to simplify the system. Assuming overall larval mortality of 90% (Rogers & Knapp 1973) and depending on climatic conditions (mainly temperature), the complete larval phase (L1–L3) lasts from 20 days to a number of months (Dorchies et al. 1999; Tabouret et al. 2001). Thus, even if it is included, the intermediate L2 instar does not become informative or significant to the model. In the model, we assumed a long larval period of 25 days (0.83 months): “Time L1 to L3”, which is also an auxiliary variable, as the arithmetic mean of the values obtained by Dorchies et al. (1999) and Tabouret et al. (2001). In addition, *in vitro* culture experiments showed that *Oestrus* sp. post-feeding third-instar larvae have a mortality rate of 10.6% and that they take 1.28 days (“Time L3 to Pupae”) on average to pupate, the pupal stage then lasting for

30 days (Pérez et al. 2006); all of these values were included in the model.

The emergence rate of adult flies reaches 43.6% (assuming a mortality rate of 56.4% during the pupal phase) with a sex ratio not differing significantly from 1:1 (Pérez et al. 2006). However, we assumed that 17.9% of adult flies emerged with vestigial wings and would probably not reproduce (Pérez et al. 2006). Because we have no information about the natural mortality of adults (e.g. by predation) nor regarding the success of mating and the rate of larviposition by gravid females (e.g. the success regarding different larviposition attempts), we have integrated the mortality rate of the pupal phase, the sex ratio, and the rate of vestigial adults into the level “resilient pupae”. The offspring potential reaches a value of 250 (since only about the 50% of adult flies are females).

In order to emulate the seasonal fluctuations in the life cycle, particularly those regarding the number of larvae belonging to each instar (Pérez et al. 1996), we have introduced different fixed delays in the model, just prior to passing to the next level, and three control cycles as well. These control cycles are defined as step functions and are also important auxiliary variables of the model.

The time unit used in this work was the month. The model of the life cycle for *Oestrus* sp. was developed with the software Vensim PLE 6.2 (Ventana Systems, Inc. 2003). In the first simulation, using an initial value of eight L1, 18 L3, 16 pupae and eight resilient pupae, we looked for the conditions that guaranteed the periodic behaviour of the population – that is, a rate of increase over time equal to or very near to zero (Caughley & Gunn 1996). These initial values are based on data on intensity of parasitism described by Pérez et al. (1996). The time length for the simulation was 25 years, for which we used the Runge Kutta method for numerical integration, with a step of  $h = 0.015625$ .

Finally, after estimating the value of larviposition which makes the model stable, we carried out a sensitivity analysis of the model based on 200 simulations using a random–uniform probability distribution for larviposition rate values between 0.25 and 12.5 larvae/gravid female/month.

## Results

The general structure of the model implemented with Vensim PLE 6.2 is represented by the equations of the model (Table I) and depicted in Figure 2.

Each of the level variables represents a sector of the population and has an input flow (births) and two output flows (deaths); the velocities or rates at which these flows operate are density dependent. These rates are regulated by the control variable “delay control cycle L1 to L3” to pupae” for the period L3 pupa.

Starting from a given initial population as described below, we obtain a stable or stationary population (system) dynamics when the mean monthly rate reaches a value of five larvae per adult gravid female and month. Moreover, the model proved to be very sensitive to small changes in the value of different auxiliary variables, especially that for larviposition (Figure 3).

The model predicts 3–4 larval generations per year (Figures 4–5). In general, the values of both L1 and L3 predicted by the model are very similar to those described by Pérez et al. (1996). The model has a cyclic behaviour and, then, the predicted dynamics of the population is periodic (Figure 6).

## Discussion

Monitoring oestrosis throughout the entire life cycle of these parasites would be extremely difficult. Thus, studies usually focus on larval-parasitic (epidemiology) or adult phases in the laboratory (after larval culture), or study adult biology in the field (Anderson 2006a). However, simulation gives us an opportunity to relate all the different phases of an oestrid’s life cycle in order to obtain predictive values under specific conditions or values for each parameter.

Matrix population models (Caswell 2001) have many applications in population dynamics. They basically operate with a matrix including the age population structure for each sex class and two parameters: one including the survival rate and the other the reproductive rate for each sex and age class. Nevertheless, in our case: (i) we don’t know the sex of the larvae; (ii) they do not participate in reproduction (therefore, the matrix would contain many zeros); and (iii) we don’t know the mating success, the reproductive rate or the survival rate of adult flies.

SD allows us to better understand the system under study and the way in which its different elements are related each other. Validation of models, when empirical data are available, can be achieved easily. SD permits obtaining the value of one of its variables or elements indirectly. Moreover, there is specific software available for working with SD.

Table I. Equations describing the model. L1: first-instar larvae; L3: third-instar larvae; INTEG: integral.

---

[1]	Pupae number = pupae/75
[2]	L1 number = L1/82
[3]	L3 number = L3/75
[4]	Offspring potential = resilient Pupae $\times$ 250 $\times$ control cycle L1 to L3
[5]	Resilient pupae = INTEG (resilience-unmeeting, 8)
[6]	Control cycle pupae to resilient pupae = PULSE TRAIN(9, 1,12,500)
[7]	From L3 to pupae = delay control cycle L3 to pupae $\times$ delay 2/time L3 to pupae
[8]	Resilience = control cycle pupae to resilient pupae $\times$ delay 3/resilient time
[9]	Delay control cycle L3 to pupae = DELAY3(control cycle L3 to pupae, 0.1)
[10]	Control cycle L3 to pupae = 0.03 $\times$ PULSE TRAIN(0,1,12,500)+0.005 $\times$ PULSE TRAIN(1,2,12,500)+0.0075 $\times$ PULSE TRAIN(2,1,12,500)+ 0.02 $\times$ PULSE TRAIN(3,1,12,500)+0.05 $\times$ PULSE TRAIN(4,1,12,500)+0.03 $\times$ PULSE TRAIN(5,1,12,500) +0.015 $\times$ PULSE TRAIN(6,1,12,500)+0.055 $\times$ PULSE TRAIN(7,1,12,500)- 0.04 $\times$ PULSE TRAIN(8,1,12,500)+0.075 $\times$ PULSE TRAIN(9, 1,12,500)-0.05 $\times$ PULSE TRAIN(10, 1,12,500)
[11]	new L1 = offspring potential $\times$ larviposition
[12]	Control cycle L1 to L3 = 0.25 $\times$ PULSE TRAIN(1,1,12,500)-0.25 $\times$ PULSE TRAIN(2,1,12,500)+ 0.3 $\times$ PULSE TRAIN(3,1,12,500)-0.9 $\times$ PULSE TRAIN(4,1,12,500)+1.2 $\times$ PULSE TRAIN(5,1,12,500)-0.2 $\times$ PULSE TRAIN(6,1,12,500)-0.5 $\times$ PULSE TRAIN(7,1,12,500)+0.6 $\times$ PULSE TRAIN(8,2,12,500)+0.8 $\times$ PULSE TRAIN(11, 1,12,500)
[13]	L1 death = L1 $\times$ L1 death rate
[14]	Resilient time = 1
[15]	From L1 to L3 = delay 1 $\times$ delay control cycle L1 to L3/time L1 to L3
[16]	Time L1 to L3 = 0.83
[17]	Time L3 to pupae = 0.043
[18]	Delay control cycle L1 to L3 = DELAY3(control cycle L1 to L3, 1)
[19]	L1 = INTEG (+new L1-L1 death-from L1 to L3 + 60.8)
[20]	L3 = INTEG (from L1 to L3-L3 death-from L3 to pupae+400.18)
[21]	Larviposition = 0.02
[22]	Delay 2 = DELAY3(L3, 0.5)
[23]	Delay 1 = DELAY3(L1, 0.8)
[24]	Delay 3 = DELAY3(pupae, 0.25)
[25]	Unmeeting rate = 0.4
[26]	Unmeeting = resilient pupae $\times$ unmeeting rate
[27]	L1 death rate = 0.9
[28]	Pupae = INTEG (from L3 to pupae-pupae death-resilience+5.16)
[29]	Pupae death = pupae $\times$ pupae death rate
[30]	Pupae death rate = 0.564
[31]	L3 death = L3 $\times$ L3 death rate
[32]	L3 death rate = 0.106

---

The seasonal pattern of prevalence and intensity of parasitism by *Oestrus* sp. larvae in Iberian ibex from the southern Iberian Peninsula included three generations of first-instar larvae per year (May, July and October), followed by successive generations of L2 and L3 (Pérez et al. 1996). In this paper, the highest values of mean intensity of parasitism were achieved during the months December–January, and this could explain the “presumable” fourth peak in L1 production observed in these months, since it is not probable that adults would be active in a high mountain habitat during this period. The prediction made by our model (Figure 4) agrees with results obtained by Pérez et al. (1996).

On the other hand, under SD we cannot simulate levels that reach a value of zero, since this will cause the system to collapse. In real life in a high

mountain habitat, we would not expect to find adult flies in the period between autumn and the following spring. During this period, the parasite population is maintained by larvae within their respective hosts and by pupae at a certain profundity in the substrate, both phases showing a certain degree of diapause. In the Ebro Valley (northeast Spain), *Oestrus ovis* adults were present and active between May and November, and a larval diapause from October to February was observed (Gracia et al. 2006). This is a subject that must be studied in greater detail.

Other important factors that are difficult to model because they are not fully understood are related to parasite embryonic development, its reproductive success (generally below its biotic potential; Colwell 2001), the behaviour of adult flies during reproduction, host seeking and larviposition related to the defensive

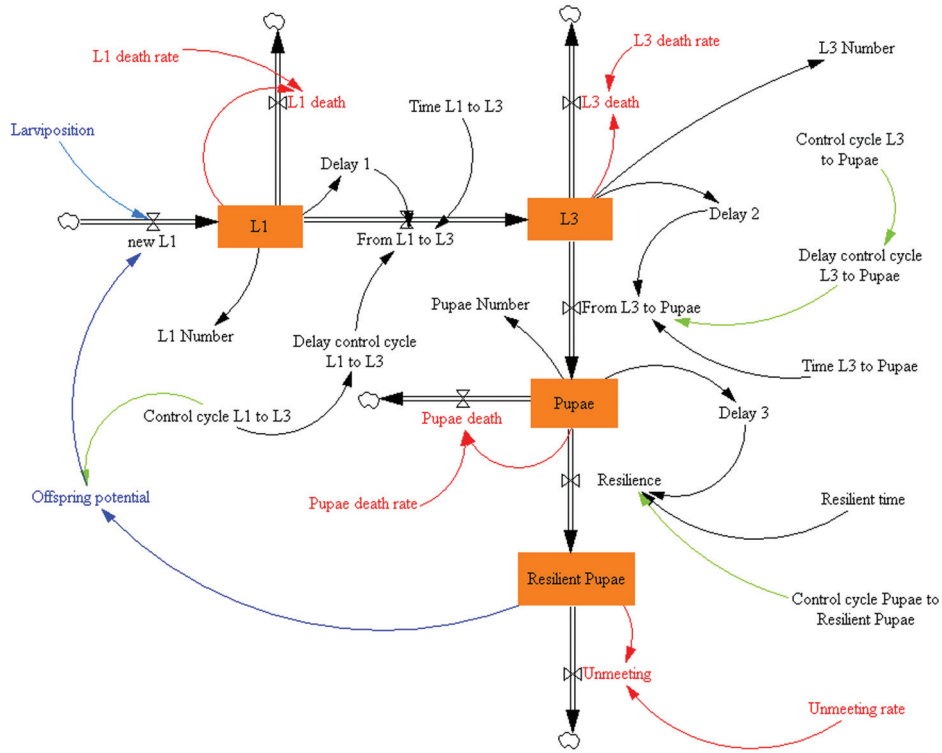


Figure 2. A Forrester's diagram representing the elements of the model together with their relationships. L1: first-instar larvae; L3: third-instar larvae.

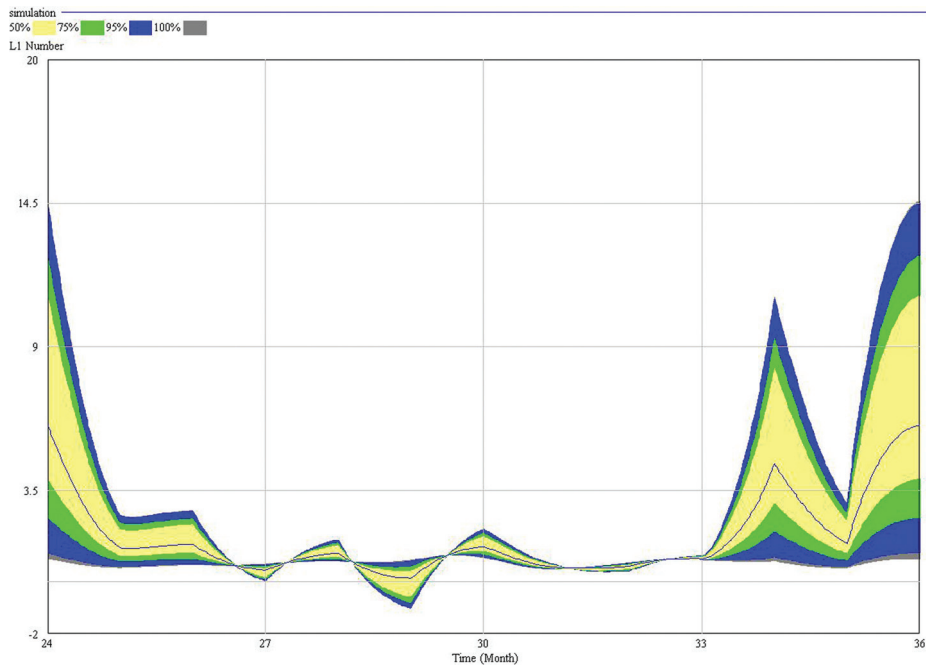


Figure 3. The sensitivity of the model, obtained after 200 simulations (larviposition ranging from 0.25 to 12.5 larvae/gravid female/month) regarding L1 (first-instar larvae) numbers (y-axis). On the x-axis, 24 and 36 represent December, and 25 to 35 represent January to November, respectively.

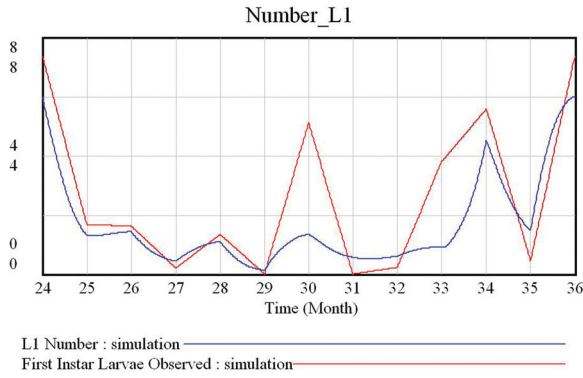


Figure 4. Dynamics of L1 (first-instar larvae) numbers. In red (bottom legend), number of L1 observed (Pérez et al. 1996). In blue (upper legend), number of L1 predicted by the model. In the x-axis, 24 and 36 represent December, and 25 to 35 represent January to November, respectively.

behaviour of hosts (Anderson 2006a), the immune response of hosts (Arias et al. 2014), the influence of the programmes for treating and controlling oestrosis (Colwell et al. 2009), and even the number of hosts present in a given area. All of these factors will determine in each case the parasite carrying capacity and the density or abundance of adult flies in a given area. In other words, basic epidemiological variables such as prevalence and incidence (including reinfestations) also need to be included in models.

Therefore, we consider that this is only a first step towards predicting certain demographic values for parasites, which would otherwise be very difficult to obtain in the field or laboratory. Nevertheless, the results obtained in this work – e.g. the minimum larval production rate (five larvae per adult female and per month) required to maintain population periodicity – suggest interesting hypotheses that need to be tested experimentally. This kind of information could become essential for oestrosis control programmes.

Future research could be focused on each phase of the parasite's cycle in order to discover how factors affecting both host and parasite – and internal and external to the system as a whole – operate and could generate more precise predictions. On the other hand, we should also consider the potential of stochastic models, which are more realistic but generate more uncertainty when predictions are made in the mid- or long term.

Aside from the host species involved, the geographical location and the respective climatological variables play an important role in the epidemiology of oestrosis. Other exogenous factors not taken into account in the model include the programmes developed for the treatment and control of these myiasis in different parts of the world (Luw 1989; Pandey 1989).

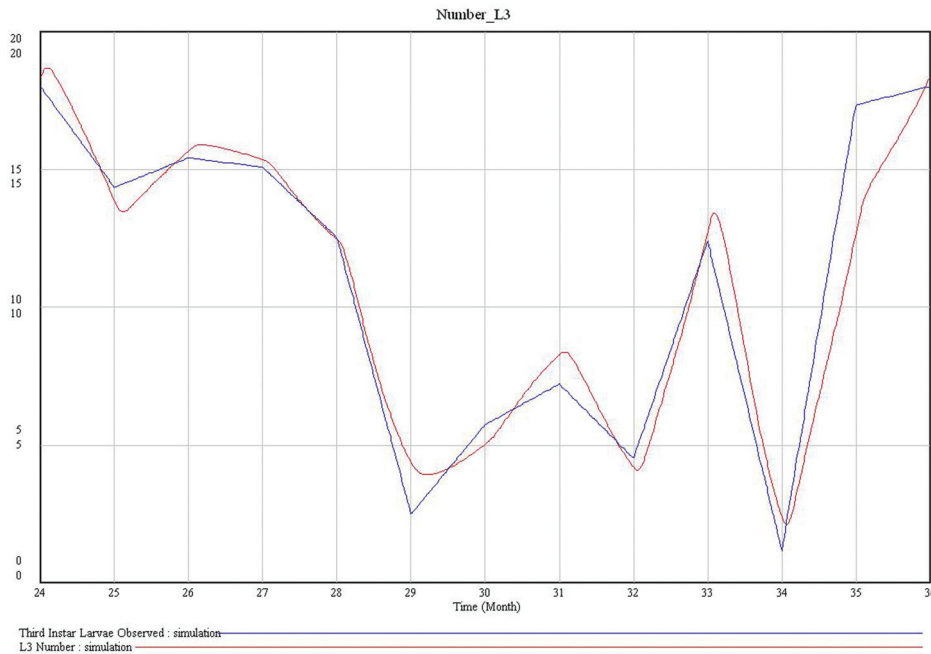


Figure 5. Dynamics of L3 (third-instar larvae) numbers. In red (bottom legend), number of L3 observed (Pérez et al. 1996). In blue (upper legend), number of L3 predicted by the model. In the x-axis, 24 and 36 represent December, and 25 to 35 represent January to November, respectively.

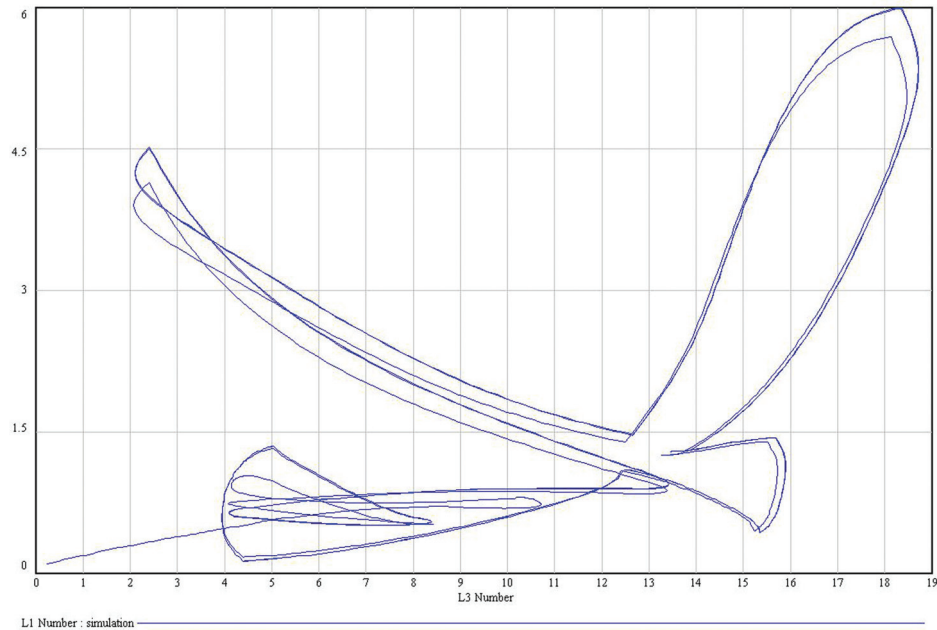


Figure 6. Limit cycle of the model. As the curve is closed, the long-term behaviour of the model is periodic. L1: first-instar larvae; L3: third-instar larvae.

## Acknowledgements

The research activities of the authors are partially supported by the Junta de Andalucía: RNM118 research group. Comments by Dr. D. Colwell allowed us to greatly improve a preliminary version of our manuscript. The authors are also indebted to Michael Lockwood for his revision of the English style.

## References

- Allen SD, Bunch TD. 1982. Cranial lesions attributable to chronic sinusitis in bighorn sheep. *Journal of the American Veterinary Medicine Association* 181:1418–1419.
- Anderson JR. 2006a. Adult biology. In: Colwell DD, Hall MJR, Scholl PJ, editors. *The oestrid flies: Biology, host-parasite relationships, impact and management*. Wallingford: CABI Publishing. pp. 141–166.
- Anderson JR. 2006b. Oestrid myiasis of humans. In: Colwell DD, Hall MJR, Scholl PJ, editors. *The oestrid flies: Biology, host-parasite relationships, impact and management*. Wallingford: CABI Publishing. pp. 201–209.
- Aracil J, Gordillo F. 1997. *Dinámica de sistemas*. Madrid: Alianza Universidad.
- Arias MS, Moreno V, Sarasa M, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Morrondo P, Díez-Baños P, Granados JE, Sánchez A, Pérez JM. 2014. Reliability of an ELISA test for diagnosing oestrosis in Iberian ibex. *Journal of Parasitology* 100:235–238. doi:10.1645/13-190.1
- Atzeni MG, Mayer DG, Spradbery JP, Anaman KA, Butler DG. 1994. Comparison of the predicted impact of a screwworm fly outbreak in Australia using a growth index model and a life-cycle model. *Medical and Veterinary Entomology* 8:281–291. doi:10.1111/j.1365-2915.1994.tb00510.x
- Biggs HC, McClain E, Muller GL, Anthonissen M, Hare KM. 1998. A prediction model for strike in the sheep nasal fly, *Oestrus ovis*, in Namibia. *Preventive Veterinary Medicine* 33:267–282. doi:10.1016/S0167-5877(97)00015-9
- Candy SG. 2000. The application of generalized linear mixed models to multi-level sampling for insect population monitoring. *Environmental and Ecological Statistics* 7:217–238. doi:10.1023/A:1009662915320
- Capelle KJ. 1966. The occurrence of *Oestrus ovis* L. (Diptera: Oestridae) in the bighorn sheep from Wyoming and Montana. *The Journal of Parasitology* 52:618–621. doi:10.2307/3276337
- Caswell H. 2001. *Matrix population models: construction, analysis, and interpretation*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Caughley G, Gunn A. 1996. *Conservation biology in theory and practice*. Oxford: Blackwell Science.
- Cepeda-Palacios R, Angulo Valadez CE, Scholl JP, Ramírez-Orduña R, Jacquet P, Dorchie P. 2011. Ecobiology of the sheep nose bot fly (*Oestrus ovis* L.): A review. *Revue de Médecine Vétérinaire* 162:503–507.
- Chi H. 1988. Life table analysis incorporating both sexes and variable development rates among individuals. *Environmental Entomology* 17:26–34. doi:10.1093/ee/17.1.26
- Chi H. 1997. *Computer program for age-stage, two-sex life table analysis*. Taichung, Taiwan: National Chung Hsin University. Available: <http://140.120.197.173/ecology/>. Accessed Mar 2015 10.
- Chi H, Liu H. 1985. Two new methods for the study of insect population ecology. *Academia Sinica, Bulletin of the Institute of Zoology* 24:225–240.
- Cobbett NG, Mitchell WC. 1941. Further observations on the life-cycle and incidence of the sheep bot, *Oestrus ovis*, in New Mexico and Texas. *American Journal of Veterinary Research* 2:358–379.
- Colwell DD. 2001. Bot flies and warble flies (Order Diptera: Family Oestridae). In: Samuel WM, Pybus MJ, Kocan AA, editors. *Parasitic diseases of wild mammals*. 2nd ed. London: Manson Publishing/The Veterinary Press. pp. 46–71.

- Colwell DD, Hall MJR, Scholl PJ. 2006. A synopsis of the biology, hosts, distribution, disease significance and management of the genera. In: Colwell DD, Hall MJR, Scholl PJ, editors. The oestrid flies: biology, host-parasite relationships, impact and management. Wallingford: CABI Publishing. pp. 220–305.
- Colwell DD, Otranto D, Stevens JR. 2009. Oestrid flies: Eradication and extinction versus biodiversity. Trends in Parasitology 25:500–504. doi:10.1016/j.pt.2009.07.011
- Dorchies P, Tabouret G, Duranton CH, Jacquet PH. 1999. Relations hôte-parasite: l'exemple d'*Oestrus ovis* (Linné 1761) chez le mouton et la chèvre. Revue de Médecine Vétérinaire 150:511–516.
- Fenton A, Wall R. 1997. Sensitivity analysis of a stochastic model for the sheep blowfly *Lucilia sericata*. The Journal of Applied Ecology 34:1023–1031. doi:10.2307/2405291
- Fenton A, Wall R, French N. 1997. Sensitivity analysis of deterministic and stochastic simulation models of populations of the sheep blowfly, *Lucilia sericata*. Journal of Theoretical Biology 184:139–148. doi:10.1006/jtbi.1996.0255
- Fenton A, Wall R, French N. 1998a. The incidence of sheep strike by *Lucilia sericata* on sheep farms in Britain: A simulation model. Veterinary Parasitology 76:211–228. doi:10.1016/S0304-4017(97)00163-5
- Fenton A, Wall R, French N. 1998b. The effect of farm management strategies on the incidence of sheep strike in Britain: A simulation analysis. Veterinary Parasitology 79:341–357. doi:10.1016/S0304-4017(98)00174-5
- Fidalgo LE, López-Beceiro AM, Vila-Pastor M, Martínez-Carrasco C, Barreiro-Vázquez JD, Pérez JM. 2015. Use of computed tomography as a non-invasive method for diagnosing cephenemyiasis in roe deer (*Capreolus capreolus*). Medical and Veterinary Entomology 29:110–113. doi:10.1111/mve.12087
- French NP, Morgan KL. 1996. A model of ovine cutaneous myiasis using the predicted abundance of *Lucilia sericata* and a pattern of sheep susceptibility. Preventive Veterinary Medicine 26:143–155. doi:10.1016/0167-5877(95)00528-5
- Gabre RM, Adham FK, Chi H. 2005. Life table of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). Acta Oecologica, International Journal of Ecology 27:179–183. doi:10.1016/j.actao.2004.12.002
- Gracia MJ, Lucientes J, Peribáñez MA, Calvete C, Ferrer LM, Castillo JA. 2006. Kinetics of *Oestrus ovis* infection and activity of adult flies. Parasite 13:311–313. doi:10.1051/parasite/2006134311
- Grunin KY. 1957. Nasal Botflies (Oestridae). Fauna USSR. Vol. 19, n° 3. Insecta: Diptera. Moscow: USSR Academy of Sciences. [In Russian].
- Guitton C, Pérez JM, Dorchies P. 2001. Scanning electron microscopy of larval instars and imago of *Oestrus caucasicus* (Grunin, 1948) (Diptera: Oestridae). Parasite 8:155–160. doi:10.1051/parasite/2001082155
- Jagannath MS, Cozab N, Vijayarathi SK. 1989. Histopathological changes in the nasal passages of sheep and goats infested with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). Indian Journal of Animal Science 59:87–91.
- Louw JP. 1989. Overberg research projects. VI. The biology and control of *Oestrus ovis* in sheep in the winter rainfall areas of the Southern Cape. Onderst. Journal of Veterinary Research 56:239–244.
- Martín-García J. 2003. Teoría y ejercicios prácticos de Dinámica de Sistemas. Barcelona, edited by the author.
- Minar J, Lobachev S, Kiefer M, Bazardorh D. 1985. New findings of warble flies (Hypodermatidae, Oestridae) of wild animals in Mongolia. Folia Parasitologica 32:89–91.
- Moon RD. 1983. Simulating developmental time of preadult face flies (Diptera: Muscidae) from air temperature records. Environmental Entomology 12:943–948. doi:10.1093/ee/12.3.943
- Moreno V, Pérez JM, Moreno PA, Granados JE, Ruiz-Martínez I, Soriguer RC, De Simón MA. 1999. Oestrid myiasis in European mouflon from Spain. Journal of Wildlife Diseases 35:78–81. doi:10.7589/0090-3558-35.1.78
- Moreno V, Romero-Fernández I, Marchal JA, Beltrán M, Granados JE, Habela MA, Tamadon A, Rakhshandehroo E, Sarasa M, Pérez JM, Sánchez A. in press. Molecular characterization of bot flies, *Oestrus* spp., (Diptera, Oestridae) from domestic and wild Bovidae hosts. Veterinary Parasitology Accepted for publication. doi:10.1016/j.vetpar.2015.08.002.
- Oksanen A, Soveri T, Nieminen M. 1992. Fiberoptic pharyngoscopy for diagnosing throat bots in the reindeer. Bulletin of the Scandinavian Society of Parasitology 2:30–32.
- Otranto D, Stevens JR. 2002. Molecular approaches to the study of myiasis causing larvae. International Journal for Parasitology 32:1345–1360. doi:10.1016/S0020-7519(02)00095-4
- Pandey VS. 1989. Epidemiology of *Oestrus ovis* infection of sheep in the Highveld of Zimbabwe. Veterinary Parasitology 31:275–280. doi:10.1016/0304-4017(89)90077-0
- Pérez JM, Granados JE, Moreno V, Calabuig G, Moço G, Serrano E. 2006. In vitro rearing *Oestrus caucasicus* third-instar larvae and pupae (Diptera: Oestridae) from naturally-infested Iberian ibex, *Capra pyrenaica* (Artiodactyla: Bovidae). Parasite 13:305–310. doi:10.1051/parasite/2006134305
- Pérez JM, Granados JE, Soriguer RC, Ruiz I. 1996. Prevalence and seasonality of *Oestrus caucasicus* Grunin, 1948 (Diptera: Oestridae) parasitizing the Spanish ibex, *Capra pyrenaica* (Mammalia: Artiodactyla). Journal of Parasitology 82:233–236. doi:10.2307/3284152
- Preuss KP. 1983. Day-degree methods for pest management. Environmental Entomology 12:613–619. doi:10.1093/ee/12.3.613.
- Rogers CE, Knapp FW. 1973. Bionomics of the sheep bot fly *Oestrus ovis*. Environmental Entomology 2:11–23. doi:10.1093/ee/2.1.11
- Tabouret G, Jacquet P, Scholl P, Dorchies P. 2001. *Oestrus ovis* in sheep: Relative third-instar populations, risks of infection and parasitic control. Veterinary Research 32:525–531. doi:10.1051/vetres:2001144
- Ventana Systems, Inc. 2003. Vensim PLE32 Version 5.3. Harvard, Ventana Systems, Inc.
- Wall R, French NP, Fenton A. 2000. Sheep blowfly strike: A model approach. Research in Veterinary Science 69:1–9. doi:10.1053/rvsc.2000.0383
- Wall R, French NP, Morgan KL. 1992. Effects of temperature on the development and abundance of the sheep blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Bulletin of Entomological Research 82:125–131. doi:10.1017/S0007485300051531
- Wall R, French NP, Morgan KL. 1993a. Predicting the abundance of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Bulletin of Entomological Research 83:431–436. doi:10.1017/S0007485300029345
- Wall R, French NP, Morgan KL. 1993b. Sheep blowfly population control: Development of a simulation model and analysis of management strategies. The Journal of Applied Ecology 30:743–751. doi:10.2307/2404252
- Wetzel H, Bauristhene E. 1970. The identity of the third larval stage of *Oestrus ovis* Linnaeus (1758) (Diptera: Oestridae). Zoologischer Anzeiger 184:87–94.
- Zumpt F. 1965. Myiasis in man and animals in the old world. London: Butterworths.



**CAPÍTULO 6. CARACTERIZACIÓN  
MOLECULAR DE *Oestrus sp.***



Con el fin de identificar la especie de oéstrido que parasita la Cabra Montés del Parque Natural de Sierra Nevada, abordamos la identificación utilizando dos marcadores genéticos diferentes, 28S rRNA y citocromo C oxidasa (COI). Para ello, se han realizado una caracterización y análisis de estos marcadores de larvas procedentes de necropsias de Cabra Montés y de otros hospedadores (ovejas, cabras domésticas y muflón europeo).





Short communication

## Molecular characterization of bot flies, *Oestrus* spp., (Diptera, Oestridae), from domestic and wild Bovidae hosts



Virginia Moreno<sup>a</sup>, Ismael Romero-Fernández<sup>b</sup>, Juan A. Marchal<sup>b</sup>, Manuel Beltrán<sup>b</sup>, José E. Granados<sup>c</sup>, Miguel A. Habela<sup>d</sup>, Amin Tamadon<sup>e</sup>, Ehsan Rakhshandehroo<sup>f</sup>, Mathieu Sarasa<sup>a</sup>, Jesús M. Pérez<sup>a,\*</sup>, Antonio Sánchez<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas, s.n., E-23071 Jaén, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas, s.n., E-23071 Jaén, Spain

<sup>c</sup> Espacio Natural Sierra Nevada, Carretera Antigua de Sierra Nevada, Km 7, E-18071 Pinos Genil, Granada, Spain

<sup>d</sup> Department of Parasitology and Parasitic Diseases, University of Extremadura, E-10071 Cáceres, Spain

<sup>e</sup> Transgenic Technology Research Center, Shiraz University, P.O. Box 71348-74478 Shiraz, Iran

<sup>f</sup> Division of Animal Health Management, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, P.O. Box: 71345-1731 Shiraz, Iran

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 April 2015

Received in revised form 29 July 2015

Accepted 1 August 2015

#### Keywords:

Bovidae

COI

28S (rDNA)

*Oestrus* spp.

Phylogeny

### ABSTRACT

The identification of *Oestrus* spp. larvae from Bovidae hosts is a difficult task due to the great morphological similarity between species. The lack of unambiguous identification criteria could have also serious epidemiological implications since domestic and wild hosts are sympatric in many natural areas. In order to accurately identify the *Oestrus* parasitizing hosts, we characterized two different genetic markers, 28S (rRNA) and COI, in larvae collected from domestic sheep and goats, European mouflon and Iberian ibex. Our sequence analyses demonstrate that all samples, except those from Iberian ibex, greatly resembles *O. ovis* and so we conclude that the species parasitizing this ibex is not *O. ovis*. Further studies will be needed to confirm whether it is in fact *O. caucasicus*, as previously suggested, or even a new species.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Oestrus* spp. are obligate mesoparasites as their larvae develop within the nasal cavities and frontal sinuses of domestic and wild hosts (Zumpt, 1965). Myiasis affects animal's welfare, causing mild to severe effects in individuals and economic losses in the livestock industry (Otranto and Stevens, 2002).

Currently, four *Oestrus* species are recognized: *O. ovis*, *O. variolosus*, *O. aureoargentatus* and *O. caucasicus*. The identity of *O. bassoni* and *O. macdonaldi* is still under discussion (Colwell et al., 2006). *O. ovis*, parasitizes sheep and domestic goats worldwide and has been reported to parasitize Asiatic ibex, argali, bighorn sheep, European mouflon, Alpine ibex, Nubian ibex and aoudad (Grunin, 1957; Moreno et al., 1999; Colwell et al., 2006). On the other hand, *O. caucasicus* larvae have been collected from Caucasian tur, Asiatic ibex and Iberian ibex (Grunin, 1957; Pérez et al., 1996).

*O. caucasicus* differs from *O. ovis* by its strong regular dorsal spinulation on segments III–V of the third-instar larvae and by the black wing veins in adult flies. The description of *O. caucasicus* was com-

pleted with a scanning electron microscopy study of larval instars collected from Iberian ibex and imagoes (Guitton et al., 2001). These two species, *O. ovis* and *O. caucasicus*, are morphologically and biologically quite similar (Pérez et al., 2006).

In light of this similarity and the fact that Iberian ibex and domestic sheep and goats are sympatric in many mountainous areas, we decided to study whether or not the morphological differences mentioned above are enough to separate these *Oestrus* species or whether, on the contrary, they merely reflect phenotypic variability within a single taxon.

Molecular markers have been used in species identification, host-specificity and the distribution of members of dipteran families. Among the most frequently used markers are the mitochondrial gene encoding for the cytochrome c oxidase subunit I (COI) and the nuclear 28S (rDNA), which also provide useful information on population genetics and for phylogenetic analyses (Otranto et al., 2003a,b, 2005a,b; Otranto and Stevens, 2002; Grisez-Duranton et al., 2002; Nelson et al., 2012).

In this paper we describe a molecular characterization of the COI and 28S (rDNA) sequences of *Oestrus* spp. larvae collected from different wild and domestic hosts. Our goal was to address the identity of the species parasitizing Iberian ibex and compare it with the oestrids collected from other hosts.

\* Corresponding author.

E-mail address: [jperez@ujaen.es](mailto:jperez@ujaen.es) (J.M. Pérez).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Collection of larvae

The *Oestrus* spp. larvae used in this study were collected from different host species (Table 1). Larvae were collected following previously described procedures (Pérez et al., 1996). They were then washed with 7% saline solution, fixed in 70% or 90% ethanol and, finally, stored at 4 °C until analysis.

### 2.2. DNA extraction and molecular analyses

Genomic DNA was extracted following the standard phenol-chloroform procedure (Sambrook et al., 1989) and the REAL pure genomic DNA extraction Kit (Durviz). In addition, the HotSHOT technique was used as described by Truett et al. (2000).

A fragment (689 bp) of the COI was amplified by PCR using primer pairs Ovis-UEA7 and Ovis-UEA10 (Zhang and Hewitt, 1997). A fragment of the 28S (rDNA) was amplified by two overlapping PCRs using two primer pairs, D1.F and D2.R; D3-5.F and D7.R, which gave PCR products of approximately 0.86 kb and 1.6 kb, respectively (Stevens and Wall, 2001). Standard PCR reactions were performed with the annealing temperatures of 55 °C and 64.3 °C for COI and 28S (rDNA), respectively. PCR amplicons were resolved in ethidium bromide-stained 1% agarose gels; the appropriate bands were isolated from the gel with QIAquick gel extraction kit (Qiagen) and cloned in JM109 bacteria using PGEMT-easy vector (Promega). Several positive clones were sequenced in both directions. Sequences were analyzed using the Bioedit program (version 7.0.9.0) (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). The number of fixed nucleotide differences and the average number of nucleotide differences between different sequence groups was calculated using the program DnaSP (available at <http://www.ub.edu/dnasp/>).

### 2.3. Phylogenetic analyses

Homologous sequences for COI and 28S (rDNA) sequences were searched for in NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the BLAST program (Altschul et al., 1997). Sequence alignments were carried out with the CLUSTAL W 1.6 software (Thompson et al., 1994). For phylogenetic analysis we used COI sequences belonging to different Oestridae genera, available in GenBank (Fig. 1).

Trees were constructed with MrBayes 3.2.3 (Ronquist et al., 2012): two independent runs, each with four Markov chain Monte Carlo, were executed for 2000,000 generations, with the first 25% discarded as burn-in. A final standard deviation value less than 0.01 (0.006678) was achieved. The majority-rule consensus tree that indicates the posterior probability values from the Bayesian analysis was obtained. The nucleotide substitution model used in the analysis was GTR+I+ $\Gamma$ , selected by the corrected Akaike Information Criterion implemented in jModelTest 2.1.6 (Darriba et al., 2012). As well, we constructed trees with Neighbor-Joining (10,000 bootstrap replicates) and Maximum Parsimony (1000 bootstrap replicates) using Mega 6 (Tamura et al., 2013) and Maximum likelihood (1000 bootstrap replicates) with Phyml version 3.0 (Guindon et al., 2010). Figtree v1.4.2 software available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree> was used to visualize and edit the trees.

## 3. Results

### 3.1. Sequence amplification and analysis

A total of 116COI clones were obtained from larvae from the different host and locations (Table 1). Clones of the same larvae containing identical sequences were removed, thereby reducing the

number of COI sequences analyzed to 96 (GenBank accession numbers: KP974835–KP974930). The length of most of the analysed sequences was 640 bp, 13 sequences were 639 bp in length and another sequence was 641 bp in length due to deletions and insertions.

Sequence comparisons reveal two well-defined groups. The identity of the COI sequences varied between 97.6% and 100% for larvae from domestic sheep, domestic goats and European mouflon from different geographic locations. However, the sequences of larvae collected from Iberian ibex presented reduced similarity when comparing them with all the others sequences obtained having identities in the range 90.3–91.5%.

The number of fixed nucleotide differences between the sequences from these two groups was 45, while the average number of nucleotide differences was 57.5.

Next, our collection of sequences was compared with a COI sequence from *O. ovis* available at GenBank (AF497767). This analysis demonstrated that larvae from domestic sheep, domestic goats and European mouflon probably belong to this species, with identities in the range 98.1–99.5%. By contrast, the COI sequences of the larvae from Iberian ibex were less similar to the *O. ovis* sequence, with identities in the range 90.7–91.0%, which indicates that these larvae probably correspond to another species.

In addition, we obtained 41 sequences 28S-1 kb, that varied between 816 and 875 bp (10 from larvae from domestic sheep, domestic goats and European mouflon and 31 from larvae from Iberian ibex), and 15 sequences 28S-1.5 kb, which varied in length between 1583 bp and 1602 bp (8 from larvae from domestic sheep and domestic goats and 7 from larvae from Iberian ibex) (Table 1), (GenBank accession numbers: KP974931–KP974986).

As previously described using COI, the 28S (rDNA) sequences from larvae collected from domestic sheep, domestic goats and European mouflon were nearly identical. Thus, the identities were in the range 98.9–99.7% for 28S-1 kb, and 98.6–99.6% for 28S-1.5 kb. However, the sequences of larvae from Iberian ibex were less similar than those from the other hosts, with observed identities of 96.5–97.5% and 95.2–96.3% for 28S-1 kb and 28S-1.5 kb, respectively. Furthermore, a comparison with the 28S (rDNA) sequence from *O. ovis* available at GenBank (AJ551428) suggests that larvae from domestic sheep, domestic goats and European mouflon probably belong to this species. Thus, the 28S-1 kb and 28S-1.5 kb sequences were 98.5–98.9% and 96.6–97.5% identical, respectively. However, the sequences from *O. ovis* showed lower values of identity when compared to larvae from Iberian ibex (97.0–97.5% for 28S-1 kb, and 95.9–96.6% for 28S-1.5 kb).

### 3.2. Phylogenetic analysis

To perform phylogenetic reconstructions, our COI data (excluding 16 non-functional sequences) were combined with sequences of the same marker from several other Oestridae species available in GenBank.

The resulting phylogenetic trees all presented practically the same topology, regardless of the reconstruction method used and so support for most of the branches was very high in all cases. Fig. 1 shows the Bayesian analysis consensus tree. In this tree, species are grouped by genus and clustered into four subfamilies of the family Oestridae (Hypodermatinae, Oestrinae, Gasterophilinae and Cuterebrinae). The branches of the subfamilies Gasterophilinae, Hypodermatinae and Cuterebrinae are grouped and separated from the subfamily Oestrinae (Fig. 1a). Interestingly, all the sequences obtained in this work are grouped on one branch separated from the rest of the species of the subfamily Oestrinae (Figs. 1a and b). This branch is further split into two branches, one including only the sequences from Iberian ibex larvae and the other sequences from larvae from domestic sheep, domestic goats and European mou-

**Table 1**  
Host species, number of larvae and sequences analyzed.

Host species	Location	Numbers of individuals	Reference	Studied larvae	COI	28 S 1 Kb	28 S 1.5 Kb	
Domestic sheep ( <i>Ovis aries</i> )	Llucmajor (Mallorca Island)	1	D. sheep Ma	1	9	2		
	Cáceres (Extremadura, Central-West Spain)	2	D. sheep Ex 1	1	5			
			D. sheep Ex 2	1	1			
	Murcia (Southeastern Spain)	2	D. sheep Mu 1	1	8	3	4	
			D. sheep Mu 2	1	8			
	Republic of Iran	4	D. sheep Ir 1	1	2			
			D. sheep Ir 2	1	2			
			D. sheep Ir 3	1	1			
			D. sheep Ir 4	1	1			
			D. goat Gr (F)1	1	2			
	Domestic goat ( <i>Capra hircus</i> )	Fondón (Granada, Southern Spain)	2	D. goat Gr (F)2	1	2	2	
		Berja (Granada, Southern Spain)	4	D. goat Gr (B)1	1	3		1
				D. goat Gr (B)2	1	2		
D. goat Gr (B)3				1	2			
European mouflon ( <i>Ovis aries</i> )	Extremadura (Central-West Spain)	2	D. goat Gr (B)4	1			2	
			E. mouflon Ex 1	1	11	1		
	Sierra de Cazorla N.P. (Jaén, Southern Spain)	2	E. mouflon Ex 2	1	7	2		
			E. mouflonJa 1	1	9			
Iberian ibex ( <i>Capra pyrenaica</i> )	Sierra Nevada N.P. (Granada, Southern Spain)	13	E. mouflonJa 2	1	4			
			I. ibex Gr 1	1	2			
			I. ibex Gr 2	5	3	10		
			I. ibex Gr 3	2	1	2	2	
			I. ibex Gr 4	1	5			
			I. ibex Gr 5	1	1	2	2	
			I. ibex Gr 6	3	4	2		
			I. ibex Gr 7	1	1	2		
			I. ibex Gr 8	1	2	2	1	
			I. ibex Gr 9	1	1	1		
			I. ibex Gr 10	1	5	2	2	
			I. ibex Gr 11	1	2	1		
			I. ibex Gr 12	1	1	1		
I. ibex Gr 13	1	2	2					

flon, and the *O. ovis* sequence from GenBank (Fig. 1b). Hence, the phylogenetic reconstruction indicates clearly that the larvae analysed in this work belong to two different *Oestrus* species, namely, *O. ovis* that parasitizes domestic sheep, domestic goats and European mouflon, and another *Oestrus* sp. that parasitizes Iberian ibex.

#### 4. Discussion

Identification of *Oestrus* species using the morphological features of larvae and adults is complicated, and so a molecular characterization of these parasites is required for species identification. However, molecular data from oestrid species are very scarce, and before this study there were only three sequences from *O. ovis* available in GenBank: COI, 28S (rDNA) and EF1 alpha gene.

Pérez et al. (1996) reported the parasitizing of Iberian ibex from Sierra Nevada National Park by *O. caucasicus* on the basis, above all, of the vein colour of the wings of imagoes. However, subsequent studies (Guiton et al., 2001; Pérez et al., 2006) have remarked on the great similarity in both morphology and biology between *O. ovis* and the species parasitizing Iberian ibex. Thus, the seemingly contradictory data regarding the identity of the species parasitizing Iberian ibex need to be more fully addressed.

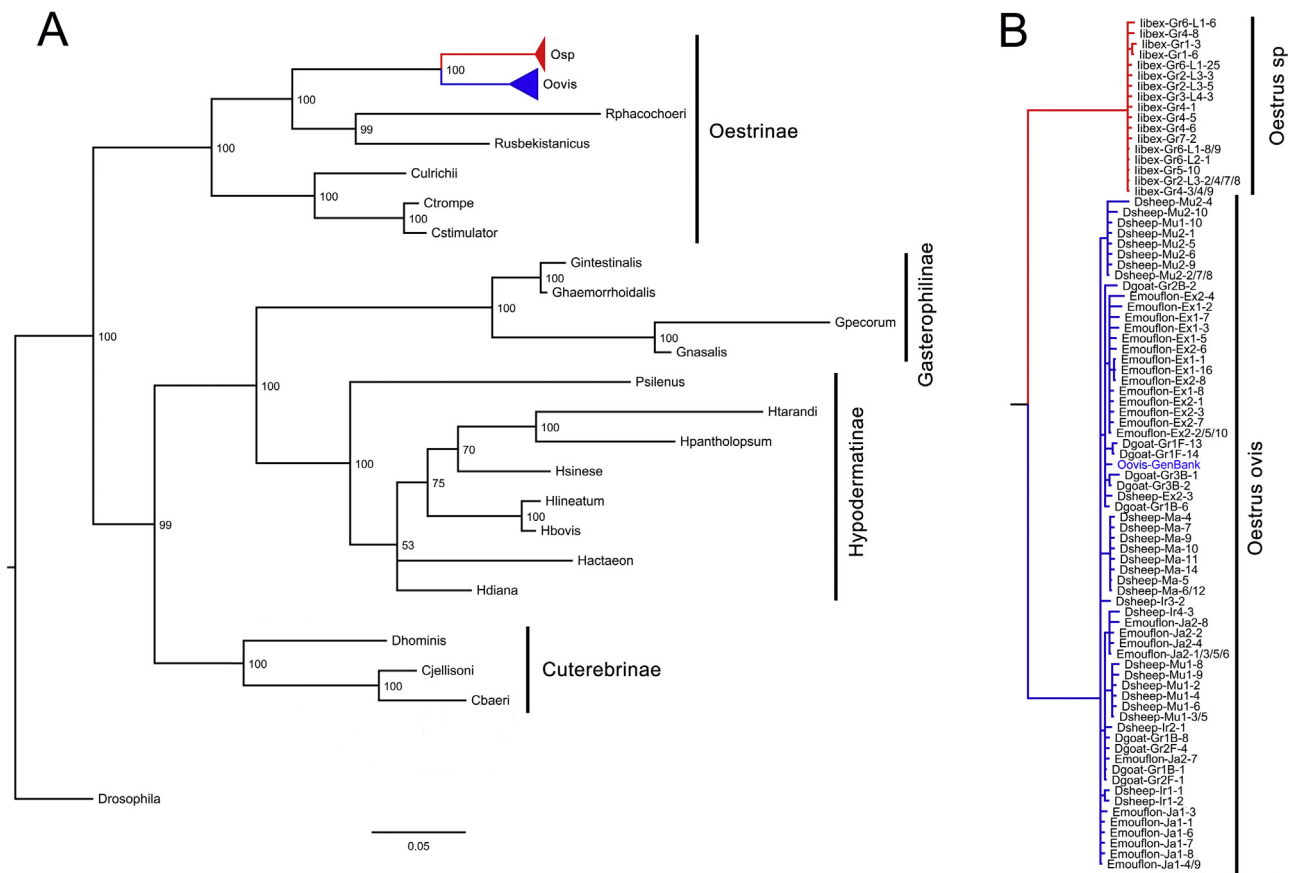
Our analyses clearly indicate that all larvae from domestic sheep, domestic goats and European mouflon correspond to *O. ovis*. However, all larvae from Iberian ibex clearly belong to a different species, which should be included in the genus *Oestrus* due to its similarity to the *O. ovis* COI sequence. The identity values obtained in our study agree with the interspecific identity described previously for species belonging to the same genus in the family Oestridae. For example, the COI sequences taken from two species of *Gasterophilus* (*G. nasalis* and *G. intestinalis*) showed comparable interspecific identity (85.1–86.44%) (Pawlas-Opiela et al., 2010). In species of the genus *Przhevalskiana*, the interspecific identity was

wide-ranging, varying from 71.0% to 99.8% (Otranto and Traversa, 2004). Overall, the mean value for interspecific similarity of COI in the Oestridae family is 81.9%, while at the subfamily level the mean reported values are 86.8% in Hypodermatinae, 86.7% in Oestrinae, 90% in Gasterophilinae and 94.7% in Cuterebrinae (Otranto et al., 2005a).

As observed in the COI sequences, comparisons using the 28S (rDNA) also indicated that *O. ovis* was parasitizing all analysed host species except the Iberian ibex, which is probably the focus of a different *Oestrus* species. For this marker, identity percentages between the *O. ovis* sequences and those from the Iberian ibex larvae are lower than for the interspecific comparison between *Rhinoestrus purpureus* and *R. usbekistanicus*, which varied between 99.7% and 100% (Otranto et al., 2005a), and also between two closely related species of the genus *Gasterophilus* (*G. intestinalis* and *G. haemorrhoidalis*), which varied between 99.5% and 99.9% (Otranto et al., 2005b).

Previous molecular studies have demonstrated a strong divergence between the four subfamilies of Oestridae (Pape, 2001; Otranto et al., 2003a). All the sequences of larvae that were analyzed in this work are included in one branch that is clearly separated from the species of the genera *Rhinoestrus* and *Cephenemyia*. Within this branch, the sequences of the larvae collected from domestic sheep, domestic goats and European mouflon are separated with strong support from the sequences of the larvae from the Iberian ibex. This result reinforces the idea of the existence of two different species within the same genus: *O. ovis* and *Oestrus* sp. Interestingly, our analyses also show evidence of a differential host preference, as domestic goats from the eastern part of the Sierra Nevada Natural Park were parasitized by *O. ovis*.

Our data clearly reveal that the species parasitizing Iberian ibex is not *O. ovis*. However, in order to name this species, we still need to conduct further analyses at both morphological and molecular



**Fig. 1.** (A) Bayesian analysis consensus tree indicating the posterior probability values. The branches corresponding to the sequences obtained from the larvae of domestic sheep, domestic goats and European mouflon (including the sequence of *O. ovis* from GenBank) (Oovis) (blue) and from Iberian ibex (Osp) (red) are condensed. (B) Representation of the condensed branches of Fig. 1A for *Oestrus ovis* and *Oestrus sp.* The *O. ovis* sequence from GenBank is in blue. The accession numbers (GenBank) for COI sequences are: *Oestrus ovis*: AF497767; *Cephenemyia ulrichii*: AF497770; *C. trompe*: AF497769; *C. stimulator*: AF497768; *Cuterebra jellisoni*: AF497778; *C. baeri*: AF497777; *Dermatobia hominis*: JQ246701; *Gasterophilus intestinalis*: AF257117; *G. pecorum*: AF497776; *G. nasalis*: AF497775; *G. haemorrhoidalis*: AF497774; *Hypoderma lineatum*: AF257116; *H. bovis*: AF257115; *H. pantholopsum*: EU276108; *H. sinese*: EU276095; *H. actaeon*: AF497765; *H. tarandi*: AF497764; *H. diana*: AF497763; *Przhevalskiana silenus*: AY332542; *Rhinoestrus phacochoeri*: AF497772; *R. usbekistanicus*: AF497771. *Drosophila melanogaster* (JX266576) was used as the outgroup species. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

levels of specimens of *O. caucasicus*. On a merely speculative level, it cannot be ruled out that biogeographic isolation in the Iberian Peninsula might have given rise to the differentiation of a new parasite species.

Gravid *Oestrus* females are not thought to be strictly specific to their hosts and domestic animals are thought to become reservoirs and the main infestation source for wild fauna (Colwell, 2001). About 49% of these flies parasitize exclusively one host species (Price, 1980). Our results were somewhat unexpected. In the Iberian Peninsula *O. ovis* parasitizes different host species (both domestic and wild) belonging to the genera *Ovis* and *Capra* and, probably, also the aoudad (*Ammotragus lervia*) in southeastern Spain. However, *Oestrus sp.* seems to be strictly specific to the Iberian ibex from Sierra Nevada, since the sampled domestic goats from the Sierra Nevada mountain range harboured only *O. ovis* larvae. This suggests: (i) a possible long co-adaptation and/or co-evolution process between ibex and their oestrids, which might have resulted in *Oestrus*-host associations shaped by the biogeographical origin of wild ungulates and domestic breeds (Naderi et al., 2008); (ii) no hybridization between different *Oestrus* sympatric species; and that (iii): defensive host behaviour against attacks by gravid females for larviposition could also influence these host-parasite associations. More studies focused on the genetics of oestrid-host associations and on the behaviour of adult flies in the field are needed in order to test these hypotheses.

## Acknowledgements

This study was supported by the National Institute for Agriculture and Food Research and Technology, Madrid (project: FAU2008-00010-00-00) and by Jaén University (project: RFC/PP2008/UJA.68.16.22). The activities of the researchers were partially supported by the Andalusian Plan for Scientific Research (PAI) (research groups RNM- 118 and BIO-220). The authors are indebted to the technical staff of the Sierra Nevada Natural Space, P. Prieto (Sierras de Cazorla, Segura and Las Villas Natural Park), Dr. M. S. Arias (University of Santiago de Compostela), Dr. C. Paredes (University of the Balearic Islands), and Dr. J. Ortiz (Murcia University) for their collaboration in obtaining samples for our study. This study complies with Andalusian and Spanish laws regarding animal experimentation and welfare.

## References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Colwell, D.D., 2001. Bot flies and warble flies (Order Diptera: Family Oestridae). In: Samuel, W.M., Pybus, M.J., Kocan, A.A. (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Mammals.*, 2nd edition. Manson Publishing/The Veterinary Press, London, pp. 46–71.
- Colwell, D.D., Hall, M.J.R., Scholl, P.J., 2006. A synopsis of the biology, hosts, distribution, disease significance and management of the genera. In: Colwell,

- D.D., Hall, M.J.R., Scholl, P.J. (Eds.), *The Oestrid Flies: Biology, Host-parasite Relationships, Impact and Management*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 220–305.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Met.* 9, 772.
- Grisez-Duranton, C., Dorchies, P., Jourdan, J., Durand, P., 2002. Genetic structure of *Oestrus ovis* populations in sheep and goats. *Vet. Parasitol.* 104, 167–173.
- Grunin, K.Y., 1957. Blowflies (Oestridae) fauna USSR. *Insecta: Diptera* 19, 1–146 [In Russian].
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321.
- Guitton, C., Pérez, J.M., Dorchies, P., 2001. Scanning electron microscopy of larval instars and imago of *Oestrus caucasicus* (Grunin, 1948) (Diptera: Oestridae). *Parasite* 8, 155–160.
- Moreno, V., Pérez, J.M., Moreno, P.A., Granados, J.E., Ruiz-Martínez, I., Soriguer, R.C., de Simón, M.A., 1999. Oestrid myiasis in European mouflon from Spain. *J. Wildl. Dis.* 35, 78–81.
- Naderi, S., Rezaei, H.-R., Pompanon, F.O., Blum, M.G.B., Negrini, R., Naghash, H.-R., Balkız, Ö., Mashkour, M., Gaggiotti, Ö.E., Ajmone-Marsan, P., Kence, A., Vigne, J.-D., Taberlet, P., 2008. The goat domestication process inferred from large-scale mitochondrial DNA analysis of wild and domestic individuals. *PNAS* 105, 17659–17664.
- Nelson, L.A., Lambkin, C.L., Batterham, P., Wallman, J.F., Dowton, M., Whiting, M.F., Yeates, D.K., Cameron, S.L., 2012. Beyond barcoding: a mitochondrial genomics approach to molecular phylogenetics and diagnostics of blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Gene* 511, 131–142.
- Otranto, D., Milillo, P., Traversa, D., Colwell, D.D., 2005a. Morphological variability and genetic identity in *Rhinoestrus* spp. causing horse nasal myiasis. *Med. Vet. Entomol.* 19, 96–100.
- Otranto, D., Stevens, J.R., 2002. Molecular approaches to the study of myiasis causing larvae. *Int. J. Parasitol.* 32, 1345–1360.
- Otranto, D., Traversa, D., 2004. Molecular evidence indicating that *Przhevalskiana silenus*, *Przhevalskiana aegagri* and *Przhevalskiana crossii* (Diptera, Oestridae) are one species. *Acta Parasitol.* 49, 173–176.
- Otranto, D., Traversa, D., Milillo, P., De Luca, F., Stevens, J., 2005b. Utility of mitochondrial and ribosomal genes for differentiation and phylogenesis of species of gastrointestinal bot flies. *J. Econ. Entomol.* 98, 2235–2245.
- Otranto, D., Traversa, D., Guida, B., Tarsitano, E., Fiorente, P., Stevens, J.R., 2003a. Molecular characterization of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene of Oestridae species causing obligate myiasis. *Med. Vet. Entomol.* 17, 307–315.
- Otranto, D., Traversa, D., Tarsitano, E., Stevens, J., 2003b. Molecular differentiation of *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae) by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Vet. Parasitol.* 112, 197–201.
- Pape, T., 2001. Phylogeny of Oestridae (Insecta: Diptera). *Sys. Entomol.* 26, 133–171.
- Pawlas-Opiela, M., Sołtysiak, Ł., Sołtysiak, Z., Otranto, D., Ugorski, M., 2010. Molecular comparison of *Gasterophilus intestinalis* and *Gasterophilus nasalis* from two distinct areas of Poland and Italy based on cox1 sequence analysis. *Vet. Parasitol.* 169, 219–221.
- Pérez, J.M., Granados, J.E., Moreno, V., Calabuig, G., Moço, G., Serrano, E., 2006. In vitro rearing *Oestrus caucasicus* third-instar larvae and pupae (Diptera: Oestridae) from naturally-infested Iberian ibex, *Capra pyrenaica* (Artiodactyla: Bovidae). *Parasite* 13, 305–310.
- Pérez, J.M., Granados, J.E., Soriguer, R.C., Ruiz-Martínez, I., 1996. Prevalence and seasonality of *Oestrus caucasicus* Grunin, 1948 (Diptera: Oestridae) parasitizing the Spanish ibex, *Capra pyrenaica* (Mammalia: Artiodactyla). *J. Parasitol.* 82, 233–236.
- Price, P.W., 1980. *Evolutionary biology of parasites*. Princeton University Press, Princeton.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MRBAYES 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model selection across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 1659.
- Stevens, J.R., Wall, R., 2001. Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *Forensic Sci. Int.* 120, 116–123.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Truett, G.E., Heeger, P., Mynatt, R.L., Truett, A.A., Walker, J.A., Warman, M.L., 2000. Preparation of PCR quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and Tris (Hot SHOT). *Biotechniques* 29, 52–54.
- Zhang, D.X., Hewitt, G.M., 1997. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Mol. Biol.* 6, 143–150.
- Zumpt, F., 1965. *Myiasis in man and animals in the Old World*. Butterworths, London.



# **CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## CAPITULO 7. RESUMEN RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### • Cultivo en el laboratorio de larvas de *Oestrus sp.*

En trabajos recientes se ha puesto de manifiesto que la Cabra Montés (*Capra pyrenaica*) del Parque Natural de Sierra Nevada está parasitada por una especie de díptero posiblemente del género *Oestrus* que fue catalogada en principio en base a caracteres morfológicos como *O. caucasicus* (Pérez et al., 1996). Sin embargo el parecido morfológico de las larvas e imagos de esta especie con los de la especie *O. ovis* nos han planteado dudas sobre su clasificación por lo que la denominamos *Oestrus sp.* El conocimiento general sobre la biología de las especies de oéstridos, y en particular de la especie que infecta a la Cabra Montés del Parque Natural de Sierra Nevada es muy escaso.

Para poder dar respuesta a interrogantes sobre la biología, el comportamiento y otros parámetros básicos demográficos relacionados con este parásito, hemos realizado un cultivo con 236 larvas procedentes de Cabra Montés de Parque Natural de Sierra Nevada. De este cultivo emergieron 78 moscas adultas (33% de emergencia). De ellas 41 eran hembras, 35 machos y dos ejemplares de la que los datos relativos al sexo no estaban disponibles. La sex-ratio fue de 1,17, con lo que este valor no difiere significativamente de la proporción esperada de 1:1.

Al igual que otros autores, consideramos que los factores que más pueden influir en el desarrollo de la pupa y durante el proceso de pupación son la temperatura y el peso de la larva. En este trabajo nuestro cultivo, se mantuvo a una temperatura de  $21,9 \pm 2,7^{\circ}\text{C}$  y una humedad relativa de  $38,9 \pm 8,0\%$ . Sin embargo en otros trabajos donde se han cultivado in vitro larvas de *O. ovis* se han empleado temperaturas comprendidas entre  $17^{\circ}\text{C}$  y  $34^{\circ}\text{C}$  (Breev et al., 1980)

El porcentaje de adultos que emergieron fue inferior al descrito por otros autores para *Hipoderma lineatum* y *H. bovis* cultivadas a  $20^{\circ}\text{C}$  (Pfadt et al., 1975). En dos cultivos de *O. ovis* mantenidos entre  $16^{\circ}\text{C}$  y  $32^{\circ}\text{C}$  se obtuvieron 42,8% y 35% de emergencia de adultos respectivamente (Rogers y Knapp, 1973; Breev et al., 1980).

También cuando la temperatura del cultivo de *O. ovis* supera los 34°C se obtienen tasas de muerte superiores a las de nuestro estudio (del 67%) lo que indica que las temperaturas altas inhiben el desarrollo (Breev et al., 1980).

Por tanto la temperatura tiene una gran influencia en el desarrollo de las pupas, y en el rango comprendido entre 17°C y 34°C en el que *O. ovis* se puede cultivar (Breev et al., 1980) parece estar inversamente correlacionada con el porcentaje de emergencia de adultos.

En nuestro estudio durante el desarrollo las pupas perdieron hasta el 85% del peso que presentaba la larva. En relación con este dato se sabe que se produce una pérdida de peso desde el momento de la recogida de las larvas hasta la emergencia de los adultos y este hecho se considera un buen ejemplo de la utilización máxima de las reservas corporales de las larvas. El peso de las larvas de *O. ovis* disminuye desde el momento de la recogida por la evacuación intestinal, por la pérdida de agua en el proceso de esclerotización y por el proceso de pigmentación fenólica de la cutícula. El glucógeno también es movilizado durante la metamorfosis de las larvas (Wigglesworth, 1984; Cepeda-Palacios y Scholl, 2000).

Las larvas del tercer estadio tenían un peso promedio de  $594,8 \pm 129,8$  mg (variando en un rango de 241,5 a 874,3 mg). El éxito de la pupación y la emergencia de los adultos se ven influidos por el peso de la larva, ya que las larvas que producen imagos fueron significativamente más pesadas que las que no completaron la pupación o dieron lugar a moscas inviábiles. La supervivencia de las larvas y de las pupas depende del peso mínimo obtenido y su dinámica con el tiempo, pero era independiente del sexo.

El dimorfismo sexual en relación al peso era evidente. Las hembras eran más pesadas tanto a nivel de larvas en LIII, de pupas y adultos que los machos. También es notable que la variabilidad para el peso fue mayor en larvas del tercer estadio (LIII) e imagos que en pupas.

El período de pupación duró  $31,5 \pm 13,4$  horas para las larvas de las que emergían machos mientras que de las que emergían hembras duró  $30,0 \pm 17,2$  horas. Este periodo de pupación fue más largo que el que se obtuvo en cultivos de *O. ovis* a temperaturas que van desde 16 a 32°C que fue de 12 horas en las larvas fuertemente

pigmentadas y de 22 horas en larvas ligeramente pigmentadas (Cepeda-Palacios y Scholl, 2000).

En nuestro cultivo, la duración de la fase de pupa alcanzó un valor medio de  $29,8 \pm 6,8$  días. No hemos encontrado diferencias significativas entre sexos. Estos datos son muy similares a los obtenidos para el período de pupa de las larvas de *O. ovis* que varía entre 12 y 52 días dependiendo de las condiciones ambientales, especialmente la temperatura (Breev et al., 1980). Sin embargo, la duración de la fase pupa fue menor en los estudios realizados en *O. ovis* por Cepeda-Palacios y Scholl (2000) y Cepeda-Palacios et al., (2001), en los que los machos emergieron después de 22 días y las hembras después de 23 días, y por Rogers y Knapp (1973) que describieron una duración media de  $20,1 \pm 3,3$  días.

Según Biggs et al., (1998), un periodo de pupación y una fase pupa más largos puede prevenir la emergencia de adultos en condiciones climáticas adversas. Este fenómeno puede ser considerado como una estrategia de supervivencia al igual que la hibernación de las larvas del primer estadio cuando realizan hipobiosis (Tabouret et al., 2001).

La longevidad de las moscas adultas de nuestro estudio no llegó a 10 días ( $9,4 \pm 3,8$  días), datos similares se han obtenido *O. ovis* con longevidades medias que van desde 7,7 a 16 días (Biggs et al., 1998; Rogers y Knapp, 1973).

En cuanto a tasas de mortalidad larvaria se ha estimado que la mortalidad de las larvas de *O. ovis* en las poblaciones silvestres osciló entre 90,2% y el 99,1% (Rogers y Knapp, 1973). Si la población silvestre de *Oestrus sp.* tiene una tasa de mortalidad similar y agregamos la tasa obtenida en el laboratorio para la etapa de pupa, a continuación, se puede estimar que sólo alrededor de un 0,3-3% de las larvas producida por las hembras grávidas se convertirá en moscas adultas.

- **Simulación del ciclo biológico de *Oestrus sp.***

El modelado de Dinámica de Sistemas (SD) es una metodología que nos puede ayudar a obtener una visión más estructurada para poder comprender las causas que provocan el comportamiento de un sistema y como actuaría éste si se modifica alguna de las variables (Martín-García, 2003).

Los parámetros expuestos anteriormente nos resultan de gran ayuda para mejorar nuestro conocimiento en cuanto a la epizootiología de esta clase de miasis y son muy útiles para tener una visión más generalizada del ciclo biológico y del comportamiento de estos dípteros causantes de miasis.

La simulación mediante Dinámica de Sistemas, a partir de estos parámetros demográficos, nos da la oportunidad de conocer aspectos del ciclo biológico de *Oestrus sp.* algo que resulta extremadamente difícil de estudiar en el trabajo de campo o de laboratorio. Los estudios de campo y de laboratorio se centran principalmente y de forma independientemente en la epidemiología (larvas-parásitas), en el cultivo de larvas en el laboratorio (fase adulta) o en el estudio de la biología de adultos (Anderson, 2006).

En un modelo de Dinámica de Sistemas, un diagrama de flujo contiene tres elementos principales: niveles, flujos y variables auxiliares. En nuestro modelo, incluimos los cuatro niveles, ocho flujos y veinte variables auxiliares (ver capítulo 5). Cada una de las variables de nivel representa un sector de la población y tiene un flujo de entrada (nacimientos) y dos flujos de salida (muertes); las velocidades o tasas a las que operan estos flujos son dependiente de la densidad y están reguladas por las variables de control de retraso “control ciclo de LI a LIII ” y “control ciclo de LIII a pupas”. Los valores utilizados para los flujos y las variables auxiliares se obtuvieron de la trabajos previos con *O. ovis* y *Oestrus sp.*

El modelo se comporta de manera cíclica y periódica cuando la tasa mensual media alcanza un valor de 5 larvas por hembra grávida y mes, mostrándose muy sensible a pequeños cambios en el valor de las diferentes variables auxiliares, sobre todo para la larviposición. Con estos datos, el modelo predice 3-4 generaciones de larvas por año.

La simulación nos va a dar la oportunidad de relacionar las diferentes fases del ciclo de vida del oéstrido con el fin de obtener valores predictivos en condiciones específicas o valores para cada parámetro.

El patrón estacional de la prevalencia e intensidad de parasitación para las larvas que infectan a la Cabra Montés del Parque Natural de Sierra Nevada (*Capra pyrenaica*) incluye tres generaciones de larvas de primer estadio (LI) al año (mayo, julio y octubre), seguido de las sucesivas generaciones de larvas del segundo estadio (LII) y del tercer estadio (LIII) (Pérez et al., 1996). En este trabajo, los valores más altos de intensidad media de parasitación se lograron durante los meses de diciembre y enero, lo que podría explicar un "presumible" cuarto pico en la producción de larvas de primer estadio (LI).

Por otra parte, en los modelos de dinámica de sistemas, no podemos simular niveles que alcancen un valor 0, ya que esto haría que el sistema se colapse. En la vida real en un hábitat de alta montaña como es el Parque Natural de Sierra Nevada no esperaríamos encontrar moscas adultas en el período entre el otoño y la primavera siguiente. Durante este período, la población de estos parásitos quedaría mantenida por las larvas en el interior de sus respectivos parásitos y por las pupas (a cierta profundidad de la superficie), ambas fases muestran un cierto grado de diapausa. En cualquier caso, este es un aspecto que debe ser convenientemente estudiado.

Otros factores que son difíciles de modelar son: el desarrollo embrionario del parásito, su éxito reproductivo, el comportamiento de las moscas adultas durante la reproducción, la búsqueda del hospedador y las dificultades para la larviposición por el comportamiento defensivo de los hospedadores e incluso por la respuesta inmunológica de estos, la influencia de los programas de tratamiento y control de oestrosis, e incluso el número de hospedadores presentes en un área dada. Todos estos factores determinarán en cada caso la capacidad de carga-parásito y la densidad o la abundancia de moscas adultas en un área determinada.

Por lo tanto, consideramos que esto es sólo un primer paso hacia la predicción de ciertos valores demográficos de parásitos, que de otro modo sería muy difícil de obtener en el campo o en el laboratorio. Estas modelizaciones aportan información que puede convertirse en esencial dentro de los programas de lucha y control de la oestrosis.

- **Identificación molecular de las Larvas de *Oestrus sp.***

Los representantes del género *Oestrus*, son dípteros con pocas diferencias en cuanto a hospedador y zonas parasitadas además de presentar similitudes morfológicas a nivel larvario y de imago y a veces la diferenciación resulta muy difícil y complicada, sobre todo en los casos en las que las muestras están mal conservadas. Por ello se están haciendo esfuerzos para caracterizar molecularmente a estos dípteros con objeto de facilitar su identificación (Otranto y Stevens, 2002; Otranto et al., 2003a; Azeredo-Espin y Lessinger, 2006).

Como ya hemos comentado a lo largo de este trabajo, el objeto de estudio se ha centrado en los dípteros que la parasitan la Cabra Montés (*Capra pyreniaca*) del Parque Natural de Sierra Nevada, abarcando distintas áreas de la biología para de esta manera poder entender mejor la ecología, biología y comportamiento de estos productores de miasis. Dentro de las distintas disciplinas de estudio, recurrimos a la biología molecular. Los datos moleculares pueden ayudar a realizar una clara identificación de las especies, en la reconstrucción de filogenias y en su caso al desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular, no invasivo, en los casos de miasis producidas por oéstridos (Arias et al, 2014a y b).

Concretamente los oéstridos que parasitan a la Cabra Montés del Parque Natural de Sierra Nevada son un claro ejemplo de los problemas actuales para distinguir este tipo de dípteros. Pérez et al., (1996) describieron que la parasitación que sufría la Cabra Montés estaba producida por larvas de la especie de *O. caucasicus* apoyándose para su identificación en el color de las venas de los imagos. Sin embargo, estudios posteriores (Guitton et al., 2001) observaron una alta similitud tanto en morfología como en la biología entre *O. ovis* y *O. caucasicus*. Por tanto los datos son relativamente contradictorios en cuanto a la identidad de la especie que parasitan la Cabra Montés, que podría tratarse de una variante de *O. ovis*, de *O. caucasicus* o incluso de una nueva especie.

Los marcadores moleculares se han utilizado para la identificación de especies, estudiar la especificidad y la distribución de diferentes especies y familias de dípteros. Entre los más utilizados están el gen que codifica para la subunidad I de la citocromo c

oxidasa (COI) mitocondrial y los genes nucleares 28S (ADNr), que también son útiles para la genética de poblaciones y análisis filogenéticos (Otranto et al., 2000, 2003a y b, 2005a y b; Otranto y Stevens, 2002; Grisez-Duranton et al., 2002; Stevens, 2003; Stevens et al., 2002; Li et al., 2004; Cameron et al., 2007; Weigl et al., 2010 ; Nelson et al., 2012).

Por tanto para abordar las cuestiones planteadas con respecto a las larvas que parasitan a la Cabra Montés, en este trabajo hemos caracterizado estos marcadores, citocromo C oxidasa (COI) y 28S rRNA) de larvas recogidas de ovejas y cabras domésticas, muflón europeo de diversas localizaciones y de Cabra Montés del Parque Natural de Sierra Nevada.

En concreto hemos amplificado por PCR, utilizando un par de cebadores UEA8 UEA10, 96 secuencias de la citocromo C oxidasa (COI) procedentes de diferentes larvas de los diferentes hospedadores analizados. El fragmento amplificado tiene una longitud de 640bp para la mayoría de los clones, y solamente 13 de ellas tenían 639bp y otra tenía 641pb debido a deleciones e inserciones.

El análisis de estas secuencias indica que cuando comparamos las secuencias de COI de oveja, cabra doméstica y muflón el porcentaje de identidad entre ellos es de entre 97,6%-100%. Cuando la comparación la hacemos con respecto a la secuencia COI de *O. ovnis* disponible en GenBank (AF497767.1), el análisis demuestra que las larvas de oveja doméstica, cabra doméstica y muflón pertenecen a la especie de *O. ovnis* ya que el porcentaje de identidad varía entre 98,1% y 99,5%. Por el contrario, las secuencias de COI de las larvas de Cabra Montés presentan menor identidad cuando las comparábamos con la secuencia de *O. ovnis* del GenBank, con identidades que varían entre 90,7 a 91,0%, lo que indica que estas larvas corresponden a otra especie de oéstrido.

Los valores de identidad obtenidos en nuestro estudio están de acuerdo con la identidad interespecífica que se ha descrito anteriormente para las especies pertenecientes al mismo género de la familia Oestridae. Por ejemplo, las secuencias COI de las especies *Gasterophilus nasalis* y *G. intestinalis* mostraron una identidad interespecífica comparable (85,1-86.44%) (Pawlas-Opiela et al., 2010). En especies del género *Przhevalskiana*, la identidad interespecífica fue amplia, variando de 71.0% a 99.8% (Otranto y Traversa, 2004). Estos valores están también en concordancia con la

---

identidad inter-específica que han descrito otros autores con valores medios de identidad inter-específica de la COI del 81,9% dentro de la familia Oestridae, mientras que a nivel de subfamilia los valores medios de identidad son del 86,8% en Hypodermatinae, 86,7% en Oestrinae, 90% en Gasterophilinae y 94,7% en Cuterebrinae (Otranto et al., 2003a).

La diversidad de nucleótidos para el grupo de secuencias de larvas de oveja doméstica, cabra doméstica y muflón fue  $Pi: 0,00929$ , con 107 sitios polimórficos (82 singleton y 25 parsimonia sitios informativos), y para las larvas de cabra montés era  $Pi: 0,00273$  con 14 sitios polimórficos (13 singleton y 1 parsimonia sitios informativos).

La traducción de los aminoácidos codificados por las diferentes secuencias analizadas dio lugar en la mayoría de los casos al correspondiente fragmento de la proteína COI, con la excepción de 20 secuencias que dieron lugar a una proteína truncada con múltiples codones de parada.

Con el fin de confirmar estos resultados decidimos caracterizar otro marcador molecular ampliamente utilizado para la comparación de especies como es 28S rDNA de acuerdo con Stevens y Wall, (2001). Hemos conjunto hemos analizado 2.46 Kb del 28S rDNA, para ello usamos dos pares de cebadores. El par de cebadores D1 y D2-F-R que amplifican un fragmento de aproximadamente 1 kb (llamado 28S-1kb) del que hemos analizado 41 secuencias. El par de cebadores D3-5-F y D-7-R que amplifican un fragmento de aproximadamente 1,5 kb (llamado 28S-1,5 kb) del que hemos analizado 15 secuencias.

Como se ha descrito anteriormente utilizando secuencias de COI, para las secuencias del 28S de las larvas recogidas de oveja doméstica, cabra doméstica y muflón eran casi idénticos, con identidades que varían entre 98,9 a 99,7% para 28S-1kb, y entre 98,6 a 99,6% para 28S-1,5 kb.

Sin embargo, las secuencias de larvas de Cabra Montés eran menos similares cuando se comparan con el resto, con identidades observadas de 96,5 a 97,5% y 95,2 a 96,3% para el 28S-1 kb y 28S-1,5 kb respectivamente. Por otra parte, la comparación con la secuencia 28S de *O. ovis* disponible en Genbank (AJ551428.1) sugiere también que las larvas de oveja doméstica, cabra doméstica y muflón pertenecen a esta especie con porcentajes de 98,5-98,9% para 1kb y de 96,6-97,5% para 1,5kb. Sin embargo, la

secuencia de *O. ovis* mostraron valores más bajos de similitud en comparación con larvas de cabra montés (97.0-97.5% para 28S-1 kb, y 95,9 a 96,6% para el 28S-1,5kb).

La diversidad de nucleótidos para el grupo de 1 kb secuencias de larvas de oveja doméstica, cabra doméstica y muflón europeo fue  $P_i$ : 0,00509, con 22 sitios polimórficos (22 singleton y 0 parsimonia sitios informativos), y para las larvas de cabra montés era  $P_i$ : 0,00104 con 13 sitios polimórficos (12 singleton y 1 parsimonia sitios informativos).

La diversidad de nucleótidos para el grupo de 1,5 kb de secuencias de larvas de oveja doméstica y cabra doméstica era  $P_i$ : 0,00546, con 33 sitios polimórficos (31 singleton y 2 parsimonia sitios informativos), y para las larvas de cabra montés era  $P_i$ : 0,00414 con 23 sitios polimórficos (23 singleton y 0 parsimonia sitios informativos).

En la reconstrucción filogenética de la familia Oestridae hemos combinando nuestros datos para COI, 28S y todas las secuencias disponibles en GenBank y se han utilizado diferentes enfoques como: Análisis Bayesiano, Neighbor-Joining, Máxima Verosimilitud y Máxima Parsimonia. Los árboles filogenéticos resultantes presentan prácticamente la misma topología independientemente del método utilizado para la reconstrucción y el apoyo de la mayor parte de las ramas era muy alta en todos los casos donde se agrupan claramente las especies analizadas en las cuatro subfamilias incluidas dentro de la familia Oestridae (Oestrinae, Hypodermatinae, Gasterophilinae y Cuterebrinae). De hecho, otros estudios moleculares previos han demostrado una fuerte divergencia entre las cuatro subfamilias de Oestridae (Pape, 2001; Otranto et al., 2003a).

Todas las secuencias de las larvas que fueron analizadas en este trabajo se incluyen en una rama claramente separada de las especies de los géneros *Rhinoestrus* y *Cephenemyia*. Las ramas de las subfamilias Gasterophilinae, Hypodermatinae y Cuterebrinae se agrupan y se separan de la subfamilia Oestrinae. Llamativamente, todas las secuencias obtenidas en este trabajo se agrupan en una rama separada del resto de las especies de la subfamilia Oestrinae. Curiosamente, esta rama se divide en dos ramas más, una de ellas incluyendo exclusivamente las secuencias de larvas de cabra montés y el otro incluyendo secuencias de larvas de la oveja doméstica, cabra doméstica y muflón junto con la secuencia de *O. ovis* del GenBank.

Nuestros resultados muestran que *O. ovis* parasita tanto hospedadores domésticos como silvestres. Este hecho sugiere: una posible co-adaptación o co-evolución entre el parásito y el hospedador; la hibridación entre diferentes especies simpátricas y también podría influir en estas asociaciones parásito-hospedador el comportamiento de defensa contra los ataques de las hembras grávidas para la larviposición.

Este trabajo revela claramente que las larvas que parasitan a la Cabra Montés del Parque Natural de Sierra Nevada no son de la especie *O. ovis*. Con el fin de caracterizar esta especie de oéstrido, tenemos que analizar a nivel molecular y morfológico larvas procedentes de la especie *O. caucasicus*. Aunque altamente especulativo y, a falta de esos estudios, no se puede excluir que el aislamiento biogeográfico en la Península Ibérica podría haber dado lugar a la diferenciación parasitaria de una nueva especie (que proponemos que podría llamarse *Oestrus nevadensis*) asociado a la Cabra Montés (*Capra pyrenaica*) de Sierra Nevada.

## **CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES**



## CAPITULO 8. CONCLUSIONES

En este trabajo concluimos que:

1. La supervivencia de las larvas y el éxito tanto de la fase de pupa como de la eclosión de adultos viables se ve influenciado por el peso de la larva III. Las larvas que terminaron el ciclo produciendo imagos fueron significativamente más pesadas que aquellas que no lo completaron o de las que se obtuvieron adultos inviábiles. Además, las hembras eran más pesadas que los machos en todos los estadios del desarrollo (larva LIII, pupa e imago).
2. Hemos establecido unos valores de la duración de la formación del puparium, de la fase pupa y la longevidad de los imagos en la especie *Oestrus sp.*, que entran dentro de los márgenes descritos previamente para la especie *O. ovis* y en otras especies de la familia Oestridae.
3. Hemos desarrollado un modelo de dinámica de sistemas que nos permite predecir el ciclo biológico de *Oestrus sp.* Este modelo es muy sensible a los cambios en las distintas variables especialmente en la tasa de larviposición.
4. El modelo, que se ajusta bien a los datos conocidos sobre el patrón estacional en cuanto a prevalencia e intensidad de parasitación de *Oestrus sp.*, predice una producción mensual mínima en 5 larvas del primer estadio al mes por hembra grávida, así como que deben existir tres o cuatro generaciones anuales para mantener una dinámica de la población estable.
5. El análisis de los marcadores moleculares, citocromo oxidasa I (COI) y 28S rDNA, confirman que las larvas que parasitan a la Cabra Montés del Parque Natural de Sierra Nevada son de una especie del género *Oestrus* diferente de la especies *O. ovis*. Por el momento, no podemos determinar si éstas pertenecen a la especie *O. caucasicus* o si por el contrario se trata de una nueva especie no descrita previamente.



## **CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA**



## CAPITULO 9. BIBLIOGRAFÍA

Acha, P.N., Szyfres, B. Myiasis. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. Parasitoses. Volumen 3. 3rd edition. Scientific and Technical Publication No. 580. Washington. pp: 331-345 (2003).

Alcaide, M., Reina, D., Frontera, E., Navarrete, I. Epidemiology of *Oestrus ovis* (Linneo, 1761) infestation in goats in Spain. *Vet Parasitol.* **130**: 277-284 (2005).

Alcaide, M., Reina, D., Sánchez-López, J., Romero, G., Sierra, M.A., Navarrete, I. Situación seroepidemiológica de la oestrosis ovina en la provincia de Cáceres, España. *Producción Animal.* **174**: 5-13 (2002).

Alcaide, M., Reina, D., Sánchez, J., Frontera, E., Navarrete I. Seasonal variations in the larval burden distribution of *Oestrus ovis* in sheep in the southwest of Spain. *Vet Parasitol.* **118**: 235–241 (2003).

Allen, S.D., Bunch, T.D. Cranial lesions attributable to chronic sinusitis in bighorn sheep. *J Am Vet Med Assoc.* **181**: 1418-1419 (1982).

Anderson, J.R. Oestrid myiasis of humans. In: *The Oestrid flies, biology, host-parasite relationships, impact and management.* Collwel, D.D., Hall, M.J.R., Scholl, P.J. (Eds.). CABI. UK. Pp 201-209 (2006).

Angulo-Valadez, C.E., Scala, A., Grisez, C. Specific IgG antibody responses in *Oestrus ovis* L. (Diptera: Oestridae) infected sheep: associations with intensity of infection and larval development. *Vet Parasitol.* **155**: 257-263 (2008).

Angulo- Valadez, C.E., Cepeda-Palacios, R., Ascensio, F., Jacquiet, P., Dorchie, P., Ramirez-Orduña, J.M., López, M.A. IgG antibody response against salivary gland antigens from *Oestrus ovis* L.larvae (Diptera:Oestridae) in experimentally and naturally infected goats. *Vet Parasitol.* **16**: 356-359 (2009).

Angulo- Valadez, C.E., School, P.J., Cepeda-Palacios, R; Jacquiet, P y Dorchies, P. Nasal bots . . . a fascinating world! *Vet Parasitol.* **174**: 19–25 (2010).

Aracil, J., Gordillo, F. *Dinámica de sistemas*. Alianza Universidad, Madrid: 235 pp (1997).

Arias, M.S., Pajares, G., Paz-Silva, A., Díez-Baños, N., Suárez, J.L., Díez-Baños, P., Sánchez-Andrade, R., Morrondo, P. Antigen characterization from second instars of oestrid bot flies for the detection of anti-Cephenemyia stimulator antibodies by ELISA in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Med Vet Entomol.* **1**: 83-89 (2014a).

Arias, M.S., Moreno, V., Sarasa, M., Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Granados, J.E., Sánchez, A., Pérez, J.M. Reliability of an ELISA test for diagnosing oestrosis in Iberian ibex. *J Parasitol.* **100**: 235-238 (2014b).

Atzeni, M.G., Mayer, D.G., Spradberry, J.P., Anaman, K.A., Butler, D.G. Comparison of the predicted impact of a screwworm fly outbreak in Australia using a growth index model and a life-cycle model. *Med Vet Entomol.* **8**: 281-291(1994).

Azeredo-Espin, A.M.L., Lessinger, A.C. Genetic approaches for studying myiasis-causing flies: molecular markers and mitochondrial genomics. *Genetica.* **126**: 111–131 (2006).

Bautista, C.R., Angulo-Contreras, R.M., Garay- Garzon, E. Serologic diagnosis of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) in naturally infested sheep. *Med Vet Entomol.* **2**: 351-355 (1988).

Baneshwar, S., Jeffrey, D. Wells. Molecular systematics of the Calliphoridae (Diptera: Oestroidea): Evidence from one mitochondrial and three nuclear genes. *J Med Entomol.* **50**: 15-23 (2013).

Benecke, M. A brief survey of the history of forensic entomology. Ein kurzer Streifzug durch die Geschichte der forensischen Entomologie. *Acta Biol Benrodis.* **14**: 15-38 (2008).

Biggs, H.C., McClain, E., Muller, G.L., Anthonissen, M., Hare, K.M. A prediction model for strike in the sheep nasal fly, *Oestrus ovis*, in Nambia. *Prev Vet Med.* **33**: 267-282 (1998).

Breev, K.A., Zagretdinov, R.G., Minár, J. Influence of constant and variable temperatures on pupal development of the sheep bot fly (*Oestrus ovis* L.). *Folia Parasitol.* **27**: 359-365 (1980).

Boulard, C., Villejoubert, C., Moire, N., Losson, B., Lonneux, J.F. Sero-surveillance of hypodermatosis in a herd under therapeutic control. Effect of a low level of infestation. *Vet Parasitol.* **66**: 109-117 (1996).

Brown, J.M., Pellmyr, O., Thompson, J.N., Harrison, R.G. Phylogeny of *Greya* (Lepidoptera: Prodoxidae) based on nucleotide sequence variation in mitochondrial cytochrome oxidase I and II: consequence with morphological data. *Mol Biol Evol.* **11**: 128-141 (1994).

Butterfield, J.F. *Oestrus ovis*. *J Comp Med Vet.* **21**: 23-24 (1900).

Cameron, S.C., Lambkin, C.L., Barker, S.C., Whiting, M.F. A mitochondrial genome phylogeny of Diptera: whole genome sequence data accurately resolve relationships over broad timescales with high precision. *Syst Entomol.* **32**: 40-59 (2007).

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

Capelle, K. J. The occurrence of *Oestus ovis* L. (Diptera: Oestridae) in the bighorn sheep from Wyoming and Montana. *J Parasitol.* **52**: 618-621 (1966).

Candy, S.G. The application of generalized linear mixed models to multi-level sampling for insect population monitoring. *Environ. Ecol. Stat.* **7**: 217-238 (2000).

Catts, E.P., Goff, M.L. Forensic Entomology in Criminal Investigations. *Annu Rev Entomol.* **37**: 253-272 (1992).

Chi, H. Life table analysis incorporating both sexes and variable development rates among individuals. *Environ Entomol.* **17**: 26-34 (1988).

Chi, H. Computer program for age-stage, two-sex life table analysis. National Chung Hsin University, Taichung, Taiwan. Disponible en <http://140.120.197.173/ecology/> (1997).

Chi, H., Liu, H. Two new methods for the study of insect population ecology. *Bull Inst Zool Acad Sin.* **24**: 225-240 (1985).

Cepeda- Palacios, R., Scholl, P.J. Factors affecting the larvipositional activity of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). *Vet Parasitol.* **91**: 93-105 (2000).

Cepeda- Palacios, R., Monroy, A., Mendoza, M.A., Scholl, P.J. Testicular maturation in the sheep bot fly *Oestrus ovis*. *Med Vet Entomol.* **15**: 275-280 (2001).

Cepeda-Palacios, R., Angulo- Valadez, C.E., Scholl, J.P., Ramírez-Orduña, R., Jacquiet, P., Dorchies, P. Ecobiology of the sheep nose bot fly (*Oestrus ovis* L.): a review. *Rev. Méd. Vét.* **162**: 503-507 (2011).

Cobbett, N.G., Mitchell, W.C. Further observations on the life cycle and incidence of the sheep bot, *Oestrus ovis*, in New Mexico and Texas. *Am J Vet Res.* **2**: 358-366 (1941).

Colwell, D.D., Baron, R.W. Early detection of cattle grub (*Hypoderma lineatum* and *H. bovis*) (Diptera: Oestridae) using ELISA. *Med Vet Entomol.* **4**: 35-42 (1990).

Colwell, D. Bot flies and warble flies (Order Diptera: Family Oestridae). En: *Parasitic diseases of wild mammals 2<sup>nd</sup> edition*. Samuel W. M., M. J. Pybus M. J. y A. A. Kocan (eds), Manson Publishing / The Veterinary Press, London. 46-71 (2001).

Colwell, D.D., Hall, M.J.R., Scholl, P.J. Introduction. The Oestrid flies: Biology, host-parasite relationships, impact and management. Ed. Colwell D.D, Martin Hall J.R, Scholl P.J. CAB International. Wallingford. pp: 1-7 (2006).

Dorchies, P., Alzieu, J.P., Bichet, H., Chiarisoli, O. Traitement et prevention de l'oestrose ovine par le closantel. *Rev Méd Vét.* **140**: 1121-1124 (1989).

Dorchies, P., Yilma, J.M. Current knowledge in immunology of *Oestrus ovis* infection. *Turkiye Parazitoloj Derg Suppl.* **1**: 563-580 (1996).

Dorchies, P., Yilma, J.M., Savey, J. Lung involvement in ovine oestrosis: prevalence of lung abscesses and interstitial pneumonia. *Vet Rec.* **133**: 325 (1993).

Dorchies, P., Cardinaud, B., Fournier, R. Efficacy of moxidectin as a 1% injectable solution and a 1% oral drench against nasal bots, pulmonary and gastrointestinal nematodes in sheep. *Vet Parasitol.* **65**: 163-168 (1996).

Dorchies, P., Alzieu, J.P. L'oestrose ovine: revue. *Rev Méd Vét.* **148**: 565-574 (1997).

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

Dorchies, P., Tabouret, G., Duranton, C.H., Jacquet, P. Relations hôte-parasite: l'exemple d'*Oestrus ovis* (Linné 1761) chez le mouton et la chèvre. *Rev Méd Vét.* **150**: 511-516 (1999).

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

Dorchies, P., Jacquet, P., Bergeaud, J.P., Duranton, C., Prevot, F., Alzieu, J.P., Gossellin, J. Efficacy of doramectin injectable against *Oestrus ovis* and gastrointestinal nematodes in sheep in the southwestern region of France. *Vet Parasitol.* **96**: 147-154 (2001).

Dorchies, P., Tabouret, G., Hoste, H., Jacquet, P. Oestrinae host- parasite interactions. *The Oestrid Flies, Biology, Host- Parasite Relationships, Impact and Management* (ed. by D.D Colwell, M.J.R. Hall and P.J. Scholl). CABI (Center for Agricultural Bioscience International) Wallingford (2006).

Drummond, P.O. Effectiveness of ivermectin for control of arthropod pests of livestock. *Southwest Entomol Suppl.* **7**: 34-42 (1985).

Durantón, C., Dorchies, P. In vitro culture of *Oestrus ovis* (Linné1761) first instar larvae: its application to antiparasitic drug screening. *Int. J. Parasitol.* **27**: 125–128 (1997).

Durantón, C., Dorchies, P., Grand, S., Lesure, C., Oswald, I.P. Changing reactivity of caprine and ovine mononuclear phagocytes throughout part of the life cycle of *Oestrus ovis*: assessment though spontaneous and inductible no production. *Vet Res.* **30**: 371-376 (1999).

Du Toit, R., Fiedler, O.G.H. A new method of treatment for sheep infested with the larvae of the sheep nasal-fly, *Oestrus ovis* L. in the Union of South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **27**: 67-75 (1956).

Easton, A., Smith, K. "The entomology of the cadaver". *Med Sci Law.* **10**: 208-215 (1970).

Erzinclioglu, Y.Z. The application of entomology to forensic medicine. *Med Sci Law.* **10**: 208-215 (1983).

Fenton, A., Wall, R. Sensitivity analysis of stochastic model of the sheep blowfly *Lucilia sericata*. *J. Appl. Ecol.* **34**: 1023-1031 (1997).

Fenton, A., Wall, R., French, N. Sensitivity analysis of deterministic and stochastic simulation models of populations of the sheep blowfly, *Lucilia sericata*. *J. Theor. Biol.* **184**: 139-148 (1997).

Fenton, A., Wall, R., French, N. The incidence of ovine myiasis by the blowfly *Lucilia sericata* on sheep farms in Britain: a simulation model. *Vet. Parasitol.* **76**: 211-228 (1998).

Fenton, A., Wall, R., French, N. The effect of farm management strategies on the incidence of sheep strike in Britain: a simulation analysis. *Vet. Parasitol.* **79**: 341-357 (1998).

French, N.P., Morgan K.L. A model of ovine cutaneous myiasis using the predicted abundance of *Lucilia sericata* and a pattern of sheep susceptibility. *Prev. Vet. Med.* **26**: 143-155 (1996).

Frugère, S., Cota Leon, A., Prevot, F., Cepeda-Palacios, R., Tabouret, G., Bergeaud, J.P., Duranton, C., Dorchies, P., Jacquiet, P. Immunization of lambs with excretory secretory products of *Oestrus ovis* third instar larvae and subsequent experimental challenge. *Vet Res.* **31**: 527-535 (2000).

Gabre, R.M., Adham, F.K., Chi, H. Life table of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: *Calliphoridae*). *Act Oecol, I J Ecol.* **27**: 179-183 (2005).

Gofft, M.L. Problems in Estimation of Postmortem Interval. Resulting from Wrapping of the Corpse: A Case Study from Hawaii. *J. Agric. Entomol.* **9**: 237-243 (1992).

Gregory, A. R., Schatz, S., Laubach, H. Ophthalmomyiasis caused by the sheep bot fly *Oestrus ovis* in Northern Iraq. *Optom Vis Sci.* **81**: 586-590 (2004).

Grisez-Duranton, C., Dorchies, P., Jourdane, J., Durand, P. Genetic structure of *Oestrus ovis* populations in sheep and goats. *Vet Parasitol.* **104**: 167-173 (2002).

Guitton, C., Pérez, J.M., Dorchies, P. Scanning electron microscopy of larval instars and imago of *Oestrus caucasicus* (Grunin, 1948) (Diptera: Oestridae). *Parasite.* **8**: 155-160 (2001).

Grunin, K.Y. Nasal Botflies (Oestridae). *Fauna of the USSR, Insecta: Diptera* **19.3**:146. Academy of Sciences of the USSR, Moscow (1957).

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

Harrison, R.G., Rand, D.M., Wheeler, W.C. Mitochondrial DNA variation in field crickets across a narrow hybrid zone. *Mol Biol Evol.* **4**: 144-158 (1987).

Harvey, M.L., Dadour, I.R., Gaudieri, S. Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in Western Australia. *Forensic Sci Int.* **131**: 134-139 (2003).

Hennesy, J.D., Sherrill, W.J., Brinder, S.P. Extremal ophthalmomyiasis caused by *Oestrus ovis*. *Am J Ophthalmol.* **84**: 802-805 (1977).

Hemmersbach-Miller, M., Sánchez-Andrade, R., Dominguez-Coello, A., Hawari, M.A., Paz-Silva, A., Caranza, C., Pérez-Arellano, J.L. Human *Oestrus* sp. Infection. Canary Islands. *Emerg Infect Dis.* **13**: 950-951 (2007).

Hoste, H., Lemerrier, P., Jacquiet, P., Dorchies, P., Lespine, A., Alvinerie, M. Efficacy of eprinomectin pour-on against gastrointestinal nematodes and the nasal bot fly (*Oestrus ovis*) in sheep. *Vet. Rec.* **154**: 782-785 (2004).

Howard, G. W. Second stage larvae of nasal botflies (Oestridae) from African antelopes. *Syst Entomol.* **5**: 167-177 (1980).

Innocenti, L., Maseti, M., Macchioni, G., Giorgi, F. larval salivary gland proteins of the sheep nasal bot fly (*Oestrus ovis* L.) are major immunogens in infested sheep. *Vet Parasitol.* **60**: 273-282 (1995).

Jagannath, M.S., Cozab, N., Vijayasarithi, S.K. Histopathological changes in the nasal passages of sheep and goats infested with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). *Indian J Anim Sci.* **59**: 87-91 (1989).

James, M.T. The flies that cause myiasis in man. U.S.D.A. Misc. Pub. **49**: 381-397 (1947).

Kettle, D.S. *Medical and Veterinary Entomology.* C.A.B. International, Wallingford. 658pp (1990).

Kilani, M., Kacem, H., Dorchies, P., Franc, M. Observations sur le cycle annuel d'*Oestrus ovis* en Tunisie. *Rev Méd Vét.* **137**: 451-457 (1986).

Landry, B., Powell, J.A., Sperling, F.A.H. Systematics of the *Argyrotaenia franciscana* (Lepidoptera: Tortricidae) Species Group: Evidence from Mitochondrial DNA. *Ann Entomol Soc Am.* **92**: 40–46 (1999).

Leclercq, M. The relations between entomology and medical sciences. *Entomol Parasitol.* Pergamon Press, London, 158 pp (1969).

Leclercq, M. Entomology and forensic medicine: importance of phorid flies on human corpses. [French] [Conference paper] *Ann Soc Entomol France.* **35**: 566-568 (1999).

Li, W., Ano, H., Jin, J., Nasu, T., Ma, Y., Zhu, X., Makimura, S. Cytochrome oxidase I gene sequence of *Hypoderma sinense* infecting yaks in the Qinghai-Tibet high plateau of China. *Vet Parasitol.* **124**: 131-135 (2004).

Lora, C., Vasquez, M., Marchinares, C. Tratamiento de la miasis cavitaria por *Oestrus ovis* con Nevugon. *Revista del centro nacional de parasitología animal.* **5**: 69-74 (1966).

Lucientes, J., Clavel, A., Ferrer-Dufol, M., Valles, H., Peribañez, M.A., Gracia-Salinas, M.J., Castillo, J.A. One case of nasal human myiasis caused by third stage instar larvae of *Oestrus ovis*. *Am J Trop Med Hyg.* **56**: 608-609 (1997).

Lunt, D.H., Zhang, D.X., Szymura, J.M., Hewitt, G.M. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol Biol.* **5**: 153-165 (1996).

Malgorn, Y., Coquoz, R. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae. An interest in forensic entomology. *Forensic Sci Int.* **102**: 111-119 (1999).

Marchenko, M.I. Medicolegal relevance of cadaver entomofauna for the determination of the time of death. *Forensic Sci Int.* **120**: 89-109 (2001).

Marchenko, V.A., Marchenko, V.P. Survival of *Oestrus ovis* larvae depends on the state of the immune system of sheep. *Parazitologiya.* **2**: 129-133 (1989).

Martín-García, J. Teoría y ejercicios prácticos de Dinámica de Sistemas. Edited by 328 the author, Barcelona (2003).

Masoodi, M., Hosseini, K. The respiratory and allergic manifestations of human myiasis caused by larvae of the sheep bot fly (*Oestrus ovis*): a report of 33 pharyngeal cases from southern Iran. *Ann Trop Med Parasitol.* **97**: 75–81 (2003).

Minar, J., Lobachev, S., Kiefer, M., Bazardorh, D. New findings of warble flies (Hypodermatidae, Oestridae) of wild animals in Mongolia. *Folia Parasitol.* **32**: 89-91 (1985).

Moon, R.D. Simulating developmental time of preadult face flies (Diptera: *Muscidae*) from air temperature records. *Environ Entomol.* **12**: 943-948 (1983).

Moreno, V., Pérez, J.M., Moreno, P.A., Granados, J.E., Ruiz-Martínez, I., Soriguer, R.C., Simón, M.A. Oestrid myiasis in European mouflon from Spain. *J Wildl Dis.* **35**: 78-81 (1999).

Moř, D. The Antigenic Structure Characterization of *Oestrus ovis* Larvae. *Anim Sci Biotechnol.* **45** (2012).

Nelson, L.A., Lambkin, C.L., Batterham, P., Wallman, J.F., Dowton, M. Whiting MF, Yeates DK, Cameron SL. Beyond barcoding: a mitochondrial genomics approach to molecular phylogenetics and diagnostics of blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Gene.* **511**: 131-142 (2012).

Nguyen, V.K., Jacquet, P., Duranton, C., Bergeaud, J.P., Prévot, F., Dorchies P. Cellular reactions of nasal and sinus mucosae of goats and sheep naturally infected with *Oestrus ovis* Linné 1761 (Diptera :Oestridae). *Parasite.* **2**: 141-149 (1999).

Nigro, L., Solignac, M., Sharp, P.M. Mitochondrial DNA sequence in the *Melanogaster* and oriental species subgroups of *Drosophila*. *J Mol Evol.* **33**: 156-162 (1991).

Nirmala, X., Mita, K., Vanisree, V., Zurovec, M., Sehna, F. Identification of four small molecular mass proteins in the silk of *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol.* **10**: 437– 445 (2001).

Otranto, D., Milillo, P., Traversa, D., Colwell, D.D. Morphological variability and genetic identity in *Rhinoestrus* spp. causing horse nasal myiasis. *Med Vet Entomol.* **19**: 96-100 (2005a).

Otranto, D., Stevens, J.R. Molecular Phylogeny and Identification. The Oestrid flies: Biology, host-parasite relationships, impact and management. Colwell DD, Martin Hall JR, Scholl PJ. CAB International. Wallingford. pp: 51-66 (2006).

Otranto, D., Colwell, D.D. Biodiversity and extinction versus control of oestrid causing myiasis in the Mediterranean area. *Parasite.* **15**: 257–260 (2008).

Otranto, D., Stevens, J.R. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. *Int. J Parasitol.* **32**: 1345-1360 (2002).

Otranto, D., Tarsitano, E., Giangaspero, A., Puccini, V. Differentiation by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of some Oestridae larvae causing myiasis. *Vet Parasitol.* **90**: 305-313 (2000).

Otranto, D., Traversa, D., Guida, B., Tarsitano, E., Fiorente, P., Stevens, J.R. Molecular characterization of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene of Oestridae species causing obligate myiasis. *Med Vet Entomol.* **17**: 307-315 (2003a).

Otranto, D., Traversa, D., Milillo, P., De Luca, F., Stevens, J. Utility of mitochondrial and ribosomal genes for differentiation and phylogenesis of species of gastrointestinal bot flies. *J Econ Entomol.* **98**: 2235-2245 (2005b)

Otranto, D., Traversa, D., Tarsitano, E., Stevens, J. Molecular differentiation of *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Vet Parasitol.* **112**: 197-201 (2003b).

Otranto, D., Traversa, D., Giangaspero, A. Myiasis caused by Oestridae: serological and molecular diagnosis. *Parassitologia*. **46**: 169–172 (2004).

Pandey, V. S. Epidemiology of *Oestrus ovis* infection of sheep in the Highveld of Zimbabwe. *Vet Parasitol*. **31**: 275-280 (1989).

Papadopoulos, E., Prevot, F., Jacquiet, P., Duranton, C., Bergeaud, J.P., Kalaitzakis, E., Dorchies, P. Seasonal variation of *Oestrus ovis* specific antibodies in sheep and goats mixed flocks in Greece. *Vet Parasitol*. **95**: 73–77 (2001).

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

Pape, T. Phylogeny of Oestridae (Insecta: Diptera). *Sys Entomol*. **26**: 133-171 (2001).

Pawlas-Opiela, M., Wojciech, L., Sołtysiak, Z., Otranto, D., Ugorski, M. Molecular comparison of *Gasterophilus intestinalis* and *Gasterophilus nasalis* from two distinct areas of Poland and Italy based on *cox1* sequence analysis. *Vet Parasitol*. **169**: 219-221 (2010).

Pérez, J.M., Granados, J.E., Soriguer, R.C., Ruíz-Martínez, I. Prevalence on seasonality of *Oestrus caucasicus* Grunin 1948 (Diptera: Oestridae) Parasitizing the spanish ibex, *Capra pyrenaica* (Mammalia artiooactyla). *J Parasitol*. **82**: 233-236 (1996).

Pfadt, R.E., Lloyd, J.E., Sharafi, G. Pupal development of cattle grubs at constant and alternating temperatures. *J Econ Entomol*. **68**: 325-328 (1975).

Preuss, K. P. Day-degree methods for pest management. *Environ. Entomol*. **12**: 613-619 (1983).

Puccini, V., Giangaspero, A., Fasanella, A. Efficacy of moxidectin against *Oestrus ovis* larvae in naturally infested sheep. *Vet Record*. **135**: 600-601 (1994).

Rogers, C.E., Knapp, F.W. Bionomics of the sheep bot fly, *Oestrus ovis*. Environ Entomol. **2**: 11-23 (1973).

Roncalli, R.A. Historical perspectives on the importance and impact of oestrids. In The Oestrid Flies: Biology, Host–Parasite Relationships, Impact and Management (Colwell, D.D. et al. eds), pp. 8–19, CABI Publishing (2006).

Rugg, D., Gogolewski, R.P., Barrick, R.A., Eagleson, J.S. Efficacy of ivermectin controlled- release capsules for the control and prevention of nasal bot infestations in sheep. Aust Vet J. **75**: 36-38 (1997).

Ruiz-Martinez, I., Pérez, J.M., Louassini, M. Comparative analysis of the prevalence of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) in sheep horns of Southern Spain and Northern Morocco. Boletim Soc Port Entomol. **139**: 421-428 (1992).

Ruiz-Martinez, I., Chiroso Rios, M. Iniciación al estudio de los dípteros productores de miasis. Introducción y generalidades. Boletín Asoc Entomol Boabdil. **1**: 41-58 (1994).

Ruiz-Martinez, I. Las miasis. Monografía Ovis. Ed. Luzon. Madrid (1997).

Sanchez-Andrade, R., Suarez, J.L., Pedreira, J., Diaz, P., Arias, M., Paz-Silva, A., Panadero, R., Diez-Banos, P., Morrondo, P., Scala, A. Comparison of *Oestrus ovis* metabolic and somatic antigens for the immunodiagnosis of the zoonotic myiasis oestrosis by immunoenzymatic probes. Immunol Invest. **34**: 91–99 (2005).

Sanyal, P.K., Maru, A y Gupta, A.K. The use of injectable rafoxanide against natural ovine nasal myiasis. Vet Parasitol. **19**: 127-131 (1986).

Scala, A., Paz-Silva, A., Suarez, J.L., Lopez, C., Diaz, P., Diez-Banos, P., Sanchez-Andrade Fernandez, R. Chronobiology of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) in Sardinia, Italy: guidelines to chemoprophylaxis. J Med Entomol. **39**: 652–657 (2002).

Schindler, P., Puccini, V., Arru, E y Tassi, P. Efficacy of ivermectin and rafoxanide against *Oestrus ovis* larvae in sheep. J Egypt Soc Parasitol. **16**: 1-7 (1986).

Scholl, P.J., Wedberg, J., Neher, N., Flashinski, R. Pest Management Principles for the Commercial Applicator; Animal Pest Control. University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, 161pp (1990).

Scholl, P.J. Management and control of oestrid flies. In: The Oestrid flies, biology, host-parasite relationships, impact and management. Collwel, D.D., Hall, M.J.R., Scholl, P.J. (Eds.). CABI. UK. Pp 201-209 (2006).

Shao, R., Barker, S.C. Mitochondrial genomes of parasitic arthropods: implications for studies of population genetics and evolution. *Parasitol.* **134**: 153–167 (2007).

Singh, S., Sedgh, G., Hussain, R. Unintended pregnancy: worldwide levels, trends, and outcomes. *Stud Fam Plann.* **41**: 241-50 (2010).

Soulsby, E.J.L. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. 809pp. London (1982).

Sperling, F.A.H., Anderson, G.S., Hickey, D.A. A DNA-based approach to the identification of insect species used for post-identification of insect species used for post- mortem interval estimation. *J Forensic Sci.* **39**: 418-427 (1994).

Spicer, G.S. Phylogenetic utility of mitochondrial cytochrome oxidase gene: molecular evolution of *Drosophila buzzatii* species complex. *J Mol Evol.* **11**: 665-749 (1995).

Stephen, S., Pheasant, M., Makunin, V., Mattick, J.S. Large-scale appearance of ultraconserved elements in tetrapod genomes and slowdown of the molecular clock. *Mol Biol Evol.* **25**: 402–408 (2008).

Stevens, J.R. The evolution of myiasis in blowflies (Calliphoridae). *Int J Parasitol.* **33**: 1105-1113 (2003).

Stevens, J.R., Wall, R. Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *Forensic Sci.* **120**: 116-123 (2001).

Stevens, J.R., Wall, R., Wells, J.D. Paraphyly in Hawaiian hybrid blowfly populations and the evolutionary history of anthropophilic species. *Insect Mol Biol.* **11**: 141-148 (2002).

Suárez, J.L., Scala, A., Romero, J.A., Paz-Silva, A., Pedreira, J., Arias, M., Diaz, P., Morrondo, P., Diez-Banos, P., Sanchez-Andrade, R. Analysis of the humoral immune response to *Oestrus ovis* in ovine. *Vet Parasitol.* **134**: 153–158 (2005).

Tabouret, G., P. Jacquet, P. Scholl y P. Dorchies. *Oestrus ovis* in sheep: relative third-instar populations, risks of infection and parasitic control. *Vet Res.* **32**: 525-531 (2001).

Tabouret, G., Bret- Bennis, L., Dorchies, P., Jacquet, P. Serine protease activity in excreted- secreted products of *Oestrus ovis* (Diptera:Oestridae) larvae. *Vet Parasitol.* **114**: 305-314 (2003).

Teskey, H.J. Morphology and terminology larvae. Manual of Nearctic Diptera. Vol 1(coord, by J.F. McAlpine, B.V. Peterson, G.E. Shewell, H.J. Teskey, J.R. Vockeroth and D.M. Wood) pp 65-88. Agriculture Canada Research Branch Monograph 27. 674pp (1981).

Unsworth, K. Observations on the seasonal incidence of *Oestrus ovis* infection among goats in Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol.* **43**: 337 (1949).

Wall, R., French, N.P., Fenton, A. Sheep blowfly strike: a model approach. *Res Vet Sci.* **69**: 1-9 (2000).

Wall, R., French, N.P., Morgan, K.L. Effects of temperature on the development and abundance of the sheep blowfly *Lucilia sericata*. *Bull Entomol Res.* **82**: 125-131 (1992).

Wall, R., French, N.P., Morgan, K.L. Predicting the abundance of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: *Calliphoridae*). *Bull Entomol Res.* **83**: 431-436 (1993a).

Wall, R., French, N.P., Morgan, K.L. Sheep blowfly population control: development of a simulation model and analysis of management strategies. *J Appl Ecol.* **30**: 743-751 (1993b).

Wallman, J.F., Donnellan, S.C. The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. *Forensic Sci Int.* **120**: 60-67 (2001).

Weigl, S., Traversa, D., Testini, G., Dantas-Torres, F., Parisi, A., Colwell, D.D., Otranto, D. Analysis of a mitochondrial noncoding region for the identification of the most diffused *Hypoderma* species (Diptera, Oestridae). *Vet Parasitol.* **173**: 317-323 (2010).

Wells, J.D., Pape, T., Sperling, F.A.H. DNA-based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae (Diptera). *J Forensic Sci.* **46**: 1098-1102 (2001).

Wells, J.D., Sperling, F.A.H. DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Int.* **120**: 110-115 (2001).

Wetzel, H., Bauristhene, E. The identity of the third larval stage of *Oestrus ovis* Linnaeus (1758) (Diptera: Oestridae). *J Zool Anzeiger.* **184**: 87-94 (1970).

Wigglesworth, V.B. *Insect physiology*. 8th Edition. Chapman and Hall, London-New York (1984).

Yilma, J.M., Dorchies, P. Epidemiological study of *Oestrus ovis* in south west France. *Vet Parasitol.* **40**: 315-323 (1991).

Zhang, D.X., Hewitt, G.M. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Mol Biol.* **6**: 143-150 (1997).

Zhang, D.X., Hewitt, G.M. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Mol Biol.* **6**: 143-150 (1996).

Zhang, D.X., Szymura, J.M., Hewitt, G.M. Evolution and structural conservation of the control region of mitochondrial DNA. *J Mol Evol.* **40**: 382-391 (1995).

Zammarchi L., Giorni, A., Gabrielli, S., Strohmeyer, M., Cancrini, G., Bartoloni, A. Human oestriasis acquired in Florence and review on human myiasis in Italy. *Parasitol Res.* **113**: 2379-2385 (2014).

Zehner, R., Amendt, J., Schütt, S., Sauer, J., Krettek, R., Povoln, D. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *Int J Legal Med.* **118**: 245–247 (2004).

Zumpt, F. Myiasis in man, animals in the old world. Ed. Butterworths, London (1965).