



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

Miasis nasales del corzo:
epidemiología y reacciones
cruzadas entre distintos
antígenos

Carlota Fernández González

Grado en Veterinaria
Año 2024
Modalidad del Trabajo: Experimental

Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a Carlota Fernández González y está bajo una licencia de “Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional”.



Resumen

Las miasis nasofaríngeas están producidas por la ocupación de las cavidades nasal y faríngea por larvas de moscas pertenecientes a la subfamilia Oestrinae (Familia Oestridae). En los cérvidos, los géneros más frecuentes son *Cephenemyia*, *Pharyngomyia* y, de forma esporádica, *Oestrus*. La visualización de las larvas constituye el método de diagnóstico de referencia, pero resulta complicado y laborioso, por lo que la detección de anticuerpos resulta de gran utilidad para la monitorización de estas miasis.

Los objetivos de este estudio consistieron en la identificación de los agentes causantes de las miasis nasofaríngeas de los corzos en España, así como la determinación de su distribución y epidemiología y el estudio, mediante ELISA indirecto, de la seroprevalencia y reacciones cruzadas entre los antígenos somáticos obtenidos de larvas 1 (Ag L1) y larvas 2 (Ag L2). Para ello entre los años 2022 y 2024 se analizaron la cavidad nasofaríngea y los sueros de 181 corzos procedentes de 11 comunidades autónomas.

Mediante análisis morfológico de las larvas recogidas en la necropsia se identificaron dos especies distintas: *Cephenemyia stimulator*, parásito específico del corzo y ampliamente distribuido en nuestro país y *Oestrus ovis*, díptero habitual en los rebaños de ovejas y cabras domésticas. Las larvas de *C. stimulator* estuvieron presentes en el 45,3% de los corzos, mientras que las de *O. ovis* sólo se detectaron en 5 animales (2,7%). De igual modo, la intensidad fue mucho más elevada para *C. stimulator* ($22,2 \pm 48,99$) que para *O. ovis* ($0,06 \pm 0,46$). Hay que destacar que no se encontraron infecciones mixtas, y que la presencia de L3 maduras de *O. ovis* sugiere que puede completar su ciclo vital en el corzo. También se observó que *C. stimulator* está presente en casi todas las comunidades del norte y centro peninsular, mientras que *O. ovis* se limita a puntos muy concretos de las regiones de Castilla-La Mancha y Castilla y León. No obstante, su presencia en el corzo no es accidental por lo que las condiciones de simpatria entre ungulados domésticos y silvestres podrían propiciar la expansión de esta miasis en el corzo. La seroprevalencia para *C. stimulator* fue del 45,8% tanto con el AgL1 como con el AgL2, ofreciendo unos valores de sensibilidad y especificidad aceptables y un buen grado de concordancia con la necropsia. Por el contrario, la seroprevalencia por *O. ovis* fue del 14,9% con el AgL1 y del 18,2% con el AgL2, ofreciendo una menor sensibilidad lo que limita su validez diagnóstica a consecuencia de las posibles reacciones cruzadas con los antígenos de *C. stimulator*.

Palabras clave: *Cephenemyia*, Corzo, Inmunodiagnóstico, Miasis nasofaríngeas, *Oestrus*, Península Ibérica, Reacciones cruzadas.

Resumo

As miases nasofarínxeas están producidas pola ocupación das cavidades nasal e farínxea por larvas de moscas pertencentes á subfamilia Oestrinae (Familia Oestridae). Nos cérvidos, os xéneros máis frecuentes son *Cephenemyia*, *Pharyngomyia* e, de forma esporádica, *Oestrus*. A visualización das larvas constitúe o método de diagnóstico de referencia, pero resulta complicado e laborioso, polo que a detección de anticorpos resulta de gran utilidade para a monitorización destas miases.

Os obxectivos deste estudo consistiron na identificación dos axentes causantes das miases nasofarínxeas dos corzos en España, así como a determinación da súa distribución e epidemioloxía e o estudo, mediante ELISA indirecto, da seroprevalencia e reaccións cruzadas entre os antíxenos somáticos obtidos de larvas 1 (Ag L1) e larvas 2 (Ag L2). Para iso, entre os anos 2022 e 2024 analizáronse a cavidade nasofarínxea e os soros de 181 corzos procedentes de 11 comunidades autónomas.

Mediante análise morfolóxica das larvas recollidas na necropsia identificáronse dúas especies distintas: *Cephenemyia stimulator*, parasito específico do corzo e amplamente distribuído no noso país e *Oestrus ovis*, díptero habitual nos rabaños de ovellas e cabras domésticas. As larvas de *C. stimulator* estiveron presentes no 45,3% dos corzos, mentres que as de *O. ovis* só se detectaron en 5 animais (2,7%). De igual modo, a intensidade foi moito máis elevada para *C. stimulator* ($22,2 \pm 48,99$) que para *O. ovis* ($0,06 \pm 0,46$). Hai que destacar que non se atoparon infeccións mixtas, e que a presenza de L3 maduras de *O. ovis* suxire que pode completar o seu ciclo vital no corzo. Tamén se observou que *C. stimulator* está presente en case todas as comunidades do norte e centro peninsular, mentres que *O. ovis* se limita a puntos moi concretos das rexións de Castela-A Mancha e Castela e León. Non obstante, a súa presenza no corzo non é accidental polo que as condicións da simpatria entre ungulados domésticos e silvestres poderían propiciar a expansión desta míase no corzo. A seroprevalencia para *C. stimulator* foi do 45,8% tanto co AgL1 como co AgL2, ofrecendo uns valores de sensibilidade e especificidade aceptables e un bo grao de concordancia coa necropsia. Pola contra, a seroprevalencia para *O. ovis* foi do 14,9% co AgL1 e do 18,2% co AgL2, ofrecendo unha menor sensibilidade o que limita a súa validez diagnóstica a consecuencia das posibles reaccións cruzadas cos antíxenos de *C. stimulator*.

Palabras chave: *Cephenemyia*, Corzo, Inmunodiagnóstico, Miases nasofarínxeas, *Oestrus*, Península Ibérica, Reaccións cruzadas.

Summary

Nasopharyngeal myiasis is caused by the infestation of the nasal and pharyngeal cavities by larvae of flies belonging to the subfamily Oestrinae (Family Oestridae). In cervids, the most common genera are *Cephenemyia*, *Pharyngomyia*, and, sporadically, *Oestrus*. The visualization of larvae constitutes the reference diagnostic method, but it is complicated and laborious, making antibody detection very useful for monitoring these myiasis.

The objectives of this study were to identify the causative agents of nasopharyngeal myiasis in roe deer in Spain, determine their distribution and epidemiology, and study, through indirect ELISA, the seroprevalence and cross-reactions between somatic antigens obtained from larvae 1 (Ag L1) and larvae 2 (Ag L2). For this, between 2022 and 2024, the nasopharyngeal cavities and sera of 181 roe deer from 11 autonomous communities were analyzed.

Morphological analysis of the larvae collected during necropsy identified two distinct species: *Cephenemyia stimulator*, a specific parasite of roe deer widely distributed in our country, and *Oestrus ovis*, a common dipteran in domestic sheep and goat herds. *C. stimulator* larvae were present in 45.3% of the roe deer, while *O. ovis* larvae were detected in only 5 animals (2.7%). Similarly, the intensity was much higher for *C. stimulator* (22.2 ± 48.99) than for *O. ovis* (0.06 ± 0.46). Notably, no mixed infections were found, and the presence of mature L3 larvae of *O. ovis* suggests that it can complete its life cycle in roe deer. It was also observed that *C. stimulator* is present in almost all the northern and central regions of the peninsula, while *O. ovis* is limited to very specific areas in the regions of Castilla-La Mancha and Castilla y León. However, its presence in roe deer is not accidental, and the conditions of sympatry between domestic and wild ungulates could promote the spread of this myiasis in roe deer. The seroprevalence for *C. stimulator* was 45.8% with both AgL1 and AgL2, offering acceptable sensitivity and specificity values and a good degree of concordance with necropsy results. In contrast, the seroprevalence for *O. ovis* was 14.9% with AgL1 and 18.2% with AgL2, offering lower sensitivity, limiting its diagnostic validity due to possible cross-reactions with *C. stimulator* antigens.

Key words: *Cephenemyia*, Roe deer, Immunodiagnosis, Nasopharyngeal myiasis, *Oestrus*, Iberian Peninsula, Cross reactions.

Índice

1. Introducción	7
1.1. Miasis nasofaríngeas	8
1.1.1. <i>Cephenemyia stimulator</i>	9
1.1.1.1. Ciclo biológico	9
1.1.1.2. Prevalencia y distribución	10
1.1.1.3. Epidemiología: Factores intrínsecos y extrínsecos	11
1.1.1.4. Diagnóstico	12
1.1.2. <i>Oestrus ovis</i>	15
1.1.2.1. Ciclo biológico	15
1.1.2.2. Prevalencia y distribución	17
1.1.2.3. Epidemiología: Factores intrínsecos y extrínsecos	18
1.1.2.4. Diagnóstico	19
2. Objetivos	22
3. Materiales y métodos	22
3.1. Animales muestreados	22
3.2. Recolección de las larvas y sangre	23
3.3. Diferenciación morfológica	27
3.4. Obtención de los antígenos larvarios	28
3.4.1. Preparación de antígeno bruto somático	28
3.4.2. Determinación de la concentración proteica	29
3.5. ELISA indirecto para la detección de anticuerpos frente a <i>C. stimulator</i> y <i>O. ovis</i>	29
3.6. Normalización de los valores de absorbancia	30
3.7. Determinación del punto de corte	31
3.8. Validación de las pruebas	31
3.9. Análisis estadísticos	32
4. Resultados y discusión	32
4.1. Identificación de los agentes causantes de miasis nasofaríngeas del corzo	32
4.2. Prevalencia e intensidad media de infestación según diversos factores	33
4.3. Validación del ELISA para el diagnóstico de <i>C. stimulator</i> y <i>O. ovis</i> en el corzo	36
4.4. Seroprevalencia de <i>C. stimulator</i> y <i>O. ovis</i> en corzos	39
5. Conclusiones	41
6. Bibliografía	42

1. Introducción

El corzo, *Capreolus capreolus* (Linnaeus, 1758), es una especie de mamífero ungulado, artiodáctilo y rumiante de la familia Cervidae. Su presencia se ciñe al hemisferio norte y, en Europa sus poblaciones se extienden desde Gran Bretaña hasta Rusia occidental, asentándose por todo el territorio europeo continental. A pesar de las vicisitudes atravesadas por esta especie a lo largo de los años, actualmente sus poblaciones se encuentran en recuperación (Pajares, 2016).

En España se distribuye por todos los ecosistemas forestales de la Península, a excepción del Levante. La distribución homogénea de los ejemplares se concentra en la Cordillera Cantábrica y en las zonas montañosas más septentrionales del Sistema Ibérico y Central, mientras que en el sur peninsular su distribución es más discontinua, con núcleos en Toledo, Ciudad Real, Cuenca, Cáceres, Jaén, Cádiz y Málaga (Braza *et al.*, 1989).

En cuanto a sus costumbres y estructura social, son animales que conviven en grupos pequeños la mayoría del tiempo, pero en los meses de invierno se suelen agrupar varios grupos como medida de supervivencia. En general, el territorio de las hembras es más pequeño que el de los machos llegando estos últimos a solapar el territorio de varias hembras.

Al contrario que el resto de los cérvidos españoles, el corzo presenta particularidades en cuanto al momento de celo, teniéndolo entre la segunda semana de julio y mediados o finales de agosto. Su duración es variable en función de factores propios de los individuos y de las condiciones atmosféricas. A mayores, las hembras comienzan a reproducirse a partir de los dos años de vida y su gestación dura unos 10 meses, caracterizándose por presentar dos fases: diapausa embrionaria y gestación. La diapausa embrionaria es una característica fisiológica particular de los corzos, dura unos 170 días y tiene como fin concentrar los partos en los meses de abril-mayo con el fin de asegurar una mayor supervivencia de los corcinos. Cada año, a principios de mayo, las hembras adultas seleccionan los mismos lugares para parir sus crías. Cada hembra pare de uno a tres corcinos, siendo dos lo más común (Pajares, 2016).

En general, el corzo es un animal que puede verse muy parasitado, siendo el cérvido que mayor diversidad de formas parasitarias presenta y también el más sensible a las parasitosis. En estos animales las enfermedades parasitarias son una de las principales causas de enfermedad y muerte, aunque en muchas ocasiones no se llega a demostrar la etiología parasitaria de las muertes (Gortázar y Vicente, 2008).

1.1. Miasis nasofaríngeas

Una miasis es una enfermedad parasitaria provocada por larvas de dípteros que se alimentan de los tejidos vivos o muertos de un hospedador. En función del grado de dependencia del hospedador, las miasis pueden ser obligatorias cuándo necesitan un animal vertebrado para completar su ciclo y facultativas u oportunistas cuándo también pueden alimentarse de materia orgánica en descomposición.

Las miasis nasofaríngeas objeto de este estudio están provocadas por la ocupación de las cavidades nasal y algunos recesos faríngeos por larvas de moscas pertenecientes a la subfamilia Oestrinae (Familia Oestridae), la cual incluye 9 géneros que afectan tanto a animales domésticos como a animales silvestres pertenecientes a los órdenes Artiodactyla, Perissodactyla y Proboscidea (Scholl *et al.*, 2019) (Tabla 1).

Tabla 1: Miasis provocadas por los distintos géneros de la subfamilia Oestrinae y sus hospedadores habituales (Tomado de: Colwell *et al.*, 2006; Scholl *et al.*, 2019).

Subfamilia	Género	Tipo de miasis	Hospedador/es
	<i>Gedoelstia</i>	Nasofaríngea	Antilopinae
	<i>Kirkioestrus</i>	Nasofaríngea	Hippotraginae (Bovidae)
	<i>Oestrus</i>	Nasofaríngea, ocular	Caprinae e Hippotraginae (Bovidae)
	<i>Rhinoestrus</i>	Nasofaríngea	Suidae, Giraffidae, Bovidae y <i>Equus</i>
Oestrinae	<i>Cephenemyia</i>	Nasofaríngea	Cervidae
	<i>Pharyngomyia</i>	Nasofaríngea	Cervidae
	<i>Pharyngobolus</i>	Nasofaríngea	Elephantidae
	<i>Tracheomyia</i>	Traqueal	<i>Macropus robustus</i>
	<i>Cephalopina</i>	Nasofaríngea	<i>Camelus</i>

Los oestrinos se diferencian del resto de oéstridos en que son larvíparos y las hembras grávidas expulsan los paquetes de larvas hacia la zona del hocico del animal, desde ahí las larvas migran hacia los senos, cavidad nasofaríngea... (Colwell, 2001; Scholl *et al.*, 2019) causando sintomatología clínica en el animal: rinitis, descarga nasal, complicaciones respiratorias (Dorchies *et al.*, 1998).

En los cérvidos de la Península Ibérica podemos encontrar diferentes oestrinos. *Pharyngomyia picta* y *Cephenemyia auribarbis* son parásitos específicos y obligados del ciervo rojo (*Cervus elaphus*) que en ocasiones, entre el 74% (Ruiz *et al.*, 1993) y el 12,5% (González *et al.*, 2020), respectivamente, se encuentran parasitando a la vez al mismo hospedador.

Otros oestrinos que podemos encontrar en el territorio español son *Oestrus ovis* y *Oestrus caucasicus*, estos parasitan a rumiantes domésticos y silvestres, y en ocasiones se han citado casos de parasitaciones accidentales en el perro (*Canis lupus*) (Lucientes *et al.*, 1997) y en el hombre (*Homo sapiens*) (Panadero y Otranto, 2015) por parte de *O. ovis*. En lo que respecta a los rumiantes domésticos, los últimos datos publicados por Garrijo-Toledo *et al.* en el 2023 revelan altas prevalencias de parasitaciones por *O. ovis*, tanto en ovejas como cabras (61,2% y 43%, respectivamente). En cuanto a los rumiantes silvestres, a lo largo del tiempo se han reportado parasitaciones por parte de ambos oestrinos tanto en la cabra montesa (*Capra pyrenaica victoriae* y *C. p. hispanica*) como en el muflón (*Ovis musimon*). Los últimos datos indican la presencia de *O. ovis* en el 47,5% de los muflones y en el 12,41% de las cabras montesas de Extremadura y Andalucía (Alonso *et al.*, 2005). Por otra parte, Pérez *et al.* (1996) encontraron prevalencias del 74,4% de las cabras montesas analizadas frente a *O. caucasicus*.

A todo esto, hay que sumar el reciente hallazgo de la parasitación de *O. ovis* en el corzo (Martínez-Calabuig *et al.*, 2023), sumándose así a *Cephenemyia stimulator* (Pajares, 2009), como agente causante de miasis nasofaríngea en este animal.

Todos estos parásitos cobran gran importancia por las pérdidas económicas que causan sobre las producciones ganaderas y por las bajas que causan sobre los animales salvajes como los cérvidos. Además, la fauna silvestre es responsable de más del 70% de las enfermedades emergentes y zoonosis que afectan a la sanidad ganadera, comprometen la producción cinegética y perjudican la conservación de fauna silvestre.

1.1.1. Cephenemyia stimulator

Dentro del género *Cephenemyia*, en Europa se han descrito cuatro especies que afectan a cérvidos silvestres: *C. ulrichii* (Brauer, 1863) es específica del alce (*Alces alces*), *C. trompe* (Modeer, 1786) del reno (*Rangifer tarandus*), *C. auribarbis* (Meigen, 1824) del ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y del gamo (*Dama dama*) y *C. stimulator* (Clark, 1815) del corzo (*Capreolus capreolus*). A *C. stimulator* se la conoce comúnmente como mosca del corzo, gusano de la garganta/nariz del corzo...

1.1.1.1. Ciclo biológico

El ciclo se inicia cuando las moscas, ya fecundadas, localizan a su hospedador, atraídas por estímulos como el olor y el CO₂ espirado del corzo. También son capaces de reconocer el punto preciso donde realizar la larviposición y hacerlo en la especie adecuada (Pajares, 2016). Las hembras fecundadas vuelan alrededor de la cabeza del corzo y depositan las larvas 1 (L1) que contienen en su interior en las fosas nasales (Arias *et al.*, 2016). No depositan todas en un único

corzo sino que lo hacen en paquetes de 30 a 50 L1 en las fosas nasales de diversos corzos con el fin de lograr una mayor tasa de supervivencia larvaria al infestar animales de diferentes estados inmunitarios, edades... (Arias *et al.*, 2012; Calero-Bernal y Habela, 2013).

Las L1, gracias a su esqueleto cefálico y a que su cuerpo está cubierto de espinas que favorecen su adherencia, acceden a la cavidad nasal a través de las fosas nasales, migrando posteriormente hacia los cornetes y senos paranasales (Pajares, 2016). También poseen una característica que ayuda a su supervivencia durante el tiempo que tardan en acceder hasta el interior del animal, se trata de un fluido denso y gelatinoso que las rodea y que posee dos funciones, favorecer la adherencia de las larvas y protegerlas de la desecación.

Una vez en el interior del animal, las espinas que cubren su cuerpo y sus ganchos bucales ayudan a que las L1 no sean expulsadas fuera por el hospedador mediante toses, estornudos, movimientos bruscos...

En los cornetes y senos paranasales las L1, si las condiciones climatológicas son adecuadas, continúan su desarrollo a L2, dirigiéndose hacia las coanas, faringe y laringe. Por el contrario, durante el otoño e invierno pueden detener su desarrollo (diapausa) (Pajares, 2016). Aunque la diapausa puede darse en cualquier estadio del parásito, es más común que se de en la fase de L1 y en la de pupa (Arias *et al.*, 2012; Pajares, 2016); aunque esta última tendría lugar en el exterior y no dentro del animal.

Las L2 se localizan en coanas, laringe y faringe, donde se alimentan de mucus y fluidos hasta que maduran a L3. Las L3 comienzan una migración inversa a la de los otros estadios larvarios para poder salir al exterior a través de los orificios nasales (Pajares, 2016) y pupar en el suelo. De la pupa saldrá la mosca adulta que, una vez fecundada que reiniciará el ciclo.

Hay ocasiones en las que las L3 no consiguen salir y quedan atrapadas en recovecos de la cavidad nasal, otras veces estas realizan migraciones erráticas o anómalas a otras localizaciones, como la cavidad craneana (Fidalgo *et al.*, 2021).

1.1.1.2. Prevalencia y distribución

La miasis causada por *C. stimulator* es una parasitosis ampliamente distribuida por Europa (Király y Egri, 2007), sobre todo por Europa central.

En la República Checa, *C. stimulator* se considera un parásito habitual de los corzos (Salaba *et al.*, 2013), si bien las prevalencias han ido descendiendo en las últimas décadas. Así, Lamka *et al.* (1997) en investigaciones realizadas hace unos 30 años señalaron prevalencias del 60-90%, mientras que, a principios de este siglo, Vaca (2000) y Curlik *et al.* (2002) obtuvieron

prevalencias del 11,1-25,6% y 44%, respectivamente. Los datos más recientes obtenidos en este país indican una prevalencia del 28,8% (Salaba *et al.*, 2013).

De forma similar, en Polonia Dudzinski (1970) halló prevalencias de hasta el 85%, mientras que en 2016 los porcentajes señalados por Kornás *et al.* (2016) no superaban el 13%.

En Hungría la prevalencia media obtenida durante 3 años consecutivos fue del 34,6% (Király y Egri, 2007). En Alemania, se encontraron prevalencias del 49% (Barth *et al.*, 1976). Finalmente, en Francia se halló una seroprevalencia por ELISA indirecto del 32,42% usando antígenos somáticos de L3 de *C. stimulator* e inmunoconjugado no específico (Maes y Boulard, 2001).

Al igual que ha ocurrido con otros animales y parásitos, la importación incontrolada de corzos procedentes de países endémicos de *C. stimulator* se cree que fue el método más probable por el cual se introdujo *C. stimulator* en la Península Ibérica. El primer caso reportado fue en 2006, se trataba de un corzo proveniente del Concejo de Valdés, Asturias (Pajares, 2009). Desde entonces, la cefenemiosis se ha extendido drásticamente en las poblaciones autóctonas de corzo, alcanzando elevadas prevalencias en el noroeste de España (Arias *et al.* 2016). Actualmente se están observando prevalencias que varían desde el 31,6% al 62,2%, con más de la mitad de corzos parasitados en el norte del país (Martínez-Calabuig *et al.*, 2022a).

1.1.1.3. Epidemiología: Factores intrínsecos y extrínsecos

Todas estas prevalencias, al igual que en otras miasis, se ven influidas por diversos factores intrínsecos propios de los corzos, como el sexo, edad, comportamiento..., y factores extrínsecos, relacionados con el medio.

Factores intrínsecos

Uno de los principales es la edad, varios investigadores han encontrado mayores prevalencias en los corcinos, animales menores de 1 año que en los adultos (Dudzinski, 1970; Király y Egri, 2004, 2007). Según estos investigadores, este hecho podría deberse a una menor eficacia de la respuesta inmune de los corcinos en comparación con los adultos, o a que se defiendan peor frente a las aproximaciones de las moscas a la hora de efectuar la larviposición por la inexperiencia (Király y Egri, 2004, 2007; Sugár *et al.*, 2004). No obstante, otros estudios realizados encontraron prevalencias más elevadas en los animales adultos (Pajares, 2016; Martínez-Calabuig, 2020) y lo relacionaron con el comportamiento de los corcinos, puesto que los adultos jóvenes (mayores de 1 año) pasan más tiempo ocultos entre la vegetación haciéndolos menos accesibles para las moscas y evitando así su larviposición (Farina y Giovannini, 2013). A

pesar de esta diversidad de opiniones, los estudios más actuales han observado que las prevalencias son mayores en individuos jóvenes que en individuos viejos y menores en adultos jóvenes, aunque las diferencias no son muy marcadas. Donde sí se vio diferencia fue en la intensidad larvaria; de modo que los más jóvenes suelen tener cargas parasitarias mucho mayores (Martínez-Calabuig *et al.*, 2022a).

Otro factor importante, aunque bastante discutido, es el sexo. En general, varios investigadores coinciden en que los machos se encuentran más parasitados que las hembras (Dudzinski, 1970; Kornaš *et al.*, 2016; Pajares, 2016; Pajares *et al.*, 2017); esto puede deberse a que el comportamiento de los machos les conlleva a estar más tiempo en áreas abiertas lo que facilita el contacto con las moscas grávidas. Datos actuales indican prevalencias algo mayores en machos que hembras, aunque no fueron significativas, por lo que el sexo no sería un factor tan influyente (Martínez-Calabuig *et al.*, 2022b).

La condición corporal juega un papel clave, ya que aquellos animales con una condición corporal excesivamente baja van a tener una probabilidad de infestación 10,7 veces superior a los que presentan una buena condición corporal, siendo esta directamente proporcional a la respuesta inmune del animal teniendo una mejor respuesta inmune para hacer mejor frente al parásito los que posean una buena condición corporal (Hoekman, 2013).

Por último, se ha visto que el color de la capa puede influir, ya que en la aproximación de los imagos durante la larviposición influye el sentido de la vista (Allan *et al.*, 1987).

Factores extrínsecos:

El clima, según estudios realizados, es un factor importante ya que los corzos de ecosistemas oceánicos tienen un mayor riesgo de infectarse (Morrondo *et al.*, 2017). Por otra parte, investigaciones recientes han manifestado que los corzos procedentes de zonas montañosas estaban más parasitados que los que habitan en zonas costeras (Pajares, 2016; Pajares *et al.*, 2017).

1.1.1.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la cefenemiosis resulta bastante complicado, sobre todo por la dificultad de realizarlo en animales silvestres en libertad.

Necropsia

El diagnóstico *postmortem* es la base diagnóstica de esta parasitosis, siendo la necropsia la técnica de referencia o “gold standard” utilizada por la mayoría de los investigadores (Čurlík *et al.*, 2004; Király y Egri, 2007; Salaba *et al.*, 2013). Esta técnica nos permite determinar además de la intensidad de infestación, las diferentes localizaciones en las que se encuentran las larvas:

cavidad nasal (cornetes), faringe,... así como las lesiones asociadas a su presencia (Martínez-Calabuig, 2020).

No obstante, cabe destacar que es una técnica que presenta varios inconvenientes, el más importante es que solo ofrece información de animales muertos y, solo durante aquellas épocas del año en las que está permitida la caza (Morrondo *et al.*, 2021).

En cuanto a la diferenciación morfológica, tanto las L1, L2 y L3, presentan XII segmentos denominándose el primero “pseudocephalon o segmento cefálico”. Este posee un endoesqueleto cefálico con unos ganchos robustos y prominentes para realizar la migración a través de los tejidos del hospedador. A su vez, estos segmentos están rodeados de espinas para impedir su expulsión (McMahon y Bunch, 1989). De forma general, las larvas de esta especie son fusiformes y con el extremo posterior oblongo.

Las L1 (Figura 1a) miden de 1 a 3 mm de longitud, están aplanadas dorsoventralmente y presentan bandas de espinas ventrales bien desarrolladas junto con un grupo de ganchos en el segmento abdominal terminal (Colwell, 2001). Los segmentos están rodeados por espinas, más evidentes en la superficie ventral y lateral y, especialmente en los “segmentos torácicos y abdominales” (Colwell y Scholl, 1995).

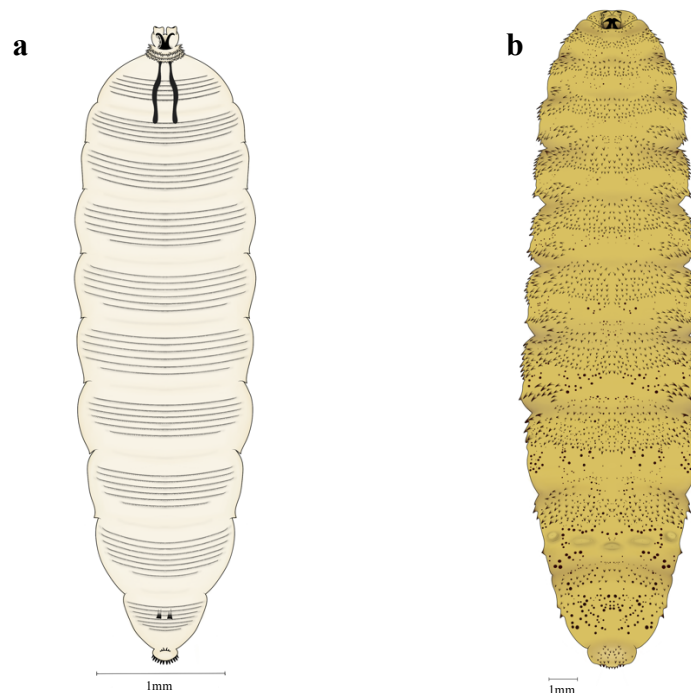


Figura 1. Larvas de *C. stimulator*: (a) vista ventral de una larva 1 en la que se puede apreciar el esqueleto cefálico en la parte anterior y la distribución de las espinas cuticulares (b) vista ventral de una larva 3 en la que se observan los ganchos bucales y la distribución de las espinas cuticulares. Fuente: elaboración propia.

Las L2 pueden alcanzar hasta los 13 mm de longitud y también están aplanadas dorsoventralmente. La distribución de sus espinas es similar a la de las L1 aunque, el segmento X carece de ellas y el XI posee un patrón muy variable ya que puede carecer de ellas o presentar hasta 4 filas. A su vez, la densidad de espinas es menor en la cara ventral y entre los segmentos III y XI poseen entre 5 y 8 hileras de espinas más regulares (Zumpt, 1965).

Las L3 (Figura 1b) varían en tamaño, pudiendo ir desde los 12 mm de largo hasta más de 25 mm (en ocasiones pueden llegar a los 30 mm). Durante esta etapa la larva va madurando, volviéndose gradualmente oscura y opaca por el acúmulo de melanina (Pajares, 2016). Los estadios maduros o casi maduros tienen espinas bien desarrolladas, generalmente con puntas negras, en las superficies dorsal y ventral. Las bases de los lóbulos antenales en el segmento cefálico están muy juntas, característica que puede usarse para distinguirlas de las larvas de *Pharyngomyia* (Zumpt, 1965).

Serodiagnóstico

A pesar de que la necropsia sea el procedimiento de referencia para el diagnóstico de esta miasis, se han desarrollado técnicas indirectas de inmunodiagnóstico que resultan de mucha utilidad para conocer en profundidad la epidemiología de la cefenemiosis (Pajares, 2016).

Los métodos de inmunodiagnóstico son fundamentales para la detección de muchas miasis, reemplazando así la necesidad de exámenes clínicos parasitológicos y *post mortem*. Además, constituyen una forma sencilla y económica de realizar el diagnóstico en animales vivos, permitiendo la planificación de tratamientos oportunos, antes de que las larvas hayan causado daños importantes, y el seguimiento de los programas de erradicación (Otranto, 2001).

Diversos autores han puesto a punto pruebas inmunológicas como el ELISA-indirecto, basados en el uso de antígenos de excreción-secreción de L2 (Arias *et al.*, 2014a) y somáticos obtenidos de L1 (González-Cuesta, 2023) que mostraron tener buena sensibilidad y especificidad. No obstante, esta técnica también presenta inconvenientes, uno de ellos son los fenómenos inmunológicos que pueden interferir en la interpretación de los resultados, tales como la inmunocompetencia del hospedador, la persistencia de los anticuerpos en animales con una inmunidad adquirida (Sarasa *et al.*, 2010) y las reacciones cruzadas entre los antígenos obtenidos entre especies de un mismo género o familia.

Diagnóstico molecular

Este método de diagnóstico lo lidera la PCR (siglas en inglés de Reacción en Cadena de la Polimerasa). Una de sus muchas particularidades es que nos permite estudiar especímenes dañados y/o incompletos que serían difíciles de identificar morfológicamente. Dicha

identificación molecular se puede lograr a través de dos enfoques diferentes: análisis de enzimas de restricción y/o comparación de secuencias con las disponibles en la base de datos, siendo más compleja de realizar la primera (Otranto y Stevens, 2002).

Muchos de los oéstridos pueden identificarse mediante técnicas de secuenciación molecular y, en particular, secuenciación de alto rendimiento. Esta técnica nos permite identificar la especie involucrada en la infestación. De hecho, en algunas ocasiones se ha dado el caso de que métodos tradicionales como la identificación morfológica, han sido desplazados por las técnicas moleculares (Scholl *et al.*, 2019), empleándose cada vez más en investigaciones diagnósticas y taxonómicas (Otranto y Stevens 2002). En este sentido, la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI) mitocondrial se ha utilizado en varios estudios para evaluar la especificidad del hospedador, la identificación de la especie, la filogenia y el diagnóstico de los oéstridos (Otranto y Stevens 2006; Moreno *et al.* 2015).

Diagnóstico por imagen

En el caso de *C. stimulator*, Fidalgo *et al.* (2014) llevaron a cabo un estudio sobre el empleo de la TAC (Tomografía Axial Computerizada) como método de diagnóstico de las larvas de este díptero presentes en la cavidad nasal del corzo. Se trata de un método no invasivo que detecta las L2 y L3 con mayor facilidad, no obstante, presenta problemas a la hora de visibilizar las L1.

1.1.2. Oestrus ovis

Como bien se mencionó anteriormente, *O. ovis* es la especie más ampliamente distribuida y económicamente importante que parasita la cavidad nasal, senos frontales y, en ocasiones, los senos maxilares de ovejas y cabras, domésticas y salvajes (Zumpt, 1965). Comúnmente se la conoce como gusano o mosca de la nariz de las ovejas.

1.1.2.1. Ciclo biológico

Las hembras grávidas depositan un paquete de 30-50 L1 cerca de la boca, la nariz y, en ocasiones, las órbitas del hospedador. Ante esto, los animales comienzan a sacudir la cabeza, estornudar e incluso intentar enterrar el hocico en el suelo. A mayores, suelen mostrar signos de nerviosismo mediante acciones como pisar de forma violenta el suelo e incluso salir corriendo con la cabeza gacha (Zumpt, 1965).

Posteriormente, las L1 comienzan a penetrar en la cavidad nasal y senos frontales, aunque sus localizaciones preferidas suelen ser el cornete nasal inferior, la cavidad nasal y los

cornetes etmoidales superiores. Allí se alimentarán del moco secretado por la mucosa, para poder desarrollarse y madurar hasta la fase de L3 post-alimentaria (Scholl *et al.*, 1990).

De forma natural, las L1 maduran y tiene lugar la primera muda larvaria, dando lugar a las L2. Estas migran preferentemente a los cornetes nasales superiores, la etmoturbinalia y los senos frontales. Tras la segunda muda larvaria, las L3 suelen situarse en los senos nasales, frontales, maxilares y corneales. Ahí se alimentan de sangre, mucus y mucosa del hospedador (Pérez *et al.*, 1996; Dorchies y Alzien, 1997). Una vez que las L3 maduran y alcanzan un peso mínimo, comienzan a migrar en sentido retrógrado hasta salir a través de las fosas nasales. A esta etapa se la conoce como “crawl-off”, durante la cual las L3 no se alimentan al haber hecho acopio de los nutrientes que necesitarán para la pupación y toda la vida adulta. A lo largo de este proceso podemos observar que el animal presenta descarga purulenta a través de las fosas nasales y que parece mover la cabeza, rechinar los dientes y presentar dificultad respiratoria. A menudo también puede vérselos restregando la nariz por el suelo o contra sus extremidades delanteras (Bedford, 1925). En los casos en los que las larvas se encuentran en la órbita ocular, se puede llegar a observar conjuntivitis en el animal.

Durante este recorrido va a resultar normal encontrar larvas en proceso de pupación aunque, 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 L3 es alto, estas no pueden quedarse en las cavidades nasales debido a su gran tamaño y tienen que ser expelidas (Nguyen *et al.*, 1999).

No obstante, en condiciones de climatología no favorable los primeros estadios larvarios pueden sufrir lo que se conoce como hipobiosis, haciendo que los tiempos de desarrollo de las larvas puedan durar desde 20 días a varios meses (Dorchies *et al.*, 1999; Tabouret *et al.*, 2001a). Es por esto que resulta difícil estimar una duración total exacta. No obstante, Dorchies *et al.* (1999) estimaron que duraría aproximadamente un mes para las puestas de primavera-verano y varios meses para aquellas que se hicieron en otoño-invierno.

Posteriormente, las L3 maduras caen al suelo para realizar la pupación. Perforan un canal perpendicular y se quedan inmóviles. Este proceso comienza con la esclerotización de la cutícula larvaria para formar el puparium (cutícula quitinizada y endurecida) (Jagannath *et al.*, 1989a) y depende de la estructura y la naturaleza del sustrato.

En condiciones ambientales adversas, las pupas al igual que las larvas, entran en estado de hipobiosis para permitir la supervivencia del parásito (Caracappa *et al.*, 2000). Este es inducido por factores climáticos como el fotoperíodo y la temperatura ambiental.

Tras la emergencia del imago (individuo adulto), este buscará cualquier objeto lejos del suelo para trepar y así poder estirar las alas para que no endurezcan (Teskey, 1981).

1.1.2.2. Prevalencia y distribución

Se trata de un parásito que se encuentra distribuido por todo el mundo, coincidiendo con el movimiento de cabras y ovejas (Colwell, 2001), y llegando a ser endémico en regiones cálidas y secas. Se encuentra especialmente extendido en zonas mediterráneas de Europa, África y América.

A lo largo del tiempo, se han ido demostrando su presencia por diversos países: Jagannath *et al.* (1989b) demostraron prevalencias del 48,3% en la India y Biu y Nwosu (1999) del 53,8% en Nigeria. En lo relativo a los países del Mediterráneo, Papadopoulus *et al.* (1997) encontraron prevalencias del 91% en Grecia y Dorchies *et al.* (2000) un 28,4% en Francia.

En lo relativo a la Península, sobre todo se ha reportado información sobre la situación de las ovejas del centro y sur peninsular, conociéndose menos sobre la situación de los ovinos del norte y de los caprinos en general.

A lo largo del tiempo se han ido realizando estudios sobre el grado de parasitación de los ovinos de la Península mediante la recolección de larvas durante el sacrificio, reportándose así prevalencias desde el 31,8% hasta el 80,6% (Ruiz Martínez *et al.*, 1992; García-Cuadrado y Moreno-Hernández, 1995; Lucientes, 2000; Reina *et al.*, 2000).

En la zona Norte de la Península, Gracia *et al.* (2010) hallaron prevalencias del 84,2% en ovejas y en las islas Baleares Paredes-Esquivel *et al.* (2012) informaron que un 46,03% de las ovejas fueron positivas.

Estudios realizados en cabras por Alcaide *et al.* (2005) mostraron una seroprevalencia estimada del 46,04% en la zona de Extremadura. En cuanto a las explotaciones, un 91,43% fueron positivas, y el mes con mayor tasa de infección fue julio (40%). Por otra parte, Alcaide *et al.* (2003) informaron de prevalencias en ovejas del 71% en la misma región.

Los datos más actuales muestran prevalencias del 56,3% en el Levante, con una mayor proporción en ovejas que en cabras, 61,2% y 43% respectivamente. A mayores, se observaron diferencias estacionales, siendo la prevalencia mayor en otoño para las ovejas (69,8%) y en invierno para las cabras (48,4%). Enero fue el mes con mayor tasa tanto en ovino (77,3%) como en caprino (59,6%), seguido de diciembre en ovino (71,6%) y noviembre en caprino (53,3%). Los porcentajes más bajos se registraron en marzo para ovinos (49,3%) y en junio para caprinos (34,6%) (Garrijo-Toledo *et al.*, 2023).

1.1.2.3. *Epidemiología: Factores intrínsecos y extrínsecos*

Al igual que se comentaba con *C. stimulator*, todas estas prevalencias se ven influidas por diversos factores intrínsecos propios del animal y factores extrínsecos relacionados con el medio.

Factores intrínsecos

La especie es un factor intrínseco interesante ya que, en cuanto a preferencias de hospedadores, si comparamos cargas y tasas de infestación de la especie entre el ganado caprino y ovino, parece haber diferencias significativas, estando las ovejas más parasitadas que las cabras (Alcaide *et al.*, 2003 y 2005; Papadopoulos *et al.*, 2006). Esto puede deberse a que las cabras puedan tener niveles más bajos de infestación que las ovejas por sus respuestas conductuales de evitación; estas parecen ser más sensibles a la irritación de las moscas y pueden evitar más eficazmente la puesta de larvas por parte de las moscas adultas (Papadopoulos *et al.*, 2006). Otro factor puede ser que las larvas de *O. ovis* estén menos adaptadas a las cabras (Dorchies *et al.*, 1998).

La edad, es un factor muy importante puesto que los últimos datos parecen indicar que la prevalencia y la carga parasitaria dependen de la edad del hospedador. Cuanto más joven es el animal, más parasitado, posiblemente debido al menor desarrollo del sistema inmunológico y de las estrategias defensivas (Caracappa, 2000).

Por último, se comprobó la influencia del color de la nariz, no encontrándose que fuera un predictor significativo de infección (Papadopoulos *et al.*, 2010), en contraste con sugerencias anteriores de que los animales de nariz oscura tenían más probabilidades de estar infectados (Murguía *et al.*, 2000).

Factores extrínsecos:

Principalmente nos encontramos con la temperatura y la humedad relativa, pues influyen y sincronizan los ritmos de desarrollo y reproducción de *O. ovis*. Investigadores como Cepeda-Palacios *et al.* (2011) afirmaron como el más importante la temperatura, este factor regula el ciclo vital del parásito en su totalidad, desde el desarrollo intrapupario hasta la vida adulta. Otros investigadores como Scala *et al.* (2002) comprobaron, en ovejas de Italia, que existía una correlación positiva entre humedad relativa y número de L1 y entre la temperatura media y el número de L2. A su vez, también demostraron que la correlación negativa entre el aumento de temperatura y la disminución del número de L1.

También se ha comprobado la influencia del clima en el ciclo de *O. ovis*. En zonas de clima Atlántico se ha visto que hay tres generaciones de moscas (marzo-abril, mayo-junio y septiembre-octubre), en las de clima continental se ha visto que solo hay una generación de adultos durante el periodo estival, y en las del mediterráneo se ha visto que puede haber moscas durante todo el año (Yilma *et al.*, 1991). A mayores, en las zonas de clima mediterráneo no hay un verdadero periodo de hipobiosis y el ciclo se desarrolla con más rapidez, llegando a haber un desarrollo interrumpido con existencia de varias generaciones conviviendo al mismo tiempo (Pangui *et al.*, 1988; Tibayrenc *et al.*, 1999).

Otro factor extrínseco que influye en el desarrollo del ciclo exógeno es la altitud a la que están situados los pastos. Ruiz-Martínez *et al.* (1992) destacaron que la presencia de moscas adultas es poco frecuente en altitudes superiores a 1500 metros. Lo mismo recalcaron Alcaide *et al.* (2005) al ver que suroeste de España las cabras procedentes de explotaciones situadas a más de 650 metros estaban menos parasitadas que las de menor altitud.

1.1.2.4. Diagnóstico

El diagnóstico de *O. ovis* se realiza normalmente en base al cuadro clínico que presentan los animales y el hallazgo de los diferentes estadios larvarios en la necropsia.

Necropsia

En el caso de la detección de la oestrosis en ungulados domésticos, la mayoría se realizan durante la inspección veterinaria en los mataderos. Si bien es cierto, que la obtención de las larvas de forma directa podría intentarse en el animal vivo mediante rinoscopia tradicional o mediante fibra óptica (Yilma y Dorchies, 1991), el diagnóstico directo, basado en la visualización de las larvas en las distintas cavidades, se realiza habitualmente sobre el animal muerto.

En cuanto a la morfología, las L1 (Figura 2a) presentan una morfología fusiforme, están aplanadas dorsoventralmente (Colwell y Scholl, 1995) y miden entre 1 y 3 mm de largo. El cefaloesqueleto es relativamente grande y está provisto de escleritos fuertemente curvados. Poseen espinas desarrolladas en las superficies ventral y lateral. Mientras el lado dorsal presenta sólo una espinulación débil que consiste en una fila completa de denticulos en el tercer segmento y uno ampliamente interrumpido en cada uno de los dos segmentos siguientes, en el lado ventral los segmentos en sus márgenes anteriores muestran de 2-3 filas completas de espinas y varias estructuras filiformes dispuestas lateralmente. En el extremo posterior hay entre 22 y 25 ganchos terminales dispuestos en dos festones.

Las L2 son blanquecinas y de tamaño variable, pudiendo llegar a medir de 1,5 a 12 mm de longitud. Sus espinas y ganchos bucales ya se encuentran bien desarrollados. Las placas

respiratorias son visibles en los segmentos terminales; presentan forma circular con un botón peritremal o ecdisial en el centro, múltiples espiráculos y un canal central que separa las dos placas (Zumpt, 1965).

Las L3 (Figura 2b) son robustas y pueden llegar a medir hasta más de 20 mm de longitud. Los ganchos bucales y las bandas de espinas presentes en la superficie ventral de los segmentos torácicos y abdominales están muy queratinizadas. Dorsalmente, las bandas quitinosas son anchas en todos los segmentos que están desprovistos de espículas, a excepción de unas pocas en el segundo segmento. Ventralmente presentan numerosas y potentes espículas dispuestas en varias filas (Zumpt, 1965). Las placas espiraculares de las L3 son notorias en el segmento abdominal terminal y completamente negras en los especímenes maduros (Colwell, 2001).

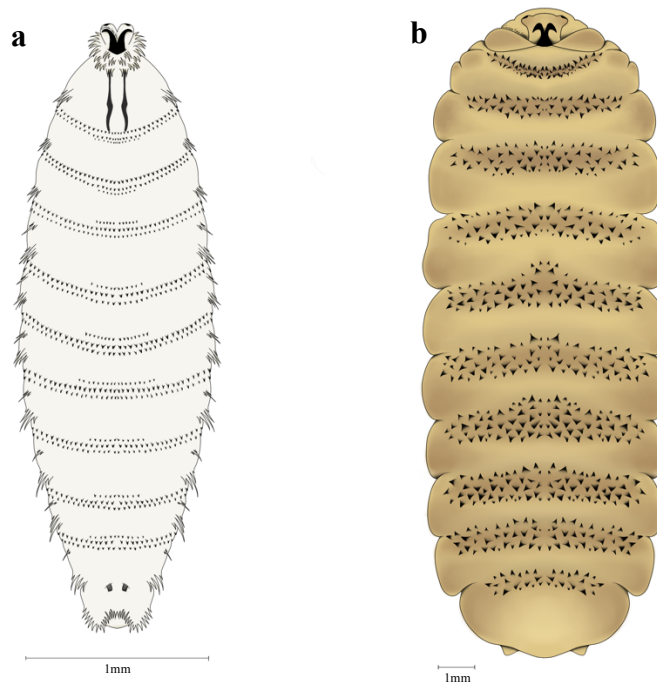


Figura 2. Larvas de *Oestrus ovis*: (a) vista ventral de una larva 1 en la que se aprecia el esqueleto cefálico y el patrón de espinulación (b) vista ventral de una larva 3 en la que se observan los ganchos bucales en el extremo anterior y la distribución característica de las espinas cuticulares. Fuente: elaboración propia

A diferencia de *O. ovis*, las L3 de *O. caucasicus* tienen fuertes espinas dorsales. No obstante, Pérez *et al.*, (2006) han destacado la enorme similitud morfológica entre las larvas de estas dos especies, pudiendo llegar a dificultar su diferenciación. A mayores, Pérez *et al.* (1996) informaron de la parasitación de cabras montesas del Parque Nacional de Sierra Nevada por *O. caucasicus* basándose en el color de las venas de las alas de los imagos.

Serodiagnóstico

En cuanto a la oestrosis ovina se han desarrollado distintas técnicas inmunológicas basadas en la utilización de extractos obtenidos de los distintos estadios larvarios, como la intradermorreacción (Ichmann y Hiepe, 1985), hemoaglutinación indirecta (Bautista *et al.*, 1988) y sobre todo técnicas inmunoenzimáticas como el ELISA-indirecto. Para el inmunodiagnóstico de las infecciones por *O. ovis* mediante ELISAI, los mejores resultados se han obtenido, en general, con el antígeno de excreción-secreción (ES), en contraposición al antígeno somático que el cual demostró un peor desempeño (Sánchez-Andrade *et al.*, 2005, 2010; Pajares, 2009). Además, se comprobó que la especificidad de esta técnica mejora cuando se utiliza como antígeno productos metabólicos de L2 en el verano y de L1 en el invierno (Alcaide *et al.* 2005).

En investigaciones previas, Sánchez-Andrade *et al.* (2005) estudiaron la seroprevalencia del parásito en ovinos y caprinos, y concluyeron que con el Ag de ES obtenido de L2 de *O. ovis* era posible establecer una correlación directa entre la respuesta inmunitaria humoral, inmunoglobulinas G (IgG), y la infestación por larvas de este parásito, convirtiéndolo en un método recomendado para la realización de encuestas epidemiológicas al permitir establecer la distribución de esta miasis.

Sin embargo, Arias *et al.* (2014b) concluyeron que se necesita de avances inmunológicos y metodológicos adicionales ya que el número de falsos positivos y negativos todavía representan una parte no despreciable de los resultados de las pruebas ELISA.

Diagnóstico molecular

Al igual que se describía para *C. stimulator*, la utilización de marcadores moleculares constituye una herramienta de mucha utilidad en el estudio de diversas enfermedades parasitarias de importancia médica y veterinaria 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 en la identificación de dípteros cuando las especies objeto de estudio están dañadas o es complicada su clasificación morfológica (Wells *et al.*, 2001), esta herramienta facilita la identificación taxonómica en cualquier etapa del insecto. No obstante, cabe destacar que se trata de una proceso complejo y todavía bastante cara.

En el caso de *O. ovis*, Moreno *et al.* (2015) han llevado a cabo la caracterización molecular usando las secuencias COXI y 28S (rADN) de *Oestrus* spp., tomando las muestras de animales tanto salvajes como domésticos.

2. Objetivos

Teniendo en cuenta los antecedentes presentados en el apartado anterior, planteamos un estudio orientado a conseguir los siguientes objetivos:

1. Identificar los agentes causantes de las miasis nasales de los corzos en España.
2. Determinar la distribución y epidemiología de las distintas especies de Oestrinae causantes de miasis nasales en el corzo.
3. Estudiar mediante ELISA indirecto la seroprevalencia y las reacciones cruzadas entre los antígenos larvarios obtenidos de los Oestrinae identificados en los corzos.

3. Materiales y métodos

3.1. Animales muestreados

Para la realización de este estudio se analizaron los sueros y la cavidad nasal de 181 corzos abatidos, en su mayoría, en jornadas de caza o muertos de forma accidental a lo largo de toda la geografía española entre 2022 y 2024.

La distribución de los animales al tener en cuenta distintos factores, como la región de procedencia, edad, sexo, estación y año, se muestran en la tabla 2.

Todas las muestras fueron cedidas por la Asociación del Corzo Español (ACE), Centro de recuperación de fauna silvestre del Veral de Lugo (Xunta de Galicia), Junta de Castilla y León, Generalitat de Catalunya y por cazadores particulares.

Las muestras fueron enviadas en cajas isotérmicas con acumuladores de frío y en el interior de bolsas de plástico, cerradas herméticamente, en las que se incluían la cabeza y parte del cuello del animal, y una ficha con sus datos identificativos. Además, los corzos procedentes de cacerías venían acompañados de la correspondiente documentación (titular del coto de caza, cazador y modalidad de caza).

Una vez en la Facultad de Veterinaria de Lugo, las cabezas se conservaron a 4°C o se congelaron a -20°C hasta su posterior procesado.

Tabla 2. Distribución de las muestras teniendo en cuenta distintos factores.

Factor	Categoría	Número
Año	2022	6
	2023	146
	2024	29
Región	Galicia	25
	Asturias	1
	Cantabria	22
	Navarra	3
	Aragón	5
	Cataluña	8
	Castilla y León	79
	La Rioja	7
	Comunidad de Madrid	1
	Castilla La Mancha	27
	Comunidad Valenciana	3
Sexo	Machos	73
	Hembras	108
Edad*	Jóvenes (≤ 23 meses)	62
	Adultos (24-71 meses)	93
	Viejos (≥ 72 meses)	25
Estación	Primavera	46
	Verano	30
	Otoño	30
	Invierno	75
Total		181

*Falta la edad de un animal

3.2. Recolección de las larvas y sangre

Para visualizar la presencia de larvas y realizar su posterior recolección, se procede a la apertura de la cabeza siguiendo el siguiente protocolo:

- 1. Inspección externa:** en primer lugar, se realiza una inspección visual del estado de la piel del animal en búsqueda de lesiones y/o parásitos externos. También se presta atención al estado de los ollares, pues en ciertas ocasiones se podrían observar larvas de diferentes estadios durante su entrada o salida del hospedador (Figura 3).



Figura 3: L3 de *C. stimulator* saliendo a través del orificio nasal izquierdo de un corzo. Fuente: propia.

2. **Extracción de sangre:** las muestras de sangre se extrajeron del seno venoso retro orbital con una jeringa de 10 ml o, si se realiza una necropsia completa, de la cavidad torácica del animal. Dicha sangre se pasa a tubos con acelerador de la coagulación que se centrifugan durante 5 minutos a 5000 rpm para obtener el suero que se congela a -20°C .
3. **Inspección interna:** este proceso comienza con el posicionamiento del animal sobre las cuernas en caso de los machos o sobre el hueso frontal en el caso de las hembras. Posteriormente, se procede al desollado de la cabeza desde la línea media de la mandíbula, esto es importante puesto que facilita el posterior manejo de la cabeza. A continuación, se retira la mandíbula inferior de la cabeza y se separa la piel de la parte dorsal de la cabeza, quedando el hueso al descubierto. Además, para una mejor visibilidad y comodidad se retira la lengua. Posteriormente, se procede a la apertura longitudinal de la tráquea con unas tijeras, en este punto pueden apreciarse en ocasiones larvas de *C. stimulator*. Finalmente, se abre longitudinalmente la laringe, dejando expuesta la glotis (Figura 4), la faringe y los sacos retrofaringeos.



Figura 4: L3 de *C. stimulator* en distintas fases de desarrollo en la glotis de un corzo.

Fuente: propia.

A continuación, se procede a la realización de dos cortes sagitales con las tijeras a ambos lados del cartílago del tabique nasal (Figura 5), lo que nos permite observar la cavidad nasal completa y de esta forma visualizar más fácilmente las larvas allí presentes (Figura 6).



Figura 5: Ilustración del proceso de apertura de una cabeza de corzo. Los cortes se realizan de forma simétrica a ambos lados de la cabeza. Fuente: Elaboración propia.

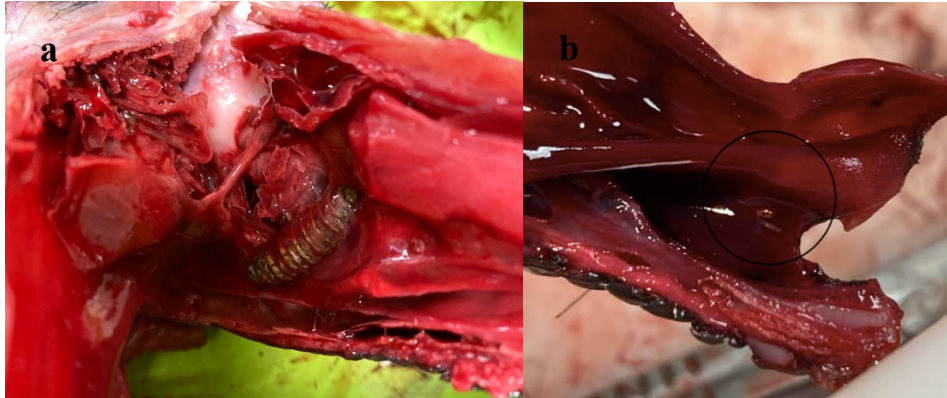


Figura 6. (a) Larva 3 en la parte posterior de la cavidad nasal (b) Larvas 1 en la parte anterior de la cavidad nasal.

Fuente: propia.

En ocasiones, nos encontramos con L3 de temporadas anteriores que se han quedado atrapadas en los cornetes del animal y que se encuentran en estado de descomposición.

Todas las larvas observadas se recogen con unas pinzas y se colocan en una placa de Petri con PBS (Figura 7). En primer lugar, se extraen todas las L2 y L3 que, por su gran tamaño, resultan fáciles de detectar y posteriormente se procede a realizar la recolección de las L1 que, por su pequeño tamaño son mucho más difíciles de observar.

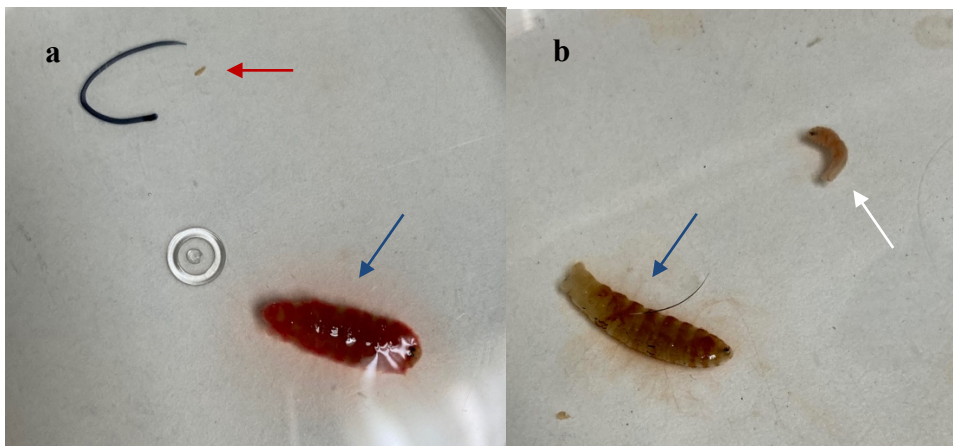


Figura 7. (a) Diferencia de tamaño entre una larva 1 (flecha roja) y L3 (flecha azul) de *C. stimulator* y (b) Larva 3 (flecha azul) y L2 (flecha blanca) de *C. stimulator* extraídas de la cavidad nasal de un corzo. Fuente: propia.

Para maximizar la recogida de L1 se realizan dos lavados de la cavidad nasal sobre una malla de 150 micrómetros que posteriormente se observa en el estereomicroscopio a 8 aumentos en busca de las L1 retenidas (Figura 8).

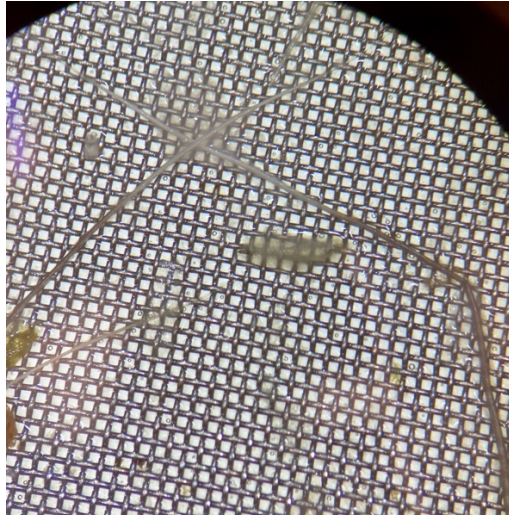


Figura 8: L1 de *C. stimulator* sobre una malla de 150 µm vista a 8 aumentos en el estereomicroscopio. Fuente: propia.

3.3. Diferenciación morfológica

Una vez recogidas todas las larvas se procede a su identificación en base a la morfología descrita por Zumpt (1965) y recopilada por Martínez-Calabuig *et al.*, (2024).

Las L1 son más complicadas de diferenciar por su pequeño tamaño y su mayor similitud entre ellas. No obstante, la diferenciación se realiza en base a la forma del cefaloesqueleto y al patrón de espinas, tal como se aprecia en la Figuras 9a1 y 9b1.

La diferenciación morfológica de las L2 o L3 resulta relativamente fácil y se realiza en base a la forma del extremo posterior, sobre todo de los peritremas (placas respiratorias), disposición de los lóbulos antenales, así como del patrón de distribución de las espinas cuticulares. En el caso de *C. stimulator* dichas placas se disponen en forma de C invertida mientras que las de *O. ovis* poseen forma de D invertida (Figura 9a2 y b2). En cuanto a los lóbulos antenales también presentan diferencias: en *O. ovis* se aprecia una mayor separación en la base, mientras que *C. stimulator* casi carece de separación adoptando la forma de V (Figuras 9a3 y b3).

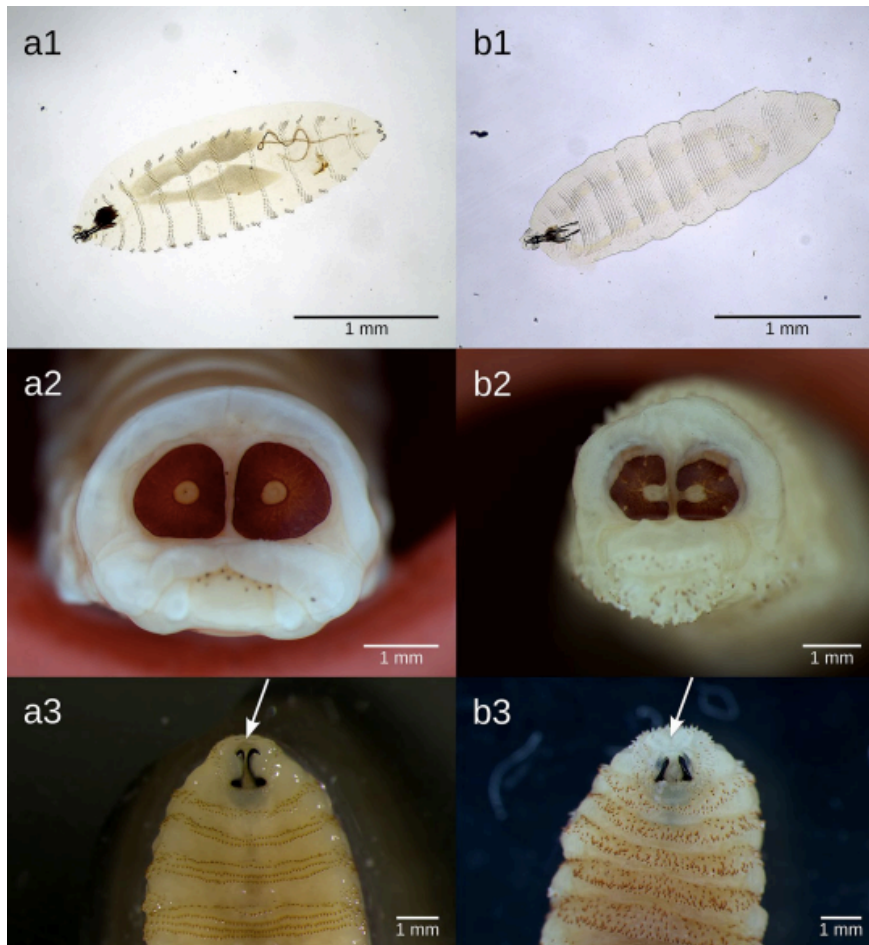


Figura 9: (a1) L1 de *O. ovis*, vista ventral, donde se puede apreciar el cefaloesqueleto y el patrón de espinulación con dos filas completas de espinas en los segmentos I a IV y otra fila incompleta de los segmentos V al XI. (a2) Parte posterior de una L3 de *O. ovis* donde se aprecian los peritremas con las placas respiratorias en forma de D invertida. (a3) Parte anterior de una L3 de *O. ovis* donde se aprecian los lóbulos antenales separados en la base (blanco flecha) y el patrón de espinulación típica. (b1) vista ventral de una L1 de *C. stimulator* donde se observa el cefaloesqueleto y el patrón de espinulación con numerosas filas de dentículos de los segmentos II al XI. (b2) extremo posterior de una L3 de *C. stimulator* donde se aprecian los peritremas con sus placas en forma de C invertida. (b3) extremo anterior de una L3 de *C. stimulator* donde se observan los lóbulos antenales con forma de V (flecha blanca). Fuente: Martínez-Calabuig *et al.* (2024).

3.4. Obtención de los antígenos larvarios

3.4.1. Preparación de antígeno bruto somático

En estudios previos como el llevado a cabo por González Cuesta (2023) se obtuvieron mejores resultados con antígenos somáticos obtenidos a partir de L1 y L2 de *C. stimulator* frente a los de excreción-secreción por lo que decidimos emplear en ambas especies este tipo de antígenos. Para ello se emplea el siguiente procedimiento:

En primer lugar, se procede al lavado de las larvas con PBS (pH 7,4) durante varias veces y se trituran en 5 ml de PBS a razón de 250 L1 y 10 L2 con un homogeneizador de tejidos (Polytron®). Posteriormente, se centrifuga el homogenizado a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se colecta el sobrenadante, se pasa a través de un filtro de 0,22 micrómetros y finalmente, se almacena a -30°C.

3.4.2. Determinación de la concentración proteica

La concentración proteica de cada antígeno se calcula mediante la técnica del ácido bicinonínico (Pierce BCA Protein Assay Reagent, ThermoScientific). Dicha técnica se basa en la reacción de las proteínas con el cobre, que una vez reducido, se combina con el ácido bicinonínico dando lugar a un color púrpura. Tras la lectura de las absorbancias a 540 nm, se elabora la recta de calibración empleando concentraciones crecientes de la seroalbúmina bovina. Finalmente, cada antígeno se liofiliza, se ajusta su concentración con agua bidestilada a 100 µg/ml y se almacena a -30°C hasta su posterior empleo en el ELISA.

3.5. ELISA indirecto para la detección de anticuerpos frente a *C. stimulator* y *O. ovis*

Tras varias pruebas para poner a punto las técnicas se empleó el siguiente protocolo:

- 1) **Antigenado de la placa:** se emplearon placas de microtitulación de poliestireno y fondo plano (Nunc Maxisorb®), con las que se consigue maximizar la unión de los antígenos. Cada placa se tapizó con 100 µl/pocillo de una dilución 1:100 para los antígenos de *C. stimulator* y una dilución 1:1500 y 1:5000 para el AgL1 y AgL2, respectivamente, con una solución tampón de PBS. En todas las placas se dejó sin antigenar la columna 12 que actuó como “blanco”. Se incubaron a 37°C durante 30 minutos y transcurrido este tiempo se vaciaron los pocillos y se guardaron las placas a 4°C hasta la mañana siguiente.
- 2) **Bloqueo de los sitios de unión inespecíficos:** con el fin de evitar que el inmunoconjugado se una de manera inespecífica a las placas, estas se bloquearon con 200 µl de una solución de bloqueo compuesta por 60 ml de PBS-Tween más 1,2 g de leche descremada en polvo. Seguidamente, se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se vació el contenido de los pocillos y se lavaron una sola vez con 200 µl de PBS-Tween, y, seguidamente tres veces con 100 µl de la misma solución.
- 3) **Adición de los sueros:** en cada placa se añadieron un testigo positivo y negativo tanto para *C. stimulator* como *O. ovis*, constituidos por una mezcla de varios sueros de animales que habían sido positivos o negativos a los parásitos estudiados. Tanto los sueros problema como los testigos se emplearon a una dilución 1:10 en PBS-Tween. La placa se

incubó durante una hora a 37°C; y posteriormente se vació el contenido de los pocillos y se lavaron de la misma manera que en el paso anterior.

- 4) **Adición del inmunoc conjugado:** se empleó proteína A/G marcada con peroxidasa a la dilución 1:10.000 en un volumen de 50 µl/pocillo, y, tras esto se volvieron a incubar las placas durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se lavaron una sola vez con 200 µl de PBS-Tween, dos veces con 100 µl de PBS-Tween, y finalmente, dos veces con 100 µl de PBS para eliminar cualquier rastro del detergente.
- 5) **Adición del substrato colorimétrico:** en todas las placas se añadió ortofenilendiamina (Sigma FAST ® OPD tablets) como substrato de la peroxidasa siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se añadieron 100 µl de la disolución a cada pocillo y se dejó reposar en un lugar sin luz durante 5-20 minutos.
- 6) **Detenimiento y lectura de la reacción:** para detener la reacción se añaden 100 µl por pocillo de ácido sulfúrico 3N. Se deja reposar durante 2-5 minutos a oscuras y posteriormente se procede a la lectura de las absorbancias en un espectrofotómetro (680XR; Bio rad) empleando filtros de 450 y 490 nm.

3.6. Normalización de los valores de absorbancia

Tras la lectura de los resultados en el espectrofotómetro, es necesario estandarizar los resultados obtenidos en las diferentes placas para minimizar las posibles variaciones. La normalización debe realizarse a dos niveles: intra-placa e inter-placa, y, para ello se procedió de la siguiente forma:

- **Normalización intra-placa:** para ello se restan los valores de absorbancia de la columna que actúa como blanco al resto de los pocillos de la placa. Si bien es cierto, el propio espectrofotómetro realiza esta operación y proporciona ambos resultados: en crudo, sin restar, y con ellos ya restados. Estos últimos son los que se utilizan.
- **Normalización inter-placa:** esta se lleva a cabo tras analizar todos los sueros y sirve para ajustar las posibles variaciones que se hayan podido dar a lo largo del ensayo por diversos factores como la temperatura, la propia preparación de las muestras, la calibración de los equipos... En primer lugar, se calcula por cada placa la media del testigo positivo y negativo para cada antígeno, también conocido como valor de placa. En segundo lugar, se calcula el valor medio, teniendo en cuenta todas las placas, para cada antígeno por separado, también conocido como valor medio. Seguidamente, se divide el valor de placa entre el valor medio, obteniendo así el factor de normalización para cada placa, también conocido como factor normalización placa. Finalmente, se procede a dividir el valor de

cada pocillo por su correspondiente factor de normalización de placa.

Este proceso se realiza de forma independiente para cada antígeno parasitario, es decir, tanto para los obtenidos de L1 como de L2.

3.7. Determinación del punto de corte

Para la determinación del punto de corte, valor de absorbancia a partir del cual un suero se considera positivo, se emplearon los valores de todos los animales incluidos en el estudio. Mediante el análisis de la curva ROC (Receiver Operating Characteristic). Estas curvas se realizan para cada antígeno y comparan las densidades ópticas de los sueros de animales positivos y negativos a larvas que actúa como prueba de referencia.

En este caso, el punto de corte para el ELISA con el Ag de L1 de *C. stimulator* se estableció en 0,468, lo que nos ofrece una sensibilidad del 83,1% y una especificidad del 85,5%. Por otra parte, para el ELISA con el antígeno obtenido de las L2 de este mismo parásito, el punto de corte fue de 1,297; dándonos una sensibilidad del 84,3% y una especificidad del 85,5%.

El punto de corte para el ELISA de *O. ovis* con Ag de L1 fue del 0,809, lo que nos indica una sensibilidad del 80,0% y nos asegura una especificidad del 87,3%. En cuanto al ELISA con antígeno de L2, su punto de corte fue de 1,295, asegurándonos una sensibilidad del 80,0% y una especificidad del 85,7%.

3.8. Validación de las pruebas

Para la validación de las pruebas desarrolladas se han calculado, además, los siguientes parámetros, tomando como referencia los datos obtenidos en la necropsia:

- Sensibilidad= $(a/a+c) \times 100$
- Especificidad= $(d/b+d) \times 100$
- Valor predictivo positivo= $(a/a+b) \times 100$
- Valor predictivo negativo= $(d/c+d) \times 100$

Tabla 3: Tabla de contingencia para la validación del ELISAi tomando como referencia los resultados obtenidos en la necropsia.

ELISAi	Necropsia	
	Infestado	No infestado
Seropositivo	Verdaderos + (a)	Falsos + (b)
Seronegativo	Falsos – (c)	Verdaderos – (d)

3.9. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos en este estudio se procesaron con ayuda de la hoja de cálculo Microsoft Excel 2016 y su análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico R versión 3.6.3.

En el apartado de estadística descriptiva se empleó la media aritmética como indicador de tendencia y la desviación estándar como medida de dispersión.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa estadístico R (R v.4.4.0; R Development Core Team, 2017). Se tomó el valor de 0,05 como el nivel de significación para todas las pruebas realizadas.

El nivel de correlación entre las distintas técnicas de diagnóstico se llevó a cabo con la prueba de correlación de McNemar. El nivel de concordancia entre la necropsia y las pruebas ELISA se calculó mediante el índice Kappa (K) y los resultados obtenidos se interpretaron siguiendo la siguiente escala: 0-0,2 correlación pobre; 0,21-0,4 correlación débil 0,41-0,60 correlación moderada 0,61-0,80 correlación buena 0,81-1 correlación muy buena (Altman 1991, según Landis y Koch, 1977)

La relación entre la prevalencia y los factores de riesgo analizados se estudió mediante un análisis de regresión logística utilizando la función glm() del paquete R. Todos los factores se añadieron en el principio del análisis y se fueron eliminando uno a uno mediante un método condicional por pasos hacia atrás según el valor AIC (“Akaike Information Criterion”) utilizando la función step() del paquete estadístico R, hasta llegar al mejor modelo.

4. Resultados y discusión

4.1. Identificación de los agentes causantes de miasis nasofaríngeas del corzo

En este estudio se han identificado, mediante análisis morfológico de las larvas recogidas en la necropsia, dos géneros distintos de Oestrinae en la cavidad nasal del corzo: *Cephenemyia* y *Oestrus*. El análisis morfométrico de los distintos estadios larvarios permitió la identificación de las especies, *C. stimulator*, también conocida como “mosca de la nariz del corzo”, y *O. ovis*, denominado vulgarmente en nuestro país como “mosca del carnero” o “gusano nasal del cordero” en referencia a sus hospedadores más habituales. En un estudio, no incluido en este trabajo, se confirmó, mediante PCR y posterior secuenciación, la identidad de dichas especies.

A partir de los resultados obtenidos en la necropsia se observa una gran disparidad entre

el número de corzos positivos a cada especie. Las larvas de *C. stimulator* estuvieron presentes en el 45,3% de los corzos analizados, mientras que las de *O. ovis* sólo se detectaron en 5 animales, lo que supone una prevalencia del 2,7%. De igual modo, el número medio de larvas por animal parasitado fue mucho más elevado para *C. stimulator* ($22,2 \pm 48,99$) que para *O. ovis* ($0,06 \pm 0,46$). Hay que destacar que no se encontraron infecciones mixtas, es decir, ningún animal estaba parasitado por ambos oestrinos.

Estos resultados ponen de manifiesto que, tras la primera cita de una infección por *O. ovis* en un corzo abatido en la provincia de Guadalajara en 2022 (Martínez-Calabuig *et al.*, 2023), esta infección sigue expandiéndose, aunque de forma moderada, por el centro de España. De acuerdo con Alcaide *et al.* (2003; 2005) la oestrosis es una miasis muy frecuente en los pequeños rumiantes domésticos de nuestro país. Además, hay que destacar que en esta zona tanto la densidad de corzos como los censos de pequeños rumiantes domésticos son bastante elevados, creando condiciones de simpatria entre los ungulados silvestres y domésticos que resultan óptimas para la aparición de infecciones cruzadas. No debe olvidarse que en esta zona ya ocurrió recientemente la transmisión interespecífica de otro oéstrido, *Hypoderma actaeon*, entre el ciervo y el corzo (Panadero *et al.*, 2016). Esto hace que a esta zona se la deba considerar epidemiológicamente como un punto caliente o “hotspot” para la transmisión cruzada de diferentes parásitos entre ungulados domésticos y silvestres.

Respecto a los valores de prevalencia total, Martínez-Calabuig *et al.* (2024) en un estudio llevado a cabo en el centro peninsular también hallaron una mayor prevalencia de *C. stimulator* (14,1%) que de *O. ovis* (9,8%), si bien los valores para la primera resultaron bastante inferiores a los obtenidos en este estudio mientras que, por el contrario, los de *O. ovis* fueron superiores.

En relación a *C. stimulator*, nuestros valores se asemejan a los obtenidos en investigaciones previas por Pajares (2016) (31,6%) y Martínez-Calabuig (2020) en el Norte de España (43,2%; $16,9 \pm 22,47$), aunque resultan bastante inferiores a los obtenidos en un estudio similar realizado por González Cuesta (2023) (65,7%; $44,6 \pm 65,7$).

4.2. Prevalencia e intensidad media de infestación según diversos factores

Los datos obtenidos en la necropsia nos han permitido establecer la prevalencia e intensidad de infestación para *O. ovis* y *C. stimulator*, teniendo en cuenta distintos factores (Tabla 4).

Tabla 4: Prevalencia e intensidad media±DS de infestación por *C. stimulator* y *O. ovis* en corzos en función de diversos factores.

Factor	Categoría	Nº	<i>Oestrus ovis</i>		<i>Cephenemyia stimulator</i>	
			Positivos (%)	Media±DS	Positivos (%)	Media±SD
Región	Galicia	25	0 (0,0)	-	24 (96,0)	86,7±96,30
	Asturias	1	0 (0,0)	-	0 (0,0)	-
	Cantabria	22	0 (0,0)	-	17 (77,3)	30,1±35,31
	Navarra	3	0 (0,0)	-	1 (33,4)	10,0±17,32
	Aragón	5	0 (0,0)	-	2 (40,0)	0,6±0,89
	Cataluña	8	0 (0,0)	-	4 (50,0)	4,9±7,08
	Castilla y León	79	4 (5,1)	0,1±0,69	28 (35,4)	11,7±23,95
	La Rioja	7	0 (0,0)	-	6 (85,7)	27,8±20,54
	Comunidad de Madrid	1	0 (0,0)	-	0 (0,0)	-
	Castilla La Mancha	27	1 (3,7)	0,04±0,19	1 (3,7)	0,04±0,19
Comunidad Valenciana	3	0 (0,0)	-	0 (0,0)	-	
Sexo	Machos	73	0 (0,0)	-	34 (46,8)	21,5±50,06
	Hembras	108	5 (4,6)	0,1±0,60	48 (44,5)	22,6±48,49
Edad	Jóvenes	62	1 (1,6)	0,03±0,25	32 (51,6)	35,3±70,99
	Adultos	93	4 (4,3)	0,1±0,61	40 (43,0)	14,8±29,93
	Viejos	25	0 (0,0)	-	11 (6,1)	18,0±32,70
Estación	Primavera	46	0 (0,0)	-	18 (42,8)	17,8±41,12
	Verano	30	0 (0,0)	-	16 (53,3)	14,8±24,50
	Otoño	30	0 (0,0)	-	19 (63,3)	52,1±91,87
	Invierno	75	5 (6,7)	0,1±0,72	30 (40,0)	15,8±28,83
Total		181	5 (2,7)	0,06±0,46	82 (45,3)	22,2±48,99

Al analizar la **distribución geográfica** de ambas miasis se aprecia que la distribución de *C. stimulator* en nuestro país es mucho más amplia que la de *O. ovis*. Mientras que *C. stimulator* está presente en casi todo el norte peninsular y la zona Central, la presencia de *O. ovis* se limita a puntos muy concretos de las regiones centrales de Castilla La Mancha y Castilla y León. La regresión logística ha señalado la región de procedencia como un factor de riesgo para la infestación por *Cephenemyia*, así en Galicia la prevalencia es significativamente superior a la de

Navarra, Aragón, Cataluña y Castilla y León (Tabla 5). Las diferencias existentes entre las distintas regiones indican que la distribución de esta miasis no es homogénea a lo largo de todo el territorio y podría explicar muchas de las diferencias encontradas en los distintos estudios realizados en nuestro país.

Tabla 5: Resultados de la regresión logística al considerar las larvas totales

Factor	Probabilidad (P)	OR	IC 95%
Galicia	-	-	-
Navarra	0,015	0,021	0,0004-0,3731
Aragón	0,009	0,107	0,0179-0,5495
Cataluña	0,010	0,028	0,0010-0,3193
Castilla y León	<0,001	0,025	0,0014-0,1304

Respecto al **sexo** de los animales, para ambos parásitos se hallaron mayores prevalencias en hembras que en machos. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$). Estos resultados difieren con lo hallado por Pajares (2016) y Martínez-Calabuig (2020), quienes detectaron mayores prevalencias para *C. stimulator* en machos que en hembras, si bien, las diferencias halladas por estos autores tampoco resultaron significativas.

En cuanto a la **edad**, en el caso de *C. stimulator* se observaron mayores prevalencias en los animales jóvenes con respecto a los adultos y los viejos, no obstante, dichas diferencias no resultaron significativas. De acuerdo con Dudzinski (1970) y Király y Egri (2007), las diferencias respecto a la edad podrían achacarse a una menor respuesta inmunitaria por parte de los animales jóvenes que propicia la supervivencia larvaria, o a una menor capacidad defensiva del hospedador frente a los intentos de larviposición de las moscas.

Al considerar la **estación del año**, la prevalencia para *C. stimulator* se mantuvo relativamente elevada durante todo el año, oscilando entre un 40% en invierno y un 63,3% en otoño. En el caso de *O. ovis*, hay que destacar que todos los animales infestados ($n=5$) se detectaron en invierno. El análisis de regresión logística no evidenció diferencias significativas al considerar la estación del año para ninguno de los parásitos.

Nuestros resultados contrastan con los de Pajares (2016) y Martínez-Calabuig (2020), quienes hallaron las mayores prevalencias en los meses de primavera y verano, achacándolo a un menor número de corzos analizados y a un menor tamaño de las larvas durante los meses de otoño e invierno lo que facilita que puedan pasar desapercibidas a simple vista.

Debemos resaltar que, debido al escaso número de animales infestados por *O. ovis* ($n=5$) no se apreciaron diferencias significativas para ninguno de los factores estudiados.

En la Tabla 6 se muestran las prevalencias de los distintos estadios larvarios en función de la estación del año. En ella vemos que las larvas de *O. ovis* solo se apreciaron en invierno, estando presentes todos los estadios larvarios. Por el contrario, las larvas de *C. stimulator* están presentes en todas las estaciones del año, aunque con un claro predominio en otoño e invierno, coincidiendo con las primeras fases del ciclo del parásito en el hospedador.

Tabla 6: Porcentaje de los distintos estadios larvarios de *C. stimulator* y *O. ovis* en función de la estación meteorológica.

Estación	% L1		% L2		% L3	
	<i>C. s</i>	<i>O. o</i>	<i>C. s</i>	<i>O. o</i>	<i>C. s</i>	<i>O. o</i>
Primavera	14,4	0,0	1,6	0,0	4,1	0,0
Verano	5,4	0,0	1,6	0,0	4,1	0,0
Otoño	38,8	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Invierno	29,5	33,3	0,0	41,7	0,1	25,0

Llama la atención el fuerte predominio de las L1 de *C. stimulator* que, a diferencia de las L2 y L3, se encuentran presentes a lo largo de todo el año. Este predominio podría atribuirse a que la mayor parte de las larvas depositadas por las moscas no logran completar su ciclo, siendo destruidas en las fases iniciales del ciclo.

4.3. Validación del ELISA para el diagnóstico de *C. stimulator* y *O. ovis* en el corzo

Para la validación de los inmunoensayos en base a antígenos somáticos obtenidos de L1 y L2, se empleó como prueba de referencia o “gold standard” la necropsia.

En la Tabla 7 se muestra la relación entre la necropsia y la seropositividad a *C. stimulator*. En ella podemos observar que, para ambos antígenos, el número de falsos positivos y negativos fue de 14 en cada caso; lo cual nos arroja una sensibilidad (Se) del 83,1% y una especificidad (Es) del 85,7%, con un valor predictivo positivo (VPP) del 83,1% y un VPN del 85,7%. Estos datos indican que tanto la Se como la especificidad de ambos protocolos de ELISA para *C. stimulator* resultan bastante buenas y de utilidad para el diagnóstico de esta miasis.

Tabla 7: Relación entre el número de corzos con larvas de *C. stimulator* y la seropositividad obtenida con los distintos antígenos de este parásito.

Necropsia	Ag L1		Ag L2	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Positivos	69	14	69	14
Negativos	14	84	14	84

Al comparar los resultados generales del ELISA con los de la necropsia, la prueba de McNemar mostró una gran coincidencia entre ambas pruebas ($\chi^2=1,1613$; $p=0,2812$), con un valor de concordancia de 0,657 (índice Kappa), clasificado como bueno según Landis y Koch (1977) (Tomado de Altman, 1991).

Si consideramos los antígenos empleados, comprobamos que el grado de coincidencia entre la presencia de larvas totales y los ELISA con Ag L1 y AgL2 fue muy elevado ($\chi^2=0$; $p=1$), con un índice Kappa de 0,688 para ambos casos. El grado de concordancia entre la presencia de larvas 1 con la seropositividad ofrecida por el ELISA Ag L1 fue también buena ($\chi^2=0,03$; $p=0,863$; $\kappa=0,621$), mientras que la coincidencia entre la presencia de larvas 2 y el ELISA Ag L2 fue baja ($\chi^2=0,03$; $p<0,001$; $\kappa=0,239$).

En la Tabla 8 se muestra la relación entre los resultados de la necropsia y la seropositividad a los distintos antígenos de *O. ovis*. En este caso, con el Ag L1 el número de falsos positivos es 23 y de falsos negativos 1; mientras que para el Ag L2 el número de falsos positivos fue 29 y el de falsos negativos 1. Teniendo en cuenta estos resultados, para el Ag L1 la Se de la prueba es de un 14,8% y la especificidad del 99,3%, con un VPP del 80,0% y un VPN del 86,9%. Para el Ag L2 la Se es del 13,8%, la Es del 99,3%, el VPP es del 80,0% y el VPN del 83,5%.

Tabla 8: Relación entre el número de corzos con larvas de O. ovis y la seropositividad obtenida con los distintos antígenos de este parásito.

Necropsia	Ag L1		Ag L2	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Positivos	4	1	4	1
Negativos	23	153	29	147

Llama la atención la baja sensibilidad de ambas pruebas para la detección de *O. ovis* en corzo. Posiblemente el hecho de contar con tan solo 5 animales positivos por necropsia haya limitado la consistencia de los resultados obtenidos. Debemos señalar que, en estudios previos en ganado ovino, hospedador habitual de este díptero, estas mismas pruebas ofrecieron valores de Se y Es superiores al 85% (datos no publicados).

Al comparar los resultados del ELISA con los de la necropsia, la prueba de McNemar mostró una escasa coincidencia entre ambas pruebas ($\chi^2=30,25$; $p=0,000$). A su vez, el valor de concordancia es de 0,14 (índice Kappa), considerado como bajo.

Con estos datos podríamos concluir que para la detección mediante ELISA indirecto de *O. ovis* en corzos, el ELISA-i mediante la utilización de Ag somáticos no nos proporciona unos valores de Se aceptables debido al elevado número de falsos positivos. Esto podría achacarse a la

existencia de reacciones cruzadas entre los antígenos de ambos parásitos o al hecho de que el corzo no resulta un hospedador adecuado para el desarrollo de *O. ovis* por lo que gran parte de las larvas que invaden al animal, desencadenan una respuesta humoral, pero son destruidas a lo largo de su desarrollo resultando negativos en la necropsia.

La Tabla 9 relaciona el número de larvas de *C. stimulator* con los valores de absorbancia medios obtenidos para ambos parásitos. Debido al bajo número de larvas de *O. ovis* no se ha establecido la relación para este parásito.

Los animales negativos a *C. stimulator* durante la necropsia mostraron, en todos los casos, los valores más bajos de absorbancia. En general, los valores de absorbancia muestran una buena correlación con los resultados de la necropsia, de modo que, a mayor número de larvas valores más altos de absorbancia.

La prueba de correlación de Spearman mostró una correlación positiva entre el número de larvas totales de *C. stimulator* ($p < 0,001$; $\rho = 0,599$) y de *O. ovis* ($p = 0,007$; $\rho = 0,197$) con los valores de absorbancia obtenidos con sus respectivos antígenos obtenidos de L1. Del mismo modo, también mostró una correlación con los valores de absorbancia obtenidos los antígenos obtenidos de L2, tanto para *C. stimulator* ($p < 0,001$; $\rho = 0,648$) como para *O. ovis* ($p = 0,015$; $\rho = 0,182$).

Tabla 9: Relación entre los valores de absorbancia (media±SD) y la presencia de los distintos estadios larvarios de *C. stimulator*

L1	L2	L3	Nº	<i>C. stimulator</i>		<i>O. ovis</i>	
				Ag L1	Ag L2	Ag L1	Ag L2
+	+	+	16	1.081±0.417	2.584±0.575	0.852±0.439	1.340±0.679
+	+	-	1	0.709±0	2.547±0	0.248±0*	0.606±0*
+	-	+	8	1.214±0.579	2.797±0.606	0.667±0.378*	1.299±0.602
+	-	-	53	0.815±0.477	1.912±0.769	0.467±0.350*	0.795±1.433*
-	+	+	2	0.833±0.044	2.414±0.066	0.555±0.107*	1.024±0.068*
-	-	+	3	0.361±0.557*	1.115±1.430*	0.461±0.500*	0.803±0.764*
-	+	-	1	1.522±0	2.692±0	0.777±0*	1.639±0
-	-	-	97	0.305±0.424 *	0.656±0.703*	0.279±0.386*	0.427±0.480*

*valor inferior al punto de corte calculado para ese antígeno

En el caso de *C. stimulator* también se obtuvo una correlación positiva entre el número de L1 y L2 y los valores de absorbancia obtenidos con el AgL1 ($p < 0,001$; $\rho = 0,552$) y el AgL2 ($p < 0,001$; $\rho = 0,347$).

4.4. Seroprevalencia de *C. stimulator* y *O. ovis* en corzos

La Tabla 10 muestra la seroprevalencia total y la obtenida con los distintos antígenos al considerar los diversos factores incluidos en este estudio.

La seroprevalencia total por *C. stimulator* en los corzos analizados fue del 45,8% (83/181), tanto con el AgL1 como con el AgL2. Estos resultados coinciden con los obtenidos mediante necropsia (45,3%). Por el contrario, la seroprevalencia total por *O. ovis* fue del 14,9% (27/181) con el AgL1 y del 18,2% (33/181) con el AgL2, resultando ligeramente superior a la obtenida mediante necropsia y cuyas causas ya se han comentado en el apartado anterior.

La prueba de regresión logística mostró a la edad de los animales y la región de procedencia como los únicos factores con una influencia significativa en la seroprevalencia por *C. stimulator* tanto con Ag L1 como Ag L2 (Tabla 11). En relación con la edad la seroprevalencia fue menor en los jóvenes que en los adultos, mientras que al considerar la región de procedencia las diferencias fueron significativas entre Galicia y Navarra, Aragón, Cataluña y Castilla y León.

Tabla 11: Resultados de la regresión logística al considerar los resultados del ELISA con Ag L1 y Ag L2 de *C. stimulator*

Factor	Probabilidad (P)	OR	IC 95%
Jóvenes	-	-	-
Adultos	0,016	3,060	1,2657-7,8491
Galicia	-	-	-
Navarra	0,009	0,014	0,0003-0,2728
Aragón	0,001	0,006	0,0001-0,0089
Cataluña	<0,001	0,020	0,0014-0,334
Castilla y León	0,009	0,035	0,0090-6,9300
Jóvenes	-	-	-
Adultos	0,004	3,936	1,2657-7,8491
Galicia	-	-	-
Navarra	0,007	0,012	0,0003-0,2463
Aragón	<0,001	0,005	0,0001-0,0079
Cataluña	0,046	0,067	0,0027-0,8827
Cataluña	<0,001	0,013	0,0006-0,075
Castilla y León	0,009	0,034	0,0014-0,3379
Castilla-La Mancha	<0,001	1,06x10 ⁻⁹	NA-2,8x10-203

Debido a la ausencia o al bajo número de animales seropositivos a *O. ovis* en algunas categorías no se ha realizado la prueba de regresión logística para esta especie.

Tabla 10: Seroprevalencia por *C. stimulator* y *O. ovis* en corzos en función de diversos factores

Factor	Categoría	Nº	<i>Oestrus ovis</i>		<i>Cephenemyia stimulator</i>	
			AgL1	AgL2	AgL1	AgL2
Región	Galicia	25	6 (24,0)	7 (28,0)	24 (96,0)	24 (96,0)
	Asturias	1	1 (100,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	0 (0,0)
	Cantabria	22	2 (9,1)	1 (4,5)	17 (77,3)	17 (77,3)
	Navarra	3	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (33,4)	1 (33,4)
	Aragón	5	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (20,0)	1 (20,0)
	Cataluña	8	0 (0,0)	1 (12,5)	6 (75,0)	6 (75,0)
	Castilla y León	79	17 (21,5)	19 (24,0)	30 (37,9)	25 (31,6)
	La Rioja	7	0 (0,0)	1 (14,3)	3 (42,8)	3 (42,8)
	Comunidad de Madrid	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Castilla La Mancha	27	1 (3,7)	2 (7,4)	0 (0,0)	6 (22,2)
	Comunidad Valenciana	3	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Sexo	Machos	73	13 (17,8)	17 (23,3)	37 (50,7)	33 (45,2)
	Hembras	108	14 (12,9)	16 (14,8)	46 (42,6)	50 (46,3)
Edad	Jóvenes	62	7 (11,3)	6 (9,7)	27 (43,5)	25 (40,3)
	Adultos	93	15 (16,1)	20 (21,5)	45 (48,4)	47 (50,5)
	Viejos	25	5 (20,0)	7 (28,0)	11 (6,1)	11 (6,1)
Estación	Primavera	46	8 (17,4)	10 (21,7)	22 (47,8)	20 (43,5)
	Verano	30	6 (20,0)	6 (20,0)	19 (63,3)	17 (56,6)
	Otoño	30	5 (16,6)	6 (20,0)	16 (53,3)	14 (46,6)
	Invierno	75	8 (10,6)	11 (14,6)	26 (34,6)	32 (42,6)
	Total	181	27 (14,9)	33 (18,2)	83 (45,8)	83 (45,8)

5. Conclusiones

A raíz de los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir lo siguiente:

1. En España las miasis nasofaríngeas del corzo están provocadas por dos géneros de la subfamilia Oestrinae, *Cephenemyia stimulator* y *Oestrus ovis*.
2. La infestación por *Cephenemyia stimulator* es bastante frecuente en corzos y está distribuida por prácticamente todo el norte y centro peninsular, si bien su prevalencia varía de forma significativa de unas regiones a otras. Las larvas de este díptero están presentes en el corzo a lo largo de todo el año, con un claro predominio de las larvas 1 frente a las larvas 2 y 3.
3. La prevalencia e intensidad de infestación de *Oestrus ovis* en el corzo son muy bajas y la distribución actual en este hospedador se limita al centro peninsular. No obstante, su presencia en el corzo no es accidental por lo que la persistencia de condiciones que favorezcan la simpatría de los ungulados domésticos y silvestres podrían propiciar la expansión de esta miasis en el corzo.
4. El ELISA basado en el empleo de antígenos de larvas 1 y 2 de *C. stimulator* ofrece unos valores de sensibilidad y especificidad aceptables y un buen grado de concordancia con los resultados obtenidos en la necropsia, por lo que se considera una técnica de utilidad para el diagnóstico de esta miasis en el corzo.
5. El ELISA basado en el empleo de antígenos de larvas 1 y 2 de *O. ovis* posee una validez limitada en corzos debido al elevado número de falsos positivos que podrían deberse a reacciones cruzadas con los antígenos de *C. stimulator*.

6. Bibliografía

Allan, S. A., Day, J. F., Edman, J. D. (1987). Visual Ecology of Biting Flies. *Annual Review of Entomology*, 32(1), 297-314.

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

Alcaide, M., Reina, D., Frontera, E., Navarrete, I., (2005). Analysis of larval antigens of *Oestrus ovis* for the diagnosis of oestrosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Medical and Veterinary Entomology*. 19, 151–157.

Alonso, M. A., Slikker, A. G., Casero, A. M. M., Carrión, E. M. F., López-Cózar, I. N., Martínez-Estélez, M. Á. H. (2005). *Estudio seroepidemiológico de la oestrosis en muflón y cabra montés de Andalucía y Extremadura*.

Altman, D. G. (1991). Mathematics for kappa. *Practical statistics for Medical Research*, 406-407.

Arias, M. S., Paz-Silva, A., Casais, R., Rodríguez, O., Oleaga, A., Sánchez-Andrade, R., Díez- Baños, P., Morrondo, P., Pajares, G. (2012). Infestación por larvas de *Cephenemyia*: un problema de importancia creciente en corzos de Asturias y Galicia. *Boletín de la Asociación del Corzo Español*, 13, 37-38.

Arias, M., Pajares, G., Paz-Silva, A., Díez-Baños, N., Salazar, J. C., Díez-Baños, P., Sánchez- Andrade, R., Morrondo, P. (2014a). Antigen characterization from second instars of oestrid bot flies for the detection of anti-*Cephenemyia stimulator* antibodies by ELISA in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Medical and Veterinary Entomology*, 28(S1), 83-89.

Arias, M. L., Moreno, V., Sarasa, M., Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Morrondo, P., Díez- Baños, P., Granados, J. E., Sánchez, A. G., Pérez, J. M. (2014b). Reliability of an ELISA Test for Diagnosing Oestrosis in Iberian Ibex. *Journal of Parasitology*, 100(2), 235-238.

Arias, M.S., Pajares, G., Díez-Baños, N., Pérez-Creo, A., Prieto, A., Díez-Baños, P., Morrondo, P. (2016). Cephemyiosis, an emergent myiasis in roe deer (*Capreolus capreolus*) from northwestern Spain. *Parasitology Research*, 115(12), 4605-4610.

Barth, D., Kudlich, H., Schaich, K. (1976). Occurrence and significance of nasal bot infestation in roe bucks (*Capreolus capreolus*). *Wildlife Diseases*, 609-613.

Bautista, C.R., Angulo, R.M., Garay, E. (1988). Serological diagnosis of *Oestrus ovis* in naturally infested sheep. *Medical and Veterinary Entomology*, 2, 331-335.

Biu, A. A., Nwosu, C. O. (1999). Incidence of *Oestrus ovis* infestation in Borno-White Sahel goats in the semi-arid zone of Nigeria. *Veterinary Research*. 30, 109–120.

Braza, F., Varela, I., San José, C., Cases, V. (1989). Distribution actuelle du chevreuil (*Capreolus capreolus*) du daim (*Dama dama*) et du cerf (*Cervus elaphus*) en Espagne. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 393-396.

Calero-Bernal, R., Habela, M. Á. (2013). First report of *Cephenemyia stimulator* (Diptera, Oestridae) parasitizing roe deer (*Capreolus capreolus*) in Extremadura (Spain). *Galemys, Spanish Journal of Mammalogy*, 25(1): 29-34.

Caracappa, S., Rilli, S., Zanghi, P., Di Marco, V., Dorchie, P. (2000). Epidemiology of ovine oestrosis (*Oestrus ovis* Linné 1761, Diptera: Oestridae) in Sicily. *Veterinary Parasitology*, 92(3), 233–237.

Cepeda-Palacios, R., Angulo Valadez, C. E., Scholl, J. P., Ramirez-Orduna, R., Jacquiet, P. P., Dorchie, P. (2011). “Ecobiology of the Sheep Nose Bot Fly (*Oestrus Ovis* L.): A Review.” *Revue Medical and Veterinary Entomology*.

Colwell, D. D., Scholl, P. J. (1995). Cuticular sensilla on newly hatched larvae of *Gasterophilus intestinalis* and *Oestrus ovis*. *Medical and Veterinary Entomology*, 9, 85-93.

Colwell, D. D. (2001). Bot flies and warble flies (Order Diptera: Family Oestridae), pp. 46–71. In W. M. Samuel, M. J. Pybus and A. A. Kocan (eds.), *Parasitic diseases of wild mammals*. 2nd ed. Manson Publishing/ The Veterinary Press, London, United Kingdom.

Colwell, D. D., M. J. R. Hall, and P. J. Scholl. (2006). A synopsis of the biology, hosts, distribution, disease significance and management of the genera, pp. 220–305. In D. D. Colwell, M. J. R. Hall and P. J. Scholl (eds.), *The oestrid flies: biology, host-parasite relationships, impact and management*. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom.

Čurlík, J., Letková, V., Ciberej, J., Lazar, P., Goldová, M., Kočíšová, A., Košuthová, L., Trávníček, M., Bhide, M., Lazar, G., Pošivak, J., Konjevič, D. (2004). The occurrence of the genera *Hypoderma*, *Cephenemyia* and *Pharyngomyia* in deer in the Slovak Republic. *Folia Veterinaria*, 48, 92-94.

Dorchies, P., Alzieu, J. P., Cadiergues, M. C. (1997). Comparative curative and preventive efficacies of ivermectin and closantel on *Oestrus ovis* (Linne 1758) in naturally infected sheep. *Veterinary Parasitology*, 72, 179-184.

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

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

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

Dudziński, W. (1970). Studies on *Cephenemyia stimulator* (Clark, 1815) (Diptera, Oestridae), the parasite of European roe deer, *Capreolus capreolus* (L.). I. Biology. *Acta Parasitologica Polonica*, 18, 555-572.

Farina, G., Giovannini, R. (2013). *Principale patologie evidenziate nella fauna selvatica dal 2001 al 2011 in Provincia di Trento*. Ed. Servizio Foreste e Fauna della Provincia Autonoma di Trento.

Fidalgo, L. E., López Beceiro, A. M., Vila-Pastor, M., Martínez Carrasco, C., Barreiro-Vázquez, J. D., Pérez, J. M. (2014). Use of computed tomography as a non-invasive method for diagnosing cephenemyiosis in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Medical and Veterinary Entomology*, 29(1), 110–113.

Fidalgo, L. E., López-Beceiro, A. M., Martínez-Carrasco, C., Caparrós-Fontarosa, N., Sánchez, A. G., Vila, M. G., Barreiro, D. L., Sarasa, M., Pérez, J. M. (2021). Unexpected intracranial location of a *Cephenemyia stimulator* larva in a roe deer, *Capreolus capreolus*, revealed by computed tomography / Inesperada ubicación intracraneal de una larva de *Cephenemyia stimulator* en un corzo, *Capreolus capreolus*, detectada mediante tomografía computerizada. *Galemys*, 33.

García-Cuadrado, N., Moreno-Hernández, B. (1995). Oestrosis ovina en una zona semiárida. *IV Congreso Ibérico de Parasitología*, Santiago de Compostela.

Garijo-Toledo, M. M., Sansano-Maestre, J., Ahuir-Baraja, A. E., Martínez-Carrasco, C., Domingo Alonso De Vega, F., Llobat, L., Ruiz De Ybáñez-Carnero, M. R. (2023). “Prevalence of *Oestrus ovis* in Small Ruminants from the Eastern Iberian Peninsula. A Long-term Study.” *Medical and Veterinary Entomology* 37(2), 330–38.

González Cuesta, A. (2023). *Empleo del ELISA indirecto para el diagnóstico de la infestación por Cephenemyia stimulator en corzos*. Trabajo de fin de Grado. Universidad de Santiago de Compostela.

González Juan, M., Martínez-Carrasco Pleite, C., Alonso, F., Leon, L., Ruiz de Ybáñez, R. (2020). Nasopharyngeal bot flies in red deer (*Cervus elaphus*) from southern Spain. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 39, 1069-1075.

Gortázar, C., Vicente, J. (2008) Breve revisión sobre enfermedades del corzo. *Instituto de Investigación de Recursos Cinegéticos (IREC)*. 8pp

Gracia, M. J., Lucientes, J., Peribáñez, M. A., Castillo, J. A., Calvete C, Ferrer, L. M. (2010). Epidemiology of *Oestrus ovis* infection of sheep in northeast Spain (Mid-ebro Valley). *Tropical Animal Health and Production*. 42, 811–813

Hemmersbach-Miller, M., Sánchez-Andrade, R., Domínguez-Coello, A., Meilud, A. H., Paz-Silva, A., Carranza, C...Pérez-Arellano, J. (2007). Human *Oestrus* sp. Infection, Canary Islands. *Emerging Infectious Diseases*, 13(6), 950.

Hoekman, E. D. (2013) Dutch roe deer (*Capreolus capreolus*), review of cases presented at the dutch Wildlife Health Centre. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria de Utrech 4-12 pp.

Ilchman, G., Hiepe, T. (1985). Immunological studies on the diagnosis of *Oestrus ovis* infestation. *Monatshefte für Veterinarmedizin*, 40, 304-307.

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

Jagannath, M. S., Cozab, N., Rahman, S. A., Honnappa T. G. (1989b) Factors influencing *Oestrus ovis* infestation in sheep and goats. *Curr Res*, 18,118–119

Király, I., Egri, B. (2004). A Tolna megyei őzállomány orrgaratbagócs fertőzöttségéről (Nasopharyngeal bot infestation of the roe deer population of Tolna county). *Magyar Állatorvosok Lapja*, 126, 433-438.

Király, I., Egri, B. (2007). Epidemiological characteristics of *Cephenemyia stimulator* (Clark, 1815) larvae infestation in European deer (*Capreolus capreolus*) in Hungary. *Acta zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 53, 271-279.

Kornaś, S., Kowal, J., Wajdzik, M., Nosal, P., Wojtaszek, M., Basiaga, M. (2016). *Cephenemyia stimulator* (Diptera) infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) from Kraków area, southern Poland. *Annals of parasitology*, 62(2): 115-118.

Lamka, J., Suchý, J., Štaud, F. (1997). Efficacy of orally administered Ivermectin against larval stages of bot fly (*Cephenemyia stimulator* C.) in roe deer. *Acta Veterinaria Brno*, 66, 51-55.

Lucientes, J., Ferrer-Dufol, M., Andres, M. J., Peribañez, M. A., Gracia-Salinas, M. J., Castillo, J. A. (1997). Canine Myiasis by Sheep Bot Fly (Diptera: Oestridae). *Journal of Medical Entomology*, 34(2), 242-243.

Lucientes, J. (2000). La oestrosis de los pequeños rumiantes. XXV Congreso de Producción Ovina y Caprina, Teruel.

Maes, S., Boulard, C. (2001) Deer myiasis in France. *Proceedings of COST Action 83, Mange and myiasis of livestock*. Brussels.

Martínez Calabuig, N. (2020). Prevalencia y desarrollo larvario de *Cephenemyia* spp. en corzos del norte de España. Trabajo de fin de Grado. Universidad de Santiago de Compostela. 48pp.

Martínez-Calabuig, N., López, C. M., Díaz, P., Remesar, S., García-Dios D., Saldaña, A., López-Lorenzo, G., Díez-Baños, P., Morrondo, P. (2022a). Distribución y Ciclo biológico de *Cephenemyia stimulator*. (Diptera: Oestridae) en corzos del norte de España. XXII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología, pp 5–8. July, Madrid, 277.

Martínez-Calabuig, N., Panadero, R., Remesar, S., García-Dios, D., Díaz, P., Prieto, A., López, G., Díez-Baños, P., Morrondo, P., López, C. M. (2022b). Mixed Nasopharyngeal Myiasis by Bots and Blowflies in a Roe Deer (*Capreolus capreolus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 58(1).

Martínez-Calabuig, N., Remesar, S., Varas, G., García-Dios, D., Saldaña, A., Díaz, P., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Panadero, R. (2023) First report of *Oestrus ovis* infesting roe deer (*Capreolus capreolus*) in an area with high sympatry between wild and domestic ruminants. Annual meeting of the European Veterinary Parasitology College, Paris, 29–30 de Junio 2023.

Martínez-Calabuig, N., Panadero, R., Varas, G., Remesar, S., López, C. M., Saldaña, A., Díaz, P., Díez-Baños, P., Morrondo, P., García-Dios, D. (2024). Prevalence of nasopharyngeal myiasis in roe deer (*Capreolus capreolus*) from an area with high sympatry between wild and domestic ungulates in Central Spain. *European Journal of Wildlife Research*, 70(3), 60.

McMahon, D. C., Bunch, T. D. (1989). Bot fly larvae (*Cephenemyia* spp., Oestridae) in Mule deer (*Odocoileus hemionus*) from Utah. *Journal of Wildlife Diseases*, 25, 636-638.

Moreno, V., Romero-Fernández, I., Marchal, J. A., Beltrán, M., Granados, J. E., Habela, M. A., Tamadon, A., Rakhshandehroo, E., Sarasa, M., Pérez, J. M., Sánchez, A. (2015). Molecular characterization of bot flies, *Oestrus* spp. (Diptera, Oestridae), from domestic and wild Bovidae hosts. *Veterinary Parasitology*. 212, 473-477.

Morrondo, M. P., Pérez-Creo, A., Prieto, A., Cabanelas, E., Díaz-Cao, J. M., Arias, M. S., Díaz Fernández, P., Pajares, G., Remesar, S., López-Sandez, C. M., Fernández, G., Díez-Baños, P., Panadero, R. (2017). Prevalence and distribution of infectious and parasitic agents in roe deer from Spain and their possible role as reservoirs. *Italian Journal of Animal Science*, 16 (2): 266- 274.

Morrondo, P., Pajares, G., Arias, M. S., Martínez-Calabuig, N., Remesar, S., García-Dios, D., Díaz, P., López, C. M., Panadero, R., Díez-Baños, P. (2021). An Update on Cephemyiasis in the European Roe Deer: Emergent Myiasis in Spain. *Animals*, 11(12), 33-82.

Murguía, M., Rodríguez, J. C., Torres, F. J., Segura, J. C. (2000). Detection of *Oestrus ovis* and associated risk factors in sheep from the central region of Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology*. 88, 73–78.

Navarrete, I., Reina, D., Habela, M., Nieto, C. G., Serrano, F., Pérez, E. (1990). Parasites of roe deer (*Capreolus capreolus*) in Cáceres province, Spain. *32 Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere*. Eskilsuna (Suecia).

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

Otranto, D., (2001). The immunology of myiasis: parasite survival and host defense strategies. *Trends Parasitology*. 17, 176–82.

Otranto, D., Stevens, J. R. (2002). Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. *International Journal for Parasitology*, 32(11), 1345-1360.

Otranto, D., Stevens, J. R. (2006). Molecular phylogeny and identification. In: *The Oestrid Flies. Biology, Host-parasite Relationships, Impact and Management*, Edited by Colwell, D. D., Hall, M. J. R., Scholl, P. J. *CABI International*, 51-66

Pajares, G. (2009). Apuntes de Biología. Primera cita en España de *Cephenemyia stimulator* en corzos. *Boletín de la Asociación del Corzo Español*, 11, 36.

Pajares, G. (2016). Estudio sobre la infestación por larvas de *Cephenemyia stimulator* (Diptera: Oestridae) en corzos (*Capreolus capreolus*) del norte de España. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Lugo, Departamento de Patología Animal: Universidad de Santiago de Compostela. 111pp.

Pajares, G., Arias, M. S., Pérez-Creo, A., Prieto, A., Callejo, A., Díez-Baños, P., Morrondo, P. (2017). Epidemiología de la cefenemiosis en corzos del noroeste de España. *Boletín*

de la Asociación del Corzo Español, IV Simposio sobre el corzo en la Península Ibérica, 15, 129-134.

Panadero-Fontán, R., Otranto, D. (2015). Arthropods affecting the human eye. *Veterinary Parasitology*, 208(1-2), 84-93.

Panadero, R., Varas, G, López, C. Díaz, P., Díez-Baños, P., Morrondo, P. (2016). First report of an infestation by *Hypoderma actaeon* in roe deer (*Capreolus capreolus*). XXIX Congress SolPA, Bari (Italy), 21-24 June 2016.

Pangui, L. J., Dorchies, P., Belot, J. (1988). Contribution à l'étude épidémiologique de l'oestrose ovine au Sénégal. *Revue du Médecine Vétérinaire*, 139, 701-704.

Papadopoulos, E., Prevot, F., Himonas, C. & Dorchies, P. (1997). Prevalence d' *Oestrus ovis* (Linne 1761) chez la chevre en Grece: enquete serologique par ELISA. *The Revue de Médecine Vétérinaire*. 148, 721-724.

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

Papadopoulos, E., Chaligiannis, I., Morgan, E. R. (2010). Epidemiology of *Oestrus ovis* L. (Diptera: Oestridae) larvae in sheep and goats in Greece. *Small Ruminant Research*. 89, 51-56.

Paredes-Esquivel, C., del Rio, R., Monerri, M., Borràs, D., Laglera, L. M., Miranda, M. Á. (2012). The influence of sheep age group on the seasonal prevalence of oestrosis in the island of Majorca. *Veterinary Parasitology*, 186(3-4), 538-541.

Perez, J. M., Granados, J. E., Soriguer, R. C., Ruiz-Martinez, I. (1996). Prevalence and Seasonality of *Oestrus caucasicus* Grunin, 1948 (Diptera: Oestridae) Parasitizing the Spanish Ibex, *Capra pyrenaica* (Mammalia: Artiodactyla). *The Journal of Parasitology*. 82:233-236

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.

Reina, D., Bonilla, F., Martínez-Moreno, J., Dorchies, Ph., Hernández, S., Navarrete, I. (2000). Preliminary results about *Oestrus ovis* in southwestern Spain. 3rd Annual Workshop COST 833 "Mange and myiasis in livestock"

Ruiz-Martínez, I., Pérez, J. M. & Louassini, M. (1992). Comparative analysis of the prevalence of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) in sheep horns of Southern Spain and Northern Morocco. *Boletín da Sociedade Portuguesa de Entomologia*, 139(3), 421-428.

Ruiz, I., Soriguer, R. C., Perez, J. M. (1993). Pharyngeal Bot Flies (Oestridae) from Sympatric Wild Cervids in Southern Spain. *The Journal of Parasitology*, 79(4), 623.

Salaba, O., Vadlejch, J., Petrtyl, M., Valek, P., Kudrnacova, M., Jankovska, I., Bartak, M., Sulakova, H. & Langrova, I. (2013). *Cephenemyia stimulator* and *Hypoderma diana* infection of roe deer in the Czech Republic over an 8-year period. *Parasitology Research*, 112, 1661-1666.

Sánchez-Andrade, R., Romero, J. L., Suárez, J. L., Pedreira, J., Díaz, P., Arias, M., Paz-Silva, A., Panadero, R., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Scala, A. (2005). Comparison of *Oestrus ovis* metabolic and somatic antigens for the immunodiagnosis of the zoonotic myiasis oestrosis by immunoenzymatic probes. *Immunological Investigations*, 34, 91-99.

Sánchez-Andrade, R., Cortiñas, F.J., Vázquez I.F., Sánchez J.A., Mula, P., Cazapal-Monteiro, C., Vázquez, L., Suárez, J.L, Vázquez, R.F., Arias M.S., Díez Baños, P., Scala, A., Paz, A. (2010) A novel second instar *Gasterophilus* excretory/secretory antigen-based ELISA for the diagnosis of gasterophilosis in grazing horses. *Veterinary Parasitology*, 171, 314-320.

Sarasa, M., Rambozzi, L., Rossi, L., Meneguz, P. G., Serrano, E., Granados, J. E., González, F. J., Fandos, P., Soriguer, R. C., González, G., Joachim, J., Pérez, J. M. (2010). *Sarcoptes scabiei*: Specific immune response to sarcoptic mange in the Iberian ibex *Capra pyrenaica* depends on previous exposure and sex. *Experimental Parasitology*, 124, 265-271.

Scala, A., Solinas, G., Citterio, C. V., Kramer, L. H., Genchi, C. (2001). Sheep oestrosis (*Oestrus ovis* Linné 1761, Diptera: Oestridae) in Sardinia, Italy. *Veterinary Parasitology*, 102(1-2), 133-141.

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

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

Scholl P. J., Colwell D. D., Cepeda-Palacios, R. (2019) Myiasis (Muscoidea, Oestroidea). In: Mullen GR, Durden LA, editors. *Medical and Veterinary Entomology*. 3rd ed. San Diego: Elsevier-Academic Press, 383–419.

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

Sugár, L., Kovács, S. Z., Kovács, A., Kőrös, A., Varga, G. Y. (2004) Distribution of the occurrence of nasopharyngeal bots by age and season in a red deer population in the Bakony mountains, Hungary. *Vadbiológia*, 11, 24-29.

Tabouret, G., Vouldoukis, I., Duranton, C., Prévot, F., Bergeaud, J., Dorchies, P., Mazier, D., Jacquiet, P. (2001a). *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae): effects of larval excretory/secretory products on nitric oxide production by murine RAW 264·7 macrophages. *Parasite Immunology*, 23(3), 111-119.

Tabouret, G. (2001b). *Oestrus ovis* (Linné 1781) Diptera: Oestridae chez les ovins: Activité trophique des larves et réponse immunitaire muqueuse. Tesis Doctoral, Universidad Paul Sabatier, Toulouse.

Teskey, H. J. (1981). Morphology and terminology larvae. In : McAlpine, J. F., Peterson, B. V., Shewell, G. E., Teskey, H. J., Vockeroth J. R., Wood, D. M. *Manual of Nearctic Diptera*. 1, 65-88.

Tibayrenc, R., Roua, B., Moumouni, R., Garba, D., Alassane, O., Dorchies, P. (1999). L'oestrose ovine au Niger: enquête de prévalence et traitement par le closantel. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 52, 47-53.

Vaca, D. (2000). Biology of nasopharyngeal bot fly *Cephenemyia stimulator* Cl. (Diptera, Oestridae) and its distribution in the Czech Republic. *COST Action*. 833, 189-194.

Wells, J. D., Sperling, F. A. H. (2001). DNA-based identification of forensically important *Chrysomyinae* (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*. 120, 110-5.

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

Zumpt, F. (1965). *Myiasis in man and animals in the Old World*. London: Butterworths, 141 pp