

Efecto de la alimentación de *Stomoxys calcitrans* (DIPTERA: MUSCIDAЕ) con sangre de *Bos taurus* inmunizado con antígenos ocultos de la mosca del establo, sobre la oviposición

Effect of feeding *Stomoxys calcitrans* (DIPTERA: MUSCIDAЕ) with blood from *Bos taurus* immunized with concealed antigens from the stable fly on the oviposition

Carlos Ramón Bautista Garfias* Ana Patricia Marín Flores** Isabel Giles Hernández***

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the effect of the antibodies present in blood from *Bos taurus* immunized with concealed antigens from *Stomoxys calcitrans* intestine on the adult fly survival or on the oviposition capacity. Five thousand intestines were collected from adult stable flies recently fed on bovine normal blood to prepare an antigenic extract (AgIn-Sc). A bovine was immunized with AgIn-Sc in Freund's incomplete adjuvant on days 0, 14, 21, 28, 35 and 40. Another bovine (control) was inoculated with saline solution on the same dates. At days 40 and 50 peripheral blood was collected from the two animals. Serum was obtained from one part of blood and frozen in aliquots at -70°C until used, the other part of blood was maintained in sodium citrate at 2% and kept at 4°C . Batches of 200 recently emerged *S. calcitrans* flies/bovine were fed with this blood during one week and maintained under laboratory conditions. During days 40 and 50 post-immunization, three daily observations were practiced to evaluate fly mortality and number of oviposited eggs (OE). There was no effect on survival of flies fed on blood from the immunized bovine; however, oviposition was reduced. There was a significant reduction in the number of OE, which oscillated between 29% ($P < 0.05$, blood from day 40) and 65% ($P < 0.01$, blood from day 50) in relation to the number of OE by flies fed on blood from the control animal. By ELISA, the IgG anti-intestine antibody titers in the serum from the immunized animal were of 1:1280 and 1:2560 for days 40 and 50, respectively; while, on the same days, in the serum from the control bovine was negative to such antibodies. By Western blot, serum of day 50 recognized seven components in the AgIn-Sc with apparent molecular weights which ranged between 35 and 205 kilodaltons. On the basis of these results, it is concluded that the immunization procedure generated the production of IgG anti-intestine antibodies which did not affect fly survival; however, these antibodies reduced the number of OE.

Key words: CONCEALED ANTIGENS, STABLE FLY, *STOMOXYS CALCITRANS*, IMMUNIZATION, *BOS TAURUS*.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de los anticuerpos presentes en la sangre de *Bos taurus* inmunizado con antígenos ocultos del intestino de *Stomoxys calcitrans* sobre la supervivencia de las moscas adultas y sobre la oviposición. Se obtuvieron cinco mil intestinos de *S. calcitrans* alimentadas con sangre normal de bovino, para preparar un extracto antigénico (AgIn-Sc). Posteriormente, un bovino fue inmunizado con AgIn-Sc en adyuvante incompleto de Freund los días 0, 14, 21, 28, 35 y 40. Otro bovino (testigo) fue inoculado con solución salina en las mismas fechas. A los días 40 y 50 posinmunización se recolectó sangre periférica de los dos animales; una parte se utilizó para obtener suero, que se congeló en alícuotas a -70°C hasta su uso, y la otra se conservó en citrato de sodio al 2% a 4°C . Con esta última se alimentó durante una semana a grupos de 200 moscas *S. calcitrans* recién emergidas/bovino, las cuales se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio. Durante los días 40 y 50 posinmunización se practicaron tres observaciones diarias durante una semana para evaluar la mortalidad de las moscas y contar el número de huevos depositados (HD). Se observó que no hubo un efecto dañino de la sangre del animal inmunizado sobre la supervivencia de las moscas, pero sí sobre la oviposición. Se apreció una disminución significativa en el número total de HD, que osciló entre 29% ($P < 0.05$, sangre del día 40) y 65% ($P < 0.01$, sangre del día 50) con respecto al número de HD por las moscas que se alimentaron de sangre del animal testigo. Mediante ELISA se obtuvieron los títulos de anticuerpos IgG antiintestino en el suero del animal inmunizado: 1:1280 y 1:2560 para los días 40 y 50, respectivamente; mientras que en los mismos días, el suero del

Recibido el 8 de marzo de 2006 y aceptado el 30 de agosto de 2006.

*Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, km 11.5, Carretera federal Cuernavaca-Cuautla, 62550, Jiutepec, Morelos, México.

**Departamento de Entomología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala, Col. Casco de Santo Tomás, México, D. F.

***Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, km 11.5, Carretera federal Cuernavaca-Cuautla, 62550, Jiutepec, Morelos, México.

bovino testigo fue negativo a dichos anticuerpos. Por Western blot, el suero del día 50 reconoció siete componentes en el AgIn-Sc con pesos moleculares aparentes que oscilaron entre 35 y 205 kilodaltones. Con base en estos resultados se concluye que el procedimiento de inmunización utilizado indujo la formación de anticuerpos IgG antiintestino, que no afectaron la supervivencia de la mosca, pero sí su oviposición.

Palabras clave: ANTÍGENOS OCULTOS, MOSCA DEL ESTABLO, *STOMOXYS CALCITRANS*, INMUNIZACIÓN, *BOS TAURUS*.

Introduction

From the economic point of view, the stable fly, *Stomoxys calcitrans* is one of the most important ectoparasites of cattle raised in North America. It has been informed that in the United States of America causes annual losses in cattle production close to one thousand million dollars.¹

This fly species is capable of mechanically transmit to cattle the hemotropic rickettsia *Anaplasma marginale*.^{2,3} It is worth to note that *Stomoxys calcitrans* has a flight range of 225 km from its reproductive site⁴ and can attack up to 30 different animal species among mammals, birds, reptiles and amphibians.⁵⁻⁹ In the last 20 years the control of the stable fly has complicated because it easily develops resistance to the insecticides. It has been informed that *S. calcitrans* shows resistance at least to 14 different insecticides.* For this reason, it is mandatory to have control alternatives, such as the immunoprofilaxis. In this context, by immunizing the host with parasites' concealed antigens (usually from the intestine) it has been demonstrated the induction of resistance in the host against different arthropod parasites such as the tick *Boophilus microplus*,¹⁰ the flea *Ctenocephalides felis felis*,¹¹ the botfly *Lucilia cuprina*¹² and the horn fly *Haematobia irritans*.¹³ In the case of *Stomoxys calcitrans*, studies have been carried out only on immunization of rabbits,¹⁴ and it is not known what happens with the stable fly when it feeds on blood from *Bos taurus* immunized with *Stomoxys calcitrans* concealed antigens. In this context, the present study was undertaken, in order to know about this effect.

Materials and methods

Stomoxys calcitrans

A laboratory strain of *Stomoxys calcitrans*, donated by the Knipling-Bushland US,** was used. The stable fly colony has been maintained during ten years at the SENASICA of the Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) in Jiutepec, Morelos, Mexico, according to the recommended conditions for the development of stable flies at the laboratory.¹⁵

Introducción

Desde el punto de vista económico, la mosca del establo, *Stomoxys calcitrans*, representa uno de los ectoparásitos más importantes registrados en el ganado bovino que se cría en Norteamérica. Se ha informado que produce pérdidas anuales cercanas a los mil millones de dólares anuales en la producción del ganado bovino en Estados Unidos de América.¹

Esta especie de mosca puede transmitir mecánicamente la rickettsia hemotrópica *Anaplasma marginale* al ganado bovino.^{2,3} Cabe señalar que *Stomoxys calcitrans* es capaz de volar hasta 225 km de su sitio de reproducción⁴ y puede atacar hasta 30 especies animales diferentes entre mamíferos, aves, reptiles y hasta anfibios.⁵⁻⁹ En los últimos 20 años, el control de la mosca del establo se ha complicado debido a que fácilmente desarrolla resistencia a los insecticidas. Se ha informado que *S. calcitrans* muestra resistencia a cuando menos 14 diferentes insecticidas.* Por esta razón, es prioritario contar con medidas alternativas de control, como la inmunoprofilaxis. En este sentido, por medio de la inmunización del portador con antígenos ocultos del parásito (generalmente del intestino), se ha demostrado que en el portador se puede inducir resistencia contra diferentes artrópodos parásitos como la garrapata *Boophilus microplus*,¹⁰ la pulga *Ctenocephalides felis felis*,¹¹ la mosca *Lucilia cuprina*¹² y la mosca del cuerno *Haematobia irritans*.¹³ En el caso de *Stomoxys calcitrans*, sólo se han llevado a cabo estudios de inmunización en conejos,¹⁴ por lo que se desconoce lo que ocurre con la mosca del establo cuando ésta se alimenta con sangre de *Bos taurus* inmunizado con antígenos ocultos de *S. calcitrans*. En este contexto, el presente estudio se llevó a cabo para conocer dicho efecto.

Material y métodos

Stomoxys calcitrans

Se utilizó una cepa de laboratorio de *Stomoxys calcitrans* que fue donada por el Knipling-Bushland US.**

*M. Whalon, D. Mota Sanchez, L. Duynslager, Resistant species profile: *Stomoxys calcitrans*, 2003. Available from: URL: http://www.pesticideresistance.org/DB/species_profile.php?arthropodi.

**Livestock Insects Research Laboratory, USDA-ARS, Ker-ville, Texas, Estados Unidos de América.

Obtaining *S. calcitrans* intestine and antigen preparation

Several fly containing boxes were set up to obtain the enough amounts of adult flies during a two month period. Next, the intestines of approximately five thousand *S. calcitrans*, after feeding on cattle blood were dissected in cold (4°C). The intestines were placed in cold (4°C) phosphate buffered saline solution (PBS), pH 7.2, containing antibiotics (penicillin 100 UI/ml – streptomycin 100 µg/ml) and washed several times to eliminate bovine erythrocytes. Afterwards, the intestines in PBS containing a protease inhibitor cocktail* were grinded by using a glass homogenizer and the resulting suspension was gently stirred with a magnetic stirrer at 4°C during 18 hours. Then, the extract was centrifuged in a refrigerated centrifuge (4°C) at 3 000 *g* for 30 minutes. Afterwards, the supernatant was collected and designated as AgIn-Sc. The amount of protein of this was obtained by the method of Lowry *et al.*¹⁶ Finally, the antigen was dispensed into vials and was frozen at -70°C until used.

Experimental bovines

Two 14 month old female Jersey bovines (*Bos taurus*), free of tuberculosis, brucellosis, babesiosis and anaplasmosis were used. One was immunized with antigens from *S. calcitrans* intestines and the other one served as non immunized control.

The animals were maintained in pens with concrete floor and were fed with alfalfa, oat straw and concentrated feed and drank water *ad libitum*. The bovines were maintained free of flies by using a *pour on* insecticide.

Immunization procedure

The inoculant (AgIn-Sc) containing 3.14 mg of protein/mL, was mixed with Freund's incomplete adjuvant (v/v), and inoculated by intramuscular route (im) into one of the bovines at days 0, 14, 21, 28, 35 and 40. The control non immunized bovine was inoculated by im route with physiological saline solution at the same days.

Fly feeding and determination of fly mortality and number of oviposited eggs

Blood was collected from each bovine at days 40 and 50 after immunization; one part of this was used to obtain serum, which was conserved in aliquots at -70°C until used and the other part was preserved in 2% sodium citrate at 4°C. With blood of each animal collected at each date, a group of 200 recently emerged

La colonia se ha mantenido desde hace diez años en el SENASICA de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), en Jiutepec, Morelos, México, de acuerdo con las condiciones recomendadas para la cría de la mosca del establo en el laboratorio.¹⁵

Obtención de intestino de *S. calcitrans* y preparación de antígeno

Se establecieron varias jaulas para obtener la cantidad suficiente de moscas adultas en un periodo de dos meses. A continuación se disecaron en frío (4°C) los intestinos de aproximadamente cinco mil moscas *S. calcitrans*, después de haber completado la depleción con sangre de bovino normal. Dichos intestinos fueron colocados en solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) fría (4°C), pH 7.2 con antibióticos (penicilina 100 UI/mL, estreptomocina 100 µg/mL) y luego se lavaron varias veces hasta eliminar los eritrocitos de bovino. Posteriormente se maceraron los intestinos en un homogeneizador de cristal que contenía SSAF con un coctel de inhibidores de proteasas.* A continuación, el macerado se mantuvo en agitación lenta con un rotor magnético, a 4°C durante 18 horas. Transcurrido ese tiempo, el extracto se centrifugó en una centrífuga refrigerada (4°C) a 3 000 *g* durante 30 minutos. A continuación se recolectó el sobrenadante y se le denominó AgIn-Sc, cuya cantidad de proteína se determinó por medio del método de Lowry *et al.*¹⁶ Finalmente, el antígeno fue dispensado en viales y se congeló a -70°C hasta su uso.

Bovinos experimentales

Se utilizaron dos bovinos (*Bos taurus*) raza Jersey, hembras, de 14 meses de edad, libres de tuberculosis, brucelosis, babesiosis y anaplasmosis. Uno se usó para inmunizarlo con antígenos de intestino de *S. calcitrans*, y el otro fungió como testigo no inmunizado.

Los animales se mantuvieron en corrales de piso de concreto; recibieron alimentación consistente en paja de avena, alfalfa achicalada y concentrado y consumieron agua *ad libitum*. Asimismo, los bovinos se mantuvieron libres de moscas utilizando un mosquicida en presentación *pour on*.

Procedimiento de inmunización

El inóculo (AgIn-Sc), que contenía 3.14 mg de proteína/mL se mezcló con adyuvante incompleto de Freund (v/v) y se utilizó para inocular por vía intramuscular (im) a uno de los bovinos los días 0, 14, 21,

*Complete, Mini, Boehringer, Mannheim, Alemania.

S. calcitrans and kept in an insect box, were fed twice (morning and afternoon). The flies were maintained in the laboratory at 27-28°C with a relative humidity of 70% to 80%. To determine fly mortality and counting the number of eggs oviposited per day (EO), three daily observations were carried out (morning, afternoon, and night).

Determination of anti-intestine antibody titers by ELISA

Sera collected at days 40 and 50 after immunization were analyzed by an indirect immunoenzyme assay (ELISA) according to Dumenigo *et al.*,¹⁷ to assess anti-*S. calcitrans* intestine antibody titers, using AgIn-Sc, rabbit serum anti-bovine IgG conjugated with peroxidase, and orthophenilenediamine (substrate). Lectures were carried out in an ELISA reader using a 492 nm filter.

Recognition of *S. calcitrans* intestine antigens by bovine anti-intestine antibodies by Western blot (immuno-electrotransference)

The AgIn-Sc was subjected to electrophoresis in a polyacrilamide gel in order to separate its components which later were transferred to a nitrocellulose membrane (NC), according to the method of Towbin *et al.*,¹⁸ and 5 mm wide strips were cut. Subsequently, the NC strips with antigen components were incubated with the bovine serum (day 50 after immunization) during one hour at 37°C; then the strips were washed every 5 min three times with Tween 20-PBS; afterwards rabbit serum anti-bovine IgG peroxidase conjugated and diluted 1:5000 was added and incubated during one hour at 37°C. Finally, the substrate (orthophenilenediamine) was added and incubated during 10-15 min. Then, the NC strips were washed with tap water and were dried at room temperature.

Statistical analysis

The data obtained were analyzed by an analysis of variance (random blocks) and these were subjected to the Tukey's test when a difference was found.¹⁹

Results

Evaluation of adult fly mortality

No differences were observed between the group of flies which fed on blood from the control bovine and the group of stable flies fed on blood from the bovine immunized with AgIn-Sc (data not showed), either at 40 or 50 days after immunization.

28, 35 y 40. El bovino testigo recibió también, por vía im, solución salina fisiológica en las mismas fechas.

Alimentación de las moscas y determinación de la mortalidad y del número de huevos depositados.

A los días 40 y 50 posinmunización, se recolectó sangre de cada uno de los animales; una parte de ésta se utilizó para obtener suero, que se conservó en alícuotas a -70°C hasta su uso, y la otra se conservó en citrato de sodio al 2% a 4°C. Con la sangre de cada fecha y por cada bovino, se alimentó diariamente en dos ocasiones (mañana y tarde), durante una semana, a un grupo de 200 moscas *S. calcitrans* recién emergidas y mantenidas en una jaula, las cuales se conservaron en el laboratorio a 27°C - 28°C con humedad relativa de 70% a 80%. Para evaluar la mortalidad de las moscas y contar el número de huevos depositados (HD) por día, se practicaron tres observaciones diarias (mañana, tarde y noche).

Determinación del título de anticuerpos antiintestino por ELISA

Los sueros recolectados los días 40 y 50 posinmunización, se analizaron por medio de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) indirecto de acuerdo con Duménigo *et al.*,¹⁷ para determinar el título de anticuerpos antiintestino de *S. calcitrans*, utilizando AgIn-Sc, suero de conejo anti-IgG de bovino conjugado con peroxidasa y ortofenilendiamina como sustrato. La lectura se llevó a cabo en un lector de ELISA utilizando un filtro de 492 nm.

Reconocimiento de antígenos de intestino de *S. calcitrans* por anticuerpos de bovino antiintestino por Western blot (immuno-electrotransferencia)

El AgIn-Sc fue sometido a electroforesis en un gel de poli-acrilamida para separar sus componentes que luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (NC), de acuerdo con el método de Towbin *et al.*,¹⁸ y se cortaron tiras de 5 mm de ancho. Posteriormente, las tiras de NC con los componentes del antígeno se incubaron durante una hora a 37°C con el suero de los bovinos (día 50 posinmunización); luego se lavó con Tween 20-SSAF tres veces cada 5 min, y se agregó el suero de conejo anti-IgG de bovino conjugado con peroxidasa, diluido 1:5000 y se incubó a 37°C durante una hora. Finalmente se agregó el sustrato (ortofenilendiamina) y se incubó durante 10-15 min. A continuación, las tiras de NC se lavaron con agua de la llave y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Determination of the number of oviposited eggs

The feeding of flies with bovine blood taken at the 40 day after immunization provoked a global reduction of 29% in the number of oviposited eggs ($P < 0.05$), as compared with the oviposited eggs by the flies in the group fed with blood from the non-immunized bovine (Table 1). Likewise, from day five after feeding and up to day 11, it was observed a lower number of oviposited eggs by the stable flies fed with blood from the immunized bovine, as compared with those flies fed with blood from de control bovine (Figure 1).

When flies fed on blood obtained at day 50, the egg global reduction in the group of flies fed with blood from *Bos taurus* immunized with AgIn-Sc was of 65.4% ($P < 0.01$), as compared with the egg global number oviposited by the stable flies fed with blood from the control non-immunized *B. taurus* (Table 1). As in the previous case, differences were noticed in the number of daily egg oviposited by both fly groups, starting at day five after feeding (Figure 2).

Anti-*S. calcitrans* intestine antibody titer

The serum from the immunized bovine with AgIn-Sc showed IgG anti-AgIn-Sc antibody titers of 1:1 280 and 1:2 560 by ELISA at days 40 and 50 after immunization, respectively; while the serum from the non-immunized bovine did not show any antibody titer to the AgIn-Sc in both dates (Table 1).

Análisis estadístico

Se practicó un análisis de varianza (bloques al azar) con los datos obtenidos; cuando hubo diferencias, éstas fueron sometidas a la prueba de Tukey.¹⁹

Resultados

Evaluación de la mortalidad de las moscas adultas

No se observaron diferencias al comparar la mortalidad de las moscas adultas que consumieron sangre del bovino testigo con la de las moscas del grupo alimentado con sangre del bovino inmunizado mediante AgIn-Sc (datos no mostrados) en ninguna de las dos fechas evaluadas (40 y 50 días posinmunización).

Determinación del número de huevos depositados

La alimentación de las moscas con sangre del día 40 posinmunización provocó una reducción global del número de huevos depositados de 29% ($P < 0.05$), en comparación con los huevos depositados por el grupo alimentado con sangre del bovino testigo no inmunizado (Cuadro 1). Asimismo, a partir del día cinco posalimentación y hasta el día 11, se observó un menor número de huevos depositados por las moscas alimentadas con sangre del bovino inmunizado, en

Cuadro 1

PROMEDIO DE HUEVOS DEPOSITADOS EN UN PERIODO DE SIETE A NUEVE DÍAS POR MOSCAS DEL ESTABLO (200 MOSCAS/GRUPO) ALIMENTADAS CON SANGRE OBTENIDA DE *Bos taurus* LOS DÍAS 40 Y 50 POSINMUNIZACIÓN CON ANTÍGENOS DEL INTESTINO DE *Stomoxys calcitrans*

MEAN NUMBER OF EGGS OVIPOSITED IN A PERIOD OF SEVEN TO NINE DAYS BY STABLE FLIES (200 FLIES/GROUP) FED ON BLOOD FROM *Bos taurus* COLLECTED AT DAYS 40 AND 50 AFTER IMMUNIZATION WITH ANTIGENS FROM *Stomoxys calcitrans* INTESTINE

Flies fed on blood from <i>Bos taurus</i> :						
Day ¹	Non-immunized		Immunized		% egg reduction ³	P ⁴
	Eggs mean	Antibody titer ²	Eggs mean	Antibody titer ²		
40	1,883.9	0	1,337.4	1:1,280	29	< 0.05
50	257.1	0	88.9	1:2,560	65.4	< 0.01

¹ Post-immunization

² IgG anti-*S. calcitrans* intestine in bovine serum, as determined by ELISA

³ Related to the control group

⁴ Tukey's test

Recognition of intestinal antigens from *S. calcitrans* by bovine anti-intestine antibodies by immunoelectrotransference

The serum from *Bos taurus* collected at day 50 after immunization recognized seven components in the AgIn-Sc, which molecular weights ranged between 33 and 205 kilodaltons, while the serum from the control bovine not immunized did not recognize any component (Figure 3).

Discussion

Adult fly mortality

There was no difference between stable fly mortality fed with blood from *Bos taurus* immunized with *Stomoxys calcitrans* intestinal antigens and that of stable flies fed with blood from the non-immunized bovine; this result is consistent with the study done on *Haematobia irritans* fed on blood from immunized bovines or with blood from control animals.¹³ It is probable that the antibodies generated against the AgIn-Sc and which were ingested by *S. Calcitrans*, did not importantly damage the fly's vital functions, or that higher antibody titers are needed to observe any effect on the survival of such insects. However, a reduction was observed in the number of eggs oviposited by the stable flies that fed on blood from *Bos taurus* immunized with antigens from the intestine of *S. calcitrans*.

comparación con aquellas que ingirieron sangre del bovino testigo (Figura 1).

Para el caso de la oviposición de las moscas que se alimentaron con sangre del día 50, la reducción global de huevos en el grupo de moscas alimentadas con sangre de *Bos taurus* inmunizado con AgIn-Sc fue de 65.4% ($P < 0.01$), en comparación con el número global de huevos depositados por las moscas alimentadas con sangre de *B. taurus* testigo (Cuadro 1). Como en el caso anterior, se apreciaron diferencias en el número diario de huevos puestos por ambos grupos de moscas, a partir del día cinco posalimentación (Figura 2).

Título de anticuerpos antiintestino de *S. calcitrans*

El análisis de los sueros obtenido por ELISA mostró títulos de anticuerpos IgG anti-AgIn-Sc de 1:1 280 y de 1:2 560 en los días 40 y 50 posinmunización, respectivamente, en el suero del bovino inmunizado con AgIn-Sc; mientras que los títulos de anticuerpos fueron de 0 en ambas fechas en el bovino testigo no inmunizado (Cuadro 1).

Reconocimiento de antígenos de intestino de *S. calcitrans* por anticuerpos de bovino antiintestino por inmunoelectrotransferencia

El suero de *Bos taurus*, del día 50 posinmunización

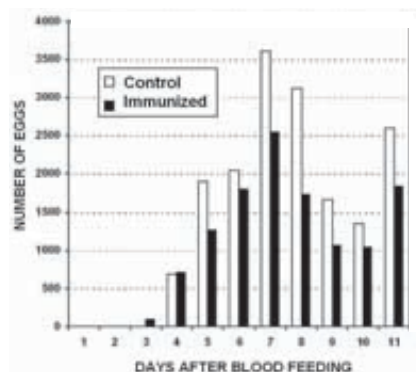


Figura 1: Número de huevos depositados por moscas del establo (200 moscas/grupo) alimentadas diariamente con sangre de *Bos taurus* inmunizado (inmunizado) o no (testigo) con antígenos de intestino de *Stomoxys calcitrans* (día 40 posinmunización).

Figure 1: Number of eggs oviposited by stable flies (200 flies/group) fed daily with blood from *Bos taurus* immunized (immunized) or not (control) with intestine antigens from *Stomoxys calcitrans* (day 40 after immunization).

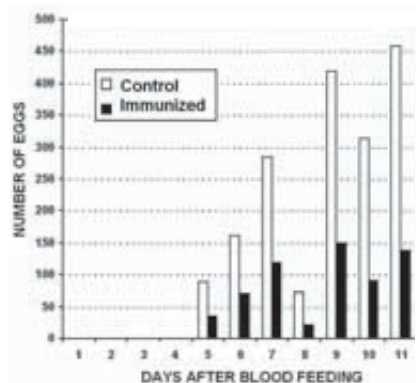


Figura 2: Número de huevos depositados por moscas del establo (200 moscas/grupo) alimentadas diariamente con sangre de *Bos taurus* inmunizado (inmunizado) o no (testigo) con antígenos de intestino de *Stomoxys calcitrans* (día 50 posinmunización).

Figure 2: Number of eggs oviposited by stable flies (200 flies/group) fed daily with blood from *Bos taurus* immunized (immunized) or not (control) with intestine antigens from *Stomoxys calcitrans* (day 50 after immunization).

The effect was more noticeable when blood from the day 50 after immunization was used. This finding is consistent with the reduction of oviposited eggs by horn flies (*Haematobia irritans*) fed on blood from immunized bovines with antigenic extracts from the intestine of this blood feeding insect species.¹³ In this context, ticks fed on bovines immunized with concealed antigens from the intestine of *Boophilus microplus*, show a lower number of oviposited eggs than that showed by ticks fed on normal animals.^{10,20,21}

The observation that a higher IgG anti-*S. calcitrans* intestine antibody titer provoked a higher reduction in the percentage of oviposited eggs, suggests that these antibodies damaged some tissue involved in the process of egg laying, or intestinal cells that resulted in a poor nutrient absorption needed for the appropriate egg production. In this context, it has been demonstrated that the larvae of the myiasis-producing fly *Lucilia cuprina*, show a retarded growth when these ingest antibodies from sheep vaccinated with intestinal peritrophic membrane extracts (PM) from the insect. These antibodies bind to the PM, reducing its permeability; as consequence, the larvae are not able to feed.²²

Likewise, serum from the bovine immunized with AgIn-Sc (day 50 after immunization) recognized, by immunoelectrotransference or Western blot, seven components in the intestinal antigen of the stable fly. In this framework, the sera from rabbits immunized with an antigenic extract of *S. calcitrans* intestine, recognized eight components in that preparation by

reconoció siete componentes en el AgIn-Sc, cuyos pesos moleculares oscilaron entre 33 y 205 kilodaltones; mientras que el suero del bovino testigo no inmunizado no reconoció ningún componente (Figura 3).

Discusión

Mortalidad de las moscas adultas

No se observó diferencia entre la mortalidad de las moscas del establo alimentadas con sangre de *Bos taurus* inmunizado con antígenos de intestino de *S. calcitrans* y la de las moscas que consumieron sangre de un bovino testigo; este resultado concuerda con el estudio realizado en moscas *Haematobia irritans* que fueron alimentadas con sangre de bovinos inmunizados o sangre de animales testigo.¹³ Es probable que los anticuerpos generados contra los AgIn-Sc, y que fueron consumidos por *S. calcitrans*, no dañaran de manera importante las funciones vitales de la mosca, o bien que se necesitaran títulos de anticuerpos más altos para observar algún efecto en la supervivencia de dichos insectos. Sin embargo, sí se observó una disminución en el número de huevos depositados por las moscas del establo que se alimentaron con sangre de *Bos taurus* inmunizado con antígenos de intestino de *S. calcitrans*. El efecto fue más notorio cuando se utilizó sangre del día 50 posinmunización. Lo anterior concuerda con los estudios en los que se observó una disminución en el número de huevos depositados por moscas del cuerno (*Haematobia irritans*) alimenta-

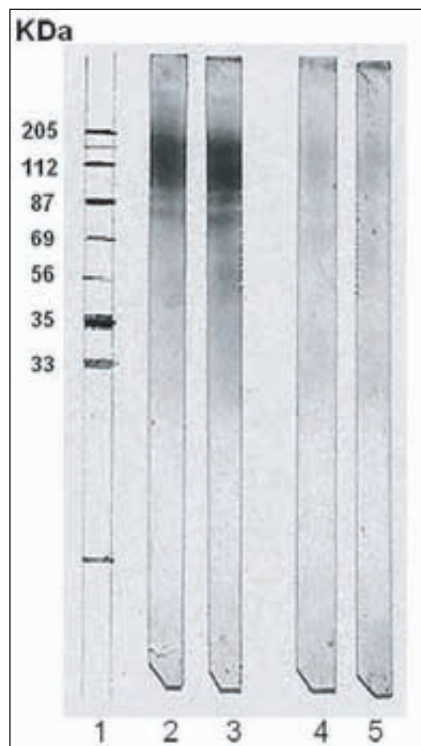


Figura 3: Reconocimiento de componentes del antígeno de intestino de *Stomoxys calcitrans* por anticuerpos IgG en el suero del bovino inmunizado (día 50 posinmunización) y del bovino no inmunizado por medio de Western blot. Carril 1: marcadores de peso molecular en kilodaltones; Carriles 2, 3: Suero del bovino inmunizado; Carriles 4, 5: suero del bovino no inmunizado.

Figure 3: Components recognized in the *Stomoxys calcitrans* intestine antigen by IgG antibodies in the serum of the immunized bovine (day 50 after immunization) and in the serum from the non-immunized bovine by Western blot. Lane 1: molecular weight markers in kilodaltons; lanes 2, 3: serum from the immunized bovine; lanes 4, 5: serum from the non-immunized bovine.

immunoelctrotransference.¹⁴ This fact suggests that the stable fly antigenic preparations used for immunization, induce the build up of antibodies to a similar number of components, both in *Bos taurus* as in *Oryctolagus cuniculus*.

On the basis of the obtained results, it is concluded that 1) the immunization procedure used in *Bos taurus* with the antigen prepared from *Stomoxys calcitrans* intestines induced the build up of anti-intestine antibodies that affected the oviposition but these did not have effect on fly survival; 2) at higher anti-*S. calcitrans* intestine IgG antibody titer a higher percentage of egg reduction was observed in the stable flies fed on blood from the immunized bovine; 3) it is suggested to carry out more studies on *Bos taurus* immunization with antigens from the intestine of *Stomoxys calcitrans*, to know in detail how this procedure could contribute as a stable fly alternative control strategy.

Referencias

- Scholl PJ, Broce AB. *Stomoxys calcitrans*. the stable fly ("Mosca de los establos"): Biology, ecology, economic importance and control. V International Seminar in Animal Parasitology. 2003 October 1-3; Mérida (Yucatán) México: Mérida (Yucatán) México: Universidad Autónoma de Yucatán; Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias; Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2003: 177-182.
- Potgieter FT, Sutherland B, Briggs HC. Attempts to transmit *Anaplasma marginale* with *Hippobosca rufipes* and *Stomoxys calcitrans*. Onderstepoort J Vet Res 1981; 48:119-122.
- Scoles GA, Broce AB, Lysyk TJ, Palmer GH. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by Dermacentor andersoni (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). J Med Entomol 2005; 42:668-675.
- Hogsette JA, Ruff JP. Stable fly (Diptera: Muscidae) migration in northwest Florida. Environ Entomol 1985; 14:170-175.
- Bishop FC. The stable fly *Stomoxys calcitrans* as an important livestock pest. J Econ Entomol 1913; 6:112-126.
- Surcouf JMR. Deuxieme note sur les conditions biologiques du *Stomoxys calcitrans* Linnaeus. Bull Mus Hist Nat Paris 1923; 29:168-172.
- Hoskins M. An attempt to transmit yellow fever virus by dog fleas *Ctenocephalides canis* Curt. and flies *Stomoxys calcitrans* Linn. J Parasitol 1933; 19:299-303.
- Haefez M, Gammal-Eddin FM. Feeding habits of *Stomoxys calcitrans* and *S. sitchensis* in Egypt. Bull Soc Entomol Egypt 1959; 43:291-301.
- Greenberg B. Flies and disease. Vol. I y II. New Jersey: Princenton University Press, 1971.
- Willadsen P, McKenna RV. Vaccination with "concealed" antigens: myth or reality? Parasite Immunol 1991; 13:605-616.
- Heath AW, Arfsten A, Yamanaka M, Dryden MW, Dale B. Vaccination against the cat flea *Ctenocephalides felis felis*. Parasite Immunol 1994; 16:187-191.
- Tellam RL, Eisemann CH, Vuocolo T, Casu R, Jarney J, Bowles V et al. Role of oligosaccharides in the

das con sangre de bovinos inmunizados con extractos antigénicos del intestino de esta especie de insecto hematófago.¹³ En este contexto, en garrapatas que se alimentan sobre bovinos inmunizados con antígenos ocultos del intestino de *Boophilus microplus*, se observa una menor oviposición que la que se presenta en garrapatas que se alimentan sobre animales normales.^{10,20,21}

La observación de que un mayor título de anticuerpos IgG antiantígeno de intestino de *S. calcitrans* provocó alto porcentaje de reducción en el número de huevos depositados sugiere que esos anticuerpos dañaron algún tejido involucrado en el proceso de oviposición o células intestinales, que dieron, como consecuencia, mala absorción de nutrimentos para la producción adecuada de huevos. En este sentido, se ha demostrado que las larvas de la mosca miasígena *Lucilia cuprina*, disminuyen su crecimiento cuando ingieren anticuerpos de borregos vacunados con extractos de la membrana peritrófica (MP) intestinal del insecto. Dichos anticuerpos se unen a la MP y reducen su permeabilidad; por consiguiente, impiden que la larva consuma comida.²²

Asimismo, el suero del bovino inmunizado con AgIn-Sc (día 50 posinmunización) reconoció, por medio de inmunoelctrotransferencia o Western blot, siete componentes en el antígeno de intestino de la mosca del establo. En este sentido, los sueros de conejos inmunizados con preparación antigénica del intestino de *S. calcitrans*, reconocieron ocho componentes en esa preparación mediante inmunoelctrotransferencia.¹⁴ Ello sugiere que las preparaciones antigénicas de intestino de la mosca del establo utilizadas para inmunización, inducen la producción de anticuerpos contra un número similar de componentes, tanto en *Bos taurus* como en *Oryctolagus cuniculus*.

Con base en los resultados obtenidos, se concluye que: 1) el proceso de inmunización utilizado en *Bos taurus* con el antígeno preparado a partir de intestinos de *Stomoxys calcitrans* indujo la formación de anticuerpos antiintestino, que no afectaron la supervivencia de la mosca pero sí la oviposición; 2) a mayor título de anticuerpos IgG antiintestino de *S. calcitrans*, habrá mayor reducción en el porcentaje de huevos en las moscas alimentadas con sangre del bovino inmunizado; 3) se sugiere llevar a cabo más estudios sobre la inmunización de *Bos taurus* con antígenos de intestino de *Stomoxys calcitrans*, para conocer con mayor detalle cómo influye este procedimiento como alternativa de control de la mosca del establo.

- immune response of sheep vaccinated with *Lucilia cuprina* larval glycoprotein, peritrophin-95. *Int J Parasitol* 2001;31:798-809.
13. Bautista CR, Giles I, Montenegro N, Figueroa JV. Immunization of bovines with concealed antigens from *Haematobia irritans*. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1026:284-288.
 14. Webster KA, Rankin M, Goddard N, Tarry DW, Coles GC. Immunological and feeding studies on antigens derived from the biting fly, *Stomoxys calcitrans*. *Vet Parasitol* 1992;44:143-150.
 15. Bailey DL, Whitfield TL, LaBrecque GC. Laboratory biology and techniques for mass producing the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae). *J Med Entomol* 1975; 12:189-193.
 16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-268.
 17. Dumenigo BE, Espino AM, Finlay CM, Mezo M. Kinetics of antibody-based antigen detection in serum and faeces of sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol* 2000; 89:153-161.
 18. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 1979; 76:4350-4354.
 19. Olivares S. Paquete de diseños experimentales FAUANL (programa de computadora) versión 2.5. Marín (NL): Facultad de Agronomía, UANL, 1994.
 20. Patarroyo JH, Portela RW, De Castro RO, Pimentel JC, Guzman F, Patarroyo ME *et al.* Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 88:163-172.
 21. Jittapalapong S, Jansawan W, Gingkaew A, Barriga OO, Stich RW. Protection of dairy cows immunized with tick tissues against natural *Boophilus microplus* infestations in Thailand. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1026:289-297.
 22. Eisemann CH, Binnington KC. The peritrophic membrane: its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropods. *Int J Parasitol* 1994;24:15-26.