

TECNICA DE MIGRACION LARVARIA MODIFICADA PARA LA OBTENCION DE LARVAS DE NEMATODOS GASTROENTERICOS EN PASTIZALES

ENRIQUE LIEBANO HERNANDEZ*

RAFAEL ANGEL MEJIA GARCIA*

La mayoría de las enfermedades parasitarias del tracto gastrointestinal de los rumiantes domésticos son causadas por nematodos pertenecientes al Orden **Strongylida** y en particular a las familias: **Ancylostomatidae**, **Strongylidae**, **Trichostrongylidae** y **Trichonematidae** (Soulsby, 1982). Estos nematodos revisten gran importancia debido a su carácter cosmopolita. Con frecuencia el ciclo biológico es monogénico o directo y la infección de los rumiantes se lleva a cabo mediante la ingestión de la larva infectante (L₃), cuyo habitat son los tallos y hojas de los pastos (Lapage, 1979).

La identificación y cuantificación de la L₃ de nematodos gastroentéricos (n.g.e.) en los pastos, tiene por objeto el estudio estadístico y cinético de la contaminación de las praderas. Lo anterior se lleva a cabo en el laboratorio con muestras de pasto provenientes de las praderas en cuestión (Euzéby, 1981).

El principio general para la extracción de las larvas contenidas en los pastos se basa en el tamaño y peso

de las mismas. Al tomar en cuenta éste, el método usual es el lavado de las muestras de pasto y el filtrado o tamizado del sedimento que contiene a las larvas. Además de este método, se pueden considerar otros dos, el primero consiste en la concentración de larvas por flotación con una solución densa y el segundo, en la combinación de los principios de flotación y sedimentación (Euzéby, 1981).

En la actualidad pocos son los trabajos relacionados con las técnicas para la extracción de larvas presentes en los pastos, se citan entre otros, a Seinhorst y Sturrock (1961), Bawden (1969), Laboratorio Central Veterinario de Weybridge (1973), Burger (1981), Bairden, Duncan y Armour (1981) y a Raynaud y Gruner (1981). La mayoría de ellos se basan en el principio general y en la técnica de Baermann, es decir, el de la migración larvaria. También se ha propuesto el uso de algunas sustancias químicas, por ejemplo, Nemeseri y Holló (1961) recomiendan utilizar formalina en diferentes diluciones para matar a los nematodos de vida libre y fitonematodos, y conservar así a las larvas infectantes, que permanecen aunque con movimientos más lentos.

* Proyecto de Parasitosis Gastroentéricas y Pulmonares de los Rumiantes. Centro de Investigación en Medicina Veterinaria del Sector Pecuário del INIFAP-SARH. Km. 15.5, Carr. México-Toluca, D.F., C.P. 05110.

El objetivo del presente estudio fue comparar la técnica de migración larvaria en pastizales con y sin tamizado, para la obtención de L_3 de nematodos gastroentéricos, para lo que se utilizó un ovino infectado por experimentación con **Haemonchus contortus**, de donde se obtuvieron las heces positivas a huevos de éste género y fueron hechos coprocultivos para recuperar las larvas L_3 . Además, se emplearon 10 muestras de pasto Kikuyo (**Panicetum clandestinum**) de 100 g cada una, recolectadas de parcelas de tipo experimental, de 1.90 m de largo por 1.40 m de ancho y libres de parásitos gastrointestinales, ubicadas en el invernadero del Centro de Investigaciones en Medicina Veterinaria del INIFAP.

Se hicieron dos grupos de cinco muestras cada uno (grupo A y grupo B). El pasto fue cortado en trozos pequeños y colocado en un lienzo de 40 x 40 cm, donde se le agregaron 2500 larvas infectadas de **H. contortus**, diluidas en 30 ml de agua y esparcidas en forma homogénea. El grupo A sólo se sometió a la técnica de Migración larvaria para forrajes y el grupo B se trabajó con esa misma técnica y además, el sedimento se pasó por tamices con aberturas de 380, 125, 44 y 10 micras.

La cantidad de larvas recuperadas y sus porcentajes correspondientes en cada técnica se muestran en el Cuadro 1. Se realizó la prueba T de Student a los resultados obtenidos en las dos técnicas y se comprobó que no hubo diferencia estadística significativa ($P > 0.01$) en cuanto al número de L_3 recuperadas. En el presente estudio se recuperaron 58.98% y 51.89% del total de L_3 incorporadas. Estos resultados son similares al obtenido por Bairden, Duncan y Armour (1981), quienes encontraron un 60% de recuperación de larvas con

una técnica de tamizado. Raynaud y Gruner (1981) al comparar tres técnicas para detectar si en una pradera hay larvas, observaron que se pueden recuperar hasta un 80% de las larvas, con la técnica de "Soaking". Por el contrario, con la técnica del Laboratorio Central Veterinario de Weybridge (1971), se logran recoger sólo el 40% de las larvas de la muestra.

En cuanto al grado de limpieza que presentaron los sedimentos que se tamizaron, se observó una mínima cantidad de detritos del suelo, lo cual agiliza y facilita la lectura del sedimento y detección de las larvas. Al contrario de lo esperado, sí lograron pasar larvas a través del tamiz de 10μ , aún cuando en promedio las larvas miden 20μ de ancho. Esto puede deberse a la flexibilidad de la cutícula larval. A este respecto, Bawden (1969) recomienda utilizar una serie de tamices y usar por último filtros "Millipore" con aberturas también de 10μ , aunque el uso de estos filtros aumenta en forma considerable el costo de la técnica.

Otra ventaja del método con tamizados recomendado aquí, es el tiempo que se emplea en el manejo de las muestras. En total (Baermann con tamizado, lectura, recuperación e identificación de larvas) se requieren cerca de 28 horas (por estar más limpia la muestra), y sin tamizar se necesita esperar hasta 32 horas. A este respecto, Burger (1981) emplea un tiempo promedio de 10 horas en el manejo e identificación de sus muestras, sólo que requiere de equipo (revolvedora eléctrica) y reactivo (sulfato de magnesio) más costosos. Raynaud y Gruner (1981) con su técnica de "Soaking", necesitan un mínimo de dos días y Seinhorst y Sturrock (1961) mencionan una duración de dos a cuatro días para realizar su técnica.

CUADRO 1. RECUPERACION DE LARVAS DE Haemonchus spp. MEDIANTE DOS TECNICAS DE MIGRACION LARVARIA.

Nº de MUESTRAS DE PASTO.		Nº DE L ₃ DOSIFICADAS/ MUESTRA.	TECNICA A		TECNICA B	
			Migración larvaria para forrajes Cantidad de L ₃ recuperadas	%	Migración larvaria más tamizado Cantidad de L ₃ recuperadas	%
A1	B1	2500	1518	60.72	1024	40.96
A2	B2	2500	1910	76.40	965	38.60
A3	B3	2500	1179	47.16	1491	59.64
A4	B4	2500	1458	58.32	1724	68.96
A5	B5	2500	1308	52.32	1283	51.32
PROMEDIO TOTAL				58.98	51.89	

No existió diferencia estadísticamente significativa entre las dos técnicas ($P > 0.01$).

A = Técnica de Migración Larvaria simple.

B = Técnica de Migración Larvaria más Tamizado.

SUMMARY

A experiment was performed in order to modified the simple Migration Larvae Technique for the obtention and cuantification of the infective larvae (L₃) of gastrointestinal nematodes present in grass. The samples of grass were collected from experimental plots free of infective larvae of gastrointestinal nematodes. Two groups were formed, A and B and both were divided into five samples of 100 g of grass. The grass was cut in small sections and covered with gauze. Two thousand five hundred L₃ of **Haemonchus** spp. obtained from experimentally infected sheep were added to each sample. A conventional Migration Larvae Technique was used for the samples from group A and the same technique plus filtration for those of group B. After 24 hours the sediments obtained from group A were observed directly under the stereomicroscope, and all the L₃ present were collected. Those sediments obtained from group B were passed through the test sieves, observed and the L₃ was also collected. A percentage of 58.98 and 51.98 of L₃ were recovered from groups A and B respectively. There was no statistical significance between the techniques (P>0.01). When the Migration Larvae Technique plus filtrate was used the sediment obtained was cleaner, thus the larvae were easier to observe and collect under the stereomicroscope.

LITERATURA CITADA

BAIRDEN, K., DUNCAN, J.L. and ARMOUR, J., 1981. A technique for the recovery of infective trichostrongyle larvae from soil. En: Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science. Vol. 9. Epidemiology and Control of Nematodiasis in Cattle. P. Nansen, R.J. Jorgensen, E.J.L. Soulsby (editors). **Martinus Nijhoff Publishers**. Brussels-Luxembourg. p. 31.

BAWDEN, R.J., 1969. A rapid technique for the recovery of Strongyloid larvae from pasture samples. **Aust. Vet. J.** 45:228.

BURGER, H.J., 1981. Experiences with our techniques for the recovery of nematode larvae from herbage. En: Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science. Vol. 9. Epidemiology and Control of Nematodiasis in Cattle. P. Nansen, R.J. Jorgensen, E.J.L. Soulsby (editors). **Martinus Nijhoff Publishers**. Brussels-Luxembourg. p. 25.

EUZEBY, J., 1981. Diagnostic Experimental des Helminthoses Anmales (Animaux domestiques-Animaux de laboratoire-Primates). Travaux Pratiques d'Helmintologie Veterinaire. Livre I: Generalités. Diagnostic *ante-mortem*. Edition "Informations Techniques des Services Veterinaires". **Ministere de l'Agriculture**. Paris, p. 154.

LAPAGE, J. 1979. Parasitologia Veterinaria. 5a. Impresión. **C.E.C.S.A.**, México, p. 122.

MANUAL DE TECNICAS DE PARASITOLOGIA VETERINARIA. Laboratorio Centro Veterinario (Weybridge, Gran Bretaña). 1973. (Traducido por Tarazona Villas J.M.). **Editorial Acribia**. Zaragoza, España. pp. 20, 53, 54 y 55.

NEMESERI, L. y HOLLO, F., 1961. Diagnóstico Parasitológico Veterinario. **Editorial Acribia**. Zaragoza, España. p. 81.

RAYNAUD, J.P. and GRUNER, L., 1981. Comparison of techniques for assessment of the contamination of pasture herbage with infective nematode larvae. En: Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science. Vol. 9. Epidemiology and Control of Nematodiasis in Cattle. P. Nansen, R.J. Jorgensen, E.J.L. Soulsby (editors). **Martinus Nijhoff-Publishers**. Brussels-Luxembourg. p. 51.

SEINHORST, J.W. and STURROCK, R.F., 1961. The quantitative use of the Seinhorst "mistifer" to recover nematodes from soil, faeces and herbage. **J. Helmin.**, 35:309.

SOULSBY, E.J.L., 1982. Helminths, Arthropods and protozoa of domesticated animals. 7th. edition. **Bailliere Tindall**. London.