

Cultivo e Identificación de Larvas Infectantes de Nematodos Gastrointestinales del Bovino y Ovino.



Román Niec
Doctor en Medicina
Veterinaria

Instituto de Patología Animal, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Secretaría de Estado de Agricultura y Ganadería de la Nación, República Argentina (1968)

Resumen

Se describen brevemente los caracteres diferenciales de las larvas infectantes de nematodos gastrointestinales más comunes de bovinos y ovinos, tomando como punto básico de referencia el largo de "la cola de la vaina larval" (distancia entre ano y punta de la vaina).

Otros caracteres adicionales facilitan la clasificación: cavidad bucal, células intestinales, cola de la larva y ciertas medidas.

Se relata una técnica para el cultivo y recuperación de larvas en el laboratorio.

Se dan algunas medidas de larvas, según varios investigadores y las obtenidas por el autor sobre material proveniente de la provincia de Buenos Aires, República Argentina.

Summary:

"Cultivation and identification of infective larvae of gastro-intestinal nematodes in cattle and sheep".

Differential characters of infective larvae of some of the most common nematodes parasitic in cattle and sheep are described. The tail of "larval sheath" (the distance between the anus and the top of the sheath tail) is considered a basic reference.

Other additional outstanding features make classification easier: bucal cavity, intestinal cells, larva tail and some measures.

A technique for cultivation and recuperación of larvae under laboratory conditions is described.

According to several investigators, certain larvae measures and also those obtained by the author from material collected in the province of Buenos Aires, Argentina, are given.

Introducción:

La importancia práctica del conocimiento del cultivo, recolección y clasificación de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales del bovino y ovino, nos ha movido a publicar el presente trabajo. Creemos

cumplir así, con una necesidad, ya que no hemos hallado literatura de habla castellana que se refiera al tema.

En el último decenio la parasitología veterinaria ha tomado nuevas orientaciones, tanto en las labores rutinarias como en el campo de la investigación. Uno de los capítulos de la parasitología, la "Helmintología", ha progresado con el descubrimiento de nuevas drogas de más amplio espectro antihelmíntico. Las investigaciones sobre inmunología en parasitología también han logrado ya la obtención de vacunas a base de larvas irradiadas, contra la bronquitis verminosa de los bovinos y ovinos. Los temas mencionados no se pueden desarrollar sin el dominio del ciclo biológico de los parásitos, el cultivo en el laboratorio de sus formas evolutivas, infectantes y por consiguiente la diferenciación de ellas. El punto de partida en investigaciones sobre ecología de los nematodos gastrointestinales de los rumiantes, es el conocimiento de la morfología de los estados larvales infectantes (L 3) de estos parásitos.

En la práctica, la determinación del tipo de infección parasitaria tiene mucha importancia, dado el diferente poder patógeno de las especies y su desigual sensibilidad frente a la acción de los diversos antihelmínticos. El análisis de materia fecal (ovina o bovina) efectuado solamente en base a la cantidad de huevos de nematodos gastrointestinales, no es completo porque no nos permite diferenciar en muchos casos las especies de parásitos presentes. Varios de ellos tienen huevos microscópicamente muy parecidos y sólo los cultivos de larvas, a partir del material en examen, nos permite determinar el porcentaje de cada tipo de larvas presentes, estableciendo así, luego, la cantidad de huevos de cada grupo por gramo de materia fecal.

Conociendo las características diferenciales que nos permitan clasificar las larvas L 3, podremos también establecer el grado y tipo de contaminación larval de una pastura.

Reseña del ciclo evolutivo de los nematodos gastrointestinales de los rumiantes.

Los huevos de nematodos gastrointestinales son expulsados del organismo del animal parasitado con las heces y sembrados sobre el campo. Al ser eliminados se encuentran en estado de división (embriogénesis), salvo los de *Strongyloides papillosus* que ya contienen larvas (L 1) formadas.

En condiciones adecuadas de humedad y temperatura, en 1-2 días desarrolla el embrión dentro del huevo y eclosiona una larva de primer estado (L 1). La estructura de esta larva es muy simple; posee cavidad bucal y esófago bulboso (rabditiforme) provisto de un aparato valvular característico en forma de Y al que sigue un intestino simple de luz bien visible, que termina en el ano. Dentro del cuerpo de las larvas se ven granulaciones de sustancias nutritivas. Esta larva de primer estado se alimenta con las sustancias contenidas en las materias fecales y con

bacterias, esporas de hongos y agua. Se mueve bastante, pero no tiene la facultad de trepar a los pastos. Pasado un tiempo, y después de un breve período de inmovilidad (algunas horas), especie de letargo, la larva sufre una primera muda y cambia su envoltura, transformándose en larva de segundo estado. Su morfología es muy semejante a la larva primera, solamente que es mucho más grande y su esófago es menos rabadiforme, pero con aparato valvular bien visible. Se alimenta en forma similar a la L 1.

Después de 2-3 días, las larvas de segundo estado (L 2) sufren una nueva muda convirtiéndose en larvas de tercer estado o larvas infectantes (L 3). Estas conservan la envoltura de la L 2, la que le sirve de protección contra los factores externos: frío, calor, sequedad, etc.

La L 3 no se alimenta del mundo externo, consumiendo en cambio sus reservas contenidas en las células intestinales. Por esta razón las larvas jóvenes son más oscuras que las viejas, en las que las granulaciones alimenticias de reserva han desaparecido. Las larvas infectantes son muy activas, pudiendo trepar por los tallos y subir a las hojas de pasto. En los cultivos artificiales se las puede encontrar en las gotas de agua condensada.

Las larvas infectantes constituyen la última etapa del ciclo biológico fuera del huésped definitivo, el rumiante, ovino o bovino. Ingeridas con el pasto penetran en la mucosa del cuajo e intestino, donde sufren dos mudas más, convirtiéndose en larvas de cuarto y quinto estado y finalmente en los nematodos maduros, formas sexuales. El ciclo biológico completo varía según la especie desde más o menos 17 días (*Cooperia* spp.) hasta 25-45 días (*Nematodirus* spp.).

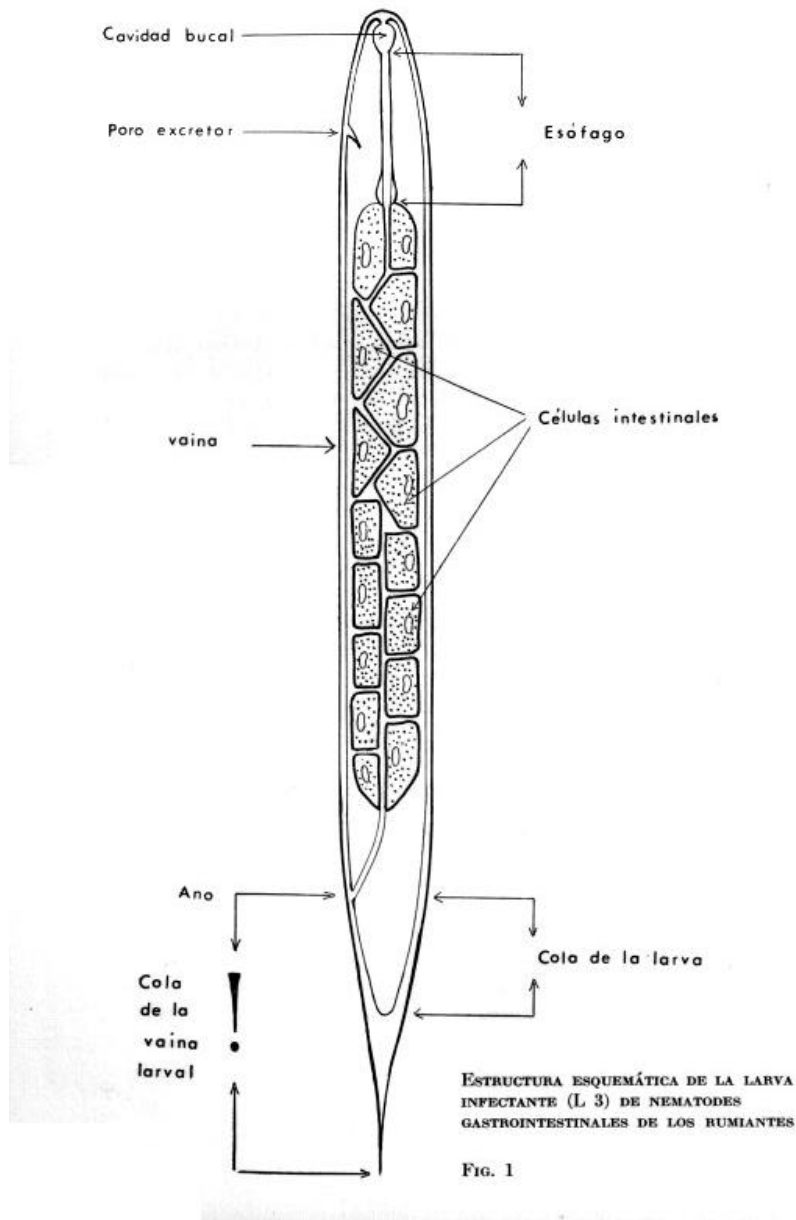
En las descripciones de las larvas infectantes de nematodos gastrointestinales de bovinos y ovinos se señalarán solamente aquellos caracteres morfológicos que nos pueden orientar para la ubicación y clasificación dentro de un grupo o de una especie.

La envoltura de la segunda muda ("vainita"), nos sirve como punto de referencia para la clasificación de las larvas infectantes de nematodos gastrointestinales de los ruminantes.

Los orificios naturales (boca, ano) de la larva propiamente dicha están encerrados por la "vainita" de la segunda muda que no se ha desprendido, pero son igualmente visibles y nos sirven de puntos de referencia para la clasificación y diferenciación. La cavidad bucal de la L 3 es menor que la de L 2, siendo característica para ciertas especies o faltando en otras (por ej., en *Trichostrongylus*). El esófago de la larva infectante es filiforme, sin pronunciada deformación bulbosa y sin aparato valvular. Las células intestinales dorsales y ventrales, de diferentes formas (triangulares, rectangulares o pentagonales) son bien diferenciables. La cantidad de éstas, es característica para cada especie.

RED DE HELMINTOLOGIA PARA AMERICA LATINA Y EL CARIBE
Cultivo e Identificación de Larvas Infectantes de Nematodos Gastrointestinales del
Bovino y Ovino. Dr. Roman Niec (INTA - ARGENTINA)

En esta publicación llamaremos "cola de la vaina larval" a la distancia que media entre el ano de la larva y la punta de la cola de la vaina. (Fig. 1).



Para la diferenciación, también tiene importancia considerar el largo total de la larva (vaina) y en ciertos casos el del esófago.

Cultivo de larvas de nematodos gastrointestinales.

Existen varios métodos de cultivo de larvas, partiendo de huevos de nematodos, que se encuentran en calidad y cantidad variable en las heces, o a partir de huevos obtenidos de hembras maduras de parásitos. Todos los métodos se basan sobre los mismos principios: permitir que maduren y eclosionen los huevos de nematodos y que desarrollen las larvas, gracias a condiciones favorables, evolucionando hasta larvas infectantes.

El éxito del cultivo depende de tres factores: humedad, temperatura adecuada y oxigenación. Las materias fecales demasiado secas deben humedecerse, las demasiado húmedas o diarreicas deben consolidarse. Como materia consolidante se puede usar: carbón vegetal, musgo estéril, o materia fecal bovina u ovina previamente desecada, esterilizada a 140-150° C y posteriormente pulverizada. Es necesario comprobar la

CULTIVO DE LARVAS SEGÚN TÉCNICA DE
B. CORTICELLI Y M. LAI

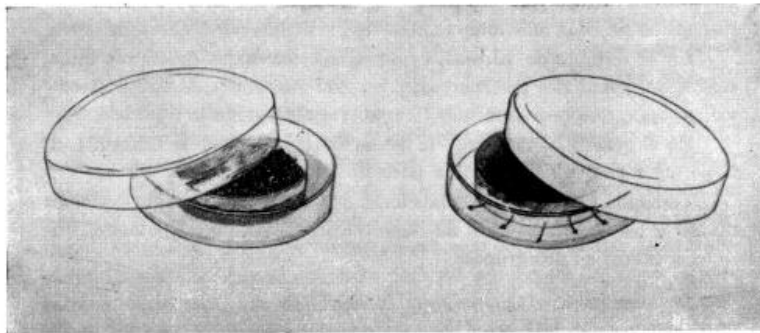


FIG. 2

esterilidad de este material, sometiéndolo a cultivo. El agua para cultivos, puede ser esterilizada o de canilla, pero sin rastros de cloro, cuya presencia mata a las larvas de primer y segundo estado. El agua proveniente de tanques debe ser examinada por la posible presencia de nematodos de vida libre y en tal caso, hervida y filtrada.

Comparando varios sistemas de cultivo, hemos adoptado el método de Corticelli y Lai (1963), el cual es una modificación del de Roberts y O'Sullivan (1950).

El procedimiento de Corticelli y Lai consiste en el uso de dos cajas de Petri. Una de tamaño corriente (10 cm de diámetro) que contiene el material en cultivo y va colocada dentro de otra mayor (15 cm de diámetro) con agua a altura de 1 cm, aproximadamente. La caja menor va sin tapa, la grande tapada. Así formada una "cámara húmeda" con el cultivo, se coloca en estufa oscurecida, a temperatura de 24-27° C durante 7-8 días, o en temperatura ambiente (10-15° C) durante diez

días. Diariamente se destapa la caja grande durante 1-2 horas para airear el cultivo. Hemos observado que variaciones de temperatura (3-4° C) parecen favorecer el cultivo, más bien que la temperatura constante. Transcurridos 8-10 días, se invierte la caja chica con cultivo dentro de la grande y se deja más o menos doce horas, término durante el cual la mayoría de las larvas pasan al agua. Por sedimentación y/o centrifugación se concentran las larvas. Observamos que con este método se recupera un mayor porcentaje de larvas y además se obtiene una suspensión de ellas más limpia, libre de partículas orgánicas y de tierra.

En el término de 10 días, evolucionan casi todas las larvas infectantes de nematodos gastrointestinales, con excepción de las de *Nematodirus* spp., que necesitan más tiempo, variable según la especie.

En el género *Nematodirus* la evolución larval desde L 1 hasta L 3, tiene lugar dentro del huevo de parásito.

Tomando en cuenta las condiciones de evolución y eclosión podemos dividir a las cuatro especies de *Nematodirus*: *helvetianus*, *spathiger*, *filicollis* y *battus*, en dos grupos:

1) *Nematodirus helvetianus* y *N. spathiger*, los dos cultivan entre 22-24° C, llegando a L3; el primero comienza a eclosionar a los ± 10 días; el segundo a partir de los 14-15 días, ambos en forma espontánea.

2) *Nematodirus filicollis* y *N. battus*, cultivan en ± 27-30 días entre 22-24° C. Las dos especies necesitan para eclosionar un estímulo, sea mecánico o térmico. El estímulo mecánico se logra en el laboratorio sacudiendo la suspensión con huevos larvados, mediante perlas de vidrio de 3-4 mm de diámetro. El térmico, sometiendo el cultivo a temperaturas mayores (36-38° C) o mediante un cambio brusco alternado, -2° C y 21° C. De ambas maneras se logra la eclosión de las larvas infectantes incluidas en los huevos.

En la práctica, si nos interesa obtener cultivos de larvas de *Nematodirus* spp., una vez recuperadas las larvas de nematodos (a los 8-10 días de cultivo), se deja nuevamente el material en estufa unos veinte días más; por último se aplica el estímulo (térmico o mecánico) para provocar la eclosión de las larvas.

Recuperación de larvas del cultivo.

En casi todos los métodos la recuperación de larvas se obtiene utilizando el clásico aparato de Baermann. Por su hidrotropismo positivo las larvas pasan del material de cultivo al agua. El material cultivado se coloca sobre una malla metálica de abertura entre hilos de unos 150 micrones (100 meshes), o dentro de una bolsita de gasa sumergida en un embudo con agua entibiada. Las larvas caen al fondo y son recolectadas a las 24 horas y posteriormente centrifugadas 3-4 minutos a 1.500 revoluciones

por minuto. Este método tiene un inconveniente, pues junto con las larvas, decantan partículas orgánicas o inorgánicas que obstaculizan el examen posterior.

El procedimiento empleado en nuestro Instituto es el siguiente: El agua, que contiene las larvas recuperadas con el método Corticelli-Lai anteriormente mencionado, libre de partículas gruesas, es vertida en un vaso cónico poniéndolo por 1-2 horas en la heladera a 4° C. Las larvas, inmovilizadas por el frío, se juntan en el fondo del recipiente. Decantado el líquido superior por sifonaje, se deja un residuo de 20-30 cc. el que es centrifugado durante 3' a 1.500 r.p.m. Con pipeta se extrae el líquido del tubo de centrifuga dejando un culote de unas décimas de centímetro cúbico, que contiene las larvas aptas para el examen inmediato o posterior. Mantenidas en agua, las larvas se conservan durante mucho tiempo a 4° C. Esta temperatura las inmoviliza, ahorrando sus reservas alimenticias. Muchas especies mantienen su vitalidad durante varios meses, otras no resisten tanto, pero de igual modo pueden ser diferenciadas en los exámenes en base a su estructura morfológica.

Aquí podemos mencionar el diferente grado de resistencia de algunas especies, tal el caso de *Nematodirus* spp. que puede resistir uno o dos años en las praderas. En nuestras observaciones hemos podido comprobar que cierto porcentaje de L3, mantenidas a temperatura de 1° C, se conservan vivas después de 8 a 12 meses (*Oesophagostomum* spp.) y de 18 meses (*Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oncophora* y *punctata*). Las larvas de *Strongyloides papillosus* y de *Haemonchus* spp., en cambio, son más sensibles al frío y al calor.

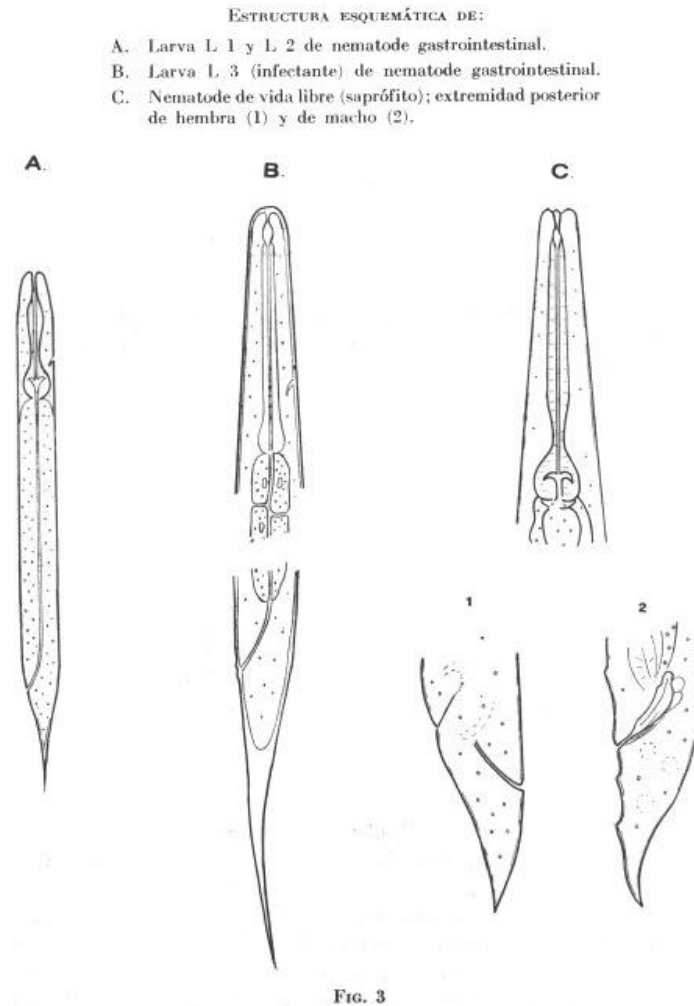
Examen

El material en examen debe ser lo más limpio posible, desprovisto de partículas extrañas que obstaculicen el campo visual. Los cultivos obtenidos a partir de materia fecal recolectada del suelo o los lavados de pasto para clasificación y cuenta de larvas infectantes, están siempre contaminados con larvas y nematodos de vida libre que dificultan u obstaculizan la observación microscópica. (Fig. 3).

La purificación de esos materiales contaminados se consigue volcando el material en capa fina, sobre papel de filtro o secante. Los nematodos saprófitos y las larvas de vida libre, expuestos durante 3 a 5 horas a temperatura de 35° C, en su mayoría mueren, mientras que las larvas infectantes de nematodos gastrointestinales resisten y pueden ser recuperadas con el sistema de Baermann anteriormente mencionado. Conviene utilizar para los exámenes cultivos frescos, pues las larvas mantenidas mucho tiempo en heladera, presentan deformaciones tanto en su estructura interna como en sus proporciones, que dificultan el diagnóstico.

RED DE HELMINTOLOGIA PARA AMERICA LATINA Y EL CARIBE
Cultivo e Identificación de Larvas Infectantes de Nematodos Gastrointestinales del
Bovino y Ovino. Dr. Roman Niec (INTA - ARGENTINA)

Para poder apreciar los detalles morfológicos de las larvas se las debe inmovilizar. Existen dos métodos, cada uno de ellos con ventajas e inconvenientes:



1) Por calentamiento cuidadoso del material sobre el portaobjeto, pasando la suspensión de larvas sobre la llama, ellas mueren con su cuerpo estirado, lo que facilita las mediciones, pero en cambio se altera un poco la estructura por el calor.

2) Mediante el tratamiento con solución yodoiodurada (Yodo 2 gr, Yoduro de potasio 4 gr, agua 100 cc.), las larvas mueren, pero quedan algo incurvadas; sin embargo, la coloración de contraste que ellas toman, facilita la observación de los detalles morfológicos y permite diferenciar a las larvas infectantes, de los nematodos y larvas de vida libre. Las primeras, protegidas por la vaina de la segunda muda, se conservan más

claras, en cambio los últimos se colorean íntegramente de color marrón claro u oscuro. Las larvas infectantes, si son expuestas a fuerte concentración o a prolongada acción de solución yodoiodurada, toman también un color marrón bastante intenso pero manteniendo siempre sus caracteres morfológicos diferenciales.

Para fines especiales, como obtención de larvas puras de una determinada especie, con la finalidad de infectar, por ejemplo, animales de experiencia (evaluación de antihelmínticos, estudios inmunológicos, etc.), tenemos que partir de cultivos de huevos obtenidos de hembras maduras de dicha especie. Estas se lavan bien y se dejan en solución fisiológica en estufa de 35° C, aproximadamente por uno o dos días. De este modo se provoca la maduración de los huevos y oviposición. Por último, las hembras son disecadas y los huevos contenidos en ellas junto con los obtenidos anteriormente, se ponen en cultivo en materia fecal esterilizada, desecada y molida, por espacio de 8 a 10 días a 24-25° C.

Clasificación.

De la larga lista de investigadores que con sus publicaciones aportaron datos referentes al ciclo biológico de los Nematelmintos y describieron sus formas evolutivas -las larvas- mencionaremos algunos:

En 1906-1907 Ramson describió el ciclo evolutivo del *Haemonchus contortus*. En 1913, Maupas y Seurot describieron las características diferenciales del *Nematodirus mauritanicus*, *N. filicollis* y *Ostertagia marshalli*. Estos autores fueron los primeros en llamar la atención sobre el número de células intestinales como carácter diferencial para distinguir a ciertas especies. Luego siguieron los trabajos de Boulenger (1915) sobre ciclo evolutivo de *Nematodirus filicollis*, de Veglia (1924) sobre formas libres de *Oesophagostomum columbianum*, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus extenuatus* y *Strongyloides papillosus*. Cameron (1926) describe la larva de *Chabertia ovina* y Morgan (1928) la de *Ostertagia circumcincta*. Veglia fue el primero que comprobó que las larvas maduras de la mayoría de los nematodos que infectan a los rumiantes, pueden ser diferenciadas en base a sus caracteres constantes, entre éstos, el largo y forma de la cola. Posteriormente Morgan (1930), Monnig (1931), Gordon, Dickmans y Andrews (1933), Keith (1952), Wertejuk (195:5), Borchert (1959), Corticelli y Lai (1964) y otros publicaron trabajos sobre el tema.

La mayoría de los métodos de clasificación de las larvas infectantes de nematodos gastrointestinales se basan sobre mediciones totales y parciales de órganos. Nosotros encontramos más prácticos y aplicables los métodos de Wertejuk y de Corticelli y Lai, que se basan sobre las diferencias morfológicas de las larvas, principalmente sobre el largo de la cola de la vaina. Solamente en algunos casos las mediciones nos dan una información adicional.

RED DE HELMINTOLOGIA PARA AMERICA LATINA Y EL CARIBE
Cultivo e Identificación de Larvas Infectantes de Nematodos Gastrointestinales del
Bovino y Ovino. Dr. Roman Niec (INTA - ARGENTINA)

En forma gráfica (fig. 4), que consideramos más didáctica, damos una clave-guía para clasificación de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales del bovino y ovino.

De acuerdo al largo de la cola de la vaina larval, formamos tres principales grupos:

- a) Larvas con cola de vaina corta;
- b) Larvas con cola de vaina mediana;
- c) Larvas con cola de vaina larga.

En el grupo a, de cola corta, ubicamos a las larvas de: *Trichostrongylus* (*axei*, *colubriformis* y *vitrinus*) y *Ostertagia* (*circumcincta* y *ostertagi*). En el grupo b, de cola mediana, incluimos *Haemonchus* (*contortus* y *placei*) y *Cooperia* (*oncophora*, *punctata* y *ssp.*).

Al grupo c, de cola larga, pertenecen: *Nematodirus* (*spathiger*, *battus*, *fillicolis* y *helvetianus*), *Oesophagostomum* (*radiatum* y *venulosum*) y *Chabertia ovina*.

Fuera de los tres grupos mencionados debemos considerar por separado a la L 3 de *Strongyloides papillosus* y *Bunostomum spp.*

Las larvas de *Strongyloides papillosus* son características por: su pequeño tamaño ($\pm 600\mu$), su largo esófago filiforme (1/3 de cuerpo), falta de vaina larval y terminación trifurcada de la cola, que las hacen fácilmente distinguibles de las larvas de otras especies.

La larva de *Bunostomum spp.* es una de las más pequeñas L 3 (*B. trigonocephalum* 507-678 μ , *B. phlebotomum* 443-647 μ). Contiene dieciséis células intestinales poco evidentes; cavidad bucal en forma de embudo con engrosamiento cuticular. Esófago bastante largo, marcadamente bulboso. La cola de la vaina larval muy fina, larga en proporción con el largo total de la larva.

Dentro de cada grupo de larvas, podemos diferenciar a las especies en base a ciertos detalles morfológicos, por ejemplo:

En el grupo de colas cortas tenemos que buscar puntos de referencia para poder distinguir las larvas de *Trichostrongylus spp.* de las de *Ostertagia spp.*

En general las larvas de *Trichostrongylus* son más chicas y de ancho proporcionalmente mayor que las de *Ostertagia*. Los dos grupos tienen dieciséis células intestinales. La terminación de la cola de la vaina de *Trichostrongylus spp.* es más corta y cónica. En cambio la cola de *Ostertagia* es más filiforme en la mayoría de los casos, y posee una característica desviación a la altura de la punta de la cola de la larva propiamente dicha. En caso de duda, midiendo el largo de la cola de la vaina larval podemos orientarnos para la diferenciación, ya que la del *Trichostrongylus colubriformis* generalmente no llega a los 100 micrones (85-105 μ); la del *Trichostrongylus axei* es más larga que la del *Tr. colubriformis* y mide entre 80-110 μ ; la de *Ostertagia circumcincta* es de

RED DE HELMINTOLOGIA PARA AMERICA LATINA Y EL CARIBE
 Cultivo e Identificación de Larvas Infectantes de Nematodos Gastrointestinales del
 Bovino y Ovino. Dr. Roman Niec (INTA - ARGENTINA)

**CLAVE PARA IDENTIFICACION DE LARVAS INFECTANTES DE NEMATODES
 GASTROINTESTINALES DE BOVINOS Y OVINOS**

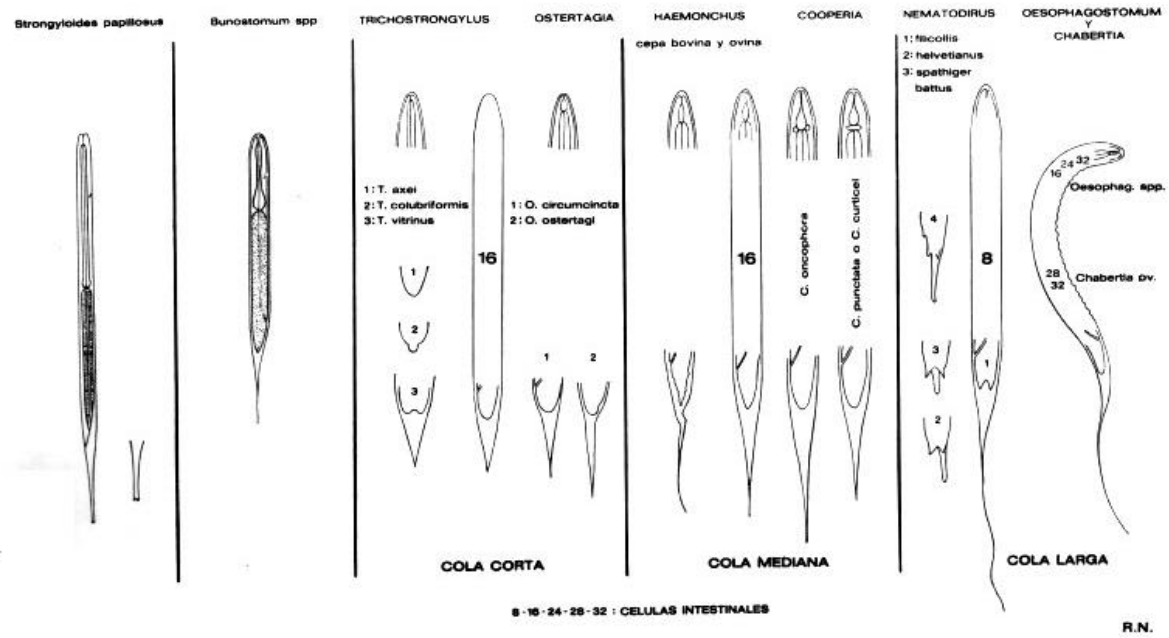


FIG. 4

alrededor de 100 μ (94-128) y la de *Ostertagia ostertagi* oscila entre 110-170 μ .

Otro detalle morfológico nos ayuda para distinguir las larvas de *Trichostrongylus* de las de *Ostertagia*. En las de este género se puede observar la presencia de cavidad bucal; en cambio la extremidad anterior de las del género *Trichostrongylus* es muy simple, sin cavidad bucal. La forma de la terminación de la cola de la larva propia, nos permite diferenciar las especies dentro de los géneros *Trichostrongylus* y *Ostertagia*.

Dentro del grupo de colas medianas tenemos dos géneros: *Haemonchus* y *Cooperia*, cuyas larvas poseen dieciséis células intestinales. Las de *Cooperia* son generalmente más grandes que las de *Haemonchus*; además, en el lugar donde la cavidad bucal termina y comienza la faringe, poseen una cinta fibrinosa, la que se ve como dos puntos refringentes o como una línea clara.

No todas las especies del género *Cooperia* son diferenciables entre sí. Las L 3 de *C. oncophora* son las más robustas de todas las del género: sus colas de vainas larvales, de terminación obtusa, son relativamente largas (dentro del grupo de las colas medianas). Las restantes especies del género, muestran colas de vainas larvales más cortas proporcionalmente que las de *C. oncophora* y además terminan en punta aguda.

El origen del material en examen nos orienta para la diferenciación de las especies de *Cooperia*. Ejemplo: si en un coprocultivo de ovino observamos larvas de *Cooperia*, cuyas colas de vaina terminan en punta aguda, podemos suponer que se trata de *C. curticei*, por ser un parásito frecuente de los ovinos. En cultivo de heces de bovino, además de L 3 de *C. oncophora*, fáciles de reconocer, se pueden hallar larvas de otras especies tales como: *C. punctata*, *C. pectinata* o *C. zurnabada*. Estas tres larvas son similares y prácticamente no diferenciables entre sí. En cultivos a veces hemos notado ciertas diferencias en el tamaño y ubicación de los puntos refringentes -típicos para el género- y en la forma y largo de la cola de la vaina larval, que posiblemente pudieran ser caracteres diferenciales no bien establecidos aún.

Determinadas las especies que parasitan a los rumiantes en una zona, será más fácil la clasificación de las larvas infectantes del género *Cooperia* que se observen en el coprocultivo.

Dentro del género *Haemonchus*, las larvas de *H. placei* (cepa bovina) son mayores que las de *H. contortus* (cepa ovina). Ambas poseen colas de vaina larval filiformes y de terminación fina, pero la de *H. placei* es más larga.

Tercer grupo: larvas infectantes con colas de vaina larga. Este grupo comprende a los géneros *Nematodirus*, *Oesophagostomum* y *Chabertia* ovina.

Las larvas de *Nematodirus* spp. son las más grandes de todas las que parasitan a los rumiantes. Se diferencian de las otras del grupo por

poseer sólo ocho células intestinales, mientras que las de *Oesophagostomum* suelen tener 16-24 ó 32, según la especie y las de *Chabertia ovina* 28-32.

Las larvas de *Oesophagostomum* spp. muestran una envoltura gruesa y ondulada. Son bastante anchas y generalmente toman el aspecto incurvado de una letra C, después de la fijación.

Las larvas de *O. radiatum* pueden tener 16-24-32 células intestinales; las de *O. venulosum* tienen 32 y las de *O. columbianum* 16-24 (más frecuentemente 16).

Resulta difícil la diferenciación entre larvas de *Oesophagostomum venulosum* y *Chabertia ovina*. La mayoría de los autores (Wertejuk, Keith, Cameron) consideran que las larvas pertenecientes a este grupo, menores de 700 micrones, son larvas de *Chabertia ovina*. Las larvas mayores de 800 micrones se consideran como *O. venulosum*. Las larvas pertenecientes a este grupo cuyas medidas oscilan entre 700 y 800 μ de largo no son diferenciables entre sí.

Ecdisis (desenvainamiento de las larvas infectantes).

La forma del extremo posterior de la larva propiamente dicha (cola larval) nos permite en muchos casos llegar a la clasificación de la especie dentro de un género. Para poder observar bien dicha terminación a veces es necesario provocar la ecdisis de las larvas, es decir despojarlas de su envoltura protectora o sea de su vaina. Con tal fin empleamos una solución de hipoclorito de sodio al 5 %, poniendo una gota sobre el preparado. Ya a los uno a dos minutos las larvas comienzan a abandonar sus envolturas.

En base a la diferente terminación de la cola de la larva propiamente dicha, podemos distinguir, dentro del género *Trichostrongylus* las especies *T. axei*, *T. colubriformis* y *T. vitrinus*. Dentro de las *Ostertagia*: *O. ostertagi* de *O. circumcincta*. Las cuatro especies de *Nematodirus* que suelen infectar a los rumiantes: *N. filicollis*, *spathiger*, *battus* y *helvetianus*, son fácilmente diferenciables por sus terminaciones de cola larval muy características.

Algunas observaciones de carácter práctico.

Para el examen y clasificación de larvas infectantes, conviene iniciar la observación con débil aumento (40 x). De este modo se aprecian mejor: el aspecto general de las larvas, su largo total y ancho, y lo más importante, la proporción entre el largo de la cola de la vaina y el largo total de la larva. Una vez ubicada dentro de uno de los tres grupos (cola larga, mediana o corta), se examina con mayor aumento para observar: forma de la extremidad anterior, existencia de cavidad bucal, forma de la

misma, cantidad de células intestinales, terminación de la cola larval y, por último, forma de la cola de vaina larval.

Resulta práctico utilizar cubreobjetos de 24 X 40 mm que abarcan un campo más amplio. Colocada una gota del líquido que contiene a las larvas en suspensión, se observa primero el estado en que se presentan, su vitalidad, movimiento, etc. Luego se las fija, ya sea por el calor o agregando una pequeña gota de la solución yodoiodurada como indicamos anteriormente, para observar los detalles morfológicos.

Las larvas infectantes de parásitos gastrointestinales del vacuno son generalmente más grandes que las de ovino. Las que se recuperan del pasto son, por lo general, de tamaño mayor que las cultivadas en laboratorio. Posiblemente este fenómeno se deba a la selección natural; en condiciones naturales sobrevivirían solamente las larvas más robustas y resistentes.

Para evitar cierta confusión en la interpretación del examen del cultivo de larvas, hay que tomar en cuenta el ciclo biológico de *Strongyloides papillosus*. Del huevo embrionado, depositado por el parásito hembra en el intestino del huésped y expulsado con las heces, eclosiona ya en 4-10 horas, a temperatura de 20-30° C, una larva de primer estado rabadiforme (L 1). Esta puede transformarse, pasando por larva segunda (L 2) en larva infectante (L 3), o bien en forma sexuada. A su vez las formas sexuadas pueden dar origen a larvas infectantes o a una segunda generación sexuada. Se ignoran las causas o condiciones que hacen que unas veces sea mayor la producción de larvas infectantes y otras de formas sexuadas. En los coprocultivos, a los dos o tres días, aparece una de las dos formas o bien las dos simultáneamente.

Clasificación de larvas infectantes como complemento de la cuenta de huevos de nematodos gastrointestinales.

Se cuentan y clasifican las larvas recogidas del cultivo; si el mismo es pobre, el total; si es abundante, unas 200. Se establece el porcentaje de cada especie o género hallado y este porcentaje se relaciona con la cantidad total de huevos por gramo obtenidos en el examen coprológico previo (Mc Master).

Ejemplo: Resultado de la cuenta de huevos (h.p.g.) = 2.400.

Resultado del cultivo de larvas (porcentaje de cada tipo hallado):

Haemonchus spp.....	30 %
Cooperia oncophora.....	20 %
Cooperia spp.....	10 %
Trichostrongylus axei	15 %
Ostertagia ostertagi.....	15 %
Oesophagostomum spp.....	10 %
	100 %

RED DE HELMINTOLOGIA PARA AMERICA LATINA Y EL CARIBE
Cultivo e Identificación de Larvas Infectantes de Nematodos Gastrointestinales del
Bovino y Ovino. Dr. Roman Niec (INTA - ARGENTINA)

Cálculo de huevos de cada tipo eliminados por gramo de heces:

Haemonchus spp.....	720 h.p.g.
Cooperia oncophora.....	480 h.p.g.
Cooperia spp.....	240 h.p.g.
Trichostrongylus axei.....	360 h.p.g.
Ostertagia ostertagi	360 h.p.g.
Oesophagostomum spp.....	240 h.p.g.
	2400 h.p.g.

Todavía deben aclararse ciertos puntos referentes a la morfología y diferenciación de algunas L 3, en especial del género Cooperia. También convendría determinar las medidas propias de las larvas infectantes de los Nematodos gastrointestinales que parasitan a los rumiantes de la República Argentina.

A continuación describimos algunas de las larvas infectantes de los nematodos gastrointestinales más comunes, que parasitan a los rumiantes. Damos solamente ciertas medidas que consideramos de valor para la clasificación de larvas. Los límites mínimos y máximos (según varios autores) se dan en micrones. Las medidas originales propias, corresponden a material obtenido de animales de la provincia de Buenos Aires, República Argentina.

Se describen las larvas infectantes de las siguientes especies:

Familia: **Ancylostomidae;**

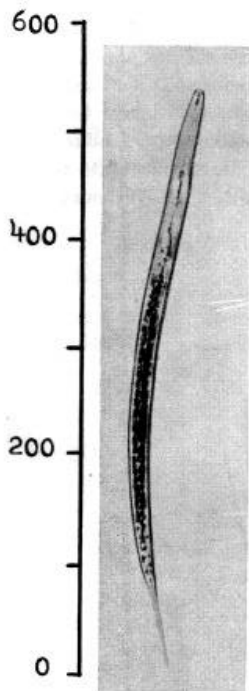
Bunostomum trigonocephalum, Bunostomum phlebotomum.

Familia: **Strongyloididae;**

Strongyloides papillosus.

Familia: **Strongylidae;** Oesophagostomum ssp., Chabertia ovina.

Familia: **Trichostrongylidae;** Trichostrongylus axei, Trich. colubriformis, Trich. vitrinus, Ostertagia ostertagi, Ost. circumcincta, Cooperia oncophora, Cooperia spp. (C. curticei, C. punctata, C. pectinata, C. zurnabada), Haemonchus contortus (cepa ovina), Haemonchus placei (cepa bovina), Nematodirus filicollis y Nematodirus spp. (N. battus, N. helvetianus, N. spathiger).



L3 de *Bunostomum trigonocephalum*

Larva Infectante de *Bunostomum* spp.

La más pequeña de las larvas de nematodos gastrointestinales de bovinos y ovinos. Cavidad bucal de paredes gruesas, en forma de embudo. Esófago bastante largo con ensanchamiento ¡bulboso! Dieciséis células intestinales, pocas veces bien diferenciadas. Terminación de la cola de la larva propiamente dicha, obtusa. La cola de la vaina larval, fina y bastante larga en relación con el largo total de la larva. En temperatura óptima de 22-24° C se forman larvas infectantes en 6-7 días.

Bunostomum trigonocephalum (Rudolfi, 1808) (ovino)

MEDIDAS MÍNIMAS Y MÁXIMAS EN MICRONES

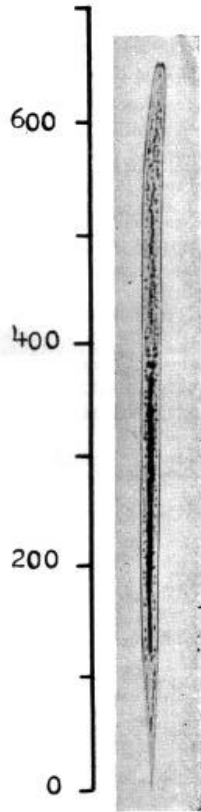
	Varios autores	Observ. propias
Largo total	514-678	507-625
Largo de esófago	140-175	128-165
Largo cola vaina larval	146-183	148-166

Bunostomum phlebotomum (Railliet, 1900) (bovino)

	Varios autores	Observ. propias
Largo total	443-633	507-647
Largo de esófago	130-182	108-184
Largo cola vaina larval	129-164	126-165

Larva infectante de *Strongyloides papillosus* (Wedl, 1856)

Una de las larvas más pequeñas. Sin envoltura de la segunda muda (vaina). Esófago muy largo, aproximadamente 1/3 del total de la larva y de color claro. Intestino bastante corto formado por células no diferenciadas, con oscuras granulaciones. En larvas de cultivos viejos no se distingue bien el esófago del intestino. La cola larval termina trifurcada; vista de costado aparece bifurcada. Evolución de huevo a larva infectante a 10-15° C en 7-8 días; a 20-25° C en 30-70 horas.



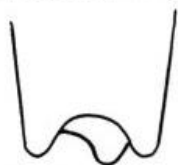
MEDIDAS MÍNIMAS Y MÁXIMAS EN MICRONES

	Varios autores	Observ. propias
Largo total	520-710	507-650
Largo de esófago	200-275	170-245
Largo cola vaina larval	75-95	80-92

Vista lateral

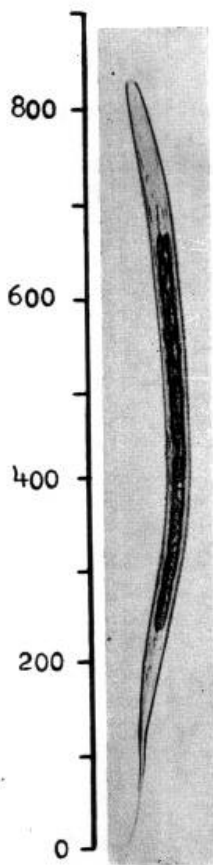


Vista ventral con aumento grande



Terminación de la cola larval

Larva de *S. papillosus*



**L 3 de
Oesophagostomum spp.
(radiatum)**

Larvas infectantes de Oesophagostomum spp.

O. radiatum (Rudolphi, 1803); *O. venulosum* (Rudolphi, 1809) *O. colombianum* (Curtice, 1890)

Larvas de tamaño mediano, provistas de una vaina gruesa y floja, que forma bien visibles ondulaciones. La cavidad bucal recta, de paredes engrosadas. Cantidad de células intestinales características para cada especie. Larvas infectantes cultivan en 7-8 días a temperatura de 22-24° C.

Oesophagostomum radiatum (bovino) 16-32 células intestinales

MEDIDAS MÍNIMAS Y MAXIMAS EN MICRONES

	Varios autores
Largo total	704-857
Largo de esófago	133-160
Largo cola vaina larval	209-269

Oesophagostomum venulosum (ovino) 32 células intestinales, triangulares

	Varios autores
Largo total	740-1140
Largo de esófago	159-191
Largo cola vaina larval	165-212

Oesophagostomum columbianum (ovino) Según varios autores se diferencia del *O. venulosum* solamente por poseer 16-24 (frecuentemente 16) células intestinales.

Larva Infectante de Chabertia ovina (Gmelin, 1790)

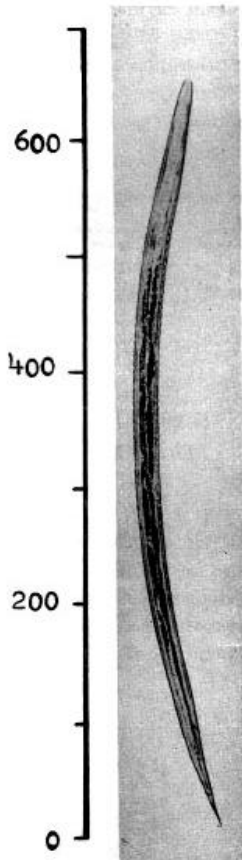
Larva de tamaño entre chico y mediano, morfológicamente muy parecida a la de *Oesophagostomum venulosum*. Células intestinales, 28-32, por lo general 32, de forma rectangular. Las larvas infectantes cultivan en seis días a la temperatura de 22-24° C.

MEDIDAS MÍNIMAS Y MAXIMAS EN MICRONES

	Varios autores
Largo total	608-889
Largo de esófago	140-178
Largo cola vaina larval	131-220

En cultivos mixtos con *O. venulosum* y *Chabertia ovina*, se considera (según varios autores) a las larvas menores de 700 micrones como de *Chabertia ovina* y a las mayores de 800 micrones como *O. venulosum*. Las larvas con medida entre 700-800 micrones, no son diferenciables entre sí.

Larva infectante de *Trichostrongylus axei* (Cobbold, 1979)



Larva de tamaño mediano, sin cavidad bucal. Dieciséis células intestinales. Terminación de la larva propiamente dicha, redondeada. Cola de la vaina larval; corta, cónica, aguda. En temperaturas de 22-24° C se forman larvas infectantes en 6-8 días.

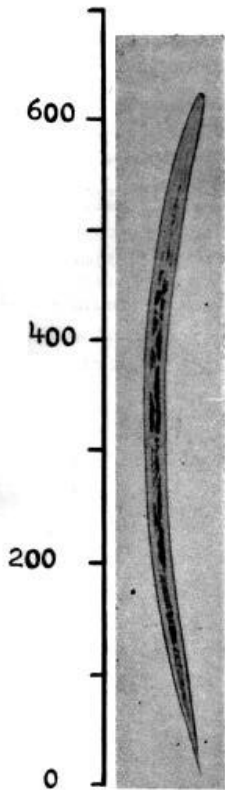
MEDIDAS MÍNIMAS Y MÁXIMAS EN MICRONES

	Varios autores	Observ. propias
Largo total	583-785	625-727
Largo de esófago	138-181	160-180
Largo cola vaina larval	80-110	80-110

L3 de *T. axei*

**Larva infectante de *Trichostrongylus colubriformis*
 (Giles, 1892)**

Larva relativamente chica, sin cavidad bucal. Dieciséis células intestinales. La cola de la larva termina en una o dos protuberancias. Cola de la vaina larval muy corta, cónica, recta. En temperatura de 22-24° C se forman larvas infectantes en 7-8 días.



L 3 Larva de *T. colubriformis*

MEDIDAS MÍNIMAS Y MAXIMAS EN MICRONES

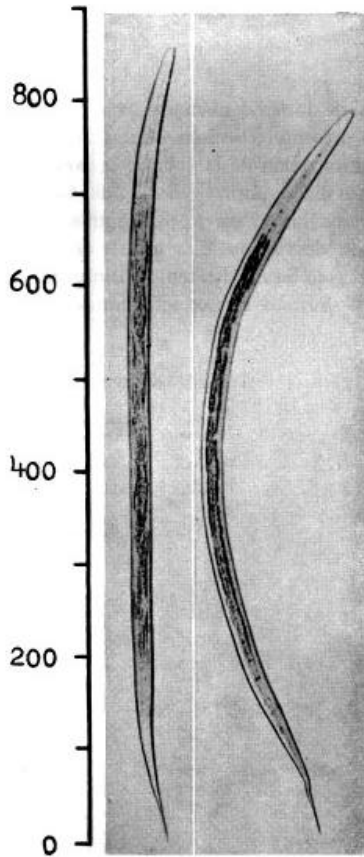
	Varios autores	Observ. propias
Largo total	583-749	591-794
Largo de esófago	132-180	140-172
Largo cola vaina larval	85-105	88-104

Larva infectante de *Trichostrongylus vitrinus* (Looss, 1905)

Larva de tamaño mediano, sin cavidad bucal. Dieciséis células intestinales. La punta de la cola de la larva con una hendidura semejando una W. Cola de la vaina larval corta, cónica. En temperatura de 22-24° C se forman larvas infectantes en 7-8 días.

MEDIDAS MÍNIMAS Y MAXIMAS EN MICRONES

	Varios autores
Largo total	622-796
Largo de esófago	145-180
Largo cola vaina larval	76-118



L3 de *O. ostertagi*

Larva infectante de *Ostertagia ostertagi* (Stiles, 1892)

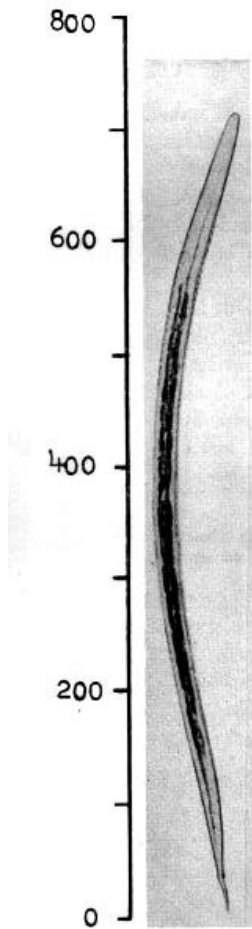
Larva de tamaño entre mediano y grande; con cavidad bucal presente. Dieciséis células intestinales. Terminación de la cola de larva redondeada con pequeña incisión en la parte ventral de la larva.

La cola de la vaina larval alargada (dentro del grupo de cola corta!), puntiaguda, mayormente con desviación característica.

En temperatura de 22-24° C se forman larvas infectantes en 6-8 días.

MEDIDAS MÍNIMAS Y MÁXIMAS EN MICRONES

	Varios autores	Observ. propias
Largo total	780-978	727-929
Largo de esófago	140-185	160-180
Largo cola vaina larval	122-170	110-164



L3 de *O. circumcincta*

**Larva infectante de *Ostertagia circumcincta*
(Stadelmann, 1894)**

Larva de tamaño mediano, con cavidad bucal presente. Dieciséis células intestinales. Terminación de la cola de la larva propiamente dicha, obtusa-redondeada. Cola de la vaina larval corta, puntiaguda, a menudo con desviación a la altura de la punta de la cola larval. En temperaturas de 22-24° C se forman larvas infectantes en 6-7 días.

MEDIDAS MÍNIMAS Y MÁXIMAS EN MICRONES

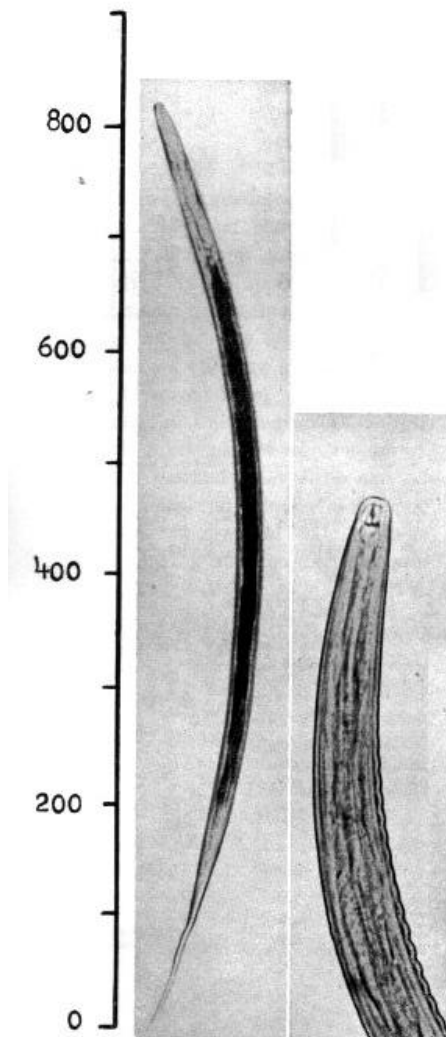
	Varios autores	Observ. propias
Largo total	720-848	709-845
Largo de esófago	145-188	128-168
Largo cola vaina larval	94-119	99-128

**Larva infectante de Cooperia oncophora
(Railliet, 1898)**

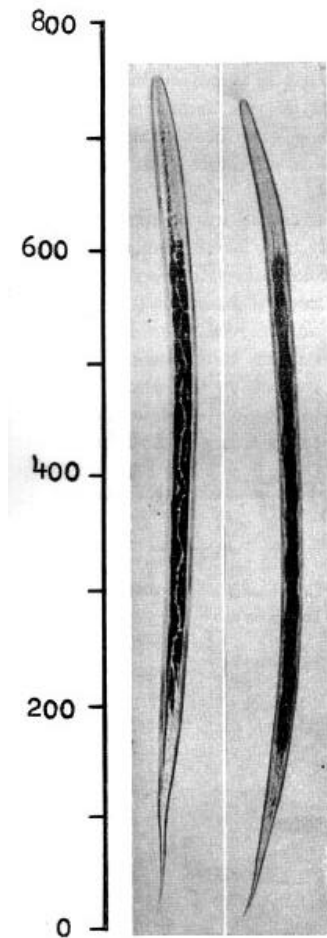
Tamaño, entre mediano y grande. Cavidad bucal en forma de pera. En el sitio donde empieza el esófago existe una cinta fibrilosa la que a la observación microscópica se ve como dos puntos refringentes o una línea clara, detalle morfológico característico para el género Cooperia. Dieciséis células intestinales. Terminación de la cola larval obtusa, redondeada. La cola de la vaina larval, por lo general ligeramente ondulada, se reduce gradualmente en una terminación obtusa. En cultivo se forman larvas infectantes en siete días a la temperatura de 22-24° C.

MEDIDAS MÍNIMAS Y MAXIMAS EN MICRONES

	Varios autores	Observ. propias
Largo total	756-1046	861-930
Largo de esófago	152-180	164-190
Largo cola vaina larval	124-198	168-180



L3 de *C. oncophora*



L3 de Cooperia spp.

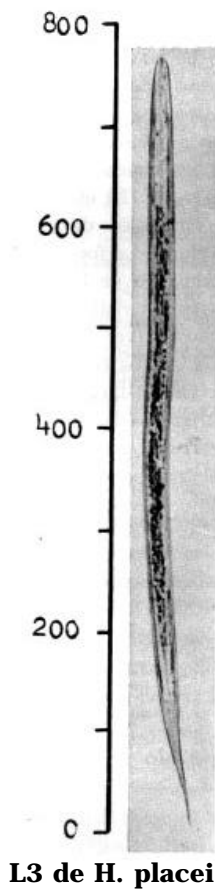
Larvas Infectantes de Cooperia spp.

C. curticei (Railliet, 1893); *C. punctata* (Linstow, 1907);
C. pectinata (Ransom, 1907);
C. zurnabada (Antipin, 1931)

Las larvas infectantes de todas estas especies son más chicas (más cortas y delgadas) que las de *C. oncophora*. Se observan los característicos cuerpos refringentes pero más pequeños y más juntos entre sí que los de *C. oncophora*; a veces se los observa como un solo punto ovalado más grande. Dieciséis células intestinales. Terminación de la cola larval obtusa. La cola de la vaina larval recta, reduciéndose en una terminación filamentosa. Las larvas infectantes de estas especies cultivan en 7-8 días a 22-24° C.

MEDIDAS MÍNIMAS Y MAXIMAS EN MICRONES

	Varios autores	Observ. propias
Largo total	666-899	766-895
Largo de esófago	140-175	160-192
Largo cola vaina larval	97-157	136-180



Larvas infectantes de *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) - cepa ovina

Larva de tamaño mediano, delgada. Cavidad bucal ovalada. En muchos casos a la altura de la cavidad bucal se observa una pequeña plaqueta quitinosa, oscura. Dieciséis células intestinales. Terminación de la cola larval cónica, en muchos casos arrugada. La cola de la vaina larval, que adelgaza gradualmente, termina en una prolongación filamentososa.

MEDIDAS MÍNIMAS Y MAXIMAS EN MICRONES

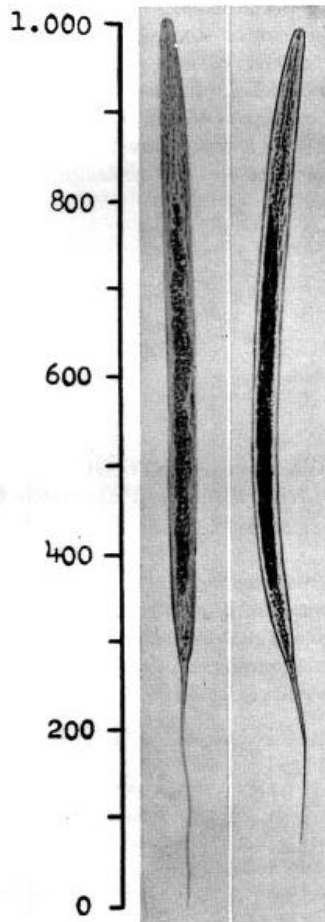
	Varios autores	Observ. propias
Largo total	600-805	675-761
Largo de esófago	119-175	90-140
Largo cola vaina larval	119-149	124-160

Larva Infectante de *Haemonchus placei* (Place, 1893) cepa bovina

Es de tamaño generalmente mayor que la de *Haemonchus contortus*. Morfológicamente no hay diferencias entre ellas, salvo que la cola de la vaina larval de *H. placei* parece ser más robusta y menos latigoforme que la de *H. contortus*.

MEDIDAS MÍNIMAS Y MAXIMAS EN MICRONES

	Varios autores	Observ. propias
Largo total	625-880	692-862
Largo de esófago	134-170	148-164
Largo cola vaina larval	129-196	160-188



1. *N. filicollis*
2. *N. spatigher*

Larvas infectantes de *Nematodirus* spp.

N. filicollis (Rudolphi, 1802); *N. spatigher* (Railliet, 1896); *N. battus* (Crofton y Thomas, 1951-1954); *N. helvetianus* (May, 1920) Entre todas las larvas infectantes de nematodos gastrointestinales, las de *Nematodirus* spp. son las de mayor tamaño. La cavidad bucal en forma de tubo recto. El intestino está compuesto de ocho grandes células. La forma de la terminación de la cola larval es característica para cada especie (ver el gráfico-clave, fig. 4). La cola de la vaina larval es larga, en forma de látigo. La larva infectante desarrolla dentro del huevo del parásito en 15-30 días, según especie, a la temperatura de 24-28° C.

MEDIDAS MÍNIMAS Y MÁXIMAS EN MICRONES

	Varios autores
Largo total	940-1204
Largo de esófago	182-252
Largo cola vaina larval	269-370

BIBLIOGRAFIA

1. ANDREWS, J. S. (1935). A note on the morphology of the anterior ends of the infective larvae of some nematodes parasitic in the alimentary tract of sheep. Proc. Heln. Soc. Wash., 2, 88.
2. BORCHERT, A. (1959). Morphologische und differentialdiagnostische Angaben über die ektogenen Larvenstadien der Magenfadennotchen, Dickdarms und Zwergfadenwürmer der Schafe. Monatshefte für Veterinärmedizin, 431-437.
3. CAMERON, T. W. W. (1926). On the morphology of the free living larvae of *Chabertia ovina*. J. Helm., 4, 185.
4. CORTICELLI, B. y LAI, M. (1961). Osservazioni sulle larve infestive di *Haemonchus* ottenute dal bovino e dall'ovino in Sardegna. Extracto de *Alli della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, vol. 15, 708-715.

RED DE HELMINTOLOGIA PARA AMERICA LATINA Y EL CARIBE
Cultivo e Identificación de Larvas Infectantes de Nematodos Gastrointestinales del
Bovino y Ovino. Dr. Roman Niec (INTA - ARGENTINA)

5. CORTICELLI, B. y LAI, M. (1963). Ricerche sulla tecnica di coltura delle larve infestive degli strongili gastro-intestinali del bovino. Acta Medica Veterinaria, año 9, fás. V/VI.
6. CORTICELLI, B. y LAI, M. (1964). La diagnosi di tipo d'infestione nella strongilosi gastro-intestinale del bovino. Extr. de Bassegna Veterinaria, año XLI, fás. 3.
7. DICKMANS, G. y ANDREWS, J. S. (1933). A comparative morphological study of the infective larvae of the common nematodes parasitic in the alimentary tract of sheep. Trans. Amer. Micr. Soc., vol. 52, 1.
8. ECKERT, J. (1960). Die diagnose des Magen-darmstrongylidenbefalles des Schafes durch Differenzierung der freilebenden dritten Larven. Publicación de "Institut für Parasitologie und Vet-med. Zoologie der Tierärztlichen Hochschule", Hannover.
9. GEVREY, J., TAKASHIO, M. y EuzrBY, J. (1964). Identification des "Strongles digestifs" des ruminants par les caractères de diagnose de leurs larves infestantes. Bull. Soc. Sej. Vél. el Méd., comparée de Lyon, 66, N° 2.
10. HANSEN, M. F. y SHIVNANI, G. A. (1956). Comparative morphology of infective Nematode larvae of Kansas beef cattle and its use in estimating incidence of Nematodiasis in cattle. Trans. Amer. Micr. Soc., 75, 91.
11. KEITH, R. K. (1953). The differentiation of the infective larvae of some common nematodes parasitic of cattle. Austr. J. Zool., 1, 223.
12. MOROAN, B. B. y HAWKINS, P. A. (1953). Veterinary Helminthology. 36
13. MULLER, G. 1.. (1959). On the differential diagnosis of the third stage (infective) larvae of Chabertia ovina and Oesophagostomum spp. (O. columbianum and O. venulosum). With special emphasis on the characteristic lengths of Chabertia ovina. J. S. Afr. Vel. Med. Ass., 30, 427.
14. ROBERTS, F. H. S. y O'SULLwA!v, Y. J. (1949). Methods for egg counts and larvae cultures for Strongyles infesting the gastro-intestinal traet of cattle. Aust. J. Agr. Res., vol. 1, 99-102.
15. ROBERTS, F. 1-1. S. y coll. (1954). On the specific distinctness of the ovine and bovine strains of Haemonchus contorius. Ausi. J. Zool., 2, 275.
16. SOULSBY, 1;. J. 1.. (1965). Textbook of veterinary clinical parasitology, vol 1. 17. STEWART, T. B. (1954). The life history of Cooperia punctata, a nematode parasite in cattle. J. Paras., 40, 321.
18. SUPPERER, R. (1958). Über die in der Aussenwelt ablaufende Entwicklungsphase von Bunostomum phlebotomum. Wien. tierúrzll. Monats., 45, 553. 19. THOMAS, 11. J. (1957). a) A comparative study of the infective larvae of Nematodirus species parasitic in sheep. Parasitol., 47,60.

RED DE HELMINTOLOGIA PARA AMERICA LATINA Y EL CARIBE
Cultivo e Identificación de Larvas Infectantes de Nematodos Gastrointestinales del
Bovino y Ovino. Dr. Roman Niec (INTA - ARGENTINA)

- b) A comparative study of the life history of *Nematodirus battus* and *N. filicollis*, nematodes parasites of sheep. *Parasitol.*, 49, 374.
20. WERTEJUK, M. (1955). O larwach inwazyjnych nicieni zoladkowo jelitowych owiec i ich rozpoznawaniu (On the invasive larvae of the gastro-intestinal nematodes of sheep and their identification). *Acta Parasitologica Polonica*, vol. 11, fás. 19.
21. WETZEL y MARHOLDT, D. (1955). Differentiadiagnose der im dritten Larven von *Chabertia ovina* und *Oesophagostomum venulosum*. *Deusch. Tier. Woch.*, 62, 429.
22. WHITLOCK, 11. V. (1959). The recovery and identification of the first stage larvae of sheep nematodes. *Aus. Vel. J.*, 35, 7, 310-316.

Se terminó de imprimir el 11 de julio de 1968, en los talleres del Instituto Salesiano de Artes Gráficas (I.S.A.G.), Don Bosco 4053, Buenos Aires (Argentina)