

Los numerosos géneros de Nemátodos que parasitan el tubo gastrointestinal de los rumiantes, los cuales realizan postura en el interior de sus huéspedes, pero sus huevos son muy parecidos entre si, ha llevado a los investigadores a diferenciar los diferentes géneros por medio del cultivo de larvas. Para distinguir los géneros se deben utilizar larvas L3 o infectantes que presentan características en cuanto a longitud del cuerpo, diámetro, longitud del esófago, posición relativa del ano y anillo nervioso, distribución de los órganos genitales, sistema excretor y número y forma de las células intestinales. Ver características L3.

Para obtener larvas infectante L3, los huevos de los nemátodos se deben cultivar e incubar en frascos a temperatura entre 22 - 26° C. durante una semana, los cultivos deben tener una consistencia adecuada lo que se puede obtener mezclando las heces con materiales estériles como carbón, arena, aserrín o viruta de madera y que permita un buena aireación durante la incubación.

El frasco se cubre con una caja de petri, después de siete días las larvas se recogen llevando el frasco con agua entre 40 - 45° C. , el cual se coloca boca abajo, sobre una caja de petri ligeramente inclinada. Con una capa de agua. Las larvas se recogen después de 12 o más horas. Para inmovilizar las larvas se puede utilizar ligero calentamiento, o formoll al 5%, lugol al 5%, o colocarlas en refrigeración por unos minutos y luego visualizadas.

Las larvas se pueden concentrar por sedimentación o centrifugación en tubo de ensayo, luego se examinan unas gotas de sedimento utilizando un porta y cubreobjetos. Posteriormente se cuentan 100 larvas y se establecen los porcentajes para cada género. Para determinar el número de larvas por ml. se debe utilizar una pipeta graduada.

Los nemátodos durante su vida pasan por 5 estados; los dos primeros estados larvarios son de vida libre y el tercero es el infestante, el cual puede vivir fuera del huésped. La L3 final, cuarto y quinto estado son morfológicamente distinguibles y pueden ser separados en estados inicial y final y se encuentran dentro de el huésped. Basándonos en la morfología podemos obtener información de la historia natural de los parásitos por ejemplo la presencia de un gran número de larvas L3, indican una gran exposición del huésped y continua infestación.

Poblaciones compuestas de formas inmaduras L4 inicial y final y de L5 inicial y final en una cantidad más o menos igual puede indicar un parasitismo característico de animales jóvenes sin experiencia previa con parásitos.

Una composición de L4 inicial y preponderancia L5 final indica ajustamiento al parasitismo, al menos que cantidades perjudiciales de L5 final estén presentes; 500 o más vermes es un parasitismo normal.

---

\* M.V.Z. Ms. Profesor titular Parasitología Clínica. Universidad de Caldas.

La presencia de numerosas formas inmaduras después de un tratamiento antihelmíntico puede indicar una falla en el tratamiento puesto que las formas larvianas son más resistentes que los nemátodos adultos.

La presencia única de L5 final puede indicar un estado de inmunidad transitoria o un parasitismo característico (hipobiosis).

Para obtener estados larvianos de nemátodos G.I. en los órganos tales como el cuajar, intestino delgado, intestino grueso, se deben realizar necropsias de los animales y recoger los parásitos por:

- a) Lavado y raspado de mucosas
- b) Digestión de órganos

Primero se deben abrir los órganos, se retiran todos sus contenidos, luego se lavan en 1 - 2 litros de agua; se hace un raspado con el fin de retirar las formas adultas que se encuentren adheridas a la mucosa.

Para digerir los órganos se utiliza un litro de una solución de HCl al 3% y pepsina al 1% o solamente el HCl al 3% a una temperatura de 37 - 40° C. por un período de 2 - 6 horas; las larvas son liberadas de la mucosa y sedimentan en el fondo del recipiente. Una vez retirado el órgano se homogeniza bien la muestra y se procede a filtrarla en un tamiz de 38 Micras. En algunos casos se puede tomar solamente 100 ml o sea el 10%; el número de nemátodos encontrados se deben multiplicar por 10 para obtener el total.

Para separar los nemátodos inmaduros se debe utilizar un estereomicroscopio y estiletes agudos; la identificación debe realizarse en un microscopio.

Para el intestino grueso no se utiliza digestión puesto que los parásitos que se encuentran en este órgano son de gran tamaño y raras veces se encuentran en las mucosas. El tamiz debe ser de 150 micras para gusanos adultos y 50 micras para larvas.

## DIFERENCIACION DE ESTADOS LARVARIOS

Las L3 final son similares a las infestantes o L3 pero estas ya no poseen vaina. Las larvas L4 inicial presentan un pequeño indicio de formación de los órganos internos en hembras y los machos presentan en extremidad posterior ligera dilatación que corresponde al comienzo de la formación de la bolsa copulatrix.

Las larvas L4 final presentan el orificio vulvar en las hembras, y el macho su cola típica con su bolsa copulatrix encapsulada y una forma característica de guante de dedo.

Las L5 inicial presentan los órganos genitales desarrollados. Los machos tienen sus espículos poco quitinizados y las hembras en el útero no presentan huevos.

DOUVRES nos presenta algunas claves para la diferenciación de larvas L3 y L4 de los rumiantes:

## CLAVES PARA LA IDENTIFICACION DE LAS LARVAS DE NEMATODOS

### Clave para el tercer estado larval en el abomaso

1. Cavity bucal no distinguible; esófago truncado anteriormente; el poro excretor puede estar localizado en una depresión visible; cola con terminación fuertemente redondeada y puede estar curvada ventralment redondeada y puede estar curvada ventralmente (Fig. 1 y 2) ... T. axei. Cavity bucal de 5 a 7 micras de longitud y fácilmente distinguible; en otros casos difiere del anterior.... 2
2. Cavity bucal tubular con la base cónica y parcialmente rodeada por el esófago; de este último se proyectan hacia adelante dos procesos situados lateralmente; cola en forma de dedo (Fig. 4 y 7) .. O. ostertagi. Cavity bucal tubular no rodeada por el esófago, con sus paredes rodeadas por dos masas granulares , cada una de estas últimas de forma semejante a una pinza; protuberancia presente en la parte dorsal del polo anterior del esófago; terminación de la cola fuertemente redondeada (Fig. 6 y 8) ..... Haemonchus spp.

### Clave para el cuarto estado larval en el abomaso

1. Poro excretor localizado en una depresión visible; la pared de la cápsula bucal aparece como un cuerpo semilunar dividido en dos partes, o como dos estructuras en forma de jotas, isómeras gruesas y cortas; la cola termina fuertemente redondeada (Fig. 3, 3A y 2) ...T. axei. Poro excretor no localizado en depresión visible; en otros casos difiere del anterior... 2
2. Cápsula bucal cónica, aparece anteriormente como dos estructuras semejantes a varillas o dientes; posteriormente como dos líneas finas completamente rodeadas por el esófago; estriaciones diagonales bien marcadas presentes en la porción anterior del esófago; la cola termina suavemente redondeada (Fig. 5 y 9)..... O. ostertagi. Cápsula bucal de apariencia globular, relativamente profunda y de pared gruesa; la terminación anterior del esófago no tiene tales estriaciones; cola atenuada y redondeada (Fig. 10 y 11).. Haemonchus spp.

### Clave para el tercer estado larval en el intestino delgado

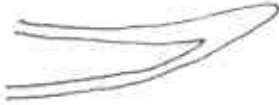

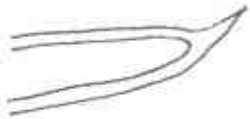











1. Esófago ahusado anteriormente; dos cuerpos ovoides visibles o áreas vacuoladas en forma de pera en el flanco laterla de la cavity bucal y polo anterior del esófago (Fig. 14) ..... Oe. radiatum. Esófago truncado anteriormente; no hay tales estructuras en el polo anterior.... 2
2. Cola terminada en un proceso simple... 3 Cola terminada en más de un proceso.... 4
3. Cola adelgazada y curvada dorsalmente en forma característica (Fig. 17 y 18)..... C. punctata. Cola con un lódulo ventral y otro dorsal, entre los que se asienta un proceso en forma de varilla que se extiende más allá del margen posterior de los lóbulos (Fig. 22 y 26)..... N. helvetianus

4. Cola terminada en dos tubérculos de longitud desigual (Fig. 1 y 2) ..... *T. colubriformis*. Terminación trifida de la cola, apareciendo como tres puntas (Fig. 21 y 24) ..... *S. papillosus*.

#### Clave para el cuarto estado larval en el intestino delgado

1. Con una cutícula cefálica inflada.... 2 Sin cutícula cefálica inflada.... 4
2. Esófago redondo y dilatado anteriormente, estriaciones cuticulares transversas, muy pronunciadas, en la región cefálica (Fig. 19)..... *C. punctata*. Esófago truncado anteriormente; estriaciones cuticulares transversas, no pronunciadas, en la región cefálica.... 3
3. Cápsula bucal pequeña de apariencia tubular e inerme; cola puntiaguda, en forma de espina finamente atenuada (Fig. 20 y 27) ..... *N. helveticus*. Cápsula bucal grande en forma de huevo o de copa y armada de dientes en su base; cola obtusa, no puntiaguda (Fig. 15 y 16) .... *Oe. radiatum*.
4. Cápsula bucal en forma de copa y armada con 4 lancetas cuticulares en su base; terminación de la cola en un punto (Fig. 23 y 28) ..... *B. phlebotomum*. Cápsula bucal en forma de copa e inerme; terminación de la cola en algo diferente a un punto.... 5
5. Poro excretor localizado en una depresión visible; la cola está fuertemente redondeada (cerca del cuarto estado larval) o termina (en la cuarta muda) en dos tubérculos de longitud desigual (Fig. 2, 3, 3A y 13)..... *T. colubriformis*. Poro excretor no localizado en una depresión visible; terminación trifida de la cola, o en forma de punta de dedo (Fig. 24 y 25) ..... *S. papillosus*.

## CARACTERISTICAS DE LARVAS L3 DE NEMATODOS DE RUMIANTES

GENERO	TIPO DE COLA	LONGITUD TOTAL	FORMA DE LA COLA	CARACTERISTICAS CORPORALES	
<i>Hichostrongylus</i> spp.	Corta	+ - 650 u		Región anterior aguda 16 células rectangulares	
<i>Ostertagia</i> spp.	Corta	+ - 840 u		Región anterior rectangular 16 células	
<i>Bunostomum</i> spp.	Mediana	+ - 600 u		Dilatación del esófago en la partes distal 16 células Se colorean con lugol	
<i>Haemonchus</i> spp.	Mediana	+ - 720 u		Sombras en la parte media o inferior 16 células rectangulares	
<i>Cooperia</i> spp.	Mediana	+ - 800 u		Dos cuerpos refringentes en la región anterior. 16 células	
<i>Oesophagostomum</i> spp.	Larga	760 a 1.100 u		Cutícula rugosa 16-24 células poligonales	
<i>Chabertia</i> spp.	Larga	724 u a 890 u		Células intestinales rectangulares 24 -32	

Nematodirus  
spp.

Larga

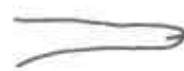
920 a  
1.130 u



Solo se encuentra en  
cultivos de más de 10 días  
8 células

Strongyloides  
spp.

+ -  
580 u



Sin vaina. Cola bifida

Mecistocirrus

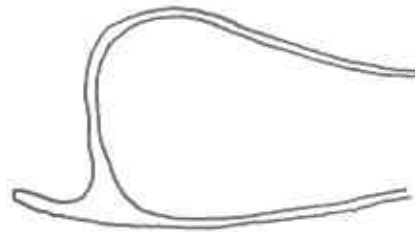
Corta

675 a  
725 u

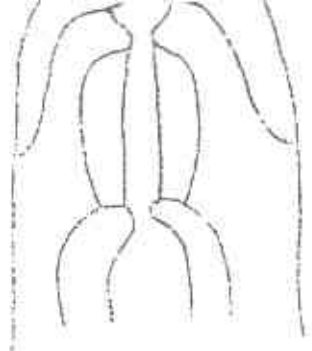
Extremo anterior de la  
vainas con una protuberan-  
cia cónica, esófago con 2  
estructuras en forma de U  
de color pardo oscuro en  
su extremo anterior.



L4 INICIAL



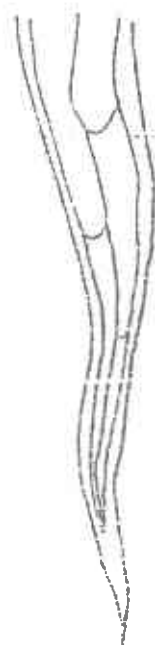
L4 FINAL



3º est. - Extremidad anterior (Douvres)



3º asc. - extremidad anterior (44x) - Benz.



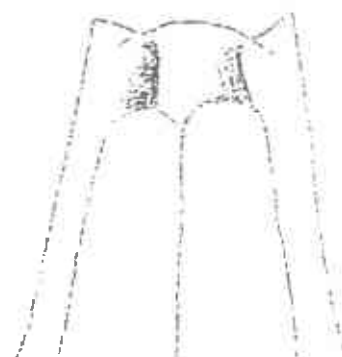
3º est. - extremidad posterior (44x) - Benz.



3º asc. - extremidad posterior (44x) - Benz.

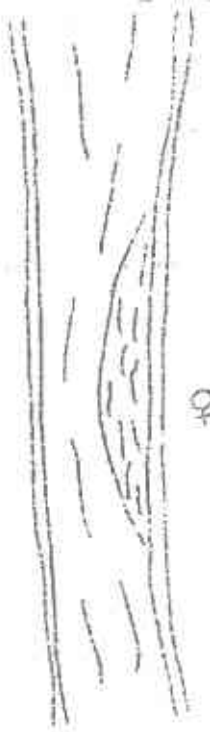


3º asc. - extremidad anterior (Douvres)





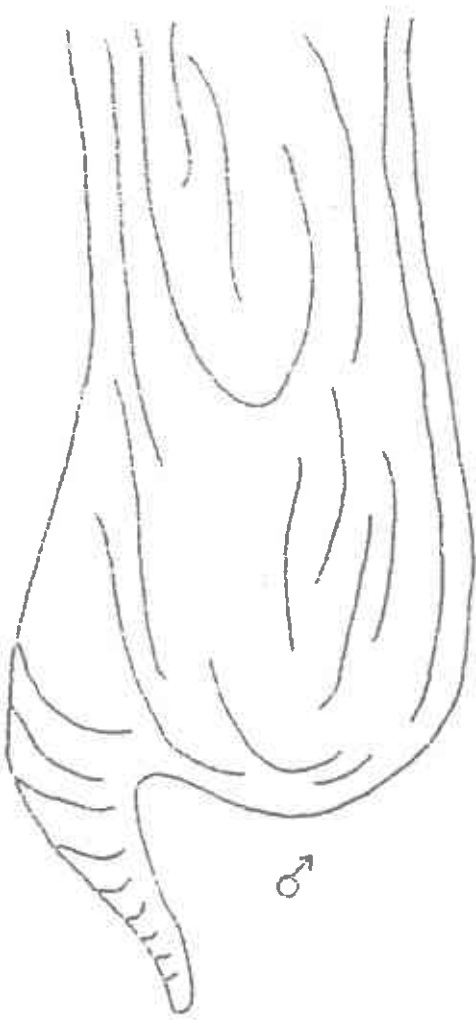
4º est. final - extremidad anterior (Benz.)



4º est. final - ext. posterior (44x) - Benz



4º est. final - primordios genitais (44x) Benz



5º est. Inicial - ext. ant. (10x) Benz



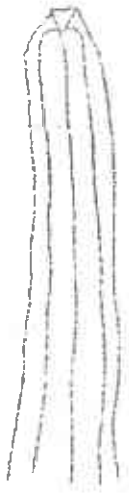
5º est. inicial - ext. post. (10x). Benz.

4º Est. final - ext. posterior (44x) Benz.



5º est. inicial - ext. posterior (10x) - Benz

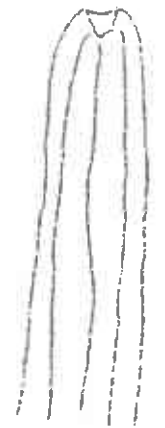
OSTERTAGIA SP



4<sup>o</sup> est. inicial  
Ext. ant. (44x) Benz.



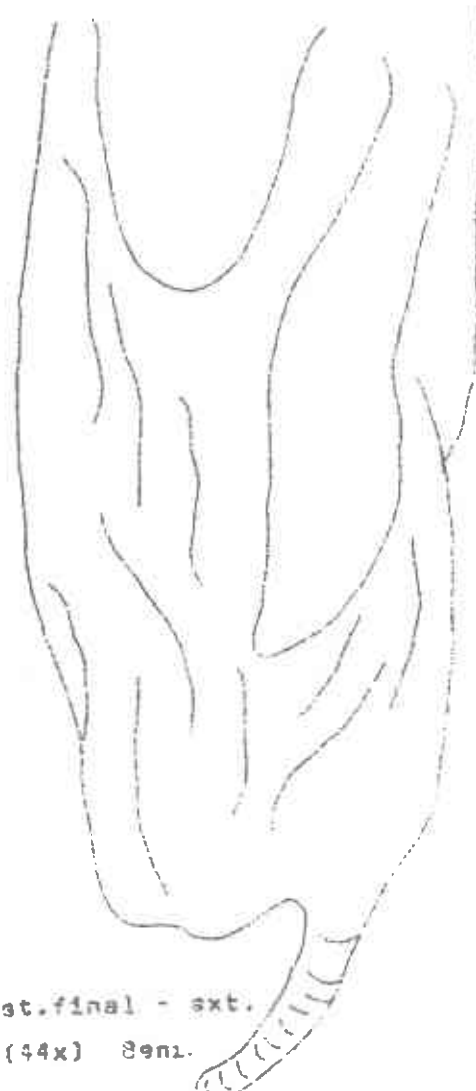
4<sup>o</sup> est. inicial - ext. posterior  
(44x) Benz.



4<sup>o</sup> est. final - ext. a.  
(44x) Benz.



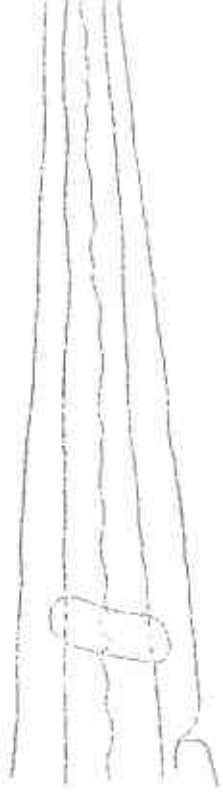
4<sup>o</sup> est. final - primórdios  
genitais (44x) Benz.



4<sup>o</sup> est. final - ext.  
post. (44x) Benz.



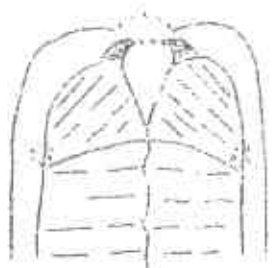
4<sup>o</sup> est. final -  
ext. post. (44x) Benz.



3° est. - ext. ant. (Douvres)



3° est. Ext. post. (Douvres)



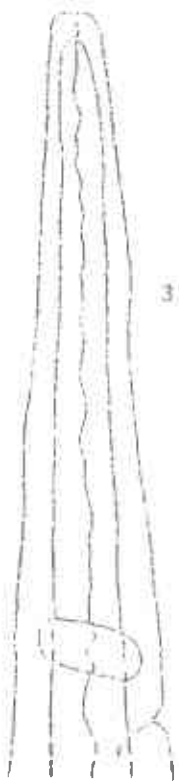
4° est. - ext. ant. (Douvres)



4° est. - ext. post. (Douvres)

3° est. ext. ant. (Douvres)

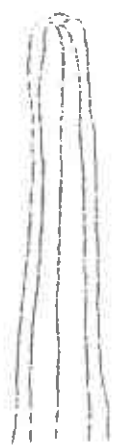
TRICHOSTRONGYLUS AXSI



3° est. ext. ant. (Douvres)



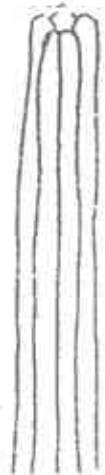
3° est. ext. post. (Douvres)



4° est. initial ext. ant. (4x) Benz

4° est. initial ext. post. (4x) Benz.





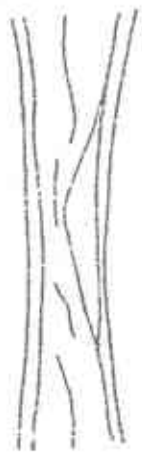
4<sup>o</sup> est. final -  
ext.ant. (44x) Benz



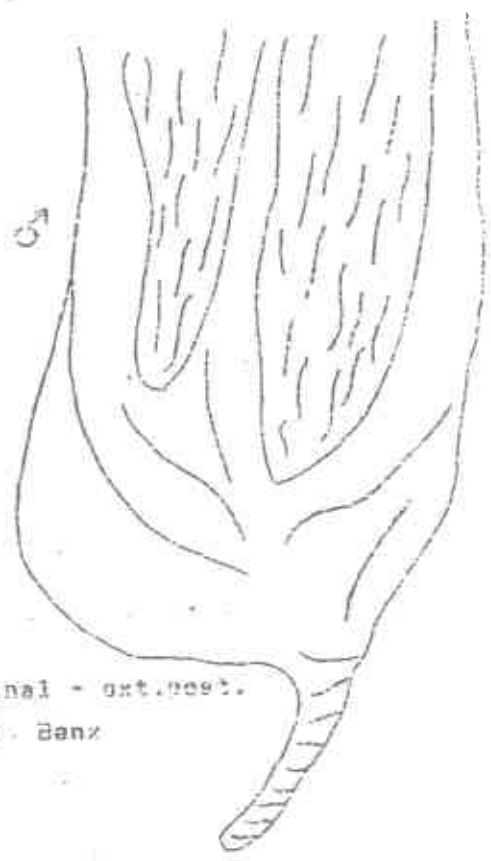
4<sup>o</sup> est. - ext.ant.  
(Courves)



4<sup>o</sup> est. final - ext.post.  
(44x) Benz



4<sup>o</sup> est. final  
ext.post. (44x) Benz



4<sup>o</sup> est. final - ext.post.  
(44x) Benz

T. COLUBRIFORMIS



3<sup>o</sup> est. - ext.post.



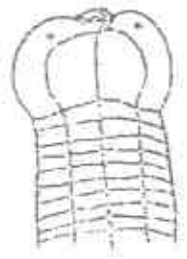
4<sup>o</sup> est. - ext. p



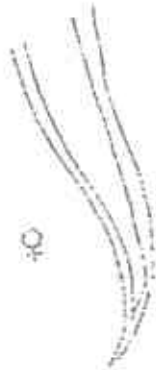
3<sup>o</sup> est. - ext. ant.  
(Douvrea)



3<sup>o</sup> est. - ext. post.  
(Douvrea)



4<sup>o</sup> est. - ext. ant.  
(Douvrea)

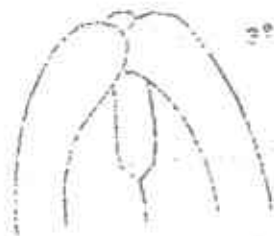


4<sup>o</sup> est. final - ext. post.



4<sup>o</sup> est. final - ext. post.

HEMATODIRUS SP



3<sup>o</sup> est. - ext. ant.  
(Hematodirus)



3<sup>o</sup> est. ext. dors.  
(Hematodirus)



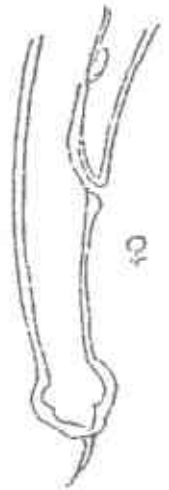
3<sup>o</sup> est. - ext. anterior  
(Hematodirus)



4<sup>o</sup> est. ext. post.  
(Douvres)

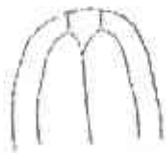


4<sup>o</sup> est. inicial -  
ext. posterior



4<sup>o</sup> est. inicial - ext.  
post.

STRONGYLOIDES SP



3<sup>o</sup> est. - ext. ant.  
(Douvres)

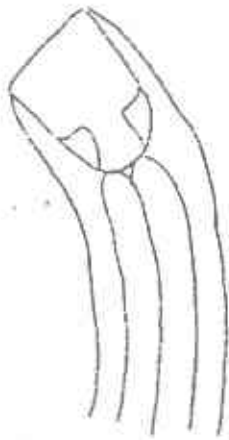


3<sup>o</sup> est. - ext. post.  
(Douvres)



4<sup>o</sup> est. - ext. post.  
(Douvres)

BUNOSTOMUM SP



4<sup>o</sup> set. ext. ant.  
(Douvres)

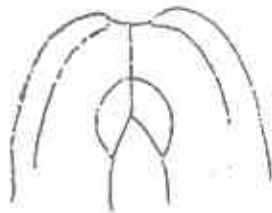


4<sup>o</sup> set. ext. post.

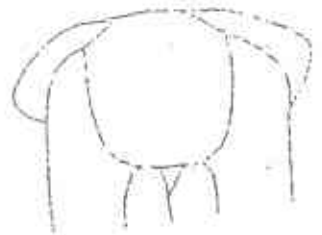
OESOPHAGOSTOMUM SP



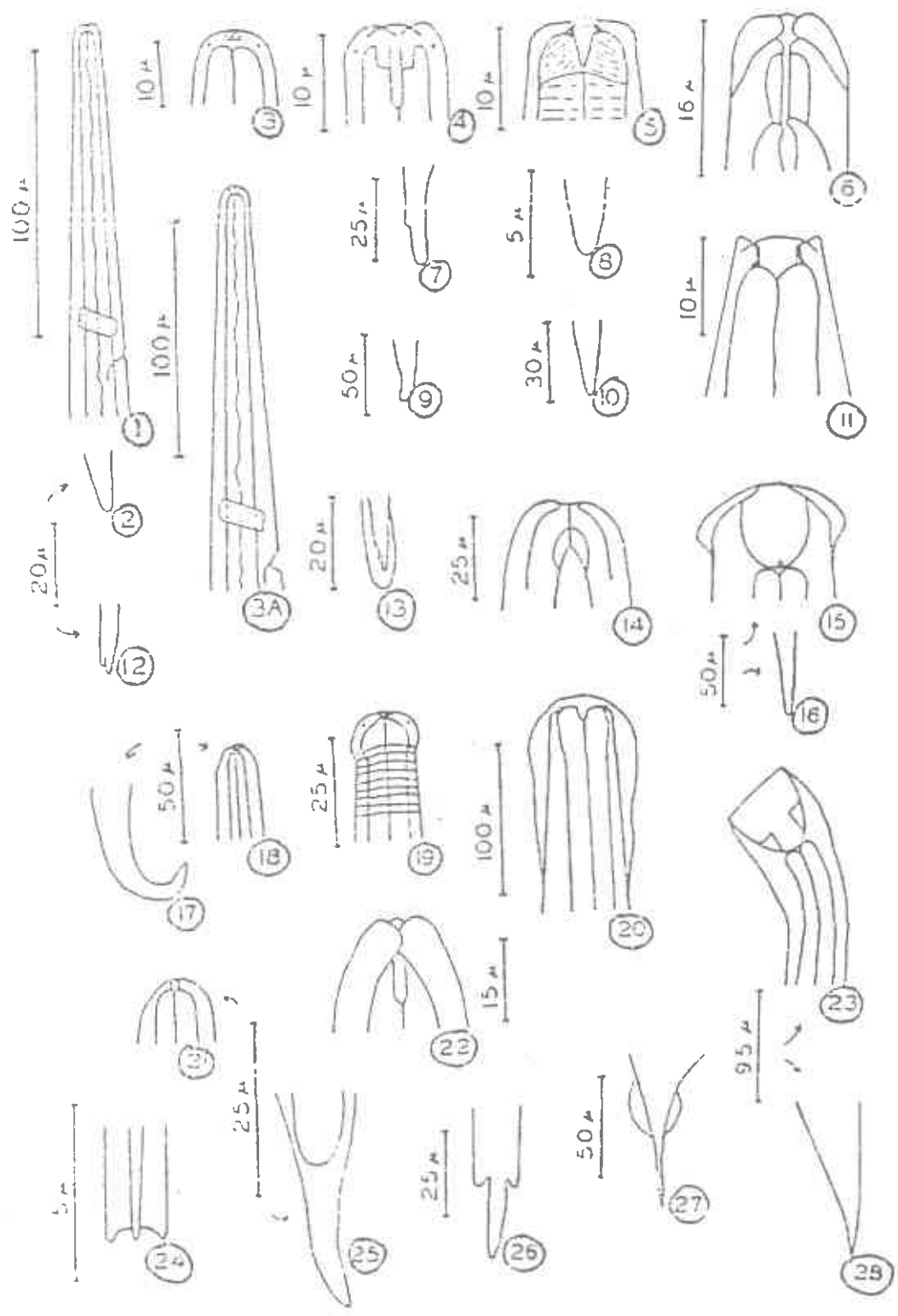
4<sup>o</sup> set. - ext. post.  
(Douvres)



3<sup>o</sup> set. - ext. ant.  
(Douvres)



4<sup>o</sup> set. - ext. ant.  
(Douvres)



## BIBLIOGRAFIA

- AARON GOLDBERG.** Relationship of spaced administration of larvae to Worm burden in calves. The Helminthological society of Washington. Vol. 40 (2), 1973. 288 - 291.
- CHITWOOD M, LICHTENFELS R.** Identification of Parasitic Metazoa in Tissue sections. Parasitological Review. Vol. 32 (3), 1972. 407 - 519.
- DOUVRES, F. W. ET. AL.** In vitro cultivation of *Ostertagia ostertagi*, the medium stomach Worm of cattle II. Effect of insect - growth - disrupting amines and amides on development. Vet. Paras 7 (1980). 195 - 205.
- DOUVRES, F. W.** Identificación de algunos estados parasitarios inmaduros de nemátodos gastrointestinales en bovinos. Am. J. Vet. Res. Vol. 18 (66), 1957.
- DUN, A.M.** Helminthologia Veterinaria Ed. Moderna, 1983. 362 - 365.
- GASBARRE, L. C. ET.AL.** Genetic control of immunity to gastrointestinal nematodes of cattle. Vet. Paras. 37 (1990). 257 - 272.
- GUTIÉRREZ, V. C. CABRAL G.P.** Identificacao de formas imaturas de Helminthos parásitos de coagulador e intestino delgado de ovinos e bovinos. 1977.
- PATIÑO, T. F.** Carga patogénica parasitaria en rumiantes. Rev. Vet. y Zoot. Caldas. Vol. (2). 1982. 6 - 9.