



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MODIFICACION A LA TECNICA DE MIGRACION LARVARIA PARA LA OBTENCION DE LARVAS DE NEMATODOS GASTROENTERICOS EN FORRAJES.

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :
ENRIQUE LEBANO HERNANDEZ

Asesor: M.V.Z. M.Sc. V. Rafael A. Mejía García

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1985



V N A M



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

<u>CONTENIDO</u>	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	7
RESULTADOS	13
DISCUSION	23
CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFIA	27

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue comparar la técnica simple de Migración Larvaria para forrajes, con la Técnica de Migración Larvaria para forrajes más tamizado, en la obtención y cuantificación de larvas infectantes de nematodos gastroentéricos presentes en los pastos.

Se utilizaron 10 muestras de pasto, colectadas de parcelas experimentales y libres de nematodos gastroentéricos. Se hicieron dos grupos A y B, con 5 muestras de 100 g de pasto cada uno, cortándose en pequeños trozos, se colocó en gasa y a cada muestra se le añadieron 2500 larvas infectantes de Haemonchus spp. Las larvas se obtuvieron por coprocultivo de heces de un ovino infectado con Haemonchus spp.

El grupo A se sometió a la Técnica de Migración Larvaria para forrajes y el grupo B se trabajó con esa misma técnica en una primera fase y en una segunda fase, se incorporaron algunos pasos de la Técnica de Tamizado, empleada en la obtención de fitonematodos y nematodos de vida libre, utilizándose tamices de diferentes mallas: 40, 100, 200, 325 y 500 mallas (De la Jara y Zerón, 1980).

Después de 24 horas de haberse colocado las muestras en sus recipientes correspondientes, se obtuvieron los sedimentos y 5 de ellos se examinaron directamente con el microscopio estereoscópico, extrayéndose las larvas presentes, y los otros 5 fueron pasados por los diferentes tamices ya mencionados.

Para el grupo A, el porcentaje total de larvas recuperadas fue de 58.98% y para el grupo B, de 51.89%.

Se verificó que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambas técnicas ($P \geq 0.01$). En cuanto al grado de limpieza, con la técnica B, se obtuvo una mejor visibilidad al examen microscópico, por contener menor cantidad de detritos en el sedimento.

INTRODUCCION

La mayoría de las enfermedades parasitarias del tracto gastrointestinal de los rumiantes domésticos, son causadas por nematodos pertenecientes al Orden Strongylida y particularmente a las familias: Ancylostomatidae, Strongylidae, Trichostrongylidae y Trichonematidae, Soulsby (1982). Estos nematodos revisten gran importancia debido a su carácter cosmopolita. Su ciclo biológico es, en su mayoría Monogénico o directo.

La infección de los rumiantes se lleva a cabo mediante la ingestión de la Larva 3 - (L₃), cuyo habitat son los tallos y hojas de los pastos, Lapaçe (1979).

Las larvas infectantes de los nematodos gastroentéricos (n.g.e.) que se encuentran sobre los pastos tienen diferentes tropismos, determinando así su actividad. Por ejemplo, poseen un fototropismo negativo a la luz fuerte, por lo que tienden a localizarse en la base de las plantas y permanecer quietas durante las horas de mayor intensidad de luz solar. Por el contrario, presentan un fototropismo positivo a la luz tenue es decir, si la irradiación solar es poca, como es al amanecer y al atardecer, las larvas se desplazan con mayor facilidad hacia la punta de los pastos; ambos tropismos provocan una migración vertical, Soulsby (1976).

La identificación y cuantificación del estadio L₃ de n.g.e. en los pastos, tiene por objeto el estudio estadístico y cinético de la contaminación de las praderas, lo cual es de gran importancia en la epidemiología de las parasitosis; la identificación y cuantifi-

cación se lleva a cabo en el laboratorio, utilizando muestras de pasto provenientes de las praderas a estudiar, 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. Tomando en cuenta este principio, se enuncia como método general: 1o. El lavado de las muestras de pasto y 2o. El filtrado o tamizado del sedimento conteniendo a las larvas. Además del método general, se pueden considerar otros dos, consistiendo el uno en la concentración de las larvas por flotación con una solución densa, y el otro combinando 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, citándose entre otros a Durie (1959), Seinhorst y Sturrock (1961), Bawden (1969), Heath y Major (1968), Laboratorio Central Veterinario de Weybridge-L.C.V.W.- (1973), Smeal y Hendy (1972), Van Dyne y Torell (1974), --Burger (1981), Bairden, Duncan y Armour (1981), Reynaud y Gruner (1981). La mayoría de estos investigadores se basan además del principio general mencionado por Euzéby (1981), en la técnica propuesta por Baermann (1917) -citado por Nemeseri y Holló (1961)-, es decir, el de Migración Larvaria. También se ha propuesto el uso de algunas sustancias químicas, como por ejemplo, la Formalina en diferentes diluciones en la obtención de larvas de n.g.e., lo que provoca la muerte de los nematodos de vida libre y fitonematodos, mientras que las L₃ de n.g.e., continúan vivas pero con movimientos más lentos, Nemeseri y Holló (1961).

Durie (1959) - citado por Euzéby (1981) -, sugiere una técnica para el lavado de una muestra de hierba, usando un chorro de agua dirigida de abajo hacia arriba; esta agua arrastrará o contendrá a las larvas presentes en la hierba, y estará dirigida hacia un tamiz con mallas de 25 micras donde se recolectarán las larvas en un volumen determinado.

Seinhorst y Sturrock (1961) - citado por Euzéby (1981) -, modificaron el funciona--

miento del aparato de Baermann utilizando nuevo material un tanto sofisticado y poco práctico, y donde el tiempo mínimo de obtención de la muestra es de 2 días, pudiendo ser hasta 4 días.

Un estudio realizado por Bawden (1969) - citado por Euzéby (1981) -, sugiere que el sedimento de la muestra de pasto obtenido por la Técnica de Baermann, se filtre sobre tamices con mallas cada vez más finas, permitiendo el paso de las larvas y colectándose al final sobre filtros "Millipore" con poros de 10 micras.

Otro método de investigación consiste en el análisis helmintológico de la hierba tomada del animal mismo que ya ingirió y masticó, obteniendo la muestra (100-200 g de hierba) por fístula esofágica después de la deglución. Aunque esta técnica no permite la recuperación total de hierba ingerida, es muy interesante, al observarse que únicamente un pequeño número de larvas se pierde durante la masticación y la deglución y además, constataron que se puede recuperar mayor cantidad de larvas en la hierba masticada que en la hierba de las praderas (Heath et al., 1968; Van Dyne y Torell, 1974).

Smeal y Hendy (1972) - citado por Euzéby (1981) -, utilizan un método donde se procesa un filtrado de suspensión larvaria lo cual proponen el empleo de un aparato bastante complejo, y que requiere más de 12 horas para obtener resultados; la posible ventaja que ofrezca, es que permite trabajar varias muestras a la vez.

El L.C.V.W. (1973) utiliza la siguiente técnica: se pesan 500 g de pasto y se sumergen en una cubeta con 10 litros de agua; se deja así reposar durante 2 horas y después se remueve la hierba, sacándola por pequeñas porciones y comprimiéndola manualmente; se pasa a una segunda cubeta con agua y se repite el lavado. Las dos cubetas se dejan en reposo - hasta el día siguiente permitiendo así la sedimentación de las larvas. Después, se elimina el sobrenadante por sifonado hasta dejar 400 ó 500 ml en cada cubeta. Ese sedimento - se pasa por un tamiz de 100 mallas y se coloca en una copa, donde permanecerá 3 horas para

sedimentar. Nuevamente se elimina el sobrenadante por sifonado hasta dejar 60 ml y ese sedimento se somete a la flotación de sal común. Con esta técnica se recogen el 40% de las larvas presentes en la hierba.

Burger (1981), cita una técnica para la recuperación de larvas de n.g.e. a partir de forrajes, utilizando una lavadora eléctrica comercial ("Washing machine"). El líquido obtenido del lavado se pasa a través de un tamiz de 250μ para eliminar detritos vegetales y después las larvas se colectan en una malla de 25μ y finalmente para concentrarlas, se centrifuga 3 veces con solución saturada de Sulfato de Magnesio (s.g. = 1.28); el porcentaje de recuperación larval es del 60%.

Bairden, Duncan y Armour (1981), al recuperar larvas infectantes de tricostrongilidos a partir del suelo, utilizaron una técnica basada en los principios de sedimentación y filtración (con mallas de 27μ), seguida de una extracción por medio del aparato de Baermann y obtienen un 60% de recuperación larvaria.

Raynaud y Gruner (1981) compararon 2 técnicas para evaluar la contaminación de pastos con larvas infectantes de n.g.e. 1a.) Técnica de remojo y colado, en la cual la muestra de pasto se deja remojar en cubetas con agua y detergente. El pasto se deja así durante 12 horas y al final se pasa a través de un cedazo de 200μ y posteriormente por otro de 20μ donde quedarán atrapadas las larvas presentes; 2o.) Técnica del lavado mecánico, utilizando una lavadora eléctrica o bien una mezcladora de cemento, según el método de Jorgensen (Comunicación personal citada por Raynaud y Gruner, 1981). El líquido de lavado se pasa por un cedazo con abertura de 200μ colectándose las larvas hacia un embudo de metal diseñado especialmente, en el cual se coloca una tela de "nylon" con malla de 20μ . Lo anterior se realiza con la ayuda de una regadera de plástico manual.

En nuestro país, pocos son los laboratorios que realizan análisis helmintológicos de los pastos. En el laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Investiga-

ciones Pecuarias (I.N.I.P. - S.A.R.H.), se utiliza la técnica simple de Migración Larvaria para forrajes, con el inconveniente de que al revisar el sedimento final existe una gran cantidad de detritos, fitonematodos y nematodos de vida libre inclusive dificultando la extracción de las larvas de n.g.e.

HIPOTESIS

Al tamizar muestras de sedimentos de pasto, obtenidos a través de la Técnica de Migración Larvaria para forrajes, se eliminan detritos lo cual facilita la extracción y observación de las larvas de n.g.e. presentes.

OBJETIVO

Comparar la técnica simple de Migración Larvaria para forrajes, con la técnica de Migración Larvaria para forrajes más tamizado, en la obtención de larvas infectantes de nematodos gastroentéricos.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 10 muestras de pasto Kikuyo (Panicetum clandestinum) colectadas de parcelas de tipo experimental (1.90 m X 1.40 m) de la Unidad Central del I.N.I.P. y libres de nematodos gastroentéricos.

Se hicieron 2 grupos A y B, con 5 muestras de 100 g de pasto cada una, cortándose en pequeños trozos y colocados en gasa de 40 X 40 cm. A cada muestra se le añadieron en forma homogénea 2500 larvas infectantes (L₃) de Haemonchus spp. diluidas en 30 ml de agua. Las larvas del inóculo se obtuvieron por medio de coprocultivo de heces de un ovino infectado con Haemonchus spp.

Las muestras del grupo A se trabajaron con la Técnica de Migración Larvaria para forrajes o de rutina y las del grupo B, con la Técnica de Migración Larvaria para forrajes en una primera fase, y en una segunda fase, se procesaron mediante la Técnica de Tamizado siguiendo las indicaciones descritas en la técnica original a partir del inciso 4.

A continuación se describe en su forma original la Técnica de Migración Larvaria para forrajes y la Técnica del Tamizado.

Técnica de Migración Larvaria para forrajes.

Material:

- a) Cubeta de plástico de 6 lts.
- b) Gasa de algodón.
- c) Copas de plástico de 500 ml.
- d) Cajas de Petri de 10 cm de diámetro.
- e) Pipeta Pasteur con tapón de hule.
- f) Manguera de hule latex.

- g) Porta objetos y cubre objetos.
- h) Solución de Tintura de Yodo.
- i) Microscopio estereoscópico y microscopio compuesto.

Método:

1.- Se colocan 100 g de pasto cortado en pequeños trozos sobre gasa de 40 X 40 cm, se unen las cuatro puntas de ésta, se anudan con un cordel y se introducen en una cubeta inclinada que contenga agua tibia (25°C). La cantidad de agua será la suficiente para cubrir el paquete de gasa conteniendo la muestra. Evitar que ésta toque el fondo de la cubeta, para lo cual sujeta con cañamo delgado y "masking-tape" en uno de los bordes de la cubeta.

2.- Se deja reposar la muestra 24 hrs.

3.- Después de transcurrido ese tiempo, se retira la muestra suavemente para no agitar el sedimento, y se decanta el sobrenadante por sifonado con una manguera de hule látex.

4.- El sedimento que quedó en la cubeta, se recolecta en una copa de plástico y se deja reposar 3 horas.

5.- Después de ese tiempo, se decanta el sobrenadante de la copa también por sifonado utilizando una manguera de hule látex.

6.- Este último, se pasa a una caja de Petri y se observa al microscopio estereoscópico con los objetivos de 16x y 40x.

7.- De encontrarse larvas éstas se detectarán por su movilidad característica. A partir de aquí se procede mediante una pipeta Pasteur, a obtener las larvas presentes en el sedimento para su cuantificación (fig. 1).

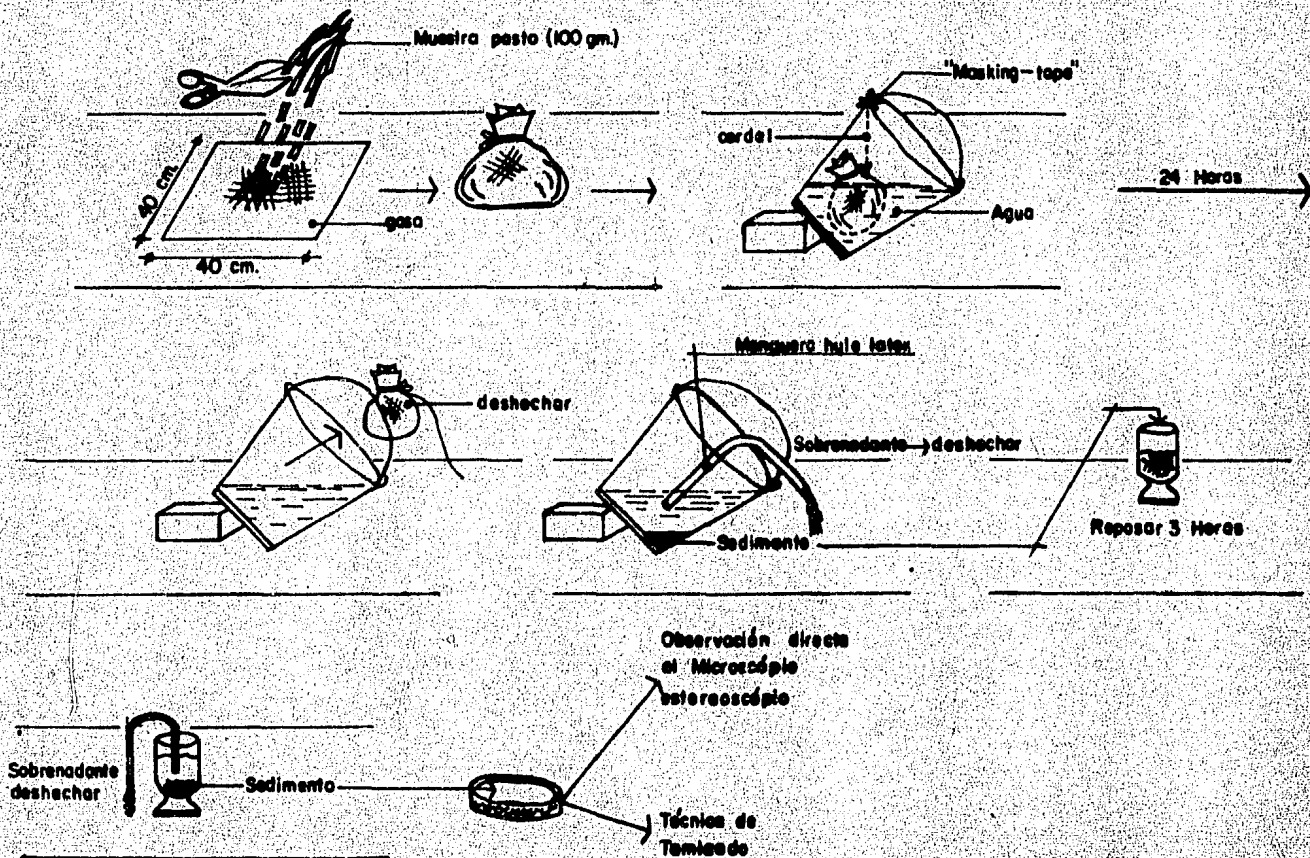


Fig. 1. Esquema de la Técnica de Migración larvaria para forrajes.

Técnica del Tamizado*

Material:

- 1.- Recipientes de aluminio o plástico de 3 a 4 lts.
- 2.- Embudos de lámina de 20 cm de diámetro y tallo de 10 X 1 cm.
- 3.- Tamices de malla de bronce de 40, 100, 200, 325 y 500 mallas.
- 4.- Frascos de vidrio de boca ancha de 6 cm de diámetro por 16 cm de altura.
- 5.- Pisetas de polietileno para agua de 1 lt.
- 6.- Muestra de suelo (1 kg).

Método:

- 1.- En el frasco de boca ancha (6 X 16 cm), se vierte agua hasta 200 ml y enseguida se agrega la muestra de suelo hasta la marca de 400 ml.
- 2.- Esa mezcla se vierte en un recipiente de aluminio, agregando 2 litros de agua y se homogeniza manualmente.
- 3.- Sin dejar sedimentar esa mezcla, se pasa por el tamiz de 10 mallas y el filtrado se recoge en un segundo recipiente, de esta manera se eliminan piedras, raíces, etc.
- 4.- El líquido así filtrado, se vuelve a pasar por el tamiz de 40 mallas recogiendo éste en un recipiente. El residuo que queda en el tamiz de 40 mallas, se debe coleccionar en el "frasco colector", lavando con una piseta y en zig-zag la malla, por dentro y por fuera de ésta.
- 5.- Se sigue este mismo procedimiento con los tamices de 100, 200, 325 y 500 mallas.
- 6.- Al final, se pasa nuevamente el líquido del frasco colector por el tamiz de 500 mallas a un nuevo frasco, con el fin de reducir el volumen de líquido; el material retenido en la malla, se recoge por medio de una piseta con agua, con movimiento de zig-zag y se pasa a un segundo frasco colector que concentrará a los fitonematodos --

presentes (fig. 3).

* Utilizada en el laboratorio de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, para la separación de nematodos del suelo (De la Jara y Zerón, 1980).

Nota. En el presente estudio el número 1 de la técnica la muestra que se usa es la colectada con la técnica de Baermann para forrajes (ver fig. 2).

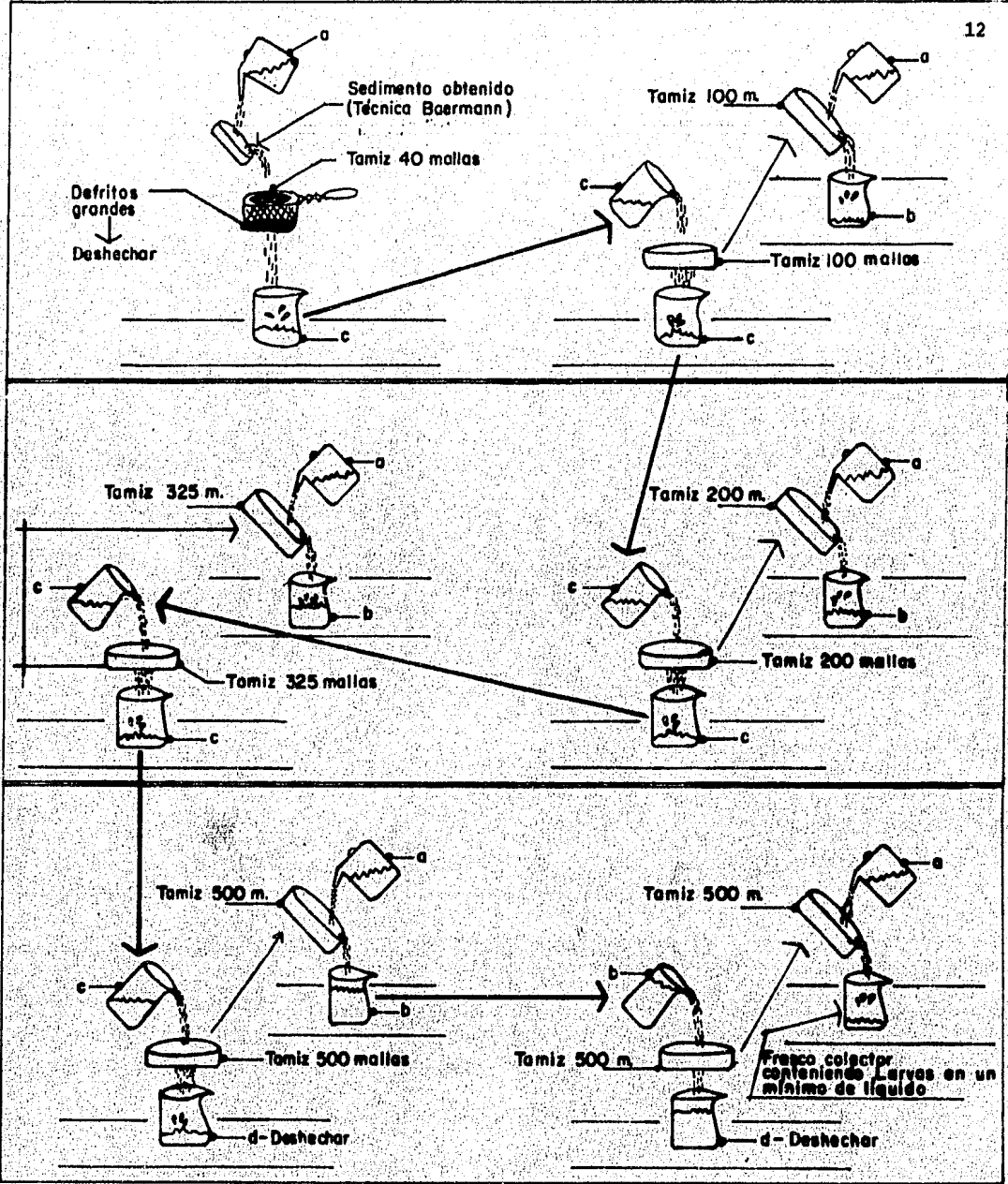


Fig. 2. Esquema de la Técnica del Tamizado practicado en el presente estudio.

- a) Pizeta con agua para lavado. b) Frasco colector con líquido conteniendo larvas.
 c) Líquido sobrenadante conteniendo larvas. d) Líquido sobrenadante sin larvas.

RESULTADOS.

En el grupo A, el número de larvas recuperadas a las 24 horas fue el siguiente: - 1518, 1910, 1179, 1458 y 1308 para cada muestra respectivamente, correspondiendo en porcentaje a un 60.72%, 76.40%, 47.16%, 58.32% y 52.32%, lo que equivale a un promedio total del 58.98% de recuperación larvaria para esta técnica.

En el grupo B, la recuperación larval final fue de 1024, 965, 1491, 1724 y 1283 para cada muestra respectivamente, correspondiendo en porcentaje a 40.96%, 38.60%, 59.64%, 68.96% y 51.32%, resultando un promedio total de 51.89% de recuperación larvaria (Cuadro 1).

En el cuadro 2 se observan los resultados del tamizado de las muestras del grupo B, donde se anotan el número de larvas obtenidas en cada tamiz así como en el sedimento final y su total recuperación.

Se practicó la prueba T de Student y se verificó que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambas técnicas ($P > 0.01$).

**MODIFICACION A LA TECNICA DE MIGRACION LARVARIA PARA FORRAJES EN LA
OBTENCION DE LARVAS DE NEMATODOS GASTROENTERICOS.**

Cuadro 1. Cantidad y porcentaje de larvas infectantes de *Haemonchus* spp. recuperadas mediante 2 Técnicas de Migración Larvaria para forrajes.

Número de Muestras de Pasto		Técnicas de Migración Larvaria			
		Simple	Larvas Recuperadas		Más Tamizado
		Cantidad	%	Cantidad	%
A ₁	B ₁	1518	60.72	1024	40.96
A ₂	B ₂	1910	76.40	965	38.60
A ₃	B ₃	1179	47.16	1491	59.64
A ₄	B ₄	1458	58.32	1724	68.96
A ₅	B ₅	1308	52.32	1283	51.32
P R O M E D I O			58.98		51.89

No existió diferencia estadísticamente significativa entre las 2 técnicas ($P > 0.01$).

A = Técnica de Migración Larvaria simple.

B = Técnica de Migración Larvaria más Tamizado.

MODIFICACION A LA TECNICA DE MIGRACION LARVARIA PARA FORRAJES EN LA
OBTENCIÓN DE LARVAS DE NEMATODOS GASTROENTERICOS

Quadro 2. Cantidad de larvas infectantes de *Haemonchus* spp., colectadas bajo la
Técnica de Migración Larvaria más Tamizado.

N° de Muestras de Pastos*	Tamiz 40 L ₃	Tamiz 100 L ₃	Tamiz 200 L ₃	Tamiz 325 L ₃	Tamiz 500 L ₃	Sedimento final L ₃	T o t a l Recuperado L ₃
B ₁	0	45	232	407	119	221	1024
B ₂	0	20	172	103	175	495	965
B ₃	0	22	146	179	419	725	1491
B ₄	0	11	672	234	234	573	1724
B ₅	0	6	257	245	245	530	1283

* Muestra de pasto infectado con 2,500 L₃ de Haemonchus spp.

Utilizando el microscopio estereoscópico se observó que los sedimentos tamizados del grupo B, estaban más limpios que los sedimentos no tamizados del grupo A.

Al extraer las larvas, fue más fácil apreciar las características de la L₃ de n.g.e., es decir, su movimiento vigoroso en zig-zag, la presencia de la vaina larval - misma que le dá un aspecto afilado en el extremo posterior, así como su contenido celomático rico en células embriológicas; caracteres que en nematodos de vida libre no se aprecian.

Además, con el microscopio óptico, se verificaron las características morfológicas según las claves de identificación correspondientes. (Quadro 3; figura 4-7).

Cuadro 3. Características morfológicas de las larvas infectantes (L₃) de nematodos gastroentericos y de las larvas y adultos de nematodos de vida libre y fitonematodos.

NEMATODOS GASTROENTERICOS (L ₃)	FITONEMATODOS Y NEMATODOS DE VIDA LIBRE
<ol style="list-style-type: none"> 1.- Las larvas miden 500 μ a 1200 μ. 2.- Ausencia de estilete y presencia de estructuras características en algunos géneros por ejem.: en región anterior cuerpos refringentes en <i>Cooperia</i> spp. y "manchas de cobra" en <i>Mecistocirrus</i> sp. 3.- Esófago rabadiforme en los estadios L₁ y L₂ y filariforme para L₃. 4.- Presentan células intestinales en el celoma, en número variable (8-16-32) y de diferente forma (triangular, pentagonal, etc.). 5.- Poseen vaina larval de diferente tamaño. 6.- Ausencia de gonoporo o vulva. <p>Keith, 1953; Nec, 1968; Iab. Central Veterinario de Weybridge, 1973; Euzéby, 1981).</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Las larvas miden 500 μ y los adultos hasta 1000 μ. 2.- Los adultos pueden o no presentar estilete y hilbos del estilete en cavidad bucal. 3.- Esófago rabadiforme presente en todos los estadios. 4.- Larvas y adultos presentan contenido granular en el celoma. 5.- No poseen vaina larval. 6.- Las hembras adultas presentan una vulva en la mitad posterior del cuerpo con labios vulvares aparentes; los machos presentan un par de espículas pequeñas y oscuras y carecen de bursa copulatrix. <p>(Christie, 1976; De la Jara y Zerón, 1980).</p>

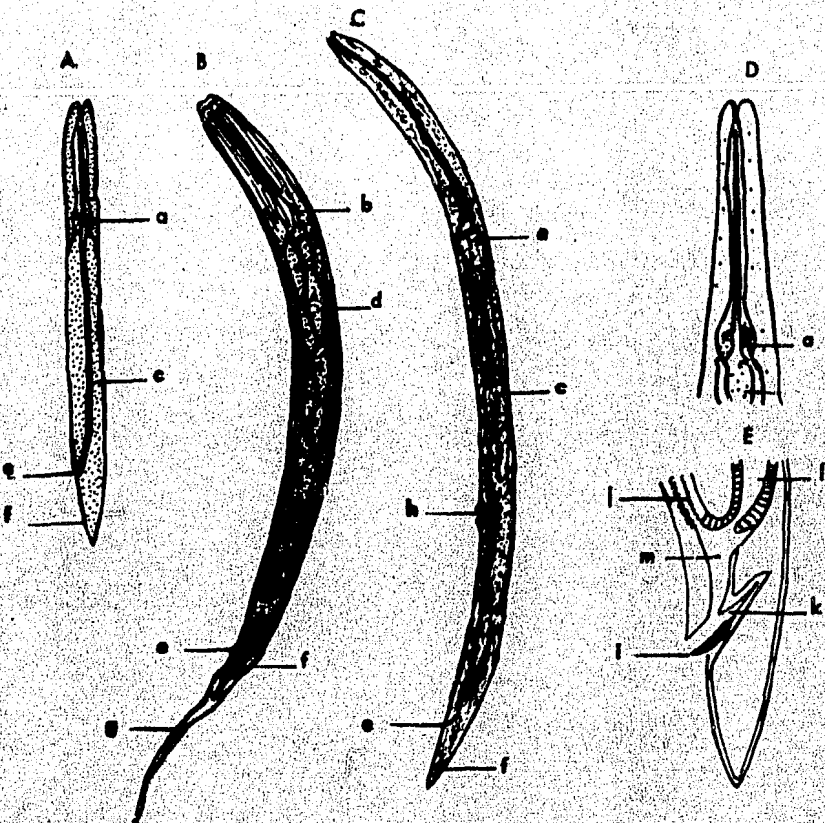


Fig. 3. Estructura esquemática de: A, Larva L₁ y/o L₂ de nemátodo gastrointestinal; B, Larva L₃ de nemátodo gastrointestinal; C, Nemátodo de vida libre (hembra adulta); D, Nemátodo adulto de vida libre: extremidad anterior; E, Nemátodo adulto de vida libre: extremidad posterior de un macho. a) Esófago rabbitiforme b) Esófago filariforme c) Intestino (contenido granular) d) Células intestinales e) Ano f) Cola del cuerpo de la larva y/o adulto g) Cola de la vaina de la larva h) Vulva (labios vulvares opuestos) j) Espícula j) Conducto eyeculador k) Vaina de la espícula l) Intestino (porción rectal) m) Región cloacal.

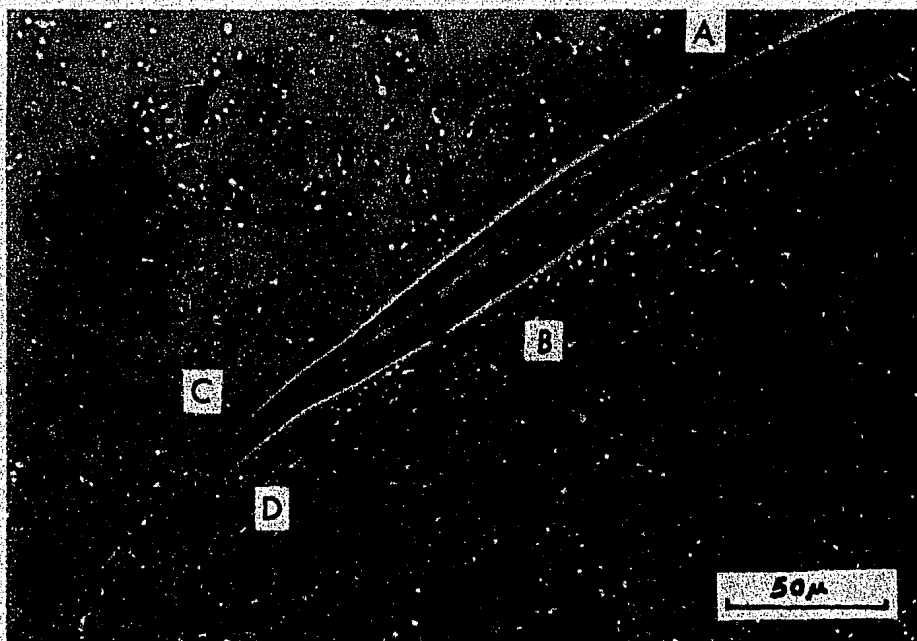


Figura 4. Extremidad posterior de una larva infectante (L₃) de Haemonchus spp. A, Célula intestinal; B, Ano; C, Cola de la larva; D, Cola de la vaina.

Liébano (1984).

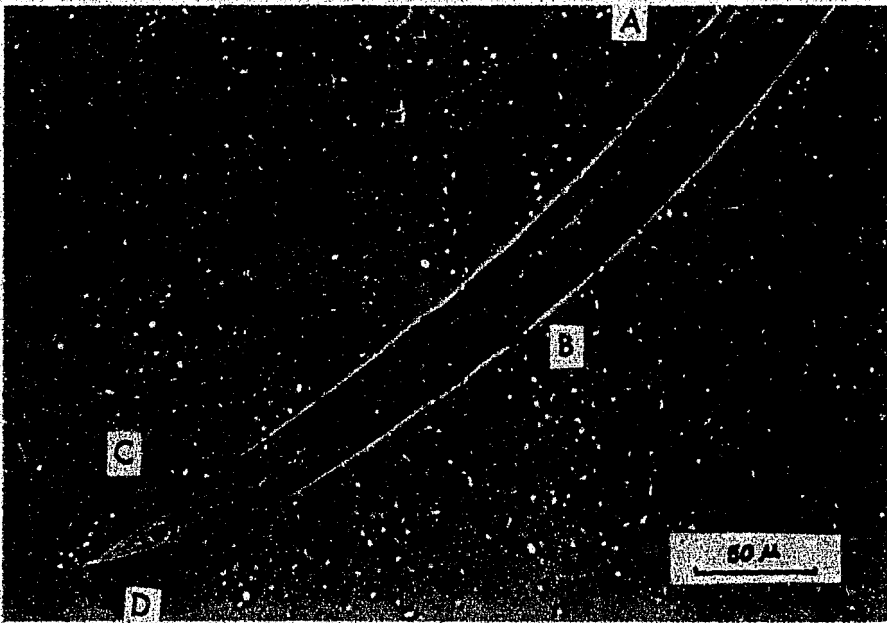


Figura 5. Extremidad posterior de un nematodo adulto (hembra) de vida libre. A, Labios vulvares aparentes; B, Intestino; C, Ano; D, Cauda.

Liébano (1984).

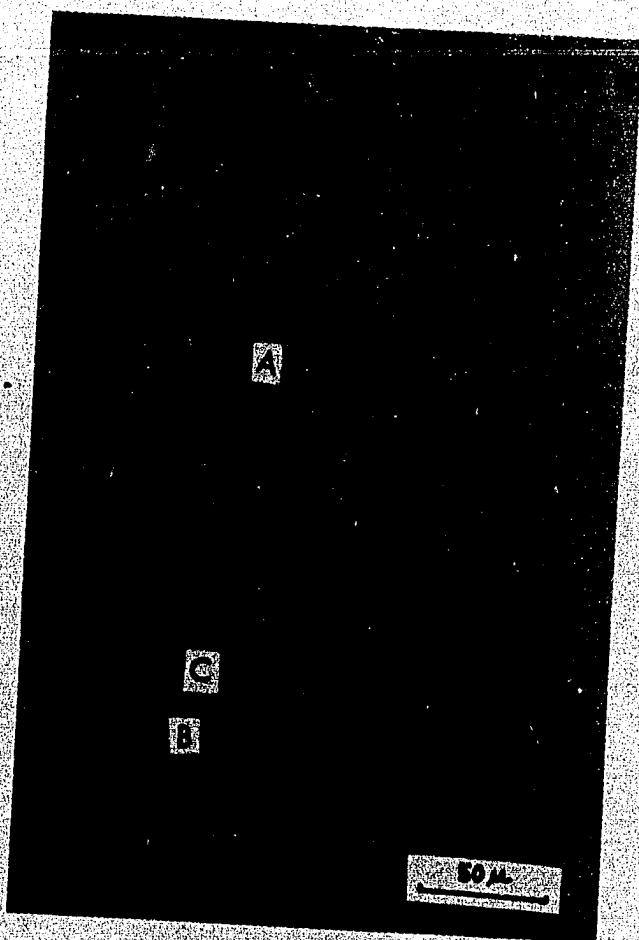


Figura 6. Extremidad posterior de un nematodo adulto (macho) de vida libre. A, Intestino; B, Cloaca; C, Espículas.

Liébano (1984).

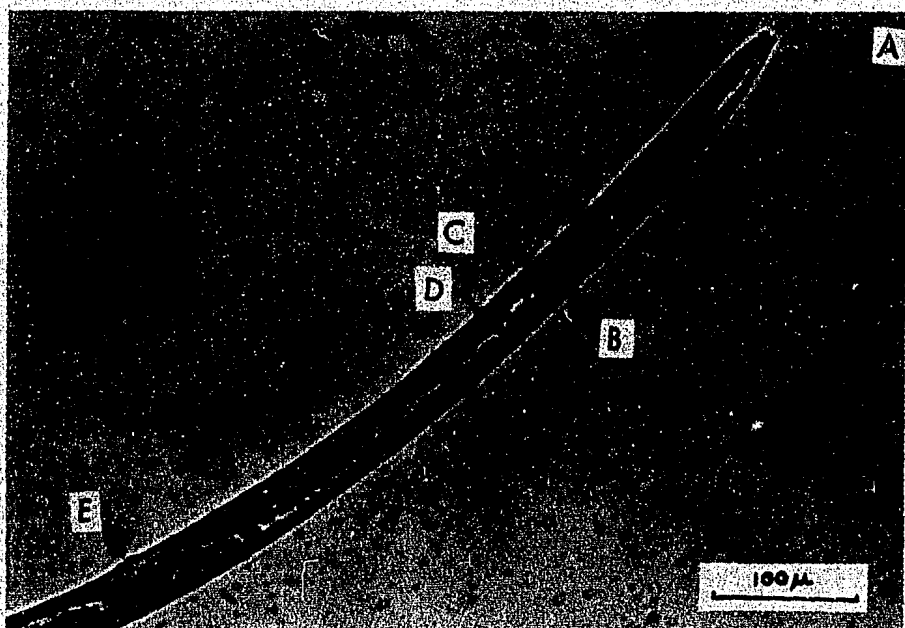


Figura 7. Extremidad anterior de un nematodo adulto (hembra) de vida libre. A, Abertura oral; B, Esófago rhabditiforme; C, Aparato rhabditoide; D, Luz intestinal; E, Vulva.

Liéban (1984).

DISCUSION

Los promedios de recuperación larvaria encontrados en este estudio, fueron del 58.98% y 51.89%, para los grupos A y B respectivamente, comprobándose además al practicar la prueba T de Student, que no existió diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.01$), en lo concerniente al número de larvas recuperadas.

Estos porcentajes obtenidos coinciden con lo mencionado por Bairden, Duncan y Armour (1981) quienes recuperaron un 60% de las larvas en muestras de hierba y suelo, pero con el inconveniente de que se emplean materiales caros como son un lienzo de nylon con una abertura de malla de 20μ y de un aparato especialmente diseñado en aluminio semejante a un embudo de Baermann, lo cual eleva considerablemente los costos de la técnica. Por el contrario, con la técnica señalada por el L.C.V.W. (1973), sólo se recogen el 40% de las larvas de Flotación de sal común, lo que implica aumentar el número de operaciones manuales por parte del laboratorio.

En cuanto al grado de limpieza que presentaron los sedimentos obtenidos en cada una de las técnicas, el de la técnica B, ofreció una menor cantidad de detritos en comparación con el de la técnica A, esto se debe a la utilización de los diferentes tamices. Raynaud y Gruner (1981), señalan una recuperación del 80% de larvas con la técnica del remojo y colado, pero en su elaboración no menciona el procedimiento para cuantificar las larvas y además sólo utilizan un tamiz de 20μ , lo que hace pensar que dicho sedimento pudiera contener gran cantidad de detritos lo cual por experiencia se comprobó que dificulta la extracción de larvas.

En el presente trabajo, el diámetro de la última malla que se empleó fue de 10μ , y contrariamente a lo que se esperaba lograron pasar larvas a través de éste. Bawden (1969) utiliza diversos tamices cada vez más finos, colectando finalmente a las larvas sobre filtros "Millipore" con aberturas de 10μ , aunque no menciona nada referente ni a

porcentaje de recuperación larvaria; ni al grado de limpieza del sedimento estudiado; - además, el uso de filtros "Millipore" aumenta considerablemente el costo de técnica. - Durie (1959) y Bairden, Duncan y Armour (1981), usan tamices con mallaje de 25 y 27 μ de diámetro respectivamente, obteniendo un 60% de recuperación de larvas.

En relación al tiempo empleado en el manejo de las muestras, con la técnica A se necesita un promedio de 32 horas y con la técnica B, un promedio de 28 horas en la obtención de las larvas infectantes; en ésta última, el tiempo se reduce debido a la limpieza del sedimento. Según el número de larvas a diferenciar, se necesitan de 10 a 20 minutos por laminilla para el examen microscópico. Burger (1981), emplea un tiempo promedio de 10 horas en el manejo e identificación de sus muestras, pero requiere de equipo (lavadora eléctrica para ropa) y reactivos (Sulfato de Magnesio) costosos. Raynaud y Gruner - (1981), citan para su técnica de remojado y colado un mínimo de 2 días. Por otra parte, Seinhosrt y Sturrock (1961) mencionan una duración de 2 a 4 días para realizar su técnica.

Otro de los problemas que se presentan al realizar un estudio de larvas en pasto, es de tipo biológico, es decir que no solamente se encuentran larvas infectantes de n.g.e. sino también están presentes otros elementos constituyentes de la fauna del suelo, tales como los fitonematodos en sus formas larvarias y/o adultos. Al coleccionar las larvas con el microscopio estereoscópico, se deberán observar el tipo de movimiento del nematodo, - siendo para los n.g.e. vigoroso y en zig-zag, mientras que en los de vida libre es lento y ondulante. Además con experiencia en la práctica visual, se pueden observar con - el microscopio estereoscópico algunos caracteres morfológicos propios de los fitonematodos, tales como la ausencia de la vaina larval, el cuerpo robusto, la presencia de la - vulva a la mitad del cuerpo en la hembra y en ocasiones, también se lograron apreciar - las espículas de color obscuro en el macho (Cuadro 3); lo anterior es fácil verificarlo

al emplear el microscopio óptico. También es frecuente encontrar como parte de la fauna del suelo a diferentes géneros de artrópodos, los cuales aunque es de especialistas determinar su especie, a la observación es fácil reconocerlos.

En estudios de tipo epidemiológico, es de gran utilidad la información aportada por el examen helmintológico de las praderas y/o pastos, es por ello que sería deseable que en los laboratorios Veterinarios de Diagnóstico en el país, se instituyera éste tipo de exámenes como parte de los servicios que se ofrecen al público.

CONCLUSIONES

- No existió diferencia estadísticamente significativa al comparar la Técnica de Migración Larvaria para forrajes de rutina (Técnica A), con la Técnica de Migración Larvaria para forrajes más Tamizado (Técnica B).

- El porcentaje de recuperación larvaria en las Técnicas A y B, fue del 58.98% y del 51.89% respectivamente. Ambas técnicas son cualitativas aunque al utilizar la segunda se observan las siguientes ventajas:

- a) Mayor limpieza del sedimento.
- b) Facilidad y ahorro de tiempo en la recolección manual de las larvas lo que permite así procesar un mayor número de muestras.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- 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. pp. 31-42.
- 2.- Bawden R.J., 1969. A rapid technique for the recovery of Strongyloid larvae from pasture samples. Austr. Vet. J., 45: 228-230. -Citado por Euzéby, 1981-.
- 3.- 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. pp. 25-30.
- 4.- Christie, J.R., 1976. Nematodos de los vegetales. Su ecología y control. Editorial Limusa. México, pp. 4,5.
- 5.- De la Jara F., Zerón F., 1980. Método para la separación de nemátodos del suelo. Formas libres. Técnica de lavado o tamizado. En: Manual de Prácticas de Nematología Agrícola. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., p. 32.
- 6.- Durie P.H., 1959. A new technique for the recovery of infective strongyle larvae from soil and pasture. J. Helm., 33: 189-196. -Citado por Euzéby, 1981-.
- 7.- Euzéby J., 1981. Diagnostic Experimental des Helminthoses Animaux (Animaux domestiques-Animaux de laboratoire-primates). Travaux Pratiques d'Helminthologie Vétérinaire. Livre I: Généralités Diagnostic ante-mortem. Edition "Informations Techniques des Services Vétérinaires" Ministère del 1'

- Agriculture. Paris, 1981. pp. 154, 156, 157 y 158.
- 8.- Heath D.D. et al., 1970. The use sheep fistulated at the oesophagus for the recovery of Strongyloid larvae from pasture. Parasitology, 60: 281-289. -Citado por Euzáby, 1981-.
 - 9.- Keith, R.K., 1953. The differentiation of the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. Austr. J. Zool. 1 (2): 223-235.
 - 10.- Laboratorio Central Veterinario. Weybridge (Gran Bretaña). Manual de Técnicas de Parasitología Veterinaria. (Traducido por Tarazona Vilas J.M.) 1973. - Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp 20, 53, 54 y 55.
 - 11.- Lapage G., 1979. Parasitología Veterinaria. (2a. ed. en Inglés, 1968) 1a. Publicación en Español (1971) 5a. Impresión. Compañía Editorial Continental, S.A., México. pp 122-123.
 - 12.- Levine D.N., 1980. Nematode Parasites of domestic animals and of man. 2nd. edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota. pp. 43-44.
 - 13.- Nemeséri, L. y Holló, F., 1961. Diagnóstico Parasitológico Veterinario. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp. 81-82.
 - 14.- Niec R., 1968. Cultivo e identificación de larvas infectantes de nemátodos gastrointestinales de bovinos y ovinos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. p. 17.
 - 15.- 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. pp. 51-68.

- 16.- Seinhorst J.W. and Sturrock R.F., 1961. The quantitative use of the Seinhorst - "mistifer" to recover nematodes from soil, faeces and herbage. *J. Helm.*, 35: 309-314. -Citado por Euzéby, 1981-.
- 17.- Smeal M. G. and Hendy G.A., 1972. A technique for the recovery of Strongyloid infective larvae from pasture. *J. Helm.*, 46: 201-211. -Citado por Euzéby, 1981-.
- 18.- Soulsby E.J.L., 1976. *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals.* (Sixth Edition of Monnig's Veterinary Helminthology and Entomology). The Williams and Wilkins Company, Baltimore. p. 184.
- 19.- Soulsby E. J. L., 1982. *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals.* 7th. edición. Bailliere Tindall. London.
- 20.- Van Dyne G. M. and Torell D. T., 1974. Development and use of the oesophageal fistula: a review. *J. Range Management*, 17: 7-19. -Citado por Euzéby, 1981-.