

16  
Zej



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**Facultad de Estudios Superiores  
CUAUTITLAN**



**VALORACION DE SEIS TECNICAS DE COPROCULTIVO PARA  
Haemonchus contortus**

**T E S I S**

Para obtener el Título de  
**MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

p r e s e n t a

**JOSE LUIS BELTRAN SANCHEZ**

Director de Tesis: M.V.Z. ALFREDO CUELLAR ORDAZ  
Director de Tesis: M.V.Z. DAVID HERRERA RODRIGUEZ

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1984



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

## S U M A R I O

I. INTRODUCCION

II. MATERIAL Y METODOS

III. RESULTADOS Y DISCUSION

IV. CONCLUSIONES

V. BIBLIOGRAFIA

## I.- INTRODUCCION:

Es conocido que la mayor parte de las parasitosis gastrointestinales en los ruminantes cursan con signos inespecíficos, es por esta razón que se trató de establecer un método práctico y eficaz de diagnóstico valiéndose para ello de distintas técnicas coproparasitológicas.

El diagnóstico de una parasitosis interna puede llevarse a efecto, observando las formas de eliminación de los parásitos hembras, huevos o larvas.

Para este fin se han desarrollado diferentes tipos de exámenes: cualitativos y cuantitativos.

1.- Exámenes cualitativos.- Son llamados así porque solamente nos indican la presencia de parásitos en el animal (9). (Nemeseri y Holló, 1961) (10) los divide en directos o al natural, e indirectos o de concentración.

a) Dentro de las técnicas directas.- Se considera el método simple de extensión y el método de Pataki.

b) Dentro de las técnicas indirectas.- Existen varios métodos, siendo los más comunes el método de la concentración por sedimentación, método de Toleman (1908), método de Benedek (1943), método de la concentración superficial (flotación), concentración con solución de sal común o concentración por medio de soluciones azucaradas.

Exámenes cuantitativos. Nos dan una idea del grado de infección parasitaria de animal o animales examinados, al suministrararnos una relación numérica

que se expresan en cantidades de huevos por gramo de heces (9). (Nemeseri y Hoiló, 1961) (10) menciona el método de Mc Master y el método de Wetzel. Todas las técnicas anteriormente mencionadas ponen de manifiesto huevos de nemátodos, oquistes de coccidias, huevos de céstodos, pero con solo esta información no es posible saber cuantos géneros de nemátodos gastroentéricos están involucrados en el problema, ya que con excepción de los géneros: Toxocara spp., Strongyloides spp., Nematodirus spp. y Trichuris spp., identificables por la morfología del huevo (Keith, 1953 (8); Villaseñor, 1973 (16); Borgsteede y Hendriks, 1974 (3); Thienpont, Rochette y Vanparijs, 1979 (15), los demás géneros que habitan el tracto gastrointestinal eliminan huevos morfológicamente similares y por lo tanto no identificables fácilmente.

Para poder lograr la identificación de los géneros de los nemátodos gastroentéricos involucrados se tienen que recurrir a técnicas de coprocultivo, con el objeto de identificar larvas infectantes, que por su morfología pueden ser claramente distinguidas.

Una gran cantidad de métodos han sido desarrollados tales como, la técnica de coprocultivo en frasco (\*), técnica del serrín estéril (1), técnica de coprocultivo en placa de Petri (9), técnica de las heces estériles (13), técnica de Corticelli (12), técnica de hule espuma (2).

Cauthen, (1940) (5), elaboró un método para obtener un gran número de larvas de Haemonchus contortus, a partir de los huevos existentes en las heces del ganado, utilizando como vehículo del cultivo al musgo Sphagnum, obteniéndose mejores resultados que con los métodos de las heces estériles de ovinos

(\*) Técnica elaborada en el departamento de Parasitología del I.N.I.P.

y el método del carbón de hueso.

O'Sullivan y Roberts (1949) (12), mencionan que obtuvieron buenos resultados en el cultivo de larvas de parásitos gastroentéricos de bovinos, utilizando heces estériles y heces frescas.

Abdel-Gawad (1974) (1) obtiene satisfactorios cultivos de larvas de nemátodos gastroentéricos de ovinos utilizando la técnica del serrín estéril.

#### OBJETIVOS:

Comparar 6 técnicas de coprocultivo, con el fin de determinar:

1. Cual proporciona el mayor número de larvas infectantes de Haemonchus contortus.
2. Comparar cual de ellas es lo más práctica y económica.

#### II. MATERIAL Y METODOS.

Infección experimental del borrego:

Se infectó un borrego de raza Pelibuey macho, de 4 meses de edad libre de nemátodos gastroentéricos con 10,000 larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de Haemonchus contortus. Obtenidas en el Departamento de Parasitología del I.N.I.P., una vez que el borrego eliminó huevos del parásito se le colocó un calzón metabólico para la recolección total de las heces, las cuales fueron adquiridas durante 5 días consecutivos, (número de muestras), a las 9 am., con las heces obtenidas de un día se elaboró inmediatamente las seis diferentes técnicas.

Técnicas utilizadas:

Las técnicas que se realizaron en el presente estudio fueron:

1. Técnica del hule espuma (técnica utilizada en el laboratorio de Parasitología de la Universidad Estatal de Colorado, E.U., 1980) (2).

2. Técnica del serrín estéril (Abdel Gawad, 1974) (1).

3. Técnica de coprocultivo en frasco (Técnica utilizada en el Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias). (\*)

4. Técnica de coprocultivo en caja de Petri (Morales y Arellano 1977) (9).

5. Técnica de las heces estériles (O'Sullivan and Roberts, 1949) (13).

6. Técnica de Corticelli (Niec, 1968) (12).

1. Técnica del hule espuma. (2).

MATERIAL.

1. Mortero, pistilo.

2. Hule espuma.

3. Cucharas de aluminio.

4. Charola de plástico.

5. Frasco de vidrio con una boca de 2 1/2 pulgadas y de 6 1/2 pulgadas de altura, con tapa.

\* Técnica elaborada en el Departamento de Parasitología del I.N.I.P.

#### DESARROLLO DE LA TECNICA

1. Pesar 20 g. de heces.
2. Homogeneizar las heces con agua común.
3. El homogeneizado se coloca en una charola de plástico con trozos de hule espuma (de aproximadamente 5 cm de largo por 3 cm de ancho), y se mezcla en una proporción (1 de heces por 4 de hule espuma) en relación volúmen.
4. Una vez realizada la mezcla hule espuma-heces se ponen en un frasco de vidrio, se tapa sin cerrar herméticamente, diariamente se humedece con agua común y se deja a temperatura ambiente 15 días.
5. A los 15 días se procede a colocar en el aparato de Baermann.

#### 2. Técnica del serrín estéril (1).

#### MATERIAL.

1. Mortero, pistilo.
2. Serrín estéril.
3. Cucharas de aluminio.
4. Charola de plástico.
5. Frasco de vidrio con una boca de 2 a 2 1/2 pulgadas y de 6 1/2 pulgadas de altura con tapa.
6. Estufa.
7. Autoclave.

#### DESARROLLO DE LA TECNICA.

1. Pesar 20 g. de heces.
2. Homogeneizar las heces con agua común.



3. El homogeneizado se coloca en una charola de plástico y se mezcla con el serrín estéril (aproximadamente 2/3 partes mas de serrín estéril que el volúmen de las heces).
4. Una vez realizada la mezcla serrín estéril-heces se ponen en un frasco de vidrio (evitando ensuciar las paredes), se cierra herméticamente.
5. El frasco se coloca en la estufa a 27°C, diariamente se humedece con agua común y se destapa una hora durante 8 días.
6. A los 8 días se procede a colocar en el aparato de Baermann.

### 3. Técnica de coprocultivo en frasco (\*)

#### MATERIAL

1. Mortero, pistilo.
2. Frasco de vidrio con una boca de 1 1/2 pulgada y de 2 1/2 pulgadas de altura con tapa (frasco de Gerber).
3. Cucharas de aluminio.
4. Nistatina ("Micostatin") en polvo.
5. Gotero o pipeta pasteur.

#### DESARROLLO DE LA TECNICA.

1. Pesar 10 g. de heces.
2. Homogeneizar las heces con agua común.
3. El homogeneizado se coloca en el fondo del frasco (evitando ensuciar las paredes).
4. Espolvorear en la superficie de las heces, una pequeña capa de Micostatin (única vez).

(\*) Técnica elaborada en el Departamento de Parasitología del I.N.I.P.

5. Tapar el frasco, sin cerrar herméticamente, se deja a temperatura ambiente 12 días, diariamente se humedece con agua común y se destapa una hora.
  6. A los 12 días, con la pipeta conteniendo agua simple, inclinar el frasco del cultivo y sobre una de las paredes de éste deslizar unas gotas de agua común (lo equivalente a 1/2 gotero).
  7. Teniendo así inclinado el frasco del cultivo, hacerlo girar lentamente, de manera que el agua que se depositó bañe toda la pared del frasco. (Girar el frasco 2 ó 3 veces).
  8. Realizar la lectura 3 días consecutivos.
4. Técnica de coprocultivo en caja de Petri (9).

#### MATERIAL.

1. Mortero, pistillo.
2. Papel filtro.
3. Cucharas de aluminio.
4. Caja de Petri de 15 cm de diámetro con tapa.
5. Estufa.

#### DESARROLLO DE LA TECNICA.

1. Pesar 20 g. de heces.
2. Homogeneizar las heces con agua común.
3. Colocar el papel filtro en la caja de Petri, se humedece con agua común y se pone el homogeneizado sobre la superficie del papel, extendiéndolo perfectamente y se tapa la caja de Petri.
4. Colocar en la estufa a 27°C, se humedece con agua común y se destapa diariamente una hora durante 8 días.
5. A los 8 días se procede a colocar en el aparato de Baermann.

5. Técnica de las heces estériles. (13).

MATERIAL.

1. Mortero, pistílo.
2. Heces estériles.
3. Cucharas de aluminio.
4. Charola de plástico.
5. Frasco de vidrio con una boca de 2 a 2 1/2 pulgadas y de 6 1/2 pulgadas de altura con tapa.
6. Estufa.
7. Autoclave.

DESARROLLO DE LA TECNICA.

1. Pesar 20 g. de heces.
  2. Homogeneizar las heces con agua común.
  3. El homogeneizado se coloca en una charola de plástico y se mezcla con las heces estériles (20 g).
  4. Poner en un frasco de vidrio (evitando ensuciar las paredes) y se cierra herméticamente.
  5. Colocar en la estufa a 27°C, se humedece y se destapa diariamente una hora durante 8 días.
  6. A los 8 días se procede a colocar en el aparato de Baermann.
6. Técnica de Corticelli (12).

MATERIAL.

1. Mortero, pistílo.
2. Agua destilada.
3. Cucharas de aluminio.

4. Caja de Petri de 10 cm. de diámetro.
5. Caja de Petri de 15 cm. de diámetro con tapa.
6. Estufa.

#### DESARROLLO DE LA TECNICA

1. Pesar 20 g. de heces.
2. Homogeneizar las heces con agua destilada.
3. El homogeneizado se coloca en la caja de Petri de 10 cm. extendiéndolo perfectamente.
4. La caja pequeña con el contenido se pone en la caja de 15 cm. a la cual se le agrega agua destilada (aproximadamente 20 a 25 ml.) y se tapa.
5. Colocar en la estufa a 27°C, se humedece con agua destilada y se destapa diariamente una hora durante 8 días.
6. Colocar el líquido en un vaso de precipitado para el conteo de larvas.

#### Conteo de Larvas.

Se utilizará una pipeta volumétrica digital, en el presente estudio usamos la marca Eppendorf modelo 4710, calibrada a 5 microlitros, de la cual se tomarán 5 muestras alícuotas de un volumen conocido, para tener 25 repeticiones de cada muestra, a las cuales se les tomará lectura en el Microscópio Estereoscópico, en cada una de las lecturas se limpiará la pipeta y se homogeneizará el contenido mediante una varilla de vidrio.

Para saber el número de larvas existentes por mililitro, el total de larvas de la muestra se multiplicara por 1000 (el equivalente de microlitros en un mililitro) y se divide entre 125 (total de microlitros con las que se trabajo en cada muestra).

Los resultados obtenidos se analizarán estadísticamente por los métodos del análisis de varianza por bloques (Wayne, 1980) (17) y el método de Tukey (Hurley, Aguilar, Garibay y Landeros, 1981) (7).

### III. RESULTADOS Y DISCUSION.

Se realizaron 6 técnicas de coprocultivo, las cuales se elaboraron de acuerdo a la metodología indicada por cada autor, en el cuadro 1 se indica la cantidad de larvas existentes por mililitro.

CUADRO 1

VALORACION DE SEIS TECNICAS DE COPROCULTIVO PARA Haemonchus contortus

CANTIDADES DE LARVAS POR MILILITRO OBTENIDAS DE LOS COPROCULTIVOS

NUMERO DE MUESTRA	T E C N I C A S					
	HULE ESPUMA	SERRIN ESTERIL	COPROCULTIVO EN FRASCO	COPROCULTIVO EN CAJA DE PETRI	HECES ESTERILES	CORTICELLI
1	4408	2642	2224	1656	864	344
2	2376	2000	1688	976	752	448
3	3024	1024	1472	672	456	248
4	3336	2864	2688	588	456	224
5	3656	2440	1936	464	432	192
X	3360	2190.4	2001.6	871.2	592	291.2
*	A	A	A	B	B	B

Análisis de varianza por bloques:

\* Diferentes literales indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ ).

Técnica del hule espuma con una media de 3360 larvas por mililitro, presentando la mayor media sobre las demás técnicas, no existe diferencia estadística de ( $P < 0.05$ ) con la prueba del serrín estéril, pero si tiene diferencia con respecto a las demás técnicas.

Alf, 1980) (2). Reporta tener buenos resultados trabajando en una proporción de 1 de heces por 4 de hule espuma (en relación a volumen), no menciona que haya un limite de heces con las que se pueda trabajar, es por lo que ésta técnica se recomienda para obtener grandes cantidades de larvas, es una técnica económica, puesto que es elaborada a temperatura ambiente y el material utilizado es de fácil adquisición y no costoso, requiriendose de 15 días para su realización.

Técnica del serrín estéril. Con una media de 2190.4 larvas por mililitro, si existe diferencia estadística de ( $P < 0.05$ ) con las técnicas de coprocultivo en caja de Petri, heces estériles y Corticelli, siendo ésta técnica la segunda en efectividad pero resulta ser costosa, ya que requieren de un material de laboratorio más completo, como lo es una autoclave, que no facilmente se dispone de ella. La realización de esta técnica, requiere solamente de 8 días. (Abdel Gaward, 1974) (1), hace una modificación a la técnica de O'Sullivan and Roberts notificando hacer una proporción de 2/3 partes más de serrín que de heces (en relación al volumen). Siendo recomendable ésta técnica cuando se cuente con el material necesario y se requiera de un menor tiempo para la obtención de los resultados.

Técnica de Coprocultivo en frasco. Con una media de 2001.6 larvas por mililitro, sí existe diferencia estadística de ( $P < 0.05$ ) con las técnicas de heces estériles y Corticelli.

Técnica con la que se trabaja con 10 g. de heces (como se reporta) puesto que un exceso de heces impide la oxigenación de los huevos que se encuentran en el fondo del frasco, lo que no permite la eclosión de éstos. Es económica y práctica puesto que fácilmente se pueden adquirir frascos de Gerber y se elabora a medio ambiente sin ningún problema, pero se recomienda solamente para la identificación de larvas, ya que no se puede trabajar con grandes cantidades de heces, se requiere de 12 días, además de que se le tienen que efectuar 3 lecturas, siendo así la técnica que requiere más días para la obtención de resultados.

Técnica de coprocultivo en caja de Petri. Con una media de 871.2 larvas por mililitro observándose que a partir de ésta técnica hay una baja considerable en el número de larvas, no existe diferencia estadística de ( $P < 0.05$ ) con la técnica de las heces estériles y la técnica de Corticelli, existen pocos trabajos reportados en la literatura. Utilizando ésta técnica, el autor realiza una variante a la técnica de Harada-Mori la cual es reportada por Canese, A. (1976) (4), trabajando 214 cultivos de heces para identificar larvas de Strongyloides y Necator.

Resulta ser una técnica práctica para la identificación de larvas, mas no de concentración.

Técnica de heces estériles. Con una media de 592 larvas por mililitro, es una técnica costosa y requiere de mayor cuidado en su elaboración.

Niec R., Maranguinich, L. (1973) (11). Realizan una comparación de métodos para cultivo y recuperación de larvas de nemátodos gastrointestinales en la que se menciona que la técnica de Corticelli-Lai, tiene el doble de eficacia sobre



la técnica de heces estériles, observándose que en este trabajo los resultados fueron diferentes, pudiéndose pensar que la variante es de tipo ambiental, y que esto sucede cuando se saca el cultivo a oxigenar y humedecer.

Borgsteede, F.H., Hendriks, J. (1974) (3). Mencionan que las variaciones en los métodos de cultivos probablemente resultan en diferentes producciones de larvas.

Técnica de Corticelli-Laf. Con una media de 291.2 larvas por mililitro, en el presente estudio registro el menor número de larvas, pero a diferencia de las demás técnicas, las larvas que se obtienen salen totalmente limpias, ya que no requiere de la técnica de Baermann, es una técnica práctica, en la cuál se observó que al siguiente día de su elaboración ya hay presencia de larvas, además de que puede ser utilizada a temperatura ambiente durante diez días, (de acuerdo al autor) lo que reduce el costo en su elaboración, siendo recomendada para la rápida identificación del parásito y para obtener larvas infectantes (L<sub>3</sub>) totalmente libres de materia orgánica.

Theodorides (1964) (14), menciona un método simple para el cultivo y recuperación de larvas de nemátodos intestinales de borregos, donde una gran cantidad de larvas son obtenidas prácticamente libres de material extraño, la cual presenta similitud con la técnica de Corticelli en presentar larvas libres de material extraño.

Se han elaborado otro tipo de trabajos como por ejemplo Ciordia, Bizzell y Dixon (1966) (6), reportan el efecto de temperatura y edad en el cultivo en la larva infectante de Trichostrongylus axei y T. culubriiformis en cuyes, donde combinan 1 g. de musgo Shagnum por 32 g. de heces a temperaturas de 10,25 y

32°C y con las cuales tienen diferencias significativas.

#### IV. CONCLUSIONES.

Se demostró que la técnica del hule espuma es la mejor ya que cumplió con los objetivos, dar el mayor número de las larvas, ser económica y práctica.

La técnica de Corticelli y Lai a diferencia de las demás técnicas, presenta la ventaja de proporcionar larvas libres de materia orgánica, e incluso se observó la presencia de larvas al siguiente día de su elaboración, y junto con la técnica de coprocultivo en frasco no se requiere usar la técnica de Baermann.

V BIBLIOGRAFIA.

1. Abdel-Gawad, A. F., (1974). Differential Diagnosis of Gastro-Intestinal Strongylosis of sheep in Egypt, Through the free living third stage larvae. Journal of the Egyptian Veterinary medical Association. 34. 212-226.
2. Ali, Y.O., (1980). The Identification of the infective larvae of some Nematode Parasites of cattle by the fecal culture method Department of Pathology, Colorado State. University; Fort Collins, Colorado 80523 Fall.
3. Borgsteede, F.H.M. and Hendriks. J., (1974). Identification of infective larvae of Gastrointestinal nematodes in cattle. Tijdschr Diergenees 99: No. 2, 103-113.
4. Canese A., (1976). Hallazgos en 214 Cultivos de heces con el método de Harada Mori en el área de Asunción. Revista Paraguaya de Microbiología 11(1) 30.
5. Cauthen G. E., (1940). A method of culturing larg numbers of Haemonchus contortus larvae from eggs in cattle feces. Proceeding of the Helminthological Society Wash. 7: 82-83.
6. Ciordia H., Bizzell W., Porter D. y Dixon C.F., (1966). The efect of culture temperature and age on the infectivity of the larvae of Trichostrongylus axei and T. colubriformis in rabbits and Guinea pigs. The Journal of Parasitology. Vol. 52: N° 5, pág. 866-870.
7. Hurley D.P.D., Aguilar M.A., Garibay B. J., Landeros V. J., (1981). Técnicas de diseño experimental F.E.S.C.-U.N.A.M. pág. 37-53.
8. Keith R. K., (1953). The differentiation of the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. Aust. J. Zool. 1(2): 223-235.

9. Morales C. G. y Arellis P.L., (1977). Manual de diagnóstico helmintológico en rumiantes F.C.V. de la Universidad Central de Venezuela. pág. 18-37.
10. Nemeseri L. y Holló., (1961). Diagnóstico Parasitológico Veterinario. Editorial Acribia. Vol. 2. págs. 26-47.
11. Niec, R., Marangunich, L. (1973). Comparación de métodos para cultivo y recuperación de larvas de nemátodos gastrointestinales. Revista de Investigaciones Agropecuarias, Serie 4, Patología Animal. 10(3) 79-91.
12. Niec. R. (1968). Cultivo e identificación de larvas infectantes de nemátodos gastrointestinales del bovino y ovino. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria pág. 9-12.
13. O'Sullivan P. J. y F.H. Roberts, (1949). Methods for egg counts and larval cultures for Strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. Austr. Journal Agric. Res. 99-102.
14. Theodorides V.J. (1964). A simple method for the culture and recovery of larvae of intestinal nematodes of sheep. Vet. : 76; 12, 353.
15. Thienpont D., Rochette F. y Vanparijs O. F. J., (1979). Diagnosing Helminthiasis through coprological examination pág. 38-46.
16. Villaseñor, M. L., (1973). Diagnóstico de nemátodos gastrointestinales. Seminario de Parasitología Veterinaria y Dirección General de Sanidad Animal, Secretaría de Agricultura y Ganadería. 17-34.
17. Wayne W. Daniel., (1980). Bioestadística, Bases para el Análisis de las ciencias de la salud. pág. 193-241.